

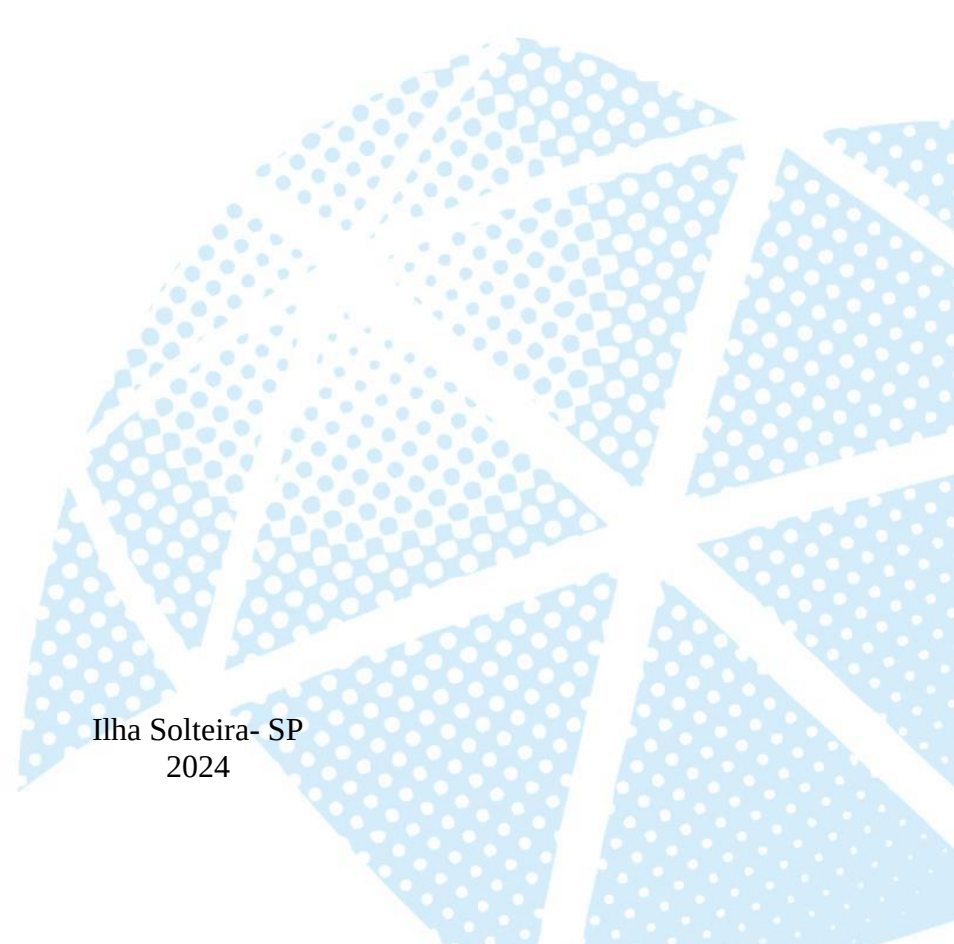
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

YASMIN SANTOS DOS REIS

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DO HÍBRIDO
PROVENIENTE DO CRUZAMENTO INTERESPECÍFICO ENTRE**

Leiarius marmoratus (♀) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (♂)

Ilha Solteira- SP
2024



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL

YASMIN SANTOS DOS REIS

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DO HÍBRIDO
PROVENIENTE DO CRUZAMENTO INTERESPECÍFICO ENTRE
Leiarius marmoratus (♀) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (♂)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira como parte das exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pelo Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

R375a Reis, Yasmin Santos dos.
Análise estrutural e ultraestrutural do desenvolvimento embrionário e larval do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre *Leiarius marmoratus* (♀) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (♂) / Yasmin Santos dos Reis. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
62 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Ciências, 2024

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

Inclui bibliografia

1. Embriões. 2. Oócitos. 3. Larvas. 4. Siluriformes. 5. Embriogênese.

IMPACTO POTÊNCIAL DA PESQUISA

Este trabalho tem grande impacto potencial, pois é importante para a sociedade, pois estudos referentes ao desenvolvimento embrionário e larval de peixes, permitem que sejam analisadas formas de reprodução em cativeiro para manuseio de espécies nativas e recuperação de estoques naturais em meio as alterações dos ecossistemas, permitindo a disponibilidade de alimento para o consumo da sociedade, além disso, serve como base para outros estudos associados à estas espécies.

POTENTIAL IMPACT OF RESEARCH

This work has a great potential impact, as it is important for society, as studies relating to the embryonic and larval development of fish allow for the analysis of forms of reproduction in captivity for the handling of native species and the recovery of natural stocks amid changes in ecosystems. , allowing the availability of food for society's consumption, in addition, it serves as a basis for other studies associated with these species.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise estrutural e ultraestrutural do desenvolvimento embrionário e larval do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *Leiarius marmoratus* e macho *Pseudoplatystoma reticulatum*

AUTORA: YASMIN SANTOS DOS REIS

ORIENTADOR: ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA**
Data: 23/02/2024 16:30:00-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA (Participação Presencial)

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Documento assinado digitalmente
 **MARIA AUXILIADORA PANTOJA FERREIRA**
Data: 23/02/2024 22:03:25-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. MARIA AUXILIADORA PANTOJA FERREIRA (Participação Virtual) Instituto de Ciências Biológicas - ICBIO / Universidade Federal do Pará - UFPA

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO MATTOS PEDREIRA**
Data: 24/02/2024 20:44:39-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO MATTOS PEDREIRA (Participação Virtual) Departamento de Zootecnia / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Ilha Solteira, 23 de fevereiro de 2024

Faculdade de Engenharia - Câmpus de Ilha Solteira -

Brasil, 56, 15385000, Ilha Solteira - São Paulo

Dedicatória

Aos meus pais Nilza e Ademir que sempre estiveram ao meu lado me dando muito apoio, por nunca me deixarem desistir, pelas orações e carinho, se eu cheguei aqui hoje foi graças a vocês, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força que tem me dado.

Ao meu orientador Professor Dr. Alexandre Ninhaus Silveira por ter aceito me orientar, por todo aprendizado, paciência e auxílio durante este período.

Aos meus pais Nilza e Ademir, ao meu irmão Vinícius, à minha avó Mercedes e a todos os meus familiares que me apoiaram, que acreditaram em mim e me ajudaram nos momentos difíceis e felizes e principalmente por todas as orações.

Agradeço a todo o pessoal que faz parte do L.I.Neo pelo acolhimento, carinho, apoio e auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa, e principalmente pela amizade, em especial à Luana, Stella, Lorena, Laicia, Giovana, Lais, Patricia e Luciane.

Também agradeço ao Eder Momesso Junior por todo apoio, auxílio e incentivo durante este tempo.

Agradeço em especial, à Piscicultura Piraí por me permitir realizar as coletas e por todo auxílio prestado.

À UNESP de Ilha Solteira pela oportunidade de fazer parte deste Programa de Mestrado e por toda estrutura oferecida. Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em especial à Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira, à Dra. Claudia Maria Bertan e em especial a Edna Lorenzon por todo auxílio prestado.

À banca, por terem aceito participar e contribuir com o meu trabalho na qualificação: Matheus Ferreira dos Santos, Giovana Souza Branco e Patricia Postingel Quirino, muito obrigada! À Dra. Maria Auxiliadora Pantoja, ao Dr. Marcelo Mattos Pedreira, ao Dr. Igor Paiva Ramos e à Luciana Ganeco por terem aceito participar da minha banca de defesa e pelas contribuições.

À FAPESP e à CNPQ pelo apoio financeiro e à PROPG pela bolsa Jovens Talentos concedida durante este período, meus sinceros agradecimentos a PROPG pela oportunidade.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar o desenvolvimento embrionário e larval dos híbridos provenientes do cruzamento interespecífico entre a fêmea de *Leiarius marmoratus* (jundiá) com macho de *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Para a obtenção dos embriões e das larvas, foi feita a indução hormonal dos reprodutores utilizando solução de extrato bruto de hipófise de carpa (*Cyprinus carpio*). A fertilização dos oócitos foi realizada seguindo o método “a seco” e, logo após, os ovos foram dispostos em incubadoras do tipo vertical com circulação de água constante. As coletas dos embriões foram realizadas da seguinte forma: seu início foi logo após a fertilização, após, em intervalos de 15 minutos durante as duas primeiras horas e, depois a cada hora até que ocorresse a eclosão das larvas. Após a eclosão, a coleta foi realizada de 6 em 6 horas nos primeiros dois dias e, a seguir, em intervalos de 12 horas até o quinto dia. O período de desenvolvimento dos embriões, desde o momento de fertilização até a eclosão das larvas à temperatura de 27,98°C, foi de 13 horas, sendo definido para a embriogênese do híbrido os seguintes estágios embrionários: zigoto, clivagem, gástrula, organogênese e eclosão. Desse modo, foi possível concluir que o desenvolvimento embrionário deste híbrido ocorre em um período semelhante ao de seus parentais *L. marmoratus* e *P. reticulatum* assim como para o híbrido inverso, proveniente das fêmeas de *P. reticulatum* com machos de *L. marmoratus*.

Palavras-chave: embriões; oócitos; larvas; siluriformes; embriogênese.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the embryonic and larval development of hybrids resulting from the interspecific crossing between the female of *Leiarius marmoratus* (jundiá) and the male of *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) using light microscopy and scanning electron microscopy. To obtain the embryos and larvae, hormonal induction of the reproductives was carried out using a solution of crude carp pituitary extract (*Cyprinus carpio*). Fertilization of the oocytes was carried out using the “dry” method and, soon after, the eggs were placed in vertical incubators with constant water circulation. Embryo collection was carried out as follows: it began immediately after fertilization, then at intervals of 15 minutes during the first two hours and then every hour until the larvae hatched. After hatching, collection was carried out every 6 hours on the first two days and then at 12-hour intervals until the fifth day. The development period of the embryos, from the moment of fertilization until the hatching of the larvae at a temperature of 27.98°C, was 13 hours, with the following embryonic stages being defined for the embryogenesis of the hybrid: zygote, cleavage, gastrula, organogenesis and hatching. Thus, it was possible to conclude that the embryonic development of this hybrid occurs in a period similar to that of its parents *L. marmoratus* and *P. reticulatum* as well as for the inverse hybrid, originating from *P. reticulatum* females with *L. marmoratus* males.

Keywords: embryos; oocytes; larvae; siluriformes; embryogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies estudadas.....	20
Figura 2 - Local da coleta.....	21
Figura 3 - Indução hormonal dos parentais e incubação.....	22
Figura 4 - Processamento das amostras para a Microscopia Eletrônica de Varredura	24
Figura 5 - Esquema do processo de clivagem com vista superior.....	27
Figura 6 - Estágios de desenvolvimento embrionário do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> ..	29
Figura 7 - Histologia do desenvolvimento embrionário do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> ..	30
Figura 8 - Histologia do embrião do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i>	31
Figura 9 - Histologia dos embriões híbridos de jundiarias.....	32
Figura 10 - Estágio de organogênese.....	34
Figura 11 - Embrião de híbrido em estágio de organogênese com 11 horas de desenvolvimento.....	35
Figura 12 - Estágio de organogênese 12 horas após a fertilização.....	36
Figura 13 - Larva eclodida do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i>	37
Figura 14 - larva híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 12 horas após a eclosão.....	38
Figura 15 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 24 horas após a eclosão.....	39
Figura 16 - Histologia do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 24 horas após a eclosão.....	40
Figura 17 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 30 horas após a eclosão.....	40
Figura 18 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 30 horas após a eclosão.....	41
Figura 19 - Larva “in toto” do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 36 horas após a eclosão.....	42
Figura 20 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 60 horas após a eclosão.....	43
Figura 21 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 60 horas após a eclosão.....	44
Figura 22 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 72 horas após a eclosão.....	45
Figura 23 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 72 horas após a eclosão.....	46
Figura 24 - Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 84 horas após a eclosão.....	47

Figura 25 · Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 96 horas após a eclosão.....	48
Figura 26 · Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 120 horas após a eclosão.....	49
Figura 27 · Larva do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de <i>L. marmoratus</i> com macho de <i>P. reticulatum</i> 108 horas após a eclosão.....	50
Figura 28 · Histologia da larva 120 horas após a eclosão (5º dia de desenvolvimento)....	47
Figura 29 · Médias das alturas das cabeças das larvas proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>L. marmoratus</i> com machos de <i>P. reticulatum</i>	52
Figura 30 · Médias dos diâmetros dos olhos das larvas proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>L. marmoratus</i> com machos de <i>P. reticulatum</i>	53
Figura 31 · Médias das alturas dos olhos das larvas proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>L. marmoratus</i> com machos de <i>P. reticulatum</i>	53
Figura 32 · Médias dos comprimentos das larvas proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>L. marmoratus</i> com machos de <i>P. reticulatum</i>	54
Figura 33 · Malformações no desenvolvimento ontogenético dos embriões e larvas dos híbridos provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>L. marmoratus</i> com machos <i>P. reticulatum</i>	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Piscicultura e produção de espécimes híbridos.....	15
1.2	Embriogênese em peixes.....	14
1.3	Ontogênese larval.....	17
1.4	Classificação das espécies em estudo.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
2.3	Hipótese.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Espécies estudadas e local da coleta.....	20
3.2	Obtenção dos embriões.....	21
3.3	Método de coleta.....	22
3.4	Processamento do material para análise.....	23
3.5	Análise em Microscopia de Luz.....	23
3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	23
3.7	Medições morfométricas.....	24
4	RESULTADOS.....	25
4.1	Embriogênese das amostras “<i>in toto</i>”	25
4.2	Zigoto (0 - 0,25h)	26
4.3	Estágio de Clivagem (0,25h - 3h)	26
4.4	Estágio de Gástrula (3h- 5h)	28
4.5	Estágio de Organogênese (6h a 9h)	33
4.6	Eclosão das larvas (13 horas)	37
4.6.1	12 horas após a eclosão da larva.....	37
4.6.2	24h após a eclosão.....	39
4.6.3	30h após a eclosão.....	40
4.6.4	36h após a eclosão.....	42
4.6.5	60h após eclosão.....	42
4.6.6	72 horas após a eclosão.....	45
4.6.7	84 horas após a eclosão.....	46
4.6.8	96 horas após a eclosão.....	48

4.6.9	108 horas após a eclosão das larvas.....	48
4.6.10	120 horas após a eclosão.....	49
4.7	Gráficos das medições dos embriões e larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>Leiarius marmoratus</i> com machos <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>.....	51
4.8	Embriões e larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de <i>L. marmoratus</i> com machos de <i>P. reticulatum</i> com desenvolvimentos anormais.....	54
5	DISCUSSÃO.....	56
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Piscicultura e produção de espécimes híbridos

A aquicultura é um ramo vital da agropecuária que está em constante crescimento global. Com o crescimento populacional observa-se o aumento do consumo de peixes, principalmente quando comparado com o consumo de outros animais, seja por motivos pessoais, culturais ou até mesmo de saúde e, conseqüentemente, essa tendência tem levado ao crescimento da produção de peixes em cativeiro (Webster; Lim, 2002).

Os setores da pesca e da aquicultura em conjunto, têm sido reconhecidos por sua colaboração para a segurança alimentar e nutricional global no século XXI. A produção total da pesca e da aquicultura, aumentou de forma significativa nas últimas sete décadas, passando de 19 milhões de toneladas (peso vivo equivalente) em 1950, para um recorde histórico de cerca de 179 milhões de toneladas em 2018, com uma taxa de crescimento anual de 3,3% (FAO, 2022).

A Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) é uma agência técnica da ONU, fundada com o objetivo de lutar contra a fome e a pobreza e que disponibiliza dados referente ao consumo de pescado no mundo, demonstrando em seu relatório que a aquicultura já comprovou seu papel essencial na segurança alimentar mundial, tendo sua produção elevada de cerca de 7,5% ao ano desde 1970. O peixe e os derivados deste, são reconhecidos como um dos alimentos mais saudáveis do mundo. Além do que, a piscicultura e os produtos da pesca estão dentro do rol de atividades produtivas consideradas menos impactantes ao ambiente natural (FAO, 2020).

Os peixes são uma fonte de ácidos graxos ômega-3 essenciais, além disso são ricos em vitaminas, minerais e proteínas de alta qualidade (FAO, 2022). A criação de peixes nativos tem crescido na aquicultura nacional, destacando-se a produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*), do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e dos surubins, como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum* e *Pseudoplatystoma reticulatum*) e os jundiás, *Leiarius marmoratus* (Boscolo et al., 2011; PEIXE, 2020).

Entretanto, devido à escassez de informações biológicas sobre as espécies de peixes nativos com importância zootécnica e a falta de pacotes biotecnológicos de produção de espécies brasileiras de peixes e/ou espécimes melhorados geneticamente, a forma mais usual de se obter material genético mais produtivo tem sido a produção de híbridos de peixes, com a

combinação genética entre diferentes espécies, com o intuito de produção de descendentes mais resistentes as intempéries climáticas, incubação e larvicultura mais efetiva e, muitas vezes, maior crescimento quando comparada aos parentais (Beerli; Logato; Freitas, 2004; Hilsdorf; Orfão, 2011; Costa *et al.*, 2014).

Um dos primeiros híbridos produzidos no Brasil foi o tambacu, proveniente do cruzamento da fêmea de *Colossoma macropomum* com o macho de *Pseudoplatystoma mesopotamicus*, daí por diante, muitos outros tem sido produzidos, como: tambatinga (*Colossoma macropomum* ♀ x *Piaractus brachypomus* ♂), o pintado-da-amazônia (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *Leiarius marmoratus* ♂), os quais apresentam características zootécnicas superiores, como crescimento rápido e resistência ao manejo (Kubitza; Ono; Campos, 2007; Hilsdorf; Orfão, 2011; Almeida, 2014).

A preferência pelos piscicultores é pela produção de híbridos de “catfishes”, como provenientes do cruzamento da fêmea de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀) com o macho do jundiá-onça (*Leiarius marmoratus* ♂). Essa escolha acontece pelos seguintes fatores técnicos, maior eficiência na incubação dos embriões e larvas, maior crescimento e, seu bom valor de mercado, sendo que a produção deste híbrido tem crescido nos últimos anos (Valenti *et al.*, 2021).

Dentre os sistemas mais utilizados na produção de surubins e seus híbridos, os viveiros escavados em sistemas semi-intensivos ou intensivos de produção tem se destacado (Araújo, *et al.*, 2021). Considerando que o escape de peixes cultivados em viveiros escavados ou em tanques-rede é um acontecimento comum, que os espécimes híbridos já estão dispersos nos corpos d'água naturais e que, contrariando a definição biológica, muitos destes podem ser férteis. Ainda não há informações sobre potencial interação reprodutiva entre os híbridos com as espécies parentais (Alves *et al.*, 2014).

Devido à ausência destas informações, ainda é difícil aferir os efeitos da hibridização de espécies de peixes nativos do ponto de vista ecológico, pois os estudos referentes ao sucesso ecológico destes peixes híbridos nos corpos d'água, ainda são iniciais no Brasil (Alves *et al.*, 2014; Arantes; Santos; Bazzoli, 2017).

1.2. Embriogênese nos peixes

O conhecimento do desenvolvimento embrionário das distintas espécies de peixes abre possibilidades para estudos referentes ao manejo dos estoques pesqueiros proporcionando um maior conhecimento referente a biologia dessas espécies. A embriologia também abre

oportunidades para estudos das relações evolutivas, da hereditariedade, dos mecanismos de desenvolvimento e das influências ambientais nas características estruturais dos organismos (Lagler, 1959 *apud* Ninhaus-Silveira; Foresti; Azevedo, 2006).

Também é imprescindível para que possa ser desenvolvida técnicas para sua preservação “*ex situ*”, como a criopreservação de embriões que traria enormes benefícios para a conservação dos ecossistemas aquáticos e para a humanidade, através da possibilidade de aumento da produção de alimentos (Ninhaus-Silveira; Foresti; Azevedo, 2006). Além disso, a compreensão dos aspectos embrionários das espécies é de extrema importância para a sua ecologia e conservação (Weber *et al.*, 2023).

Com relação ao grande número de espécies nativas de água doce brasileiras (existem cerca de 2587 espécies segundo o Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (2007), pouco se conhece acerca da biologia reprodutiva da maioria delas, muito menos sobre aspectos do seu desenvolvimento embrionário. Dentre as espécies neotropicais que apresentam estudos de embriogênese destacam-se: *Rhamdia hilarii* (Narahara *et al.*, 1988), *Brycon cephalus* (Romagosa; Narahara; Fenerich-Verani, 2001; Alexandre *et al.*, 2010), *Leporinus obtusidens* (Sampaio, 2006), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira; Foresti; Azevedo, 2006), *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum* (Faustino *et al.*, 2007), *Brycon orbignyanus* (Gomes *et al.*, 2007), *Salminus brasiliensis* (Della-Flora *et al.*, 2010), *Pimelodus maculatus* (Buzollo *et al.*, 2011), *Brycon insignis* (Isaú *et al.*, 2011), *Prochilodus argenteus* (Ribeiro *et al.*, 2011), *Colossoma macropomum* (Leite *et al.*, 2013), *Astyanax altiparanae* (Pereira-Santos *et al.*, 2017) e *Leiarius marmoratus* (Oliveira-Almeida *et al.*, 2014).

Os estudos da embriogênese de peixes são complexos e devem ser elucidados detalhadamente e observando vários aspectos que envolvem desde o tipo dos gametas, o desenvolvimento das organelas e partes do corpo do embrião, quantidade de vitelo. Em especial quando se remete a espécies de peixes neotropicais nativas, das quais pouco se conhece de sua capacidade reprodutiva e da sua ontogenia inicial.

As informações obtidas nas pesquisas quanto a ontogenia das espécies de peixes nativos, são fundamentais, pois servem como base para gestão de recursos pesqueiros, estudos de manutenção e ou reposição dos estoques naturais das espécies de peixes, visando a preservação dos ecossistemas aquáticos. Todas essas informações são conhecimentos importantes para a identificação de bioindicadores ambientais, que auxiliarão na avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática. Como também, geram informações para a melhoria e efetividade do processo de reprodução de peixes em cativeiro e, são dados fundamentais para

desenvolvimento de biotecnologias que são importantes para a piscicultura (Botero *et al.*, 2004; Ninhaus-Silveira; Foresti; Azevedo, 2006; Marques *et al.*, 2008).

1.3 Ontogênese larval

As larvas de peixes são morfológicamente muito diferentes dos adultos, pois ainda necessitam da finalização de sua formação ontogenética na maioria das espécies, apresentam exigências ecológicas distintas dos adultos, com particularidades quanto ao habitat, alimentação e comportamento (Leis; Trnski, 1989 *apud* Oliveira *et al.*, 2012). Além disso, a grande semelhança entre larvas de espécies distintas e a escassez de informações sobre ictioplâncton de espécies nativas de água doce e uma literatura comparativa, dificultam muito os trabalhos dos taxonomistas (Sanches *et al.*, 2001; Coelho, 2021).

Estudos sobre larvas de peixes são necessários na compreensão do papel biológico dos caracteres larvais para a sobrevivência, principalmente de mecanismos funcionais relacionados a requerimentos vitais, como locomoção, alimentação e respiração (Paes, 2008). Apesar da hibridação entre espécies de peixes nativos ser muito utilizada, ainda são escassos os estudos especializados referentes a sua ontogenia inicial e larval e de sua biologia reprodutiva (Oliveira-Almeida *et al.*, 2014; Coelho, 2021).

O conhecimento da biologia das espécies, principalmente sobre seus aspectos reprodutivos, é essencial quando se deseja realizar a criação intensiva de peixes. Existem diversos fatores que atuam juntos para ter uma eficiência reprodutiva e que produza um número elevado de larvas sadias, dentre eles estão: cuidado com a realização do manejo e da manutenção dos reprodutores no período pré-reprodução até cuidados com os ovos no período pós-fertilização até as fases larvais. Alguns peixes no Brasil são conhecidos por peixes piracema, ou seja, peixes que migram em distâncias longas para se reproduzirem, sendo que algumas espécies nadam mais de dois mil quilômetros para chegarem até as nascentes e isso pode afetar sua fisiologia reprodutiva, além de desencadear mudanças hormonais essenciais para o preparo da reprodução (Andrade *et al.*, 2015).

1.4 Classificação das espécies em estudo

a) Ordem

As espécies que fazem parte deste estudo são pertencentes da ordem Siluriforme, que são peixes denominados de peixes-de-couro e internacionalmente de “*catfish*”, que possuem

como características a ausência de escamas pelo corpo, revestido por pele espessa ou coberto, totalmente ou parcialmente por placas ósseas (Lundstedt, 2003).

Nesta ordem encontra-se os grandes bagres da família Pimelodidae que são conhecidos pelo seu comportamento migratório realizado a longa distância em rios como Amazonas, Paraguai, Paraná e Orinoco (Arantes; Santos; Bazzoli, 2017). Em destaque estão as espécies *Leiarius marmoratus* e *Pseudoplatystoma reticulatum*.

b) Família e Espécies

Leiarius marmoratus (Gill, 1870), conhecido também como jundiá, jandiá ou jundiá-onça, pertence à família Pimelodidae, é um peixe de porte grande, com cerca de até 50 cm, possui nadadeira dorsal larga, com 9 a 10 raios ramificados, tem padrão de coloração constituído por manchas pretas sobre um fundo marrom claro, ocorrendo com maior frequência em ambientes lóticos (Santos; Ferreira; Zuanon, 2006), se distribuindo nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco na América do Sul: (Fishbase, 2022a).

Pseudoplatystoma reticulatum, peixe conhecido como surubim ou cachara, também faz parte da família Pimelodidae e pertence ao gênero *Pseudoplatystoma* (Linnaeus, 1766). É encontrado em água doce, é demersal, e apresenta-se distribuído pela América do Sul: Amazônia Central e Rio Paraná na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Fishbase, 2022b).

Dentre os diversos métodos reprodutivos que existem entre os peixes, as espécies do gênero *Pseudoplatystoma* possuem fecundidade elevada, desova total e período curto de reprodução. A desova ocorre na cabeceira dos rios, na época das chuvas, ocasião em que os rios estão cheios com águas correntes, turbulentas e oxigenadas, propícias ao desenvolvimento larval e que possibilitam o transporte dos ovos e larvas rio abaixo (Resende *et al.*, 1995).

Visto que informações sobre a biologia reprodutiva dos peixes híbridos provenientes de espécies neotropicais nativas são praticamente inexistentes e que a exploração em grande escala destes animais pode levar a impactos ambientais (Faustino *et al.*, 2007). Este estudo objetiva produzir dados sobre a ontogênese inicial do híbrido produzido pelo cruzamento de duas espécies de siluriformes de grande importância econômica *Leiarius marmoratus* ♀ e *Pseudoplatystoma reticulatum* ♂, híbrido este popularmente denominado de jundiara.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o desenvolvimento embrionário e larval do híbrido obtido por meio do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *Leiarius marmoratus* com machos de *Pseudoplatystoma reticulatum*.

2.2 Específicos

1) Identificar e analisar os eventos morfológicos que ocorrem durante a embriogênese do híbrido obtido por meio do cruzamento entre fêmeas de *L. marmoratus* (jundiá onça) e machos de *P. reticulatum* (cachara).

2) Descrever morfo-temporalmente as modificações estruturais durante a ontogenia larval do jundiá até o 5º dia após a eclosão.

2.3 Hipótese

O período e o desenvolvimento morfológico durante a embriogênese do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *Leiarius marmoratus* com machos de *Pseudoplatystoma reticulatum* é semelhante à dos seus parentais?

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies estudadas e local de coleta

Para a obtenção dos embriões e das larvas foi realizada a seleção das fêmeas e dos machos para a reprodução. Para este trabalho foram utilizados 5 fêmeas de *Leiarius marmoratus* (Fig.1A) e 5 reprodutores machos de *Pseudoplatystoma reticulatum* (Fig.1B) em período de reprodução. Os espécimes eram pertencentes ao plantel da Piscicultura Pirai (Fig.2A), localizada na cidade de Terenos, Mato Grosso do Sul, Brasil. A utilização destes animais seguiu as normas do Comitê de Ética do Uso de Animais pela UNESP de Ilha Solteira, tendo o código de aprovação CEUA- FEIS/UNESP 09/2023. Os reprodutores foram coletados com rede de arrasto no tanque escavado onde eram mantidos (Fig.2B) e transferidos para tanques de concreto localizado no laboratório da Piscicultura para a indução hormonal.

A média do peso das fêmeas foi de $4,06 \pm 0,35$ kg e a média do peso dos machos foi de $3,28 \pm 0,38$ kg. O estudo foi conduzido no período reprodutivo das espécies parentais, tendo início no dia 23 de novembro de 2022.

Figura 1 - Fotografia das espécies estudadas. A - *Leiarius marmoratus* e B - *Pseudoplatystoma reticulatum*.



Fonte: Silveira e Pereira.

Figura 2 - Local da coleta. A - Piscicultura Pirai, utilizada para a coleta dos reprodutores e B - Tanque escavado da Piscicultura Pirai no momento da captura das espécies.



Fonte: Próprio autor.

3.2 Obtenção dos embriões

Para a obtenção dos embriões, machos de *P. reticulatum* e fêmeas de *L. marmoratus*, foram induzidos hormonalmente à reprodução por meio de aplicação de solução de extrato bruto de hipófise de carpa (EBH) (*Cyprinus carpio*). Para isso, foram aplicadas duas doses de extrato hipofisário nas fêmeas, sendo a primeira dose de 0,4 mg/kg de peso vivo e após 12 horas foi realizada a segunda aplicação, na dosagem de 1,0 mg/kg. Os machos receberam uma dosagem de 1 mg/kg de peso vivo, na segunda aplicação das fêmeas (Fig. 3A). O híbrido jundiara, proveniente deste cruzamento será também denominado de híbrido JC neste trabalho para melhor identificação ao longo do estudo.

Cerca de 6 horas após a aplicação da última dose do hormônio, foi realizada a extrusão dos oócitos e a coleta dos espermatozoides por meio de massagens abdominais no sentido céfalo-caudal, logo em seguida foi realizado um pool deles para realizar a fertilização. A fertilização dos oócitos foi realizada seguindo o método “a seco”, utilizado pela própria piscicultura, que consistiu em misturar os espermatozoides com os oócitos em um recipiente seco, sem contato com a água e, logo após, de imediato foi adicionado água para a ativação dos espermatozoides e para que ocorresse a fertilização e hidratação dos ovos. Depois de

fecundados, os ovos foram depositados em 4 incubadoras do tipo vertical de 200 litros cada. Em cada incubadora foram colocados aproximadamente 200 gramas de ovos, com vazão de água constante (Fig.3B). A incubação ocorreu sob a temperatura média de $27,98 \pm 0,42$ °C.

Figura 3 - Indução hormonal dos parentais e incubação. A - Aplicação do hormônio indutor à reprodução e B -Incubadora vertical.



Fonte: Próprio autor.

3.3 Método de coleta

A coleta dos embriões teve início logo após a fertilização, sendo realizada em intervalos de 15 minutos durante as duas primeiras horas de embriogênese. Após esse tempo, as coletas ocorreram em intervalos de uma hora até a eclosão das larvas. Após a eclosão, as coletas foram realizadas de 6 em 6 horas nos primeiros dois dias e a seguir em intervalos de 12 horas até o quinto dia.

3.4 Processamento do material para análise

A cada coleta foram retiradas duas amostras de 50 embriões, no qual foram fixadas em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato com pH à 7,2 e outra em solução

composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão fosfato sorensen pH à 7,2 (karnovsky) e, após 24 horas, as amostras fixadas em karnovsky foram desidratadas em álcool 70% para posterior análise. Todo o material fixado foi levado para o Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO), localizado na UNESP, Campus de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, para posteriores processamentos e análises.

3.5 Análise em Microscopia de Luz

Para a análise do material “*in toto*”, os embriões e as larvas foram analisados por meio de estereomicroscópio (MOTIC SMZ-168). Para o estudo da estrutura do desenvolvimento dos híbridos, foram selecionadas amostras de cada fase do desenvolvimento e incluídas em historesina. Para obter os cortes histológicos, eles foram submetidos a secções de 3 micrômetros por meio de micrótomo (LEICA RM2245) que foram colocadas em lâminas histológicas para coloração em hematoxilina de Harris-eosina (HE), e logo após foram analisadas e fotomicrografadas sob o microscópio óptico de luz (ZEISS Scope A1 AX10), com o programa ZEN 3.6 (blue edition), utilizando a Câmera (AxioCam MRc5 ZEISS).

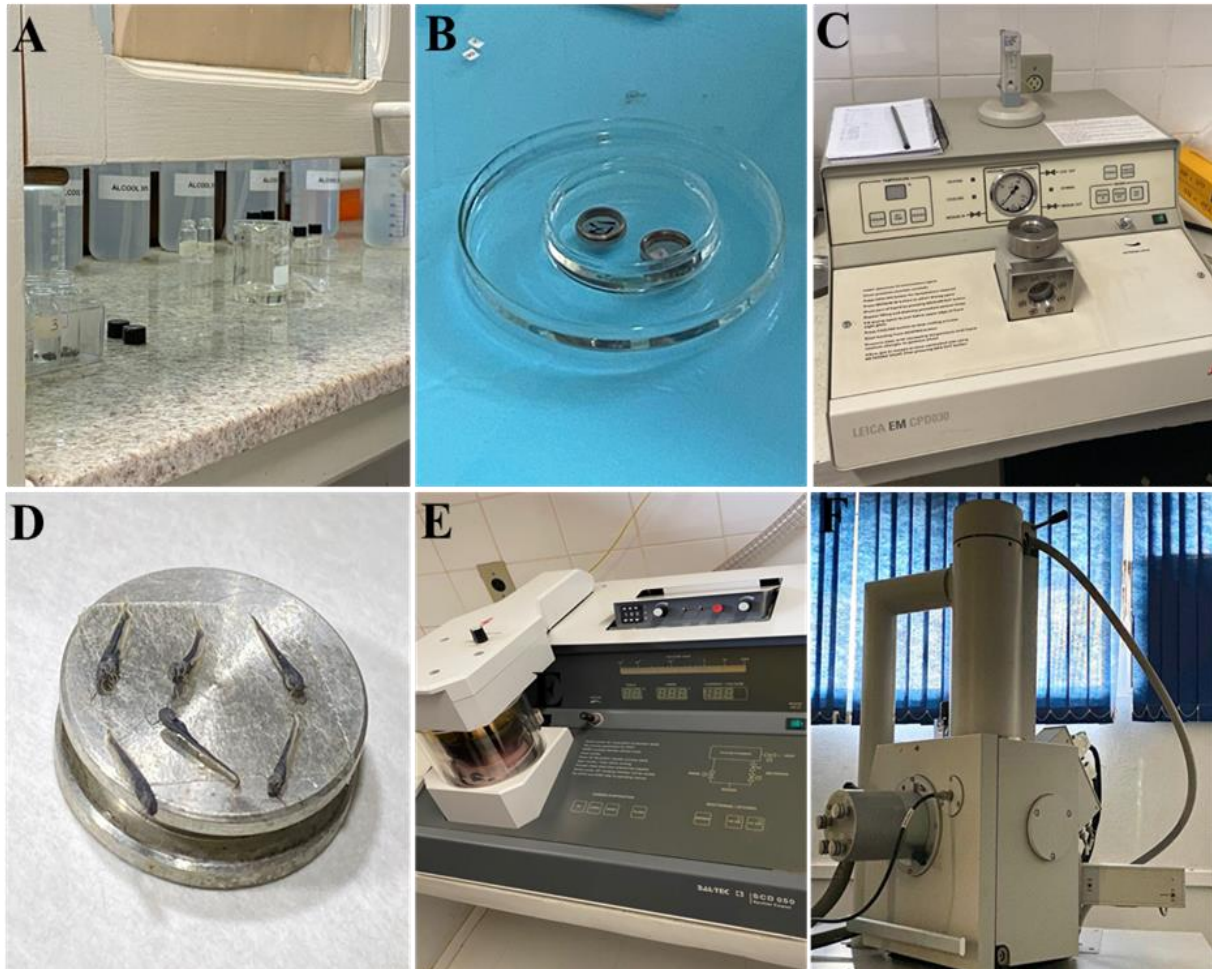
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.), as larvas fixadas em glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato pH: 7,2 foram lavadas em água destilada, sendo efetuadas três trocas de 5 minutos cada (Fig.4A), pós fixada em tetróxido de ósmio por cerca de 30 min.

Após, estas foram desidratadas com soluções crescentes de etanol: 1 - álcool 7,5%, 2x/10 min; 2- álcool 15%, 2x/10 min; 3 - álcool 30%, 2x/10 min; 4 - álcool 50%, 2x /10 min; 5 - álcool 70%, 3x/15 min; 6 – álcool 90% 2x/15 min e por fim; álcool 100%, 2x/15 min.

Em seguida, as amostras foram colocadas em cestas de metal (Fig. 4B) sendo levadas a um equipamento de ponto crítico (LEICA EM CPD030) (Fig.4C) para a secagem do material. Finalizado o processo, estas foram coladas em stubs (Fig. 4D) e levadas ao metalizador (BAL-TEC- SCD 050 Sputter Coater) (Fig. 4E) por cerca de 30 minutos, onde foram cobertas por uma película de ouro. Posteriormente, foram analisadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV- EVO LS15 – Carl Zeiss® (Fig.4F). Estes procedimentos foram realizados no Instituto de Biociências, no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP/ Campus de Botucatu.

Figura 4 - Processamento das amostras para a microscopia eletrônica de varredura. A - hidratação do material em água destilada; B - larvas na cesta de metal; C - equipamento de ponto crítico; D - larvas coladas no stub; E - metalizador e F - microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Próprio autor.

3.7 Medições morfométricas

Foram realizadas medições morfométricas por meio do estereomicroscópio (MOTIC SMZ-168) juntamente do programa e da câmera (OptView), esta foi feita por meio de medições da altura e diâmetro do espaço perivitelino, do diâmetro do globo ocular, da altura da cabeça e do comprimento total da larva.

4 RESULTADOS

Os ovos embrionados dos espécimes híbridos são esféricos, apresentam coloração amarelada, córion nítido e pequeno espaço perivitelino após a hidratação, com média do diâmetro de $40,89 \pm 10,81 \mu\text{m}$, não sendo observada a presença de gota de óleo na vesícula vitelínica durante todo o período do desenvolvimento embrionário.

4.1 Embriogênese das amostras “*in toto*”

O período de desenvolvimento dos embriões híbridos, desde o momento de fertilização até a eclosão das larvas foi de 13 horas sob à temperatura média de $27,98^\circ\text{C}$, a qual foi medida a cada coleta por meio de um termômetro. Após a fecundação foram estabelecidos os seguintes estágios de embriogênese do híbrido: zigoto, clivagem, gástrula, organogênese e eclosão (Tabela 1).

Tabela 1- Desenvolvimento embrionário do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico de *Leiarius marmoratus* (♀) x *Pseudoplatystoma reticulatum* (♂) sob a temperatura de $27,98^\circ\text{C}$

Período de Incubação	Estágio	Observações
0	Zigoto	94,4% zigoto; 5,6%: não fertilizados
0, 25h	Clivagem	90,6%: 2 blastômeros; 9,4%: não fertilizados
0,50h	Clivagem	93,1%: 4 blastômeros; 5,4%: não fertilizados; 1,5%: desenvolvimento anormal
0,75h	Clivagem	1,1%: 4 blastômeros; 54,8%: 8 células; 60,4%: não fertilizados; 5%: desenvolvimento anormal
1h	Clivagem	5,9%: 8 blastômeros; 47,1%: 16 blastômeros 44,1%: não fertilizados; 2,9%: desenvolvimento anormal
1h 15m	Clivagem	1,5%: 16 blastômeros; 53,9%: 32 blastômeros; 42,3%: não fertilizados; 2,3%: desenvolvimento anormal
1h 30min	Clivagem	2,2%: 32 blastômeros; 56,2%: 64 blastômeros 29,9%: não fertilizados; 11,7%: desenvolvimento anormal
1h 45min	Clivagem	54%: Mórula; 40,5%: não fertilizados; 5,5%: desenvolvimento anormal
2h	Clivagem	62,64%: Mórula avançada; 23,6%: não fertilizados; 13,8%: desenvolvimento anormal
3h	Gástrula	70,7%: 25% de epibolia; 14,2%: desenvolvimento anormal; 15,1%: não fertilizados
4h	Gástrula	37,4%: Epibolia 50%; 28,1%: Epibolia; 75% 6,4%: desenvolvimento anormal; 28,1%: não fertilizados
5h	Gástrula	5,1%: Epibolia 75%; 85,3%: Epibolia 90%; 9,6%: não fertilizados
6h	Organogênese	91%: 5 somitos; 1,1%: desenvolvimento anormal; 7,9%: não fertilizados
7h	Organogênese	86,6%: 10 somitos; 10,4%: não fertilizados; 3%: desenvolvimento anormal
8h	Organogênese	78,7%: 15 somitos; 21,3%: não fertilizados
9h	Organogênese	72,2%: 18 somitos; 18,3% não fertilizados; 9,5%: desenvolvimento anormal
10h	Organogênese	92,3%: 20 somitos; 7,7%: não fertilizados
11h	Organogênese	66,6%: Fase larval com + de 25 somitos; 2,4%: não fertilizados; 23,8%: + de 20 somitos; 7,2%: desenvolvimento anormal
12h	Organogênese	84,2%: Fase larval com + de 30 somitos; 15,8% não fertilizados
13h	Eclosão	42,8%: larvas eclodidas; 57,2%: não fertilizados

Fonte: Próprio autor.

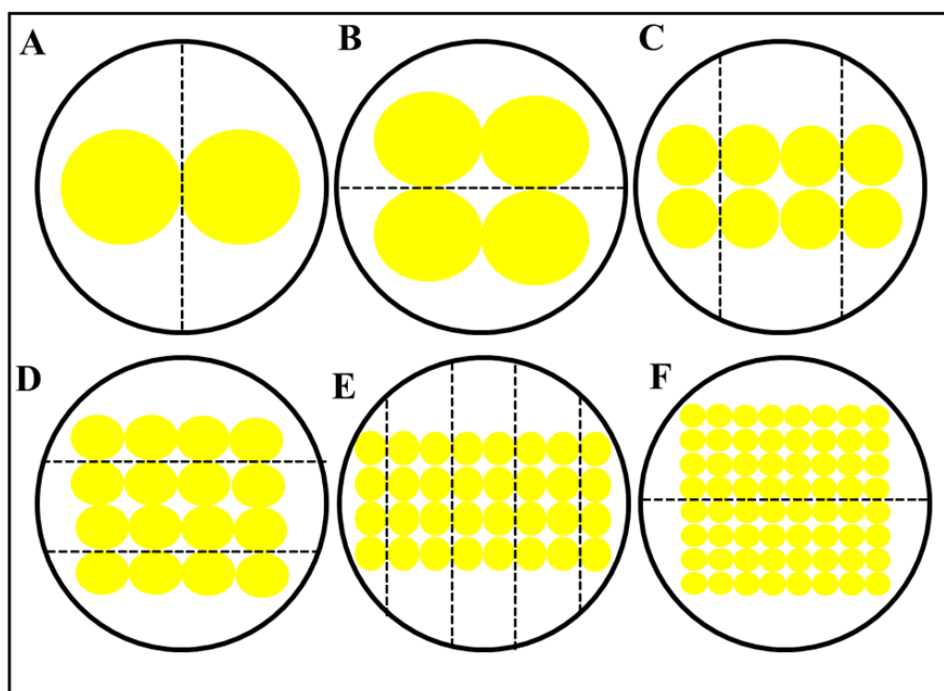
4.2 Zigoto (0 – 0,25h)

Com a fertilização, a fusão dos pró-núcleos masculino e feminino e, a migração citoplasmática, foram estabelecidos o polo animal e vegetativo (vesícula vitelina) (Fig. 5A). O polo animal é constituído pelo citoplasma ativo e um núcleo, com uma coloração amarela mais clara e translúcida e, o polo vegetativo, mais denso e com coloração amarelada mais escura (Fig. 6A). A média do diâmetro da vesícula vitelínica neste estágio foi de $703,43 \pm 35,43 \mu\text{m}$. Durante o desenvolvimento não foi identificada gota de óleo na vesícula vitelínica e os ovos apresentaram-se com a casca lisa.

4.3 Estágio de Clivagem (0,25h – 3h)

A clivagem foi do tipo meroblástica discoidal, também conhecida como parcial ou incompleta, ou seja, ela ocorre somente no polo animal, sendo observado o seguinte padrão de clivagem: a primeira vertical, dando origem a 2 blastômeros (Fig.5A; 6B) a segunda vertical e perpendicular a primeira, dando origem a 4 blastômeros (Fig.5B; 6C), a terceira vertical, paralela a primeira dando origem a 8 blastômeros (Fig.5C; 6D), a quarta vertical ocorrendo paralelamente a segunda, originando 16 blastômeros (Fig.5D; 6E), a quinta ocorreu verticalmente e paralela a primeira, dando origem a 32 blastômeros (Fig.5E) e a sexta clivagem foi horizontal, dando origem a duas camadas de células, totalizando 64 blastômeros (Fig.5F; 6F).

Figura 5. Esquema do processo de clivagem com vista superior: A - Fase de 2 blastômeros; B – Fase de 4 blastômeros; C – Fase de 8 blastômeros; D - Fase de 16 blastômeros; E – Fase de 32 blastômeros e F – Fase de 64 blastômeros. Legendas: Cor amarela: polo animal; Região branca: polo vegetativo; Linhas pontilhadas: cortes.



Fonte: Próprio autor.

A primeira clivagem foi observada às 0,25 horas após a fertilização, onde 90,6% dos ovos foram observados com dois blastômeros e a média do diâmetro vesícula vitelínica foi de $712,96 \pm 67,16 \mu\text{m}$. A segunda clivagem ocorreu às 0,50 horas após a fertilização e 93,1% dos embriões se apresentaram com 4 blastômeros. A terceira clivagem ocorreu com 0,75 horas de desenvolvimento, no qual 54,8% dos embriões se apresentaram com 8 blastômeros e apenas 1,1% ainda com 4 blastômeros.

A quarta clivagem foi observada 1 hora após a fertilização, encontrando embriões com 16 blastômeros, porém ainda foram observados 5,9% dos embriões com 8 blastômeros. A quinta clivagem foi observada após 1h e 15 minutos de desenvolvimento onde 53,9% dos embriões estavam com 32 blastômeros e 1,5% com 16 blastômeros.

A sexta clivagem foi observada com 1h e 30 minutos após a fertilização, apresentando 56,2% dos embriões com 64 blastômeros, considerado já um estágio de mórula, sendo as células arranjadas em duas camadas e 2,2% com 32 blastômeros. Com 1h e 45 minutos, 54% dos embriões já estavam na fase de mórula com mais de 100 células (Fig. 6G).

O estágio de clivagem finaliza com o início dos movimentos morfogenéticos, sendo o mais visível o movimento de epibolia, que promove um achatamento dos blastômeros periféricos mediante ao encurtamento do seu eixo ápico-basal, sendo possível observar a partir de 3 horas incubação (Fig. 6H). Como não foi observado o surgimento de um espaço blastocélico ou espaços irregulares bem definidos entre os blastômeros e o periblasto, não foi considerada a existência de um estágio de blástula característico.

4.4 Estágio de Gástrula (3h- 5h)

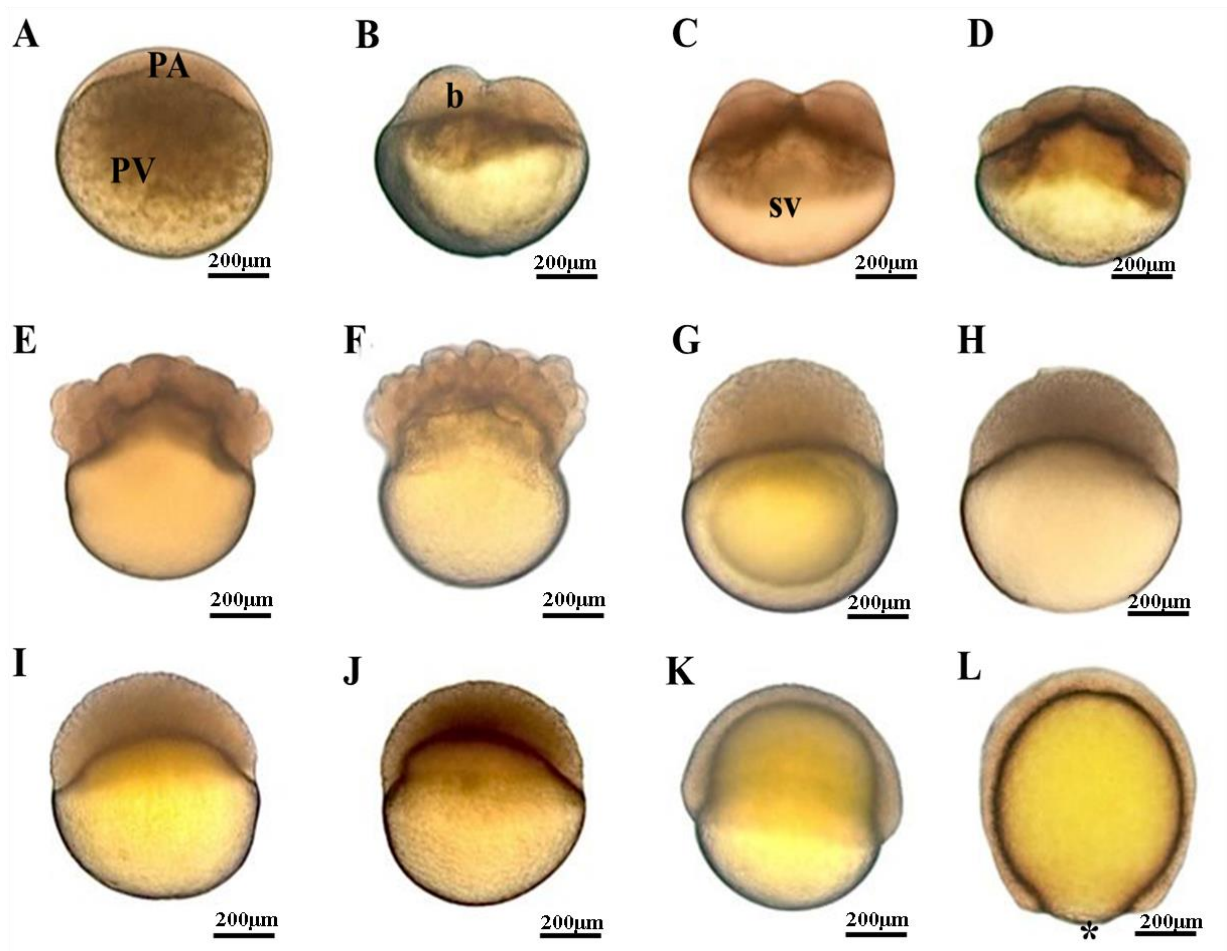
O estágio de gástrula caracterizou-se pelo início dos movimentos morfogenéticos com maior evidência ao movimento de epibolia, convergência e involução celular que posteriormente originaram os folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme e eixos embrionários caudo-cefálico e latero-lateral.

O movimento de epibolia iniciou 3 horas após a fertilização e se estendeu até a quinta hora de desenvolvimento e neste período 70,7% dos embriões coletados e analisados estavam em 25% de epibolia (Fig. 6I) e a média do diâmetro da vesícula vitelínica foi de $695,96 \pm 13,34 \mu\text{m}$, ou seja, foi observado uma pequena reduzida.

Com 4 horas de desenvolvimento, 37,4% dos embriões estavam com 50% de epibolia (Fig. 6J) e 28,1% com 75% de epibolia (Fig. 6K). Nessa etapa, foi observado os movimentos morfogenéticos de epibolia, convergência e involução das células a partir da borda do blastoderme, com a formação do anel germinativo ou escudo embrionário.

Após 5 horas de desenvolvimento, foram encontrados 5,1% dos embriões com 75% de epibolia, ou seja, 75% do vitelo recoberto pelo blastoderme e, 85,3% com 90% de epibolia (Fig. 6L) com apenas uma pequena porção do polo vegetativo exposto, o tampão vitelino.

Figura 6. Estágios do desenvolvimento embrionário do híbrido proveniente do cruzamento entre fêmea de *L. marmoratus* com macho de *P. reticulatum* A - Zigoto; Estágio de clivagem: B - Fase de 2 blastômeros; C - Fase de 4 blastômeros; D - Fase de 8 blastômeros; E - Fase de 16 blastômeros; F - Fase de 64 blastômeros; G - Fase de mórula; Estágio de gástrula: H - Início de epibolia; I - Fase de 25% de epibolia; J - Fase de 50% de epibolia; K - Fase de 75% de epibolia e L - Fase de 90% de epibolia. Legendas: PA: polo animal; PV: polo vegetativo; b: blastômero; SV: Saco Vitelino e Asterisco: tampão vitelino.



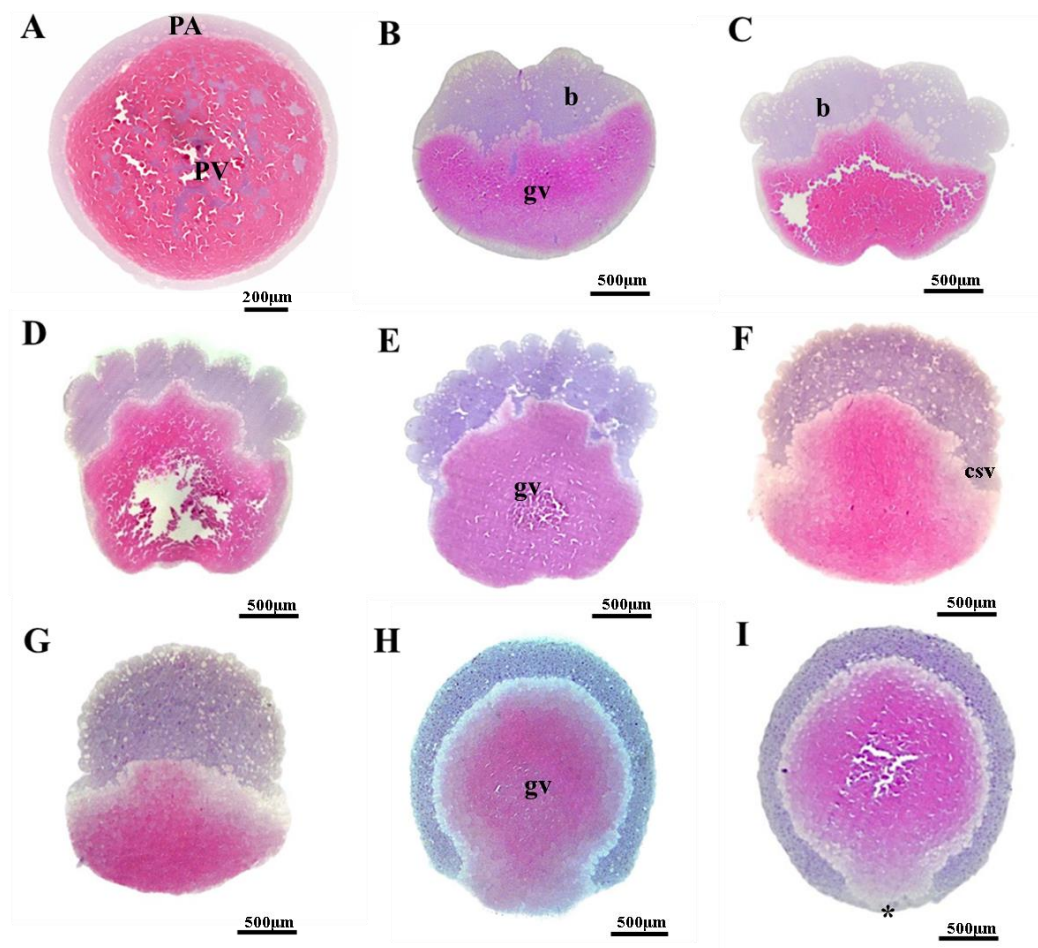
Fonte: Próprio autor.

Por meio das análises histológicas foi possível visualizar de forma mais detalhada o desenvolvimento embrionário, como é possível ver no estágio de zigoto, o acúmulo de citoplasma no estabelecimento do polo animal, os grânulos de vitelo transferidos do polo vegetativo para o polo animal (Fig.7A; 8A; 8B).

As clivagens parciais ou incompletas no início do estágio de clivagem e, na fase de mórula avançada, a formação da “franja” do periblasto e o início do achatamento das células periféricas, como preparação para o movimento de epibolia (Fig.7 B à 7F).

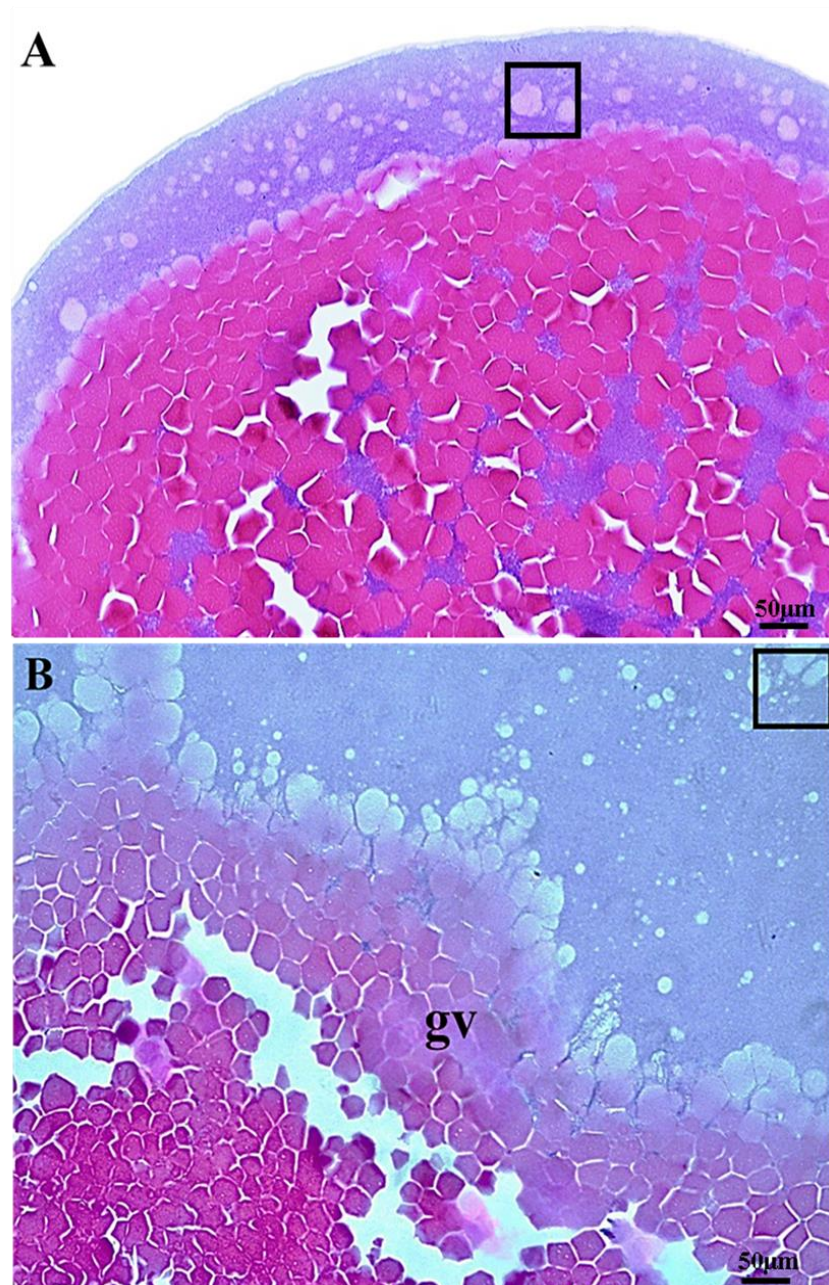
Também foi observado o estágio de gástrula, onde a vesícula vitelina, nas fases finais do movimento de epibolia, aparece quase que toda recoberta pelo blastoderme, mas já envolvida pelo periblasto, como um tampão vitelino, dando forma ao blastóporo (Fig. 7H; 7I).

Figura 7. Histologia do desenvolvimento embrionário proveniente do cruzamento entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum*. A - Zigoto; B - Fase de 4 blastômeros; C- Fase de 8 blastômeros; D- Fase de 16 blastômeros; E- Fase de 64 blastômeros; F- Fase de + de 100 blastômeros; G- Início do processo de epibolia; H- Fase de 90% de epibolia e I- Fechamento do blastóporo. Legendas: PA- polo animal; PV- polo vegetativo; b: blastômeros; gv: grânulos de vitelo; csv: camada sincicial do vitelo e *: tampão vitelino.



Fonte: Próprio autor.

Figura 8. Detalhes dos grânulos de vitelo no polo animal do híbrido. A - Estágio de Zigoto e B – Grânulos de vitelo no polo animal na fase de 8 blastômeros. Legendas: gv e quadrado: grânulos de vitelo.

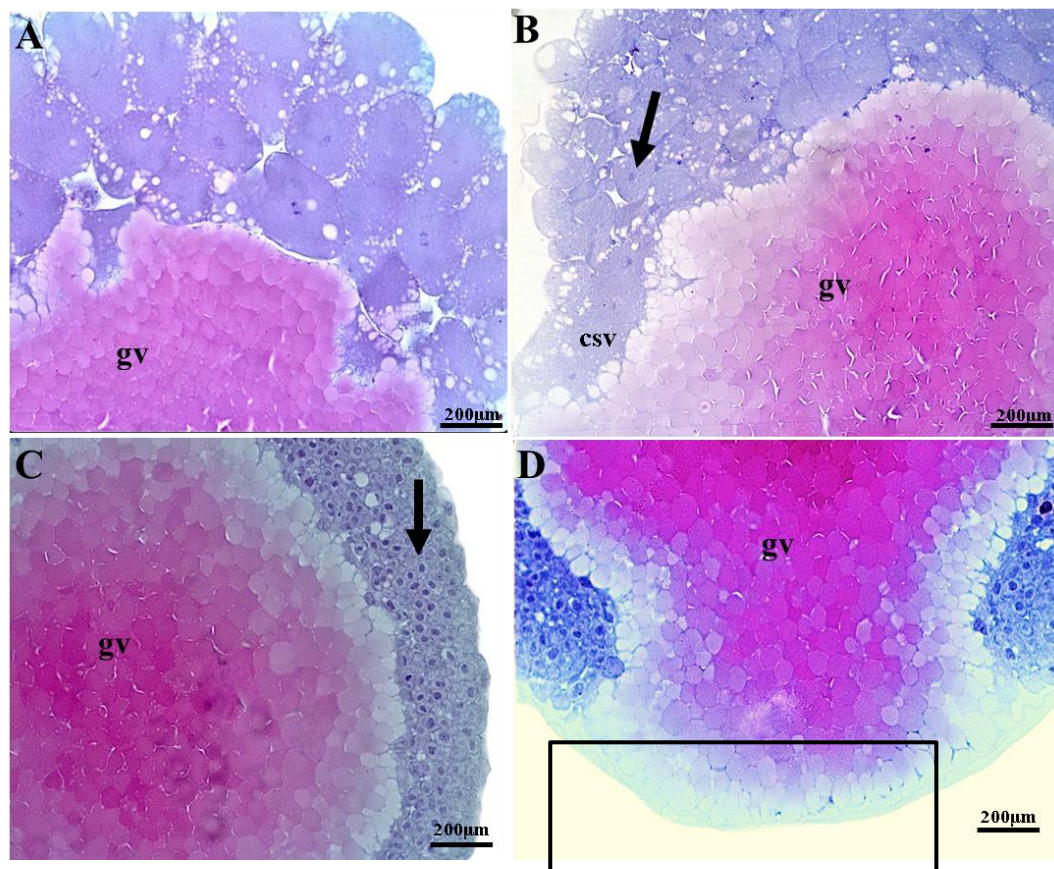


Fonte: Próprio autor.

A partir do estágio de clivagem na fase de 32 blastômeros foi possível identificar os núcleos das células. Até a quinta clivagem as divisões são perpendiculares ao vitelo e o fuso mitótico não consegue clivar as células que estão em contato direto com o polo vegetativo

(Fig.9A). Estas células irão formar o periblasto ou camada sincicial do vitelo que pode ser melhor observada na fase de mórula (Fig.9B). No estágio de gástrula também foi possível ver mais nitidamente os núcleos das células (Fig.9C) e também o tampão vitelino (Fig. 9D).

Figura 9. Histologia dos embriões híbridos. A – Blastômeros em diferentes tamanhos e em contato com o povo vegetativo; B – Presença da camada sincicial do vitelo. Estágio de Gástrula: C – Detalhe dos núcleos dos blastômeros e D – Tampão vitelino. Legendas: gv: grânulos de vitelo; Seta: núcleo da célula; csv: camada sincicial do vitelo.



Fonte: Próprio autor.

4.5 Estágio de Organogênese (6h a 9h)

Com 6 horas de desenvolvimento 91% dos embriões se encontravam em nêurula inicial (Fig.10A). Este estágio foi marcado pela diferenciação céfalo-caudal, presença do sulco neural e a mesoderme segmentada em mais de 5 pares somitos.

Após 7 horas de desenvolvimento 86,6% dos embriões apresentaram-se com mais de 10 pares de somitos. Nesta etapa, também pode-se observar o aparecimento da vesícula ótica e vesícula óptica e uma maior distinção da cabeça e cauda (Fig. 10B).

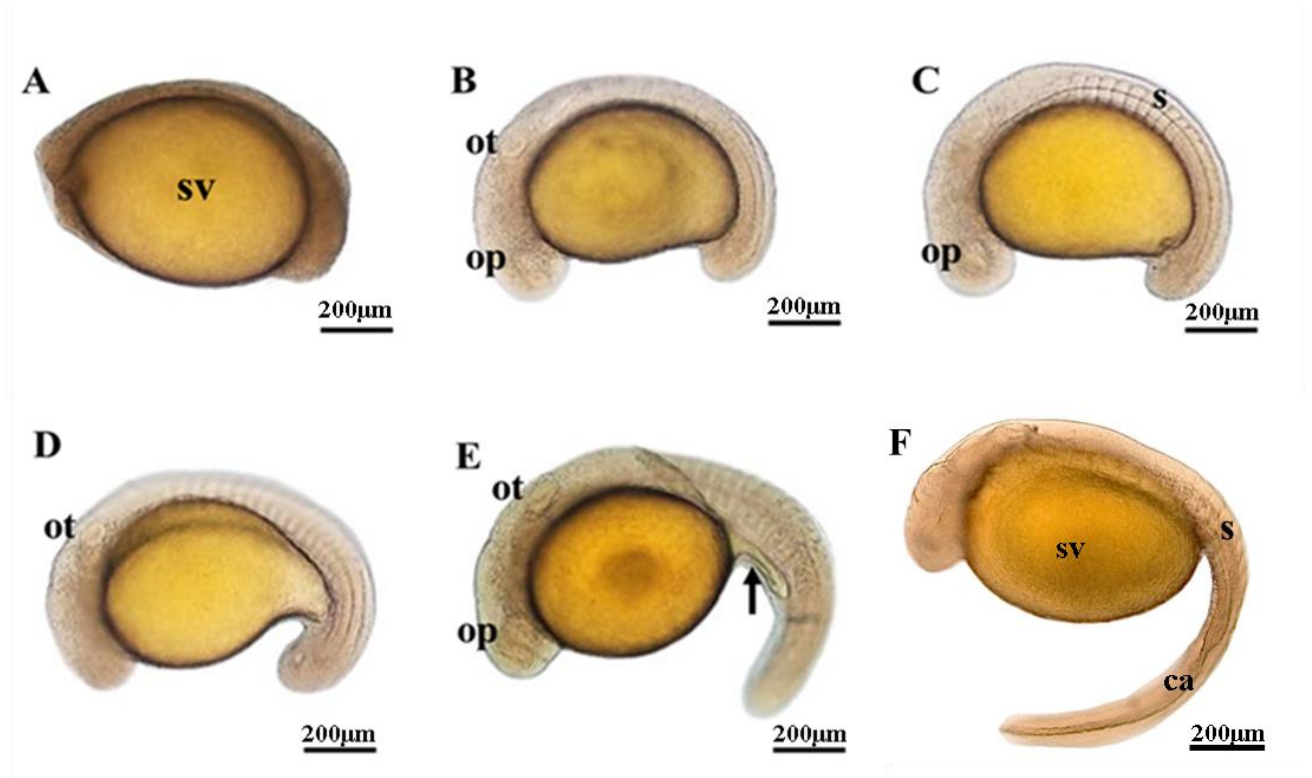
Com 8 horas após a eclosão 78,7% dos embriões apresentaram-se com mais de 15 pares de somitos e crescimento da cauda (Fig. 10C) e na nona hora eles estavam com mais de 18 pares de somitos (Fig. 10D). Após 10 horas de desenvolvimento 92,3% já haviam mais de 20 pares de somitos, assim como também foi observada a diferenciação estrutural para formação do intestino (Fig. 10E).

Com 11 horas de 66,6% dos embriões já haviam mais de 25 pares de somitos e pela microscopia eletrônica de varredura foi possível observar o início do desenvolvimento do opérculo (Fig.11A). Os somitos e veias no saco vitelino (veias vitelínicas) (Fig.11B), e nadadeira embrionária foram observados de forma mais nítida (Fig. 11C).

Com 12 horas de desenvolvimento, 84,2% já haviam mais de 30 pares de somitos e uma cauda solta (Fig. 10F). Nesse momento foi observado uma cabeça mais arqueada, a abertura do futuro opérculo mais profundo (Fig. 12A), a fosseta nasal se desenvolvendo (Fig.12B) e uma nadadeira embrionária bem visível na região da cauda (Fig.12C).

Figura 10. Estágio de Organogênese. A - Fase de neurula 6h de incubação; Fase de segmentação; B – 10 somitos com 7h de incubação; C - + de 15 somitos com 8h de incubação; D - + de 18 somitos com 9h de incubação; E - + de 20 somitos após 10h de incubação; F - 12 horas de desenvolvimento e G - Larva com 13 horas de desenvolvimento.

Legendas: SV: saco vitelino; op- vesícula óptica; ot: vesícula ótica; s- somitos; Seta: desenvolvimento do intestino e ca: cauda.



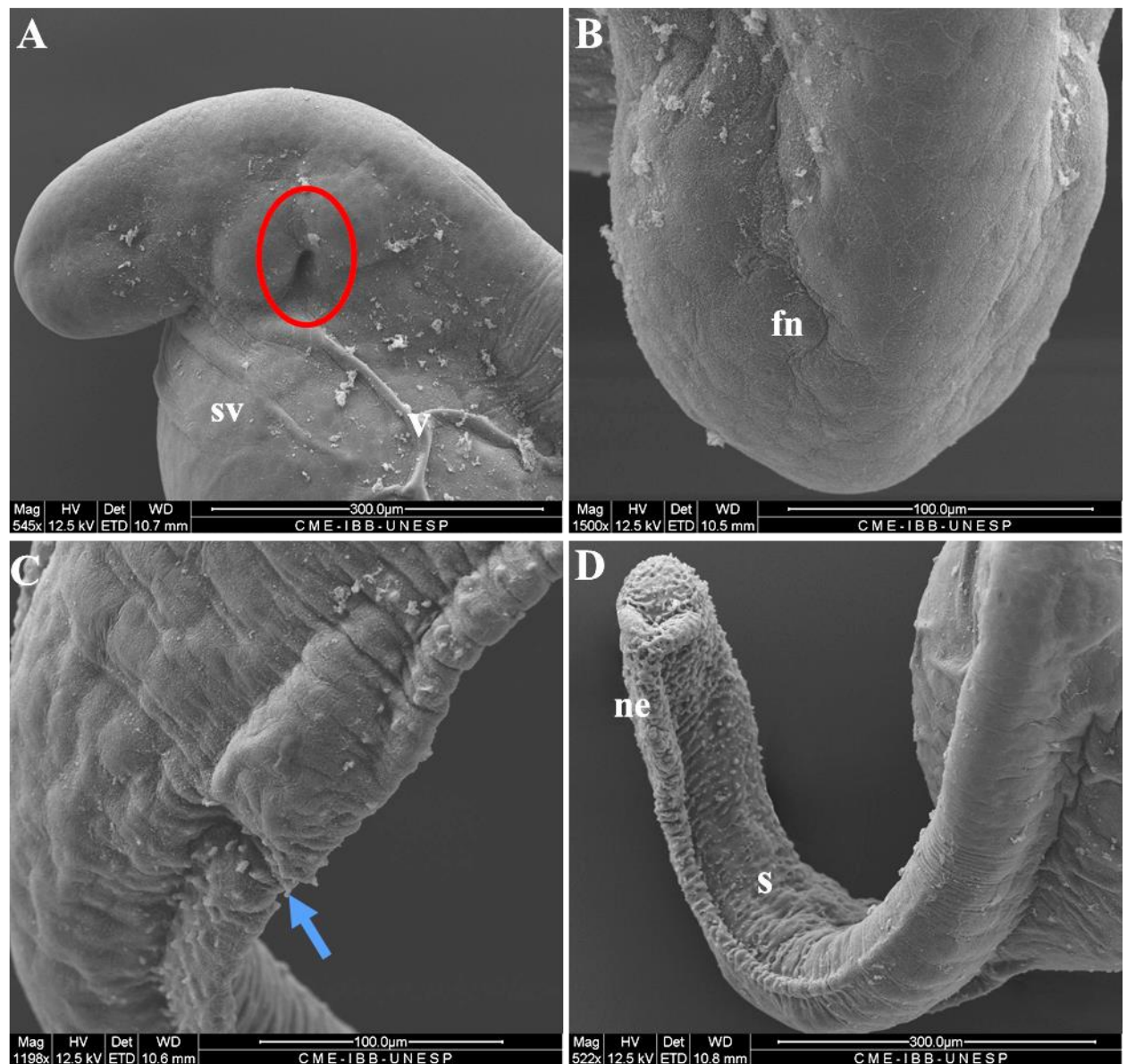
Fonte: Próprio autor.

Figura 11. Embrião de híbrido em estágio de organogênese após 11 horas de desenvolvimento. A - Embrião em desenvolvimento; B - Região do saco vitelínico e C - Cauda. Legendas: ponta de seta: vesícula óptica; Círculo: opérculo; sv: Saco Vitelínico; S: somitos; v: veias vitelínicas; ne: nadadeira embrionária e seta dupla: intestino posterior.



Fonte: Próprio autor.

Figura 12. Estágio de Organogênese 12 horas após a fertilização. A - Região da cabeça; B - Opérculo; C - Desenvolvimento do ânus e D - Cauda. Legendas: sv: saco vitelino; Círculo: Opérculo; Seta: ânus; fn: fosseta nasal; s: somitos; ne: nadadeira embrionária.

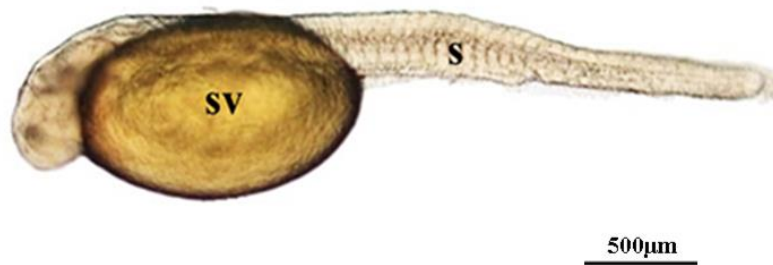


Fonte: Próprio autor.

4.6 Eclosão das larvas (13h)

Com 13 horas de desenvolvimento, houve o início de eclosão das larvas e o movimento natatório, sendo possível observar o coração pulsando, a cauda reta, notocorda e os somitos bem visíveis (Fig.13). Nesta etapa o comprimento da larva foi de 1127,6 μ m.

Figura 13. Larva eclodida do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* e machos *P. reticulatum* com 13 horas de desenvolvimento. Legendas: SV: saco vitelino e s: somitos.

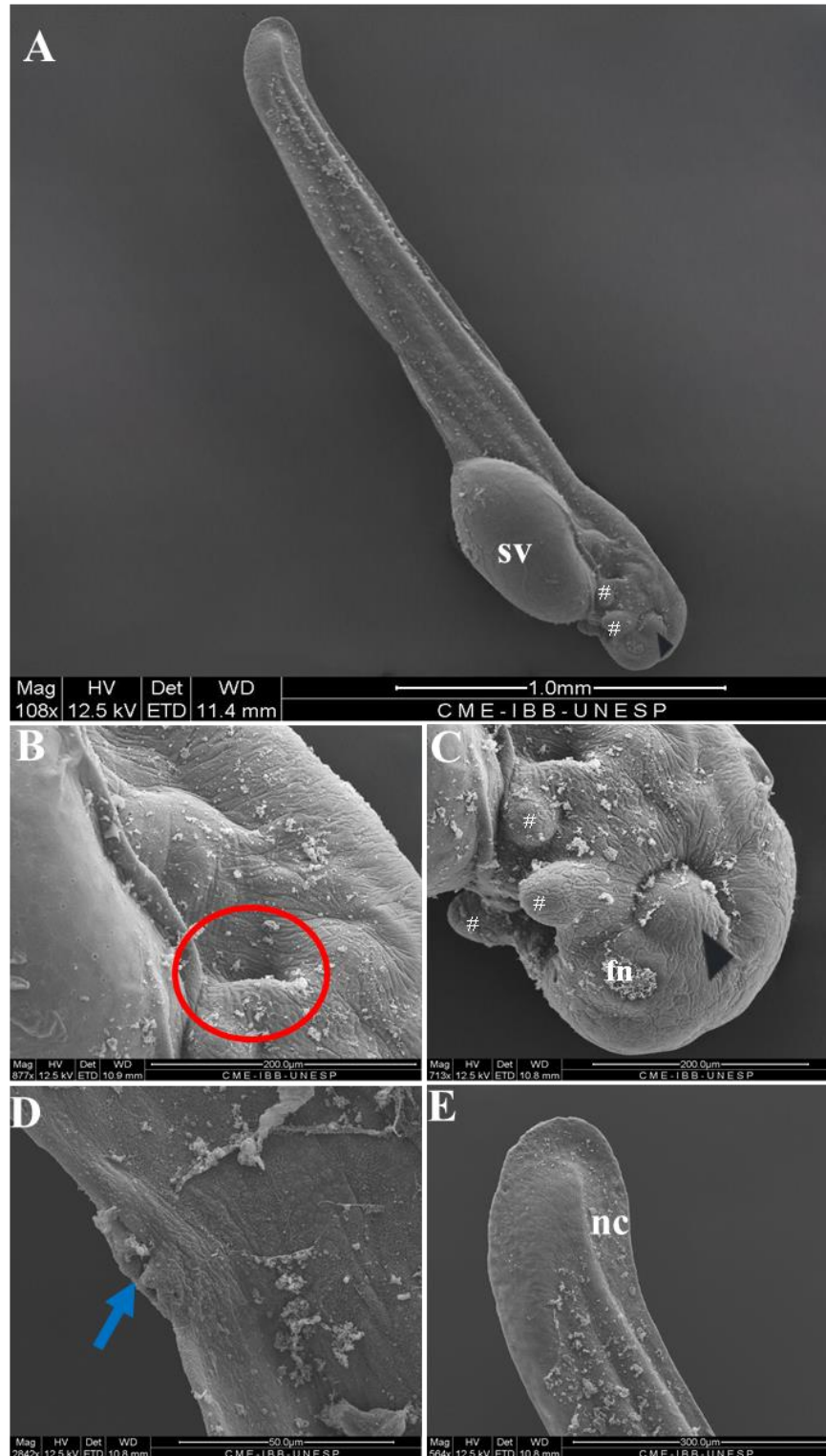


Fonte: Próprio autor.

4.6.1 Estágio larval com 12 horas após a eclosão

Após a eclosão das larvas a média do comprimento delas foi de $3070,9 \pm 238,6 \mu\text{m}$ para este momento (Fig.14A), assim como também foi visível dois pares de barbilhões em desenvolvimento. O opérculo já estava aparentemente com maior profundidade (Fig.14B) e a fosseta nasal estava mais visível e com sensores (Fig.14C), o ânus (Fig.14D) e a nadadeira caudal mais visíveis (Fig.14E).

Figura 14. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* e machos *P. reticulatum* 12 horas após a eclosão. A – Larva com barbilhões em desenvolvimento; B - opérculo; C - fosseta nasal; D - ânus e E - nadadeira caudal. Legendas: SV: saco vitelino; Ponta de seta: vesícula óptica; hashtag: barbilhões; Círculo: opérculo; fn: fosseta nasal; Seta: ânus e nc: nadadeira caudal.

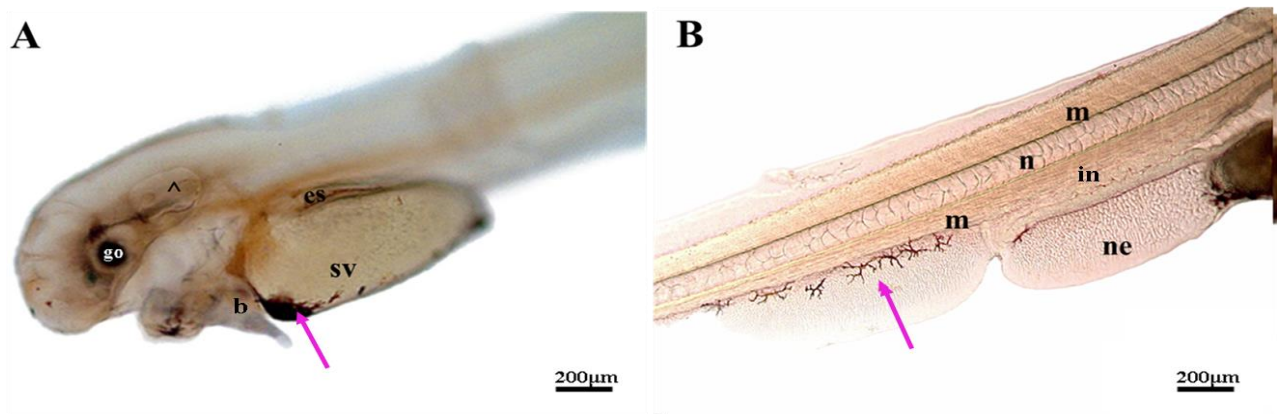


Fonte: Próprio autor.

4.6.2 Estágio larval 24 horas após a eclosão

As estruturas da cabeça estavam mais desenvolvidas, em destaque: a vesícula óptica pigmentada e a boca proeminente. Notou-se uma maior quantidade de cromatóforos espalhados pela cauda e na região do saco vitelino (Fig. 15A). Foi possível observar o início do desenvolvimento do intestino (Fig.15B) e a cauda começou a tomar formato da estrutura.

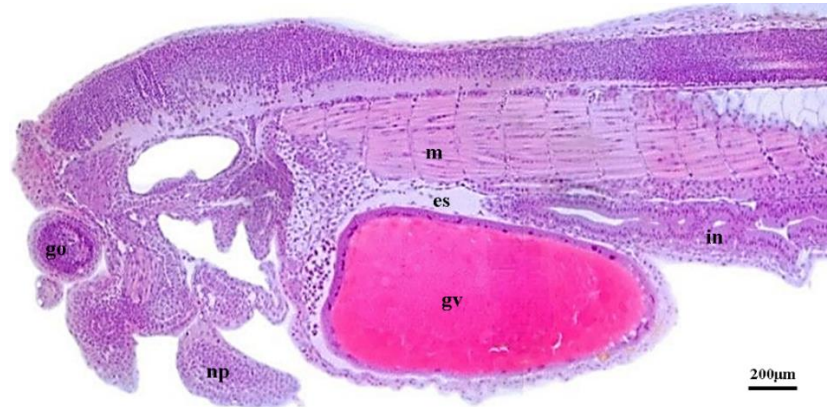
Figura 15. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* e machos de *P. reticulatum* 24 horas após a eclosão. A- Região anterior da larva e B- região da cauda. Legendas: go: globo ocular; seta: cromatóforos; n: notocorda; es: estômago; m: miômeros; ^: otólitos; b: barbilhões; in: intestino e ne: nadadeira embrionária.



Fonte: Próprio autor.

Com 24 horas após a eclosão, por meio das análises histológicas, pôde-se notar o início da formação do estômago, do intestino e do ânus de forma mais nítida. Além disso, o globo ocular já estava em estágio de desenvolvimento mais avançado, já era nítida a nadadeira pélvica em desenvolvimento e os miômeros em grande quantidade, que posteriormente darão origem à musculatura do animal (Fig.16).

Figura 16. Histologia da larva híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 24 horas após a eclosão. Legendas: go: globo ocular; np: nadadeira pélvica; gv: grânulos de vitelo; m: miômeros; es: estômago e in: intestino.

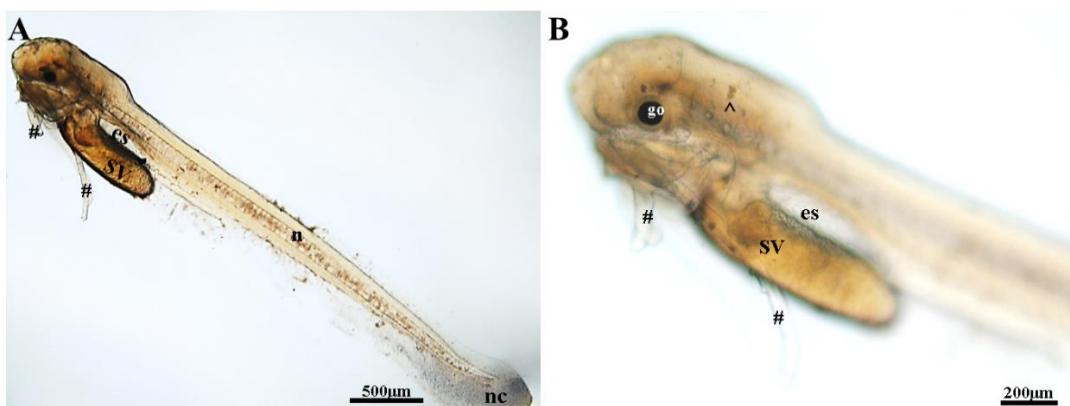


Fonte: Próprio autor.

4.6.3. Estágio larval 30 horas após a eclosão

Nesta fase, notou-se aumento no comprimento da larva, que passou a medir $3754 \pm 68 \mu\text{m}$ (Fig.17A) e o globo ocular bem desenvolvido com maior capacidade visual, sendo a média do diâmetro de $81,7 \pm 10,9 \mu\text{m}$ e a média da altura: $84,8 \pm 3,6 \mu\text{m}$ (Fig. 17B).

Figura 17. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* e machos de *P. reticulatum* 30 horas após a eclosão. A- Larva e B- Região anterior da larva. Legendas: hashtag: barbilhões; n: notocorda; es: estômago; nc: nadadeira caudal; SV: saco vitelino; ^: otólitos e go: globo ocular.

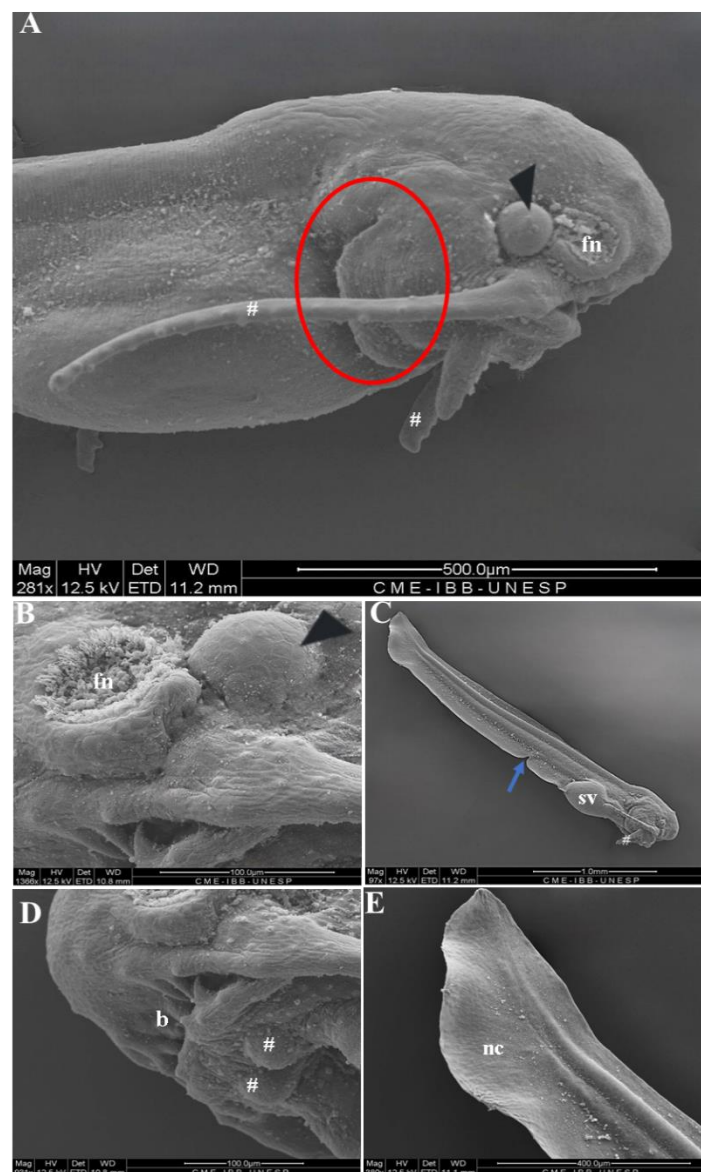


Fonte: Próprio autor.

O opérculo já apresentava o formato característico (Fig.18A), a fosseta nasal apresentou uma maior quantidade de sensores olfativos (Fig.18B) que tornarão mais profunda e o anus com

uma cavidade mais acentuada (Fig.18C). Na boca foram observados vários dentes em desenvolvimento (Fig.18D), 2 pares de barbilhões mandibulares, 2 anteriores menores e 2 posteriores maiores e uma cauda começou a tomar formato (Fig.18E).

Figura 18. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 30 horas após a eclosão. A- Região da cabeça; B- Fosseta nasal com sensores; C- Larva; D - Boca com dentes e E- Nadadeira caudal. Legendas: círculo: opérculo; Hashtag: barbilhões; Ponta de seta: vesícula óptica; fn: fosseta nasal; Seta: ânus; b: boca com dentes e nc: nadadeira caudal.

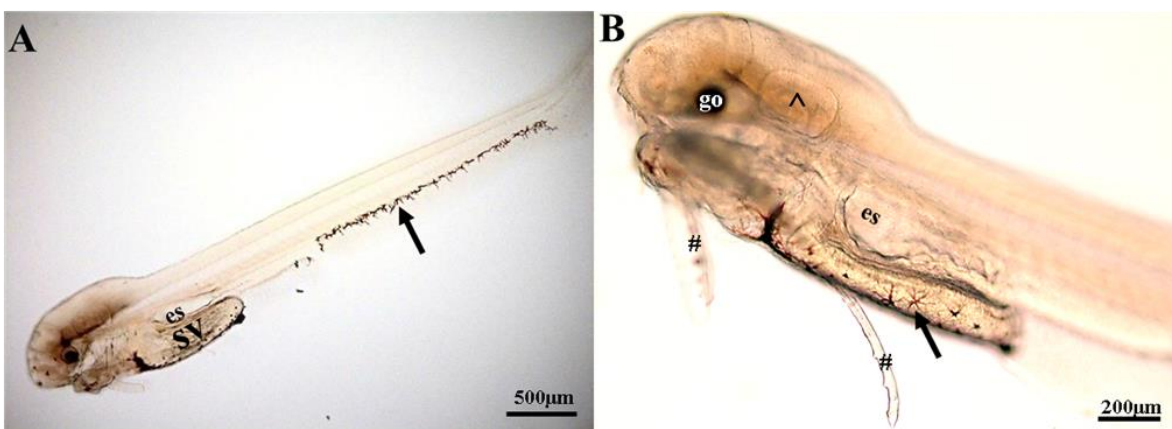


Fonte: Próprio autor.

4.6.4 36h após a eclosão

Foi notório a presença de uma maior quantidade de cromatóforos espalhados pelo saco vitelino e pela região da cauda (Fig.19A). Além de ser possível observar mais nitidamente o desenvolvimento do estômago (Fig.19B).

Figura 19. Larva “*in toto*” do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* e machos de *P. reticulatum* 36 horas após a eclosão. Legendas: SV: saco vitelino; go: globo ocular; Hashtag: barbilhões; Seta: cromatóforos; ^: otólitos e es: estômago.

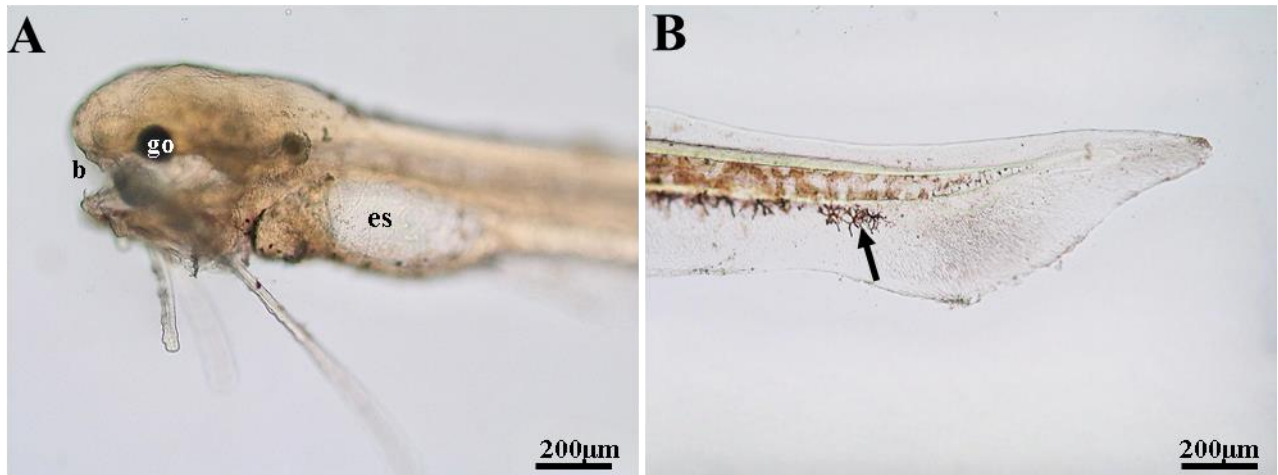


Fonte: Próprio autor.

4.6.5 60 horas após a eclosão

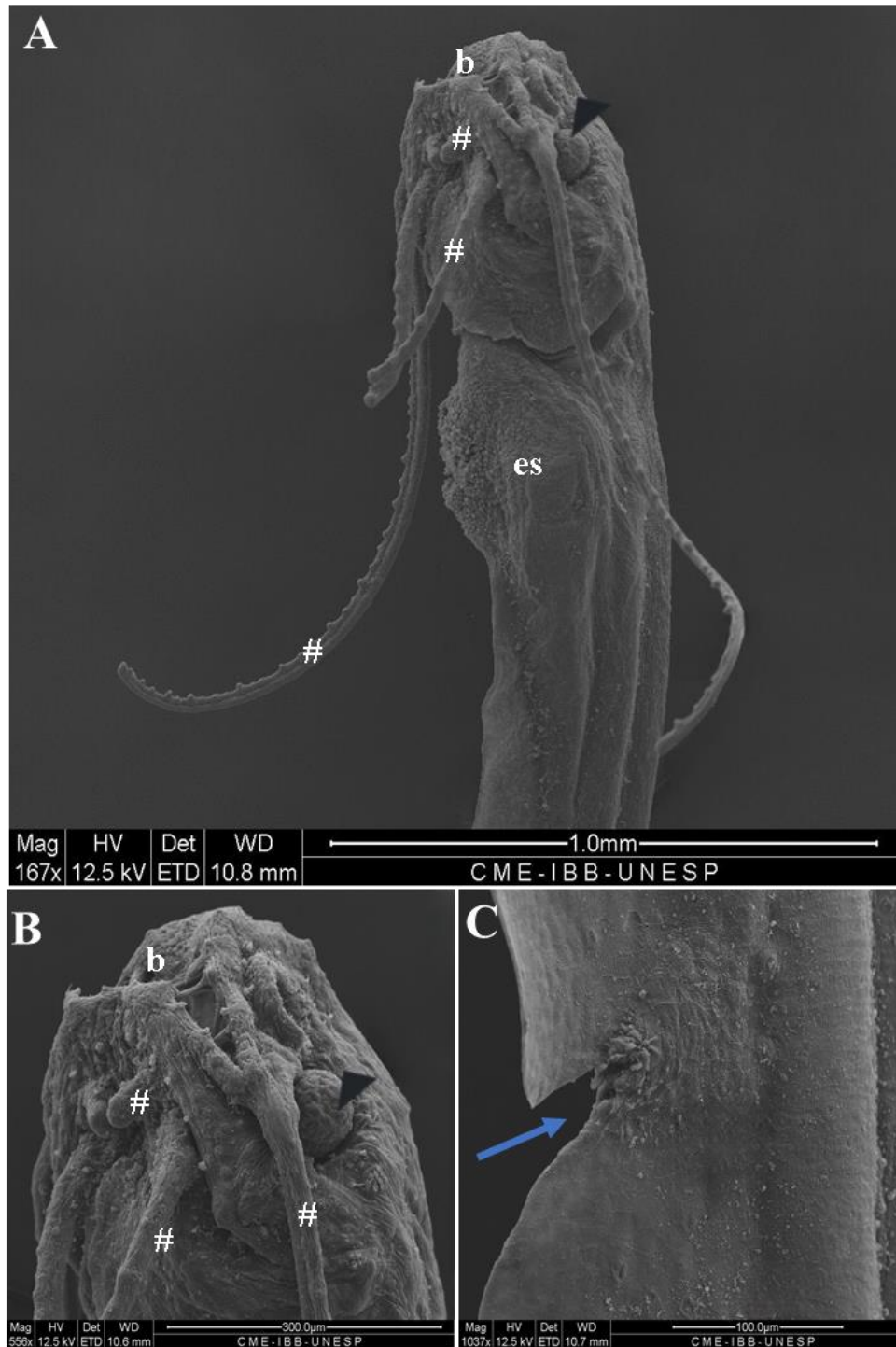
Nesta fase, notou-se um melhor desenvolvimento do estômago (Fig.20A) e não foi observado o saco vitelino, além disso, a nadadeira caudal já estava com uma estrutura heterocerca em formação (Fig.20B). Os dois pares de barbilhões estavam maiores, além de começar a se formar um terceiro par (Fig.21A). A boca apresentou vários dentes (Fig.21B), o estômago e intestino já estavam bem formados, além de o anus estar em um aspecto formato bem característicos para esses órgãos (Fig.21C).

Figura 20. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 60 horas após a eclosão. Legendas: boca; go: globo ocular; seta: cromatóforos e es: estômago.



Fonte: Próprio autor.

Figura 21. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 60 horas após a eclosão. A - Estruturas mais desenvolvidas; B - Região da cabeça e C - Ânus. Legendas: Ponta de seta: vesícula óptica; Hashtag: barbilhão; b: boca com dentes es: estômago e Seta: ânus.

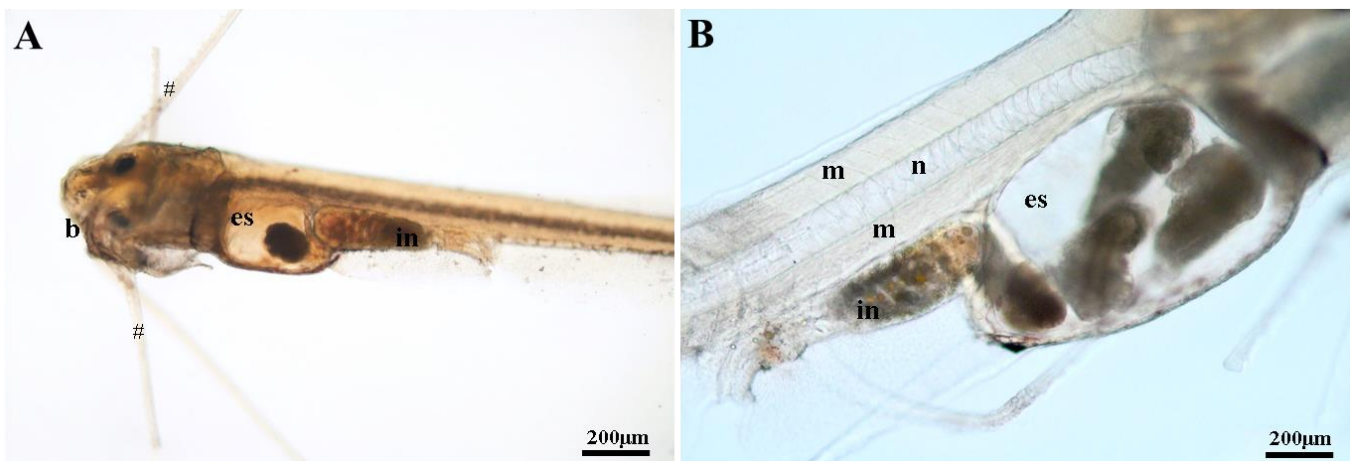


Fonte: Próprio autor.

4.6.6 72 horas após a eclosão

Nesta fase, teve início a alimentação das larvas com artêmia, pois o saco vitelino havia regredido, o sistema digestório estava bem desenvolvido e em funcionamento, com estômago, intestino e ânus com alimentos em seu interior (Fig. 22A e 22B). Também foi possível verificar o crescimento das mesmas e os barbilhões apresentaram-se mais longos. Nesta fase observou-se que houve aumento na média do comprimento total da larva, passando a medir 4961,2µm.

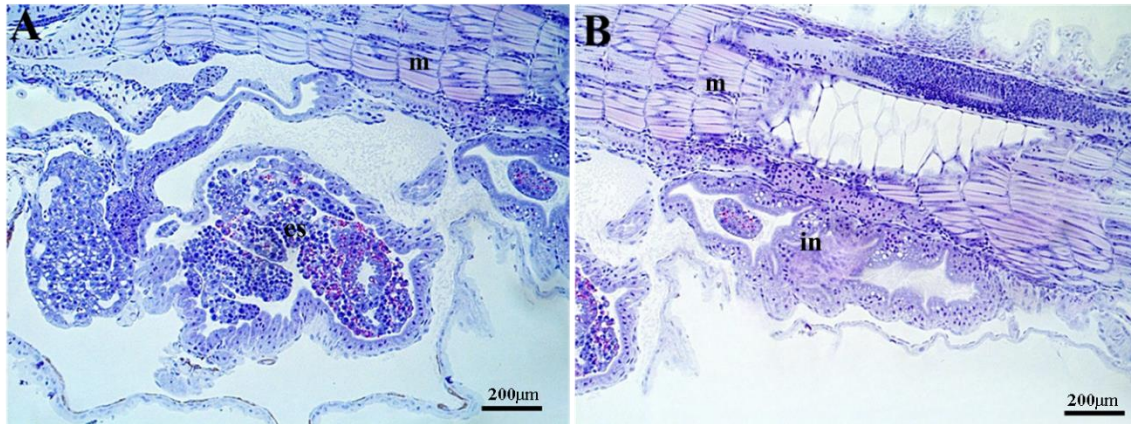
Figura 22. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 72 horas após a eclosão. Legendas: es: estômago; m: miômeros; in: intestino e hashtag: barbilhões.



Fonte: Próprio autor.

Nesta fase de desenvolvimento, notou-se muitos miômeros formando a musculatura dessas larvas, o estômago estava com suas estruturas mais desenvolvidas, assim como no intestino, que foram observadas vilosidades (Figs.23A; 23B).

Figura 23. Histologia da larva 72 horas após a eclosão (3º dia de desenvolvimento). A - Estômago e B – Intestino. Legendas: es: estômago; in: intestino e seta: musculatura.

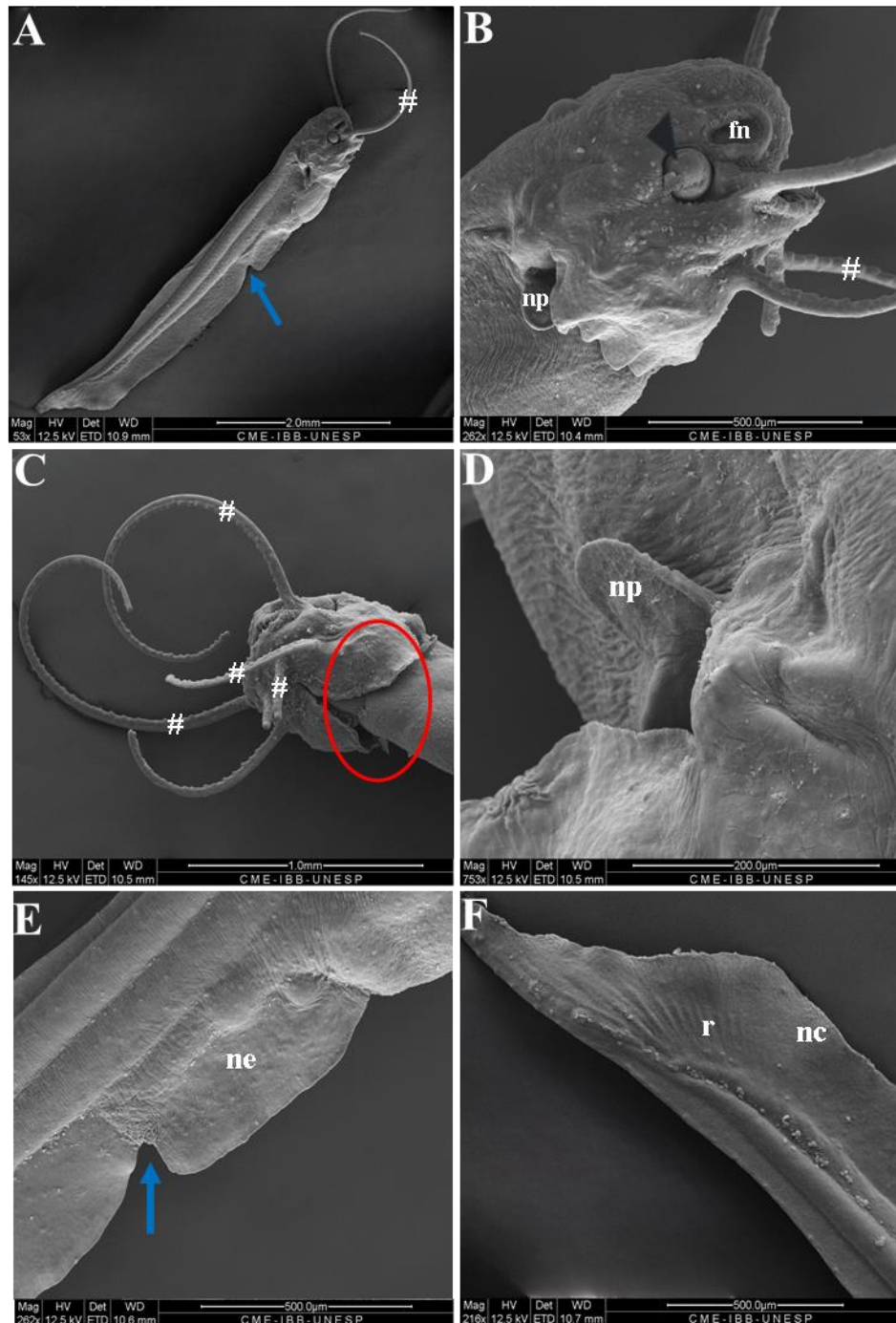


Fonte: Próprio autor.

4.6.7 84 horas após a eclosão

Após 84 horas de desenvolvimento, a larva estava maior, passando a ter $5439,6 \pm 61 \mu\text{m}$ de comprimento (Fig.24A) e a fosseta nasal começou a fechar-se (Fig.24B). O opérculo estava bem formado (Fig.24C) e a nadadeira pélvica (Fig.24D), a nadadeira embrionária (Fig.24E) e os raios da nadadeira caudal (Fig.24F) eram mais visíveis.

Figura 24. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 84 horas após a eclosão. A - Larva; B - região da cabeça; C - barbilhões; D - nadadeira pélvica; E - nadadeira embrionária e F - nadadeira caudal. Legendas: fn: fosseta nasal; Ponta de seta: vesícula óptica; Hashtag: barbilhões; Círculo: opérculo; np: nadadeira pélvica; nc: nadadeira cudal; ne: nadadeira embrionária; Seta: ânus e r: raios da nadadeira caudal.

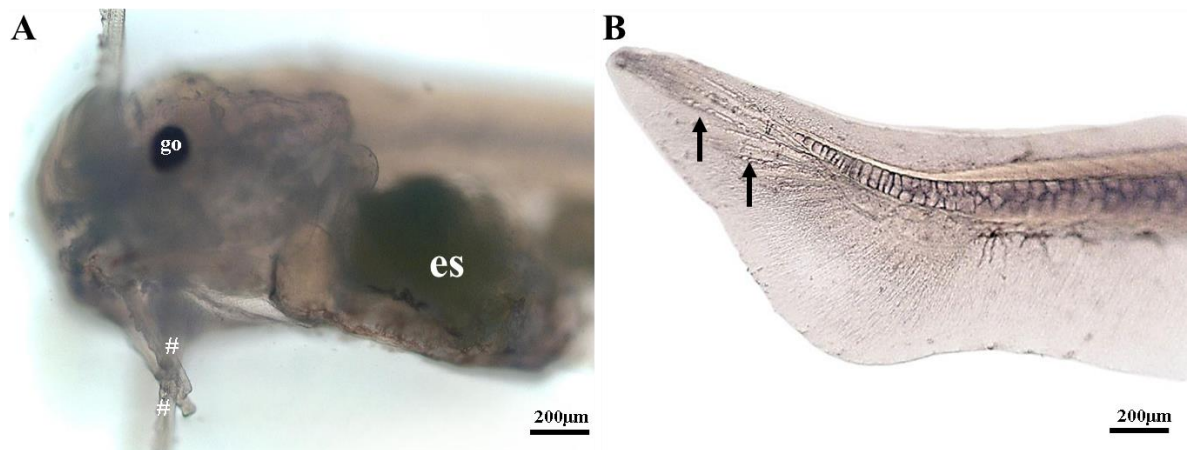


Fonte: Próprio autor.

4.6.8 96 horas após a eclosão

Com 96 horas de desenvolvimento foi observado o aumento no comprimento do terceiro par de barbilhões, o estômago estava bem cheio de alimentos (artêmia) na qual teve seu início no terceiro dia, assim como o intestino (Fig.25A) e os raios da nadadeira caudal mais visíveis (Fig.25B).

Figura 25. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 96 horas após a eclosão. Legendas: hashtag: barbilhões; es: estômago; go: globo ocular e setas: raios da nadadeira caudal.

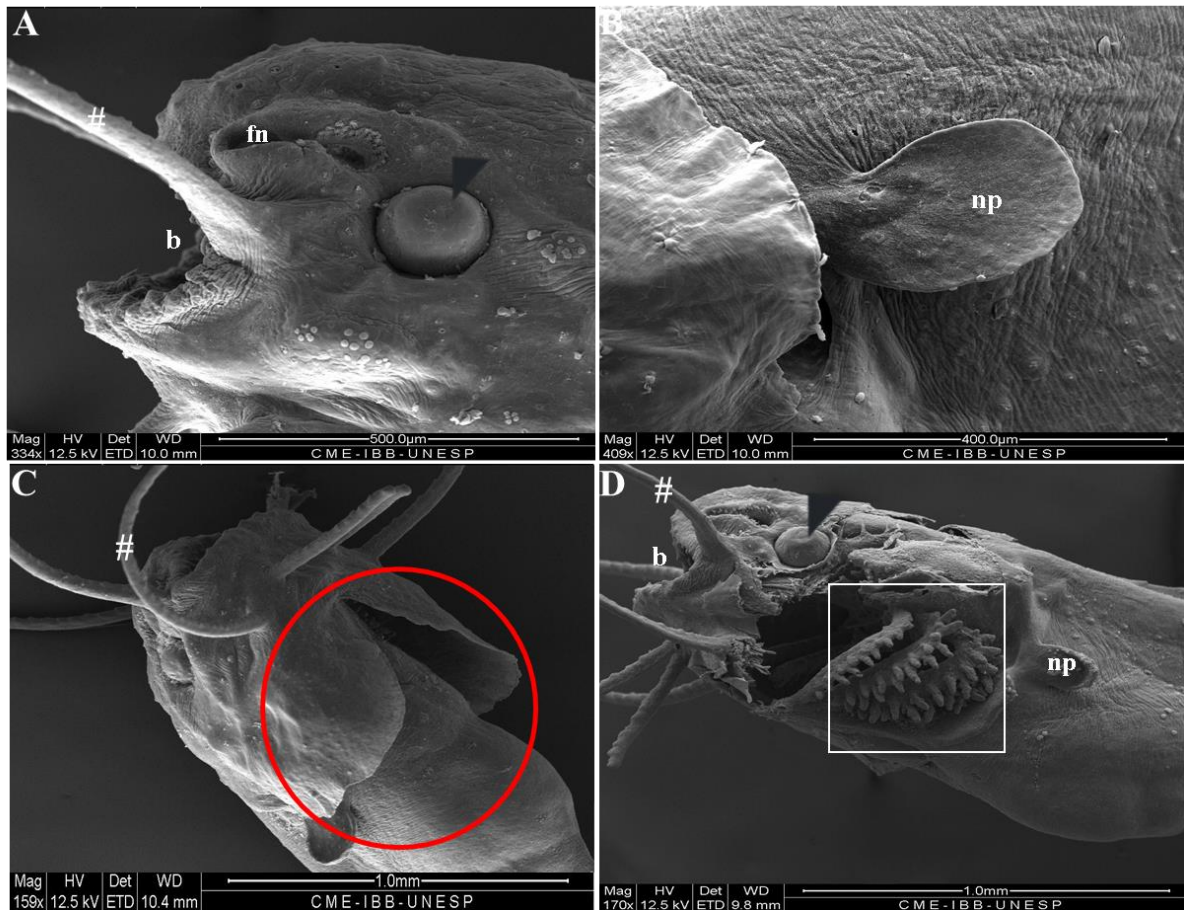


Fonte: Próprio autor.

4.6.9 108 horas após a eclosão

Nesta fase, foi observada que a fosseta nasal estava quase fechada, a boca com vários dentes e o globo ocular bem formado (Fig.26A) passando a ter diâmetro de $216,3 \pm 20,8 \mu\text{m}$ e altura de $223,3 \pm 27,9 \mu\text{m}$. A nadadeira pélvica já estava com um formato mais adequado a estrutura (Fig.26B) e foi possível visualizar o opérculo (Fig.26C) e os arcos branquiais bem desenvolvidos (Fig.26D).

Figura 26. Larvas do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 108 horas após a eclosão. A - Estruturas da cabeça em desenvolvimento; B - Nadadeira pélvica; C- Opérculo; D - Brânquias com arcos branquiais. Legendas: fn: fosseta nasal; Ponta de seta: globo ocular; b: boca; np: nadadeira peitoral; Círculo: opérculo; hashtag: barbilhões e setas: arcos e filamentos branquiais.



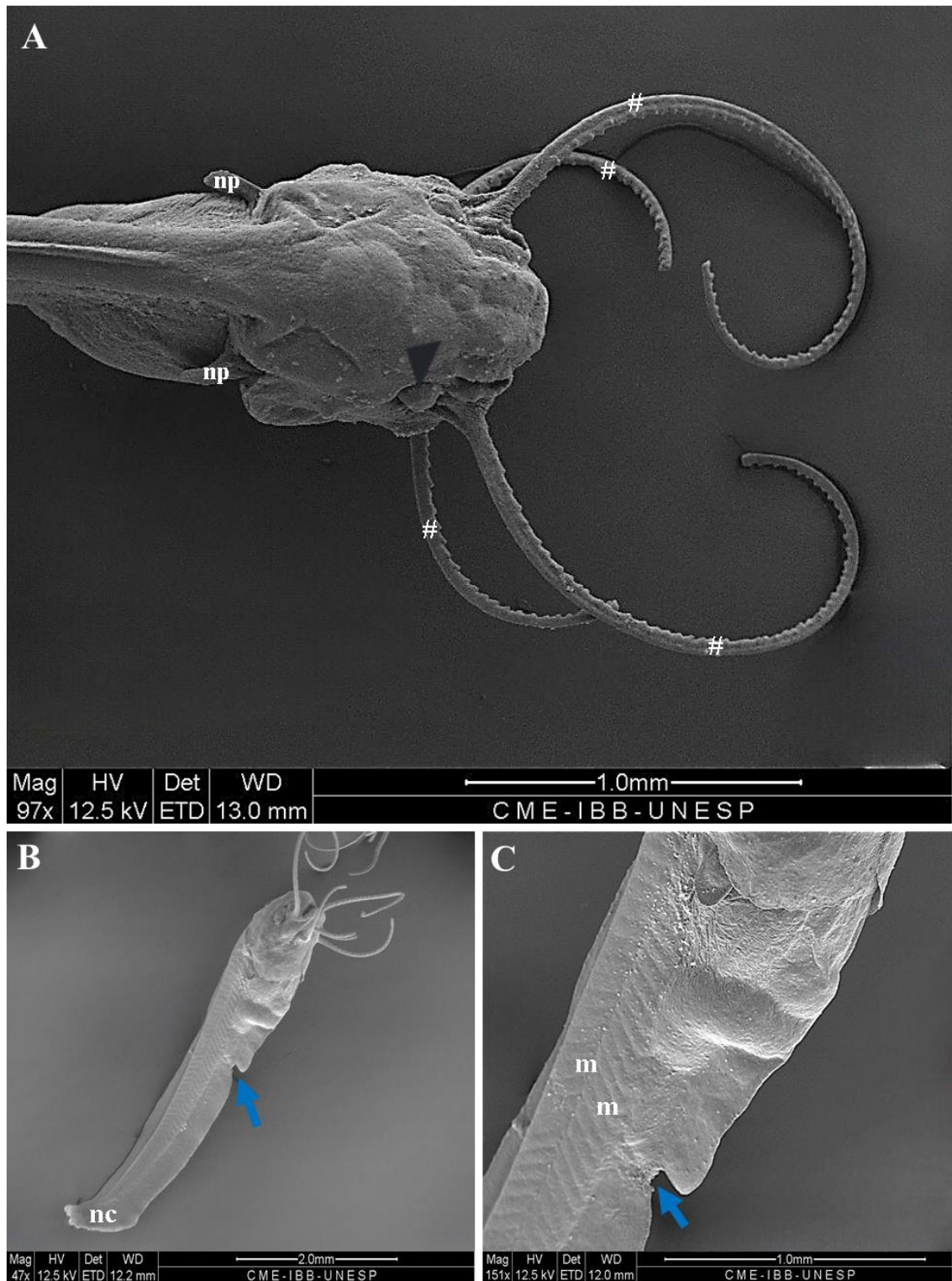
Fonte: Próprio autor.

4.6.10 120h após a eclosão

No quinto dia, os barbilhões e os olhos estavam maiores, sendo a média do diâmetro dos olhos de $231,8 \pm 22,8 \mu\text{m}$ altura $228,4 \pm 26,4 \mu\text{m}$ além de também ser visível maior desenvolvimento do estômago, intestino e ânus. Observou-se também o aumento no comprimento da larva que passou a medir $7863 \pm 171,2 \mu\text{m}$.

Ultraestruturalmente foi observado que os barbilhões se apresentaram bem mais longos, densos e curvados (Fig.27A), enquanto o corpo apresentava aspecto mais alongado (Fig.27B), em que os miômeros se destacavam (Fig.27C).

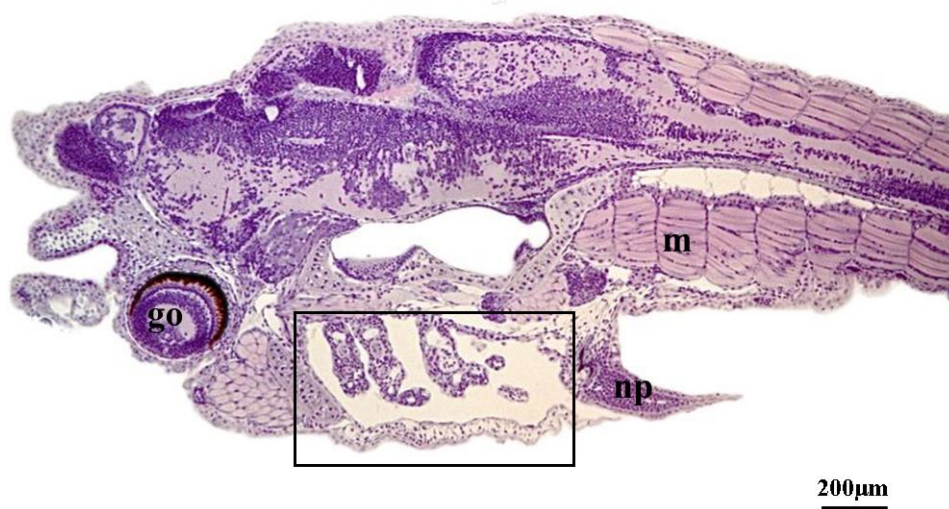
Figura 27. Larva do híbrido proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmea de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum* 120 horas após a eclosão. A - Região da cabeça; B - Larva e C - Miômeros. Legendas: Ponta de seta: globo ocular; hashtag: barbilhões; np: nadadeira peitoral; m: musculatura e seta: ânus.



Fonte: Próprio autor.

Por meio da análise histológica foi observado que o olho apresentou o globo ocular bem formado já mais adequado à estrutura e as brânquias apresentaram vários filamentos branquiais. Além disso, foi possível visualizar a musculatura bem formada (Fig. 28).

Figura 28. Histologia da larva 120 horas pós eclosão (5º dia de desenvolvimento). Legendas: go: globo ocular; Retângulo: brânquias com arcos e filamentos branquiais; m: musculatura e np: nadadeira peitoral

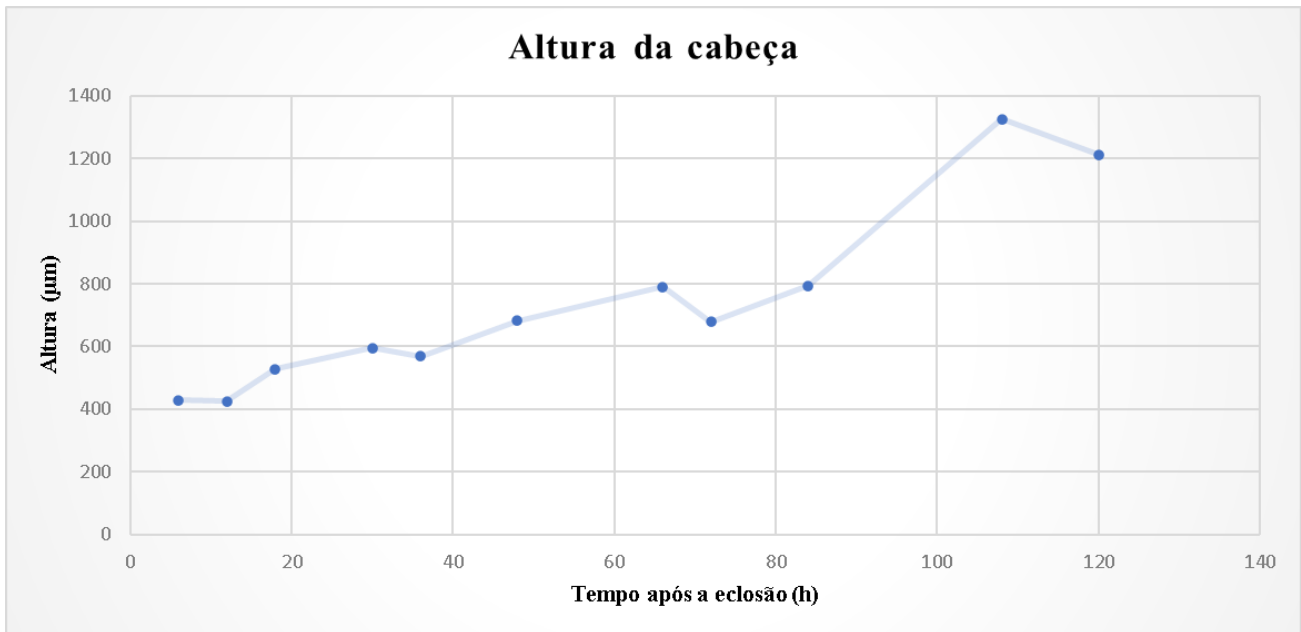


Fonte: Próprio autor.

4.7 Gráficos das medições dos embriões e larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *Leiarius marmoratus* com machos *Pseudoplatystoma reticulatum*

A altura da cabeça das larvas aumentou de acordo com o seu desenvolvimento, chegando a atingir 1200µm na última coleta, ocorrida após 120 horas de desenvolvimento, havendo uma diferença de 783,16µm quando comparada com a média das larvas 6 horas após a eclosão, podendo ser observado abaixo (Fig.29).

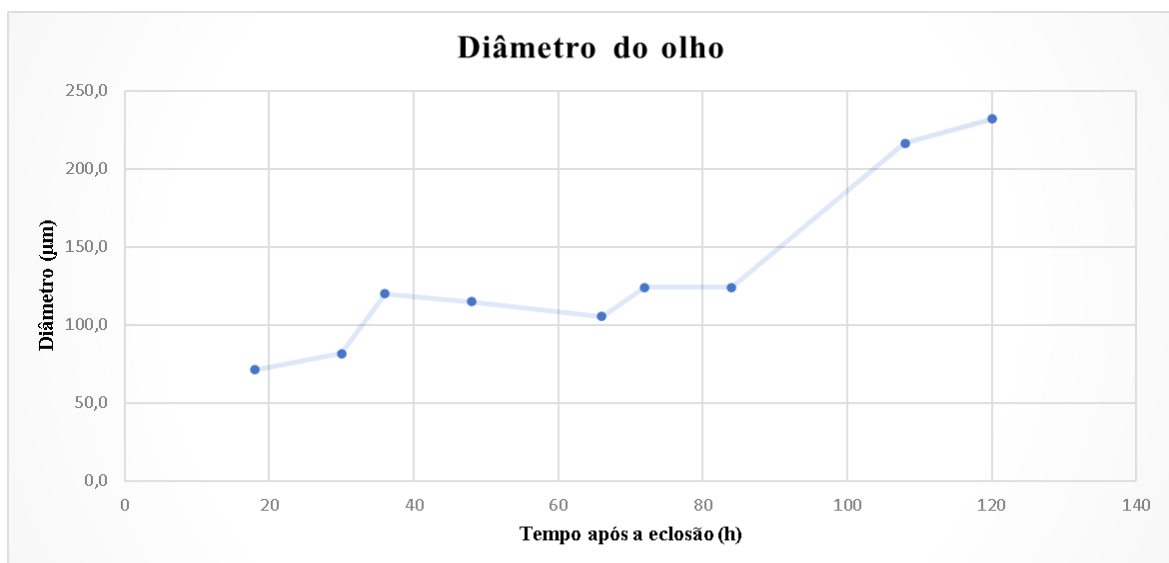
Figura 29. Médias das alturas das cabeças das larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum* em micrômetros



Fonte: Próprio autor.

Ao longo do desenvolvimento, o diâmetro dos olhos das larvas teve um aumento de 160,6µm observado no período entre 18 horas após a eclosão das larvas até 120 horas após a eclosão, a qual foi a última coleta (Fig. 30).

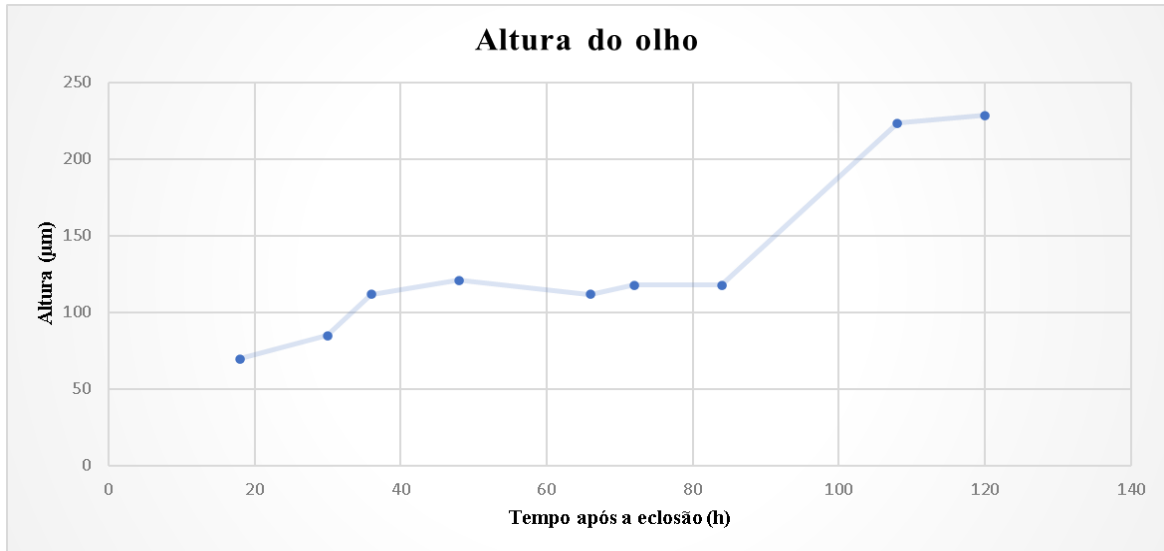
Figura 30. Médias dos diâmetros dos olhos das larvas proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum* em micrômetros



Fonte: Próprio autor.

Na figura abaixo pode-se observar o aumento na altura dos olhos ao longo do desenvolvimento das larvas (Fig. 31).

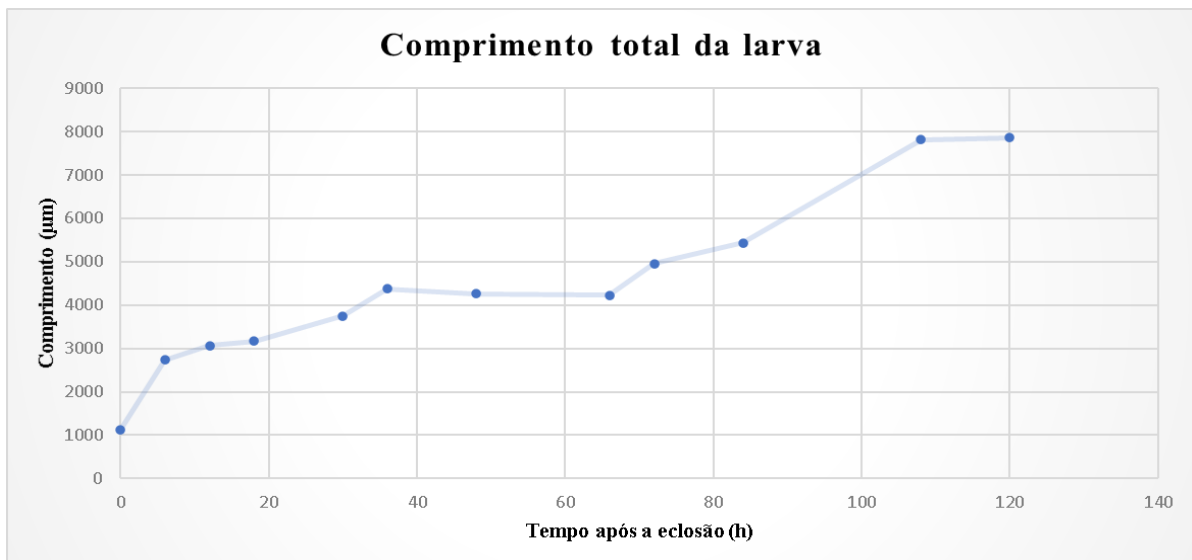
Figura 31. Médias das alturas dos olhos das larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum* em micrômetros



Fonte: Próprio autor.

Pôde-se observar houve uma diferença de 6735,6 µm no comprimento total das larvas do momento da eclosão até às 120 horas de desenvolvimento, podendo visualizar melhor na figura abaixo (Fig.32).

Figura 32. Médias dos comprimentos totais das larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum* em micrômetros



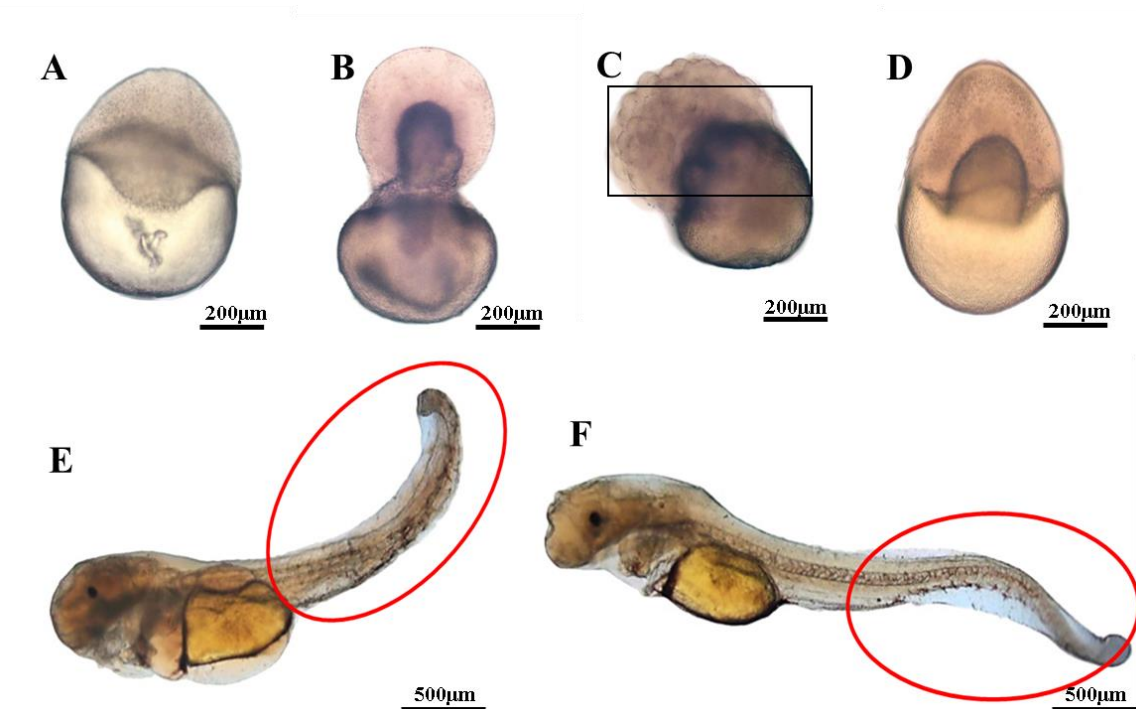
Fonte: Próprio autor.

4.8 Embriões e larvas provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum* com desenvolvimentos anormais

Durante o período de desenvolvimento embrionário, foram observados não fertilizados e embriões com desenvolvimentos anormais (Fig. 33A à 33D). Além disso, também foram observadas larvas com desenvolvimento anormal, apresentando a coluna e a cauda curva (Fig. 33E) e coluna em “s” (Fig. 33F).

Figura 33. Malformações no desenvolvimento ontogenético dos embriões e larvas dos híbridos provenientes do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos *P. reticulatum*. Legendas: A- 0,75h de desenvolvimento; B - 1h15 min. de desenvolvimento; C - 1h30min. de desenvolvimento; E e F - Larvas 24h após a eclosão.

Legendas: quadrado: blastoderme torta e Círculo: cauda com deformidade.



Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

O período de desenvolvimento do híbrido JC foi de 13 horas sob temperatura de 27,98°C para o presente estudo. Já o período de desenvolvimento embrionário dos parentais do híbrido JC, *L. marmoratus*, desde a fertilização até a eclosão da larva foi de 14 horas sob temperatura média de 28,3 °C e 12h 30 min sob a temperatura de 27,98 °C (Almeida, 2011; Oliveira, 2013; Mira-Lopes, 2014). Para *P. reticulatum* o período de desenvolvimento desde a fertilização à eclosão foi de 14 horas, sob a temperatura média de 28,2°C (Andrade, 2013).

Os estágios de desenvolvimento embrionário estabelecidos para o híbrido JC, foram: zigoto, clivagem, gástrula, organogênese e eclosão, além disso não foi identificada gota de óleo na vesícula vitelina. Estes estágios descritos para o presente estudo, foram semelhantes aos de seu parental *L. marmoratus*, além disso, os ovos de *L. marmoratus* são esféricos, amarelados e demersais e não apresentaram gotas de óleo no saco vitelino durante todo o desenvolvimento do embrião (Oliveira-Almeida, *et. al.*, 2014), para o desenvolvimento de *P. reticulatum* não foi relatado (Andrade, 2013). Portanto a gota de óleo é uma característica que pode ser um fator comum para estas espécies, que não interfere no desenvolvimento do animal.

Para o estudo do híbrido JC não foi observado apêndices em suas cascas, logo a classificação do mesmo foi dada como liso, então este híbrido provavelmente realiza migrações para se reproduzir. Pois os peixes de piracema, os animais migram em sentido aos locais de reprodução, a superfície de sua casca lisa facilita que os ovos sejam transportados rio abaixo. Para as espécies que não realizam essa migração para a reprodução, a casca possui externamente delicados apêndices que a tornam áspera e permitem ao ovo utilizar-se de distintas estratégias para a sobrevivência do embrião (Godinho, 2003).

Para estudo do híbrido inverso do JC, foram identificados grânulos de vitelo no polo animal, também de forma fragmentada (Oliveira, 2013). Assim como para o híbrido JC foi identificado semelhante, no qual o vitelo entra no polo animal fragmentado, de forma a nutrir o embrião ao longo do seu desenvolvimento, sendo um aspecto essencial.

No estudo realizado com o híbrido proveniente da fêmea de *P. reticulatum* e do macho de *L. marmoratus*, (cachadia) híbrido inverso do JC o desenvolvimento teve duração de 13 horas sob a temperatura de 28,16±0,12µm°C até a eclosão das larvas. O estágio de clivagem com 2 blastômeros ocorreu de 30 a 40 minutos de desenvolvimento e o estágio de gástrula após 220 minutos, além disso, foram identificados muitos ovos gorados, o que gerou uma baixa taxa de fertilização, o mesmo ocorreu para os parentais *L. marmoratus* e *P. reticulatum* (Oliveira, 2013). Apesar de o período de desenvolvimento para o híbrido JC ter sido semelhante sob

temperatura muito próxima, alguns estágios, como os citados acima ocorreram em um tempo menor. Assim como também foram identificados em quase todas as etapas de desenvolvimento dele ovos gorados, podendo este fator estar ligado com as condições genéticas ou até mesmo a qualidade dos oócitos que apesar de ter observado vários embriões com anomalias, nos estudos analisados de seus parentais não foram abordados sobre este aspecto, embora seja comum.

A heterogeneidade se fez presente em vários estágios de desenvolvimento do híbrido JC, uma característica comum, também identificada por outros autores, como para os embriões de híbridos cachadia e para *L. marmoratus* (Oliveira, 2013) *Prochilatus lineatus* (Ninhaus-Silveira; Foresti; Azevedo, 2006), *Steindachneridion parahybaeform* (Honji *et. al.*, 2012).

Os cromatóforos das larvas do híbrido JC se agrupavam nas regiões anteriores e posteriores do saco vitelino e algumas dispersas na região ventral do corpo, da mesma forma foi identificado para *L. marmoratus*, que apresentou um padrão de distribuição semelhante, além disso a absorção do saco vitelino se deu no terceiro dia após a eclosão (Coelho, *et. al.*, 2018), o que também foi observado para o híbrido JC, pois no terceiro dia já não foi mais identificado o saco vitelino, já havendo o estômago desenvolvido.

O padrão de pigmentação de *P. reticulatum*, e do híbrido cachadia, logo após a eclosão foi semelhante, sendo o padrão de coloração das larvas de grande importância já que é um dos fatores que auxiliam na distinção dos híbridos com seus parentais, evitando até mesmo fraudes no intercâmbio comercial de larvas dessas espécies (Oliveira, 2013; Coelho *et. al.*, 2021).

Os peixes provenientes do cruzamento deste estudo apresentaram três pares de barbilhões, sendo um par deles localizado abaixo da boca. A presença de barbilhões sensoriais localizados abaixo da boca indicio de que o peixe “fareja” seu alimento se movimentando sobre o substrato, sendo descrito para bagres. Os barbilhões são de grande importância, eles apresentam células sensoriais que ajudam na localização de alimento sobre o fundo (Bemvenuti; Fisher, 2010).

Quanto à funcionalidade do sistema digestivo como a boca e o intestino, no jundiara foi semelhante ao encontrado para *L. marmoratus*, identificada quando foi absorvida toda a reserva vitelina, na transição entre estágio vitelino e a pré-flexão, junto com o fim do consumo do vitelo e início da alimentação exógena (Coelho, *et. al.*, 2018).

O comprimento total da larva do parental *L. marmoratus* foi de 2160 micrômetros até aproximadamente 7773 micrômetros (Coelho, *et. al.*, 2018) semelhante ao do híbrido jundiara, que partiu de 1127,60 e foi até 7863,2 micrômetros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio desta pesquisa foi possível concluir que o desenvolvimento embrionário do híbrido jundiara proveniente do cruzamento interespecífico entre fêmeas de *L. marmoratus* com machos de *P. reticulatum* ocorreu em um período de desenvolvimento semelhante ao encontrado em estudos de seus parentais *L. marmoratus* e *P. reticulatum*, assim como também para o híbrido inverso, proveniente das fêmeas de *P. reticulatum* com machos de *L. marmoratus*, sob temperaturas semelhantes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. S.; E. ANDRADE, E.A.; FELIZARDO, V. O., DANIELLA, A. P.; VERAS, G. C.; MURGAS, L. D. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, p. 195-201, 2015.
- ARAÚJO, M. O.; SILVA, C. M.; GARCIA, S. G.; SOUTO, C. N. Análise econômica da produção do híbrido jundiara (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) em diferentes cenários de produção. In: Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar, 5.; Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar, 3.; Feira de Empreendedorismo, 2., 2021, Mineiros. **Anais[...]** Mineiros: UNIFIMES, 2021. p.1-6
- ALEXANDRE, J. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; BUZOLLO, H.; SENHORINI, J. A.; CHAGURI, M. P. Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Zygote**, Cambridge, v. 18, p. 173-183, 2010.
- ALMEIDA, I. R. O. **Análise do desenvolvimento embrionário de espécimes provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus***. 2011. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- ALMEIDA, T. R. **Desempenho de juvenis de pintado-da-Amazônia (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.
- ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G. **Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014. Publicação seriada.
- ANDRADE, F. F. **Caracterização do desenvolvimento inicial do Cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.
- ARANTES, F. P.; SANTOS, J. E.; BAZZOLI, N. Invasão, colonização e atividade reprodutiva de um bagre de grande porte híbrido no Rio Paraopeba, bacia do Rio São Francisco, Brasil. **Conexão Ciência**, Formiga, v. 12, p. 85-91, 2017.
- BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R.; FREITAS, R. T. F. Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 149-155, 2004.
- BEMVENUTI, M. A.; FISCHER, L. G. Peixes: morfologia e adaptações. **Cadernos de Ecologia Aquática**, Carreiros, v. 5, n. 2, p. 31-54, 2010.
- BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A.; FREITAS, J. M. A.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A. Nutrição de peixes nativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, p. 145-154, 2011.

BOTERO, M.; FRESNEDA, A.; MONTOYA, A. F.; ÁNGEL, M. O. Descripción del desarrollo embrionario de zigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 17, p. 38-45, 2004.

BUZOLLO, H.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; OLIVEIRA-ALMEIDA, I. R.; ALEXANDRE, J. S.; OKUDA, H. T.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 9, n.3, p. 601-616, 2011.

COELHO, G. C. Z. **Caracterização e transplante de células germinativas primordiais em peixes neotrópicos**. 2021. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

COELHO, G. C. Z.; COSTA, R. S.; BASHIYOY-SILVA, C. B.; SOUZA, F. M. S.; RIBEIRO, D. C. SENHORINI, J.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Caracterização da ontogenia inicial de *Leiarius marmoratus* (GILL, 1870): larvas a juvenis. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, 2018.

COELHO, G. C. Z.; COSTA, R. S.; PORTO-FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Comparative post-hatching ontogen of *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann Eigemann 1889) and *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) and their hybrid. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v.37, n.2, 2021.

COSTA, R. B.; CARVALHO, M. A. M.; SALES, R. O.; FARIAS, J. O. Os peixes híbridos e sua fragilidade reprodutiva. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, p. 187-202, 2014.

DELLA FLORA, M. A.; MASCHKE, F.; FERREIRA, C. C.; PEDRON, F. A. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n.1, p. 7-14, 2010.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; MARQUES, C.; MAKINO, L. C.; 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**, Maringa, v. 29, n.1, p. 49-55, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of the world fisheries and aquaculture: towards blue transformation**. Rome: FAO 2022.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture: sustainability in action**. Rome: FAO 2020.

GIL, *Leiarius marmoratus*. 1870. In: FROESE, R.; PAULY D. **FISHBASE: world wide web electronic publication**. [s.l.]: FISHBASE, 2024. Disponível em: <https://www.fishbase.se/summary/Leiarius-marmoratus.html>. Acesso em: 15 mar. 2022a.

EIGENMANN; EIGENMANN. *Pseudoplatystoma reticulatum*. 1889. In: FROESE, R.; PAULY D. **FISHBASE**: world wide web electronic publication. [s.l.]: FISHBASE, 2024. Disponível em: <https://www.fishbase.se/summary/Pseudoplatystoma-reticulatum.html>. Acesso em: 14 abr. 2022b.

GOMES, B.V.C.; SCARPELLI, R. S.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, Chichester v. 70, p. 1412-1429, 2007.

GODINHO, A. L. **O ovo dos peixes e sua casca engenhosa**. Belo horizonte: Peixes e Pesca no rio São Francisco, 2003. Disponível em: <http://www.sfrancisco.bio.br/aspbio/ovopeixes.html>. Acesso em: 18 abr. 2024.

GUERREIRO, L. J.; STREIT JR, D. P.; ROTTA, M. A. Economic and cost analysis in producing fingerlings unit of Brazilian reophilic fish. **Custos e agronegócio**, Recife, v. 11, n. 4, p. 377-399, 2015.

HILSDORF, A. W. S.; ORFÃO, L. H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. supl., pág. 317-324, 2011.

HONJI, R. M. *et al.* Embryonic development and larval stages of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae): implications for the conservation and rearing of this endangered Neotropical species. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 10, p. 313-327, 2012.

ISAÚ, Z.; RIZZO, E.; AMARAL, T.; MOURAD, N.; VIVEIROS, A. Structural analysis of oocytes, post-fertilization events and embryonic development of the Brazilian endangered teleost *Brycon insignis* (Characiformes). **Zygote**, Cambridge, v. 21, p. 85-94, 2011.

JARAMILLO, R.; GOICOECHEA, O.; GARRIDO, O.; MOLINARI, E. *Salmo salar*: morfología ultraestructural de la pared del corion en ovas normales y con problemas de eclosión. **Archivos de medicina veterinaria**, Valdivia, v. 41, p. 67-71, 2009.

KUBITZA, F.; ONO, E. A.; CAMPOS, J. L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 14-23, 2007.

LIMA, A. F.; BERGAMIN, G. T.; MORO, G. V. Engorda de peixe. In: RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. (Ed.). **Piscicultura de água doce**: multiplicando conhecimentos. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap. 10. p. 347-377.

LEITE, L. V.; MELO, M. A. P.; OLIVEIRA, F. C. E.; PINHEIRO, J. P. S.; CAMPELLO, C. C.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, p. 421-429, 2013.

LUNDSTEDT, L. M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia.** 2003. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 2003.

MARQUES, C.; OKADA-NAKAGHI, L. S.; FAUSTINO, F.; GANECO, L. N.; SENHORINI, J. A. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy **Zygote**, Cambridge, v. 16, n.4, p. 333-342, 2008.

MIRA-LÓPEZ, T. M. **Reprodução induzida e desenvolvimento inicial do Jundiá *Leiarius marmoratus* (Pisces: Siluridae).** 2014. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

NARAHARA, M.Y.; BASILE-MARTINS, M. A.; GODINHO, H. M.; CIPÓLLI, M. N. Escala de maturidade época de reprodução e influência de fatores abióticos sobre o desenvolvimento gonadal de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 15, p. 201-211, 1988.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 14, p. 217-229, 2006.

NUNES, L. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; REIS, F. Y. T.; NERES, R. W. P.; SILVA, S. Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 42, n.1, p. 15-21, 2018.

OLIVEIRA, F. G.; BIALETZKI, A.; GOMES, L. C.; SANTIN, M.; TAGUTI, T. L. Desenvolvimento larval de *Brycon hilarii* (Characiformes, Characidae). **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 102, p. 62-70, 2012.

OLIVEIRA, D. **Fase embrionário e larval do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e do parental *Leiarius marmoratus*.** Dissertação. Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

OLIVEIRA-ALMEIDA, I.; BUZOLLO, H.; COSTA, R.; VERÍSSIMO- SILVEIRA, R.; PORTO-FORESTI, F.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Structural analysis of embryogenesis of *Leiarius marmoratus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Zygote**, Cambridge, v. 23, n.5, p. 742-757. 2014.

PAES, M. C. F. **Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831).** Dissertação. Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

PEIXES BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2020.** São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura, 2020.

QUINTANEIRO, C.; GAGLIARDI, M.; CAPONE, L.; DOMINGUES, I. Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. **Revista captar: ciência e ambiente para todos**, Aveiro, v. 11, p. 1-20, 2022.

RESENDE, E. K.; CATELLA, A. C.; NASCIMENTO, F. L.; PALMEIRA, S. S.; PEREIRA, R. A. C.; LIMA, M. S.; ALMEIDA, V. L. **Biologia do Curimbatá (*Prochilodus lineatus*), Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do Rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1995. 75p. (EMBRAPA-CPAP. Boletim de Pesquisa, 02).

RIBEIRO, H. J.; PROCÓPIO M. S.; GOMES, J. M. M.; VIEIRA, F. O.; RUSSO, R. C.; BALZUWEIT, K.; CHIARINI-GARCIA, H.; CASTRO, A. C. S.; RIZZO, E.; CORRÊA-JUNIOR, J D. Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 346, p. 417-425, 2011.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Stages of embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n.1, p. 27-32, 2001.

SAMPAIO, K. H. **Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SANCHES, P. V.; GARTNER, Gilmar B.; BIALETZKI A.; SUIBERTO, M. R.; GOMES, F. D. C.; NAKATANI, K.; BARBOSA, D. C. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 23, p. 383-389, 2001.

SANTOS, G.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: Editora Pro-Várzea, 2006.144 p.

VALENTI, W. C. BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI R. O. Aquicultura no Brasil: uma indústria de 1 bilhão de dólares. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 34-49, 2021.

WEBER, V. GODOY, R. S.; HOFFMANN, P.H.O.; LANÉS, L. E. K.; VOLCAN, M.; MALTCHIK, L. Uma abordagem preliminar ao desenvolvimento embrionário de *Austrolebias wolterstorffi*, uma espécie de peixe anual neotropical ameaçada de extinção. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 83, p. e271218, 2023.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. E. **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. Wallingfor Oxon; CABI Publishing, 2002. 418 p.