

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA IDADE DAS MATRIZES DE TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus*
NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL.**

**Fernanda Nogueira Valentin
Biomédica**

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Março de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA IDADE DAS MATRIZES DE TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus*
NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL.**

Fernanda Nogueira Valentin

Orientadora: Prof^a. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura – Área de Concentração em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Março de 2007



*Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
Eu nada sei
Conhecer as manhãs e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso o amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir.
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha, ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
Estrada eu sou
Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, e o outro vai embora.
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
De ser feliz.*

*Tocando em Frente
Almir Sater & Renato Teixeira*

Dedicatória

*Aos meus pais
Jaime e Elídia
E meu irmão Marcelo*

Pelo amor incondicional da minha família, que sempre tornou minhas tristezas menos intensas e minhas alegrias mais duradouras nesta grande jornada que é a vida. Seus ensinamentos sempre encontrarão lugar em meu coração.

*A minha avozinha
Delmira*

Por manter a família sempre unida

*Aos meus queridos afilhados
Otávio, Jaime Neto e Cauã*

Pela inocência e pureza de seus corações... Que por muitos momentos adoçaram minha vida, deixando-a mais leve e alegre.

*A minha Orientadora
Prof. Dra Laura Satiko Okada Nakaghi*

Há alguns anos ao ser aceita no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, encontrei a Pesquisadora, que me ensinou o método. Algum tempo mais tarde, conheci a Humana que me falou sobre a vida. Hoje, ao vê-la, encontro a Amiga, que me pergunta o que penso. Os três merecem minha admiração, respeito e eterna gratidão.

“Toda vitória é alcançada com luta e sofrimento. Porém, a luta passa. O sofrimento é apenas temporário, mas a vitória que se consegue é para sempre”.

(Luciana N. Ganeco)

Homenagem

À

Prof. Dra Laura Satiko Okada Nakaghi

Pela dedicação e ensinamentos transmitidos com segurança, essenciais ao bom desenvolvimento deste trabalho, e pelas experiências acadêmico-científicas que, certamente, serão de grande valia em minha carreira. Agradeço a confiança em mim depositada, a atenção e compreensão.

“Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria. Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é só aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas aquele que também questiona e desperta para a realidade. Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo. Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da UNESP – CAUNESP, por possibilitar o crescimento acadêmico e intelectual voltado à Aqüicultura em Águas Continentais.

A todos professores que ministraram disciplina junto ao curso de Pós-Graduação do CAUNESP, por compartilharem conhecimentos e experiências.

À Prof. Dra Irene Bastos Franceschini Vicentini, pelas valiosas sugestões ao meu trabalho no momento da qualificação.

À Prof. Dra Tereza Cristina Ribeiro Dias Koberstein, por ter disponibilizado o setor de Tilapicultura do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP) e também pelas importantes sugestões dadas na ocasião da qualificação e defesa.

À Prof. Dra Heid Sueli Leme dos Santos, por participar da defesa e também pelas suas sugestões enriquecedoras que serão de grande valia no meu aprendizado. Pela sua amizade, humildade e companheirismo que guardarei por toda vida e sempre no meu coração.

Ao Prof. João Batista K. Fernandes e à prof. Lúcia Sipaúba Tavares, pelo empréstimo de equipamentos utilizados nas análises de água.

Aos técnicos e funcionários do CAUNESP: Márcio e Sílvia, que auxiliaram nos trabalhos de campo e por nunca ter deixado de ajudar durante alguns imprevistos. Também a Veralice, Fátima, Dona Ana e todos o outros, que contribuíram para direcionar, facilitar e tornar viável o cotidiano caunespiano.

Ao Camilo Prieto pela sua imensa dedicação e cumplicidade durante o experimento, meus sinceros agradecimentos.

A todos meus amigos do CAUNESP, nos quais de alguma forma contribuíram e estiveram presentes em minha vida de mestranda, e em especial ao Munir que colaborou com sua amizade, companheirismo e incentivo.

Ao Histotécnico Orandi Mateus, do Lab. De Histologia e Embriologia do Depto de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV-UNESP Jaboticabal), pela convivência agradável e sua inestimável presteza.

Aos técnicos do Lab. de Microscopia Eletrônica da FCAV-UNESP Jaboticabal, Cláudia Aparecida Rodrigues (Claudinha) e Antônio Carlos Homem (Carlinhos) pela atenção e auxílio no processamento das amostras de microscopia eletrônica.

Aos colegas do Laboratório de Histologia e Embriologia (FCAV-UNESP Jaboticabal), Camila, Érico, Francine, Lílian, Maria do Carmo, Verônica, cada qual com suas qualidades tornaram não só colegas, mas com certeza amigos que guardarei por toda existência. A vocês, minha eterna gratidão.

À república Balalaika, que me acolheu durante todo tempo que passei em Jaboticabal, obrigada de coração a todas as meninas (Camila, Francine, Louise, Maria do Carmo, Michele) que hoje se tornaram grandes amigas! Amigas de todos os momentos... Nas horas de estudo, de trabalho, de sufoco, de puxão de orelha, de diversão, até mesmo amigas de confidências, como nossas mesas redondas, de manhã e a tardezinha... lembra? Onde passamos horas divertidíssimas e hilárias.

Às minhas amigas do Laboratório de Solo – Sindicato Rural de Guaíra, Idriele e Lucilene pelo companheirismo, apoio, compreensão e acima de tudo pela amizade sincera e duradoura... Minha mais sincera gratidão!

Às minhas grandes amigas Deise e Letícia pela amizade, irmandade, apoio incondicional e companheirismos que perdurará por toda eternidade!

Às minhas amigas de faculdade Luciana, Conceição e Márcia, pela amizade mantida desde os tempos de faculdade. Amizade esta que nem a distância separa... Passe o tempo que passar.

Às Grandes famílias Franco Nogueira e Valentin por todo o apoio e estímulos constantes.

À todos, o meu muito Obrigado !!!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 - INTRODUÇÃO.....	3
2 - OBJETIVOS.....	4
3 - REVISÃO DA LITERATURA.....	5
4 - MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 – Condições Ambientais.....	9
4.2 – Análises físico-químicas da água	9
4.3 - Seleção dos Reprodutores:.....	9
4.4 - Indução Hormonal	10
4.5 - Extrusão dos gametas.....	10
4.6 - Taxa de fecundidade por lote.....	11
4.7 - Taxa de fecundidade relativa	11
4.8 - Fertilização Artificial	11
4.9 - Taxa de eclosão	11
4.10 - Coleta dos ovos	12
4.11 - Observação em Estereomicroscópio, morfometria e microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)	12
4.12 - Análise Estatística.....	13
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5.1 - Parâmetros Limnológicos	14
5.2 - Desenvolvimento morfológico inicial	14
5.3 - Tamanho do Ovo.....	15
5.4 - Características na qualidade do ovo.....	17
5.4.1 - Fecundidade.....	17
5.4.2 - Taxa de fertilização e eclosão.....	19
5.5 - Fases do desenvolvimento embrionário em Estereomicroscópio	21
5.6 - Desenvolvimento embrionário em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)	32
6 – CONCLUSÃO	37
7 - REFERÊNCIAS.....	38

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Extrusão dos ovócitos (1A) e espermição do espermatozóide (1B) de <i>O. niloticus</i> .	10
Figura 2: Ovócito de <i>O. niloticus</i> com setas mostrando como foram feitas as medidas de Diâmetro Maior e Diâmetro Menor em mm.	12
Figura 3: Ovo de <i>Oreochromis niloticus</i> evidenciando formato ovóide e pequeno espaço perivitelino (seta branca)	15
Figura 4: Diâmetro dos ovos relacionados com a distribuição de tempos obtidos das fêmeas do grupo 1 e grupo 2 de tilápia do Nilo.....	16
Figura 5: Desenho do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas de <i>Oreochromis niloticus</i> . Fertilização à fase de mórula.....	23
Figura 6: Fotografia em estereomicroscópio do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas <i>Oreochromis niloticus</i> . Fertilização à fase de mórula. Aumento de 32x.	24
Figura 7: Desenho do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas de <i>Oreochromis niloticus</i> . Fase de mórula à esboço da cabeça.	25
Figura 8: Fotografia do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas de <i>Oreochromis niloticus</i> . Fase de mórula à esboço da cabeça. Aumento 32x.	26
Figura 9: Desenho desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas de <i>Oreochromis niloticus</i> no estágio de organogênese, larval e eclosão. Esboço de cabeça e início da pigmentação do vitelo à completa formação da larva e eclosão.	27
Figura 10: Fotografia do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas de <i>Oreochromis niloticus</i> no estágio de organogênese, larval e eclosão. Esboço de cabeça e início da pigmentação do vitelo à completa formação da larva e eclosão. Aumento 32x.	28
Figura 11: Eletromicrografia do desenvolvimento embrionário de <i>Oreochromis niloticus</i> . Extrusão à gástrula (25% de epibolia).	33
Figura 12: Eletromicrografia do desenvolvimento embrionário de <i>Oreochromis niloticus</i> . Gástrula (50% de epibolia) à cauda separada do vitelo e completa formação da larva.	34
Figura 13: Eletromicrografia do desenvolvimento embrionário de <i>Oreochromis niloticus</i> . Larva eclodida, região da notocorda e boca fechada da larva.	35

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: Valores do comprimento total das fêmeas (Comp. ♀), peso das fêmeas (Peso ♀), fecundidade por lote (F_L), fecundidade relativa (F_R), diâmetro médio de ovos (D.O.) e coeficiente de variação (CV%) das matrizes de tilápias do Nilo do grupo 1 e grupo 2.....	18
Tabela 2: Taxa de Fertilização e taxa de Eclosão das Fêmeas do grupo 1 e grupo 2 de tilápias do Nilo.	19
Tabela 3: Observações obtidas durante o desenvolvimento embrionário no presente estudo com outros trabalhos de <i>Oreochromis niloticus</i>	29

RESUMO

A tilápia é uma das espécies mais significativas para a piscicultura atual. Todo o conhecimento relativo à qualidade do ovo, pode melhorar as técnicas de reversão sexual, da qual depende o seu cultivo. Assim, a identificação estrutural dos eventos que ocorrem na reprodução induzida, fertilização e desenvolvimento embrionário, numa faixa de tempo conhecida, contribuirá para uma melhor compreensão da reprodução da tilápia do Nilo e será útil tanto no manejo como no controle da espécie. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da idade de matrizes sobre as taxas de fecundidade, de fertilidade e de eclosão, bem como sobre a morfometria, a morfologia estrutural e a ultra-estrutural dos ovos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), desde as primeiras clivagens até a eclosão. A reprodução induzida foi realizada em dois tratamentos: grupo 1 (2 a 3 anos) e grupo 2 (3 ½ a 4 anos), os exemplares eram pertencentes ao setor de Tilapicultura do Centro de Aqüicultura da Unesp. As amostras dos ovos foram coletadas nos tempos de extrusão, fertilização, 1 minuto, 45 minutos, 60 minutos, de 30 em 30 minutos até completar seis horas, depois de hora em hora até completar 24 horas. A partir daí, as coletas foram realizadas de seis em seis horas até a eclosão. Para observações em estereomicroscópio, morfometria dos ovos e microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, lavadas em tampão Cacodilato de Sódio e conservadas em álcool 70 %. Nos dois grupos estudados, o período embrionário se estendeu de 60 a 84 horas, desde a fertilização até a eclosão, a uma temperatura média de $30,4 \pm 0,75$ °C. Em relação ao tamanho dos ovos, não houve diferença significativa entre os dois grupos, apresentando diâmetro médio de 2,58mm e 2,57mm para os ovos do grupo 1 e 2, respectivamente. A análise de variância também não foi diferente no comprimento (25,86-27,10 cm) e peso da fêmea (317-385 g); diâmetro dos ovos relacionados com a fecundidade do lote (1198-1523), fecundidade relativa (3,76-3,96); taxa de fertilização (72,29-72,40) e de eclosão (54,29-60,00), respectivamente, para fêmeas do grupo 1 e 2. Em relação à observação em estereomicroscópio, foram evidenciados os estágios de clivagem, blástula, gástrula, segmentação, organogênese, larval e eclosão. Em microscopia eletrônica de varredura foram observadas características complementares às do estereomicroscópio, como por exemplo, a micrópila, a entrada do espermatozóide e diferenciação da região cefálica e caudal. Os parâmetros estudados na presente pesquisa, indicam que a idade das fêmeas dos dois grupos considerados: não influenciou a qualidade do ovo e nem o tempo de desenvolvimento embrionário.

Palavra-chave: tilápia, reprodução, idade, qualidade do ovo, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Tilapia is one of the most significant species for the fish crops nowadays. All the knowledge related to egg quality can increase the sexual reversion techniques, in which its cultivation is needed. Thus, the structural identification of the events that occur on the induced reproduction, fertilization, and embryo development, in a known time range, will contribute to a better comprehension of the reproduction of the Nile tilapia and will be useful either in the management as well as in the species control. The goal of this research was to analyze the effect of the matrix age on the fecundity, fertility and eclosion rates, as well as about the morphometry, structural and extra-structural morphology of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) eggs, since the first cleavage until the eclosion. The induced reproduction was performed in two treatments: group 1 (2 to 3 years old) and group 2 (3 ½ to 4 years old), the samples pertaining to the sector of Tilapia crop of the Center of Water Crops from Unesp (State University of São Paulo). The egg samples were collected in the periods of extrusion, fertilization, 1 minute, 45 minutes, 60 minutes, every 30 minutes until complete six hours, and after every one hour until complete 24 hours. From then, the collects were performed every six hours until eclosion. For the observation in stereomicroscopy, eggs morphometry, and scanning electronic microscopy the samples were fixed in a solution of Karnovsky, washed in cacodilate of sodium buffer and conserved in alcohol 70%. In both studied groups, the embryo period has extended from 60 to 84 hours, since fertilization until eclosion, in an average temperature of $30.4 \pm 0.75^{\circ}\text{C}$. When it comes to the eggs size, no significant differences between both groups were presented, showing an average diameter of 2.58mm and 2.57mm for the eggs in group 1 and 2, respectively. The variance analysis also was not different in length (25.86cm – 27.10 cm) and weight (317g – 385g) of the females; diameter of the eggs related to the fecundity of the samples (1198 – 1523), relative fecundity (3.76 – 3.96); fertilization rate (72.29 – 72.40) and eclosion rate (54.29 – 60.00), respectively for the females of group 1 and 2. According to the observation in stereomicroscopy, it was observed the stages of cleavage, blastula, gastrula, segmentation, organogenesis, larval and eclosion. In scanning electronic microscopy, it was observed complement features of the stereomicroscopy, as for instance, the micropyle, spermatozoon penetration, and differentiation of the head and tail region. The parameters studied in this research indicate that the age of the females in both studied groups has not influenced the egg quality nor the embryo development time.

Word-key: tilápia, reproduction, age, egg quality, embryo development.

1 - INTRODUÇÃO

A despeito de haver várias espécies de peixes nativos que apresentam crescente potencial para a atividade da piscicultura, as espécies exóticas já introduzidas no Brasil mostram uma grande vantagem sobre elas no que diz respeito ao conhecimento técnico disponível, tanto no campo da biologia quanto no da piscicultura propriamente dita. Tais conhecimentos são imprescindíveis para viabilizar técnica e programa de piscicultura, seja público ou privado (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA e DO ABASTECIMENTO, 2007).

Dentre as espécies exóticas encontradas no Brasil a tilápia merece destaque, pois, atualmente sua criação encontra-se amplamente distribuída no mundo inteiro, podendo atingir uma produção mundial de 1.500.000 t em 2010, segundo Fitzsimmons (2000), representando a terceira espécie de maior importância econômica na aquicultura mundial (BORGHETTI et al., 2003).

Por serem consideradas espécies de grande importância para a aquicultura mundial, as tilápias são frequentemente indicadas para a criação intensiva. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se como uma das mais importantes, devido à sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições e criação e boa aceitação pelo consumidor (KUBITZA, 2000), principalmente pela excelente textura e pelo sabor de sua carne e ausência de espinhos intramusculares (LIMA et al., 2000).

A maturidade sexual nas tilápias está relacionada principalmente com a função da idade e do tamanho (IGARASHI, 1995). A maior restrição ao seu cultivo é a sua reprodução precoce, a partir dos quatro meses de idade, levando ao superpovoamento dos tanques, mas isso pode ser solucionado utilizando apenas alevinos machos, sexados manualmente ou revertidos através de hormônios sexuais. Tilápias com idade acima de 12 meses para maioria dos produtores é considerada como idade de despesca (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994).

Diante desses dados, indagamos as seguintes questões:

- Será que tilápias com idade acima de 12 meses precisam ser descartadas?
- Tilápias com idade acima das que foram mencionadas, não podem ser utilizadas como reprodutoras?

Baseado nestas questões, o presente trabalho teve como objetivo descrever o efeito da idade das fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na qualidade do ovo.

2 - OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são os seguintes:

- analisar o efeito da idade das matrizes de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* na qualidade do ovo, através de análise biométrica do ovo, taxa de fecundidade do lote, taxa de fecundidade relativa, taxa de fertilização e taxa de eclosão.
- descrever os aspectos morfológicos externos dos ovos e larvas pós-eclodidas, assim como o desenvolvimento embrionário sob estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura, desde as primeiras clivagens até a eclosão.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

Tilápia é o nome comum, atualmente aplicado para três gêneros de espécies de peixes da família Cichlidae: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. São nativos da África e do meio leste africano e têm se tornado a segunda fonte alimentar em peixe de água doce do mundo. O gênero *Oreochromis* está entre os mais importantes peixes comercialmente produzidos na aquicultura mundial, com mais de 75 países produtores (MORRISON et al., 2001).

Segundo Pinto (1998), algumas espécies do gênero *Oreochromis*, que se caracterizam por desovar em ninhos e as fêmeas incubarem seus ovos e larvas na boca foram trazidas juntamente com outras espécies em 1971 por técnicos do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) de Fortaleza – Ceará.

A tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* é um dos peixes mais cultivados do mundo, e pouco se sabe sobre a biologia da reprodução da espécie e qualidade de seus ovos em relação à idade da fêmea. Portanto estudos neste sentido podem melhorar as técnicas de reversão sexual, da qual depende o seu cultivo.

Entre os fatores conhecidos que afetam a qualidade do ovo, está a fecundidade, o sistema endócrino da fêmea durante o crescimento do ovócito no ovário, a dieta do peixe, o complemento de nutrientes depositados dentro do ovócito, e condições limnológicas da água nos quais os ovos são incubados (BROOKS et al., 1997), outro fator é o tamanho e a forma do blastômero, que também podem afetar a qualidade do ovo (SHIELDS et al., 1997).

Em se tratando da qualidade dos ovos em peixes, vários fatores estão relacionados como, por exemplo, diferentes níveis de proteína que podem influenciar na fecundidade (GUNASEKERA et al., 1996), na fertilização, na taxa de eclosão e no tamanho do ovo, (KJORSVIK et al., 1990). De acordo com Shields et al. (1997), um fator importante é a simetria dos blastômeros iniciais, que são vistos como indicadores de viabilidade de várias espécies, como sardinha *Clupea harengus* (DUSHKINA, 1975), em várias espécies de linguado como “Japanese flounder” *Platichthys flesus* (HIROSE et al., 1979), “Dover sole” *Microstomus pacificus* (DINIS, 1982), “turbot” *Scophthalmus maximus* (McEVOY, 1984; DEVAUCHELLE et al., 1988), como também em bacalhau “cod” *Gardus morhua* (KJORSVIK e LONNING, 1983; KJORSVIK et al., 1984) e “red seabream” *Pagellus bogaraveo* (SAKAI et al., 1985).

Características morfológicas como a transparência e distribuição de gotículas de lipídios, o tamanho do espaço perivitelino e mudanças no diâmetro do ovo depois da fertilização têm sido estudadas por Kjorsvik et al., 1984; Sakai et al., 1985. Outro indicador

da qualidade dos ovos é a presença de pigmentos no vitelo, como encontrado nos salmonídeos (CRAIK, 1985). Características do ovo de tilápia do Nilo são relatadas por Neumann (2004) como cor amarela pálido, formato ovóide, grande esfera vitelina e pequeno espaço perivitelino entre o vitelo e o córion, visível só na região caudal e cefálica do eixo embrionário.

O tamanho do saco vitelino também pode estar relacionado com o tamanho das larvas pós-eclodidas (GISBERT et al., 2000). Ademais o saco vitelino e a fecundidade diferem entre as linhagens de tilápias de acordo com Neumann, 2004. Outro fator relacionado à qualidade do ovo é a resposta ao estresse, que no caso de tilápia do Nilo pode ser uma aceleração ou inibição completa da reprodução, afetando os gametas ou a qualidade da prole (SCHECK et al., 2001).

Em relação ao tamanho dos ovos, estes também sofrem influências e variam não só entre espécie “interespecífico” como também dentro da mesma espécie “intraespecífico”, (BONISLAWSKA et al., 2001). O tamanho e o número dos ovos influenciam no tamanho das larvas, na suscetibilidade às doenças, na mortalidade (WALLACE e AASJORD, 1984) e na eclosão (COLEMAN e GALVANI, 1998). A temperatura segundo Wooton (1994), também pode influenciar os fatores citados acima.

Outro fenômeno que tem sido discutido por BONISLAWSKA et al. (2000), é a relação entre a duração do desenvolvimento embrionário e o tamanho do ovo, isto é, quanto menor é o ovo, mais rápido é a embriogênese. Existem vários fatores que influenciam a taxa de crescimento, tais como certas características do ambiente da prole, disponibilidade de alimento, densidade de população, predadores, temperatura e cuidado parental (SARGENT, 1986; EINUM e FLEMING 1999, 2002; SINERVO et al., 2000).

Estudos em relação ao número de desovas em peixes correlacionando com a estação não têm sido muito relatados, de acordo Wooton (1979), o efeito de múltiplas desovas em peixes na mesma estação produz uma fecundidade maior do que uma única desova na estação.

De acordo com Charnov (1993), o tamanho e a idade de maturação dos peixes pode ser um motivo de mortalidade em larvas pós-eclodidas. Bromage e Cumaranatunga (1988) relataram uma sobrevivência maior em ovos de fêmeas de rainbow trout, na segunda desova (Três anos de idade) comparada com a primeira desova (Dois anos de idade), respectivamente de 75 % para 58 % de sobrevivência.

A energia localizada nas gônadas parece aumentar com a idade do peixe até que a produção de ovos entra em falência, portanto, em relação ao tamanho dos ovos pós-eclodidos, Jonsson (1985), cita que desovas repetidas produzem ovos maiores do que na primeira desova, geralmente por investir relativamente mais energia nas desovas repetidas.

Conseqüentemente, trutas Brown com desovas por um longo período de reprodução, poderão no final de sua vida quase não ter reserva de energia (BERG et al., 1998).

Em se tratando da técnica de reprodução induzida artificialmente, esta já tem sido utilizada em tilápia para garantir o momento exato da fertilização e já foi realizada por Senthilkumaran et al. (2002) que induziu a desova de *O. niloticus* usando diferentes agentes indutores, como EPC, LH-RH, HCG e um antagonista da dopamina.

Apesar das técnicas para a reprodução induzida e incubação estarem bem compreendidos em diferentes espécies de peixes, os aspectos básicos do período embrionário dos peixes, que se estende da fertilização à eclosão (SHARDO, 1995), têm sido pouco estudados. O estudo das fases iniciais do ciclo de vida é de fundamental importância, tanto para o estudo da taxonomia quanto para o estudo da ecologia das espécies (SANCHES et al., 1999). Sendo assim, torna-se importante o estudo aprofundado do período embrionário dos peixes.

A fertilização é um processo de fusão celular (OHTA, 1991), que se inicia com o contato entre um espermatozóide e um ovócito e culmina na união dos núcleos destas células (MOORE, 1994; SCHATTEN, 1999). Com o processo de fertilização, uma série de eventos ocorre, incluindo despolarização da membrana plasmática do ovo, penetração do espermatozóide, exocitose do conteúdo dos alvéolos corticais, formação do espaço perivitelino e posterior divisão mitótica (IWAMATSU, 1992). Durante a exocitose do conteúdo dos alvéolos corticais ocorre um endurecimento do córion (IWAMATSU et al., 1985), esse processo é cálcio dependente e induz um aumento da rigidez da superfície externa do ovo (LÖNNING et al., 1984).

A anatomia dos gametas da tilápia, sua função e os eventos ocorridos somente durante a fertilização artificial foram relatados em microscopia eletrônica de varredura por Bern e Avtalion (1990). Na maioria dos peixes teleósteos, o espermatozóide penetra no ovócito por uma abertura denominada micrópila, localizada na sua superfície, tais observações têm sido descritas por meio de microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.). A micrópila consiste em uma depressão em forma de funil, que está presente no córion (KUDO, 1980; LAALE, 1980; KOBAYASHI e YAMAMOTO, 1981; HART, 1990).

Após a entrada do primeiro espermatozóide pela micrópila inicia-se no ovócito uma movimentação citoplasmática intensa em direção à micrópila formando os pólos animal e vegetativo (KIMMEL et al., 1995; LEME DOS SANTOS e AZOUBEL, 1996). A clivagem dos ovos de peixe é do tipo meroblástica ou parcial por ocorrer apenas no pólo animal (BALINSKY, 1970; LAGLER et al., 1977; LEME DOS SANTOS e AZOUBEL, 1996).

A ligação entre o espermatozóide fertilizante e a superfície do ovo provoca uma série de reações que previnem os espermatozóides supranumerários de entrarem no ovócito. Esse fenômeno é denominado bloqueio à polispermia, e é muito importante no desenvolvimento normal dos ovos monoespermáticos (GINSBURG, 1971; LONGO, 1987; IWAMATSU et al., 1993).

De acordo com Warga e Kimmel (1990) três movimentos celulares acompanha a formação do embrião: epibolia (movimento da blastoderme unidirecional e progressivo, do pólo animal ao vegetativo), anel germinativo (são as primeiras células da camada profunda na margem da blastoderme, as quais iniciam o movimento de involução, gerando o hipoblasto) e movimentos convergentes (movimentos através da linha média dorsal, movimentando da lateral para posição medial, alongando o eixo embrionário).

Como se pode notar existem vários fatores influenciando na qualidade e tamanho do ovo, entretanto, em condições de clima tropical não foi encontrado até o momento relato de estudos da qualidade dos ovos de tilápia do Nilo no que se referente à idade das fêmeas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Condições Ambientais

O experimento foi realizado no setor de Tilapicultura do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, durante o mês de fevereiro de 2006. As observações em estereomicroscópio e morfometria dos ovos foram observadas no Laboratório de Histologia de Peixes do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. As análises em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2 – Análises físico-químicas da água

Foram amostradas as seguintes variáveis físico-químicas da água: temperatura (termômetro de bulbo de mercúrio), pH (potenciômetro digital), oxigênio dissolvido (oxímetro), condutividade, alcalinidade e amônia, sendo as últimas duas variáveis determinadas pelos métodos de Goltermann et al., 1978.

A temperatura da água foi monitorada diariamente, às 8:00 e 20:00 horas, nas incubadoras. As demais variáveis foram amostradas diariamente na parte da manhã.

4.3 - Seleção dos Reprodutores:

Matrizes de *O. niloticus* com duas idades diferentes foram submetidas à reprodução induzida de acordo com Senthilkumaran et al. (2002) com a Gonadotrofina Coriônica Humana, hormônio HCG, sendo que as fêmeas foram acondicionadas em tanques de alvenaria com fluxo de água contínuo num total de dezenove peixes para cada grupo. Foi utilizado um macho para cada fêmea. Porém, apenas 37% das matrizes do grupo 1 e 26% do grupo 2 estavam aptas para a indução hormonal. As fêmeas foram divididas em dois grupos com sete fêmeas para o grupo 1 (2 a 3 anos) e cinco fêmeas para o grupo 2 (3 e ½ a 4 anos). Foram avaliadas amostras de ovócitos para se determinar o grau de desenvolvimento. As fêmeas foram então examinadas e selecionadas quando apresentaram características secundárias de maturação sexual como: abdômen abaulado, abertura e/ou coloração da papila genital. As fêmeas selecionadas foram colocadas individualmente em cada caixa e em seguida identificadas. Os machos foram selecionados aleatoriamente no momento da fertilização.

4.4 - Indução Hormonal

As fêmeas selecionadas foram imediatamente pesadas e medidas e em seguida foram induzidas artificialmente por meio de injeções intramusculares, com Gonadotrofina Coriônica Humana, hormônio HCG. Foi utilizado a marca Vetecor 5000 U.I. (Laboratorios Calier do Brasil Ltda), foi aplicada uma dose total de 5 UI por grama de peso de peixe, dividido em duas aplicações, a primeira correspondendo a 10% da dose total na hora zero e a segunda de 90%, aplicada 18 horas após a primeira dose.

4.5 - Extrusão dos gametas

Vinte quatro horas após a segunda dose, as fêmeas receberam o estímulo hormonal e foram imediatamente retiradas de suas caixas e submetidas à massagem abdominal com suave movimento antero-posterior, para a extrusão de gametas. Em seguida os ovócitos das sete fêmeas do grupo 1 e cinco fêmeas do grupo 2 foram colocados individualmente em placa de petri para pesagem de acordo com Figura 1A. O peso da massa de ovos foi obtido subtraindo o peso da placa de petri (determinado previamente).

O sêmen dos machos de acordo com figura 1B foi previamente coletado por compressão abdominal, momento antes da extrusão dos ovócitos, com a finalidade de minimizar o tempo entre a extrusão dos ovócitos e a fertilização.

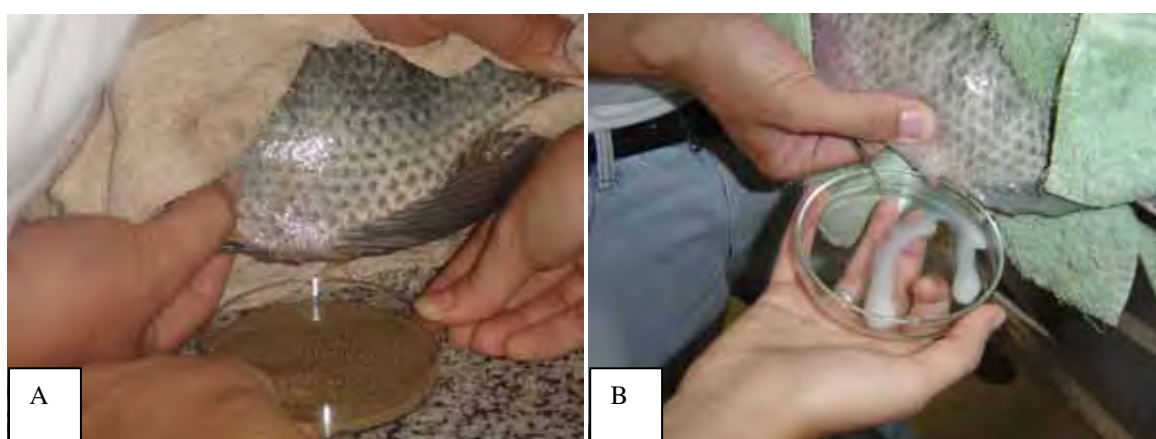


Figura 1: Extrusão dos ovócitos (1A) e espermiação do espermatozóide (1B) de *O. niloticus*.

4.6 - Taxa de fecundidade por lote

Para a estimativa do número de ovócitos extrusados, uma amostra destes foi coletada no momento da liberação. O número total de células contidas em 0,5 grama desta amostra foi verificado e multiplicado pelo peso total da massa de ovócitos liberados em cada fêmea. Assim, a fecundidade por lote foi o número total de células contidas no peso total da massa de ovócitos liberados no lote das fêmeas, segundo metodologia descrita por Vazzoler, 1996.

4.7 - Taxa de fecundidade relativa

Foi obtida pela relação do número total de ovócitos produzidos por peso de fêmea, (VAZZOLER, 1996).

4.8 - Fertilização Artificial

Os ovócitos de cada fêmea foram divididos em dois tratamentos: grupo 1 (2 a 3 anos) e grupo 2 (3 e ½ a 4 anos), constituindo 12 desovas. A extrusão foi registrada como tempo inicial. Em seguida os ovócitos e o sêmen foram misturados suavemente em placa de Petri e ativados com água. A partir daí, os ovos de cada fêmea, foram colocados em uma incubadora, constituindo num total de 12 incubadoras com recirculação de água constante. As amostras foram coletadas nos seguintes tempos: extrusão, fertilização, 1 minuto, 45 minutos, 60 minutos, de 30 em 30 minutos até completar 6 horas, depois de hora em hora até completar 24 horas. Depois desse tempo as coletas seguiram de 6 em 6 horas até a eclosão da larva.

Após 12 horas de desenvolvimento, foi calculada a taxa de fertilização:

$$\text{Taxa de fertilização} = \frac{\text{ovos fertilizados} - \text{ovos não fertilizados}}{\text{Total de ovos}}$$

4.9 - Taxa de eclosão

Em torno de 72 horas de desenvolvimento, foi calculada a taxa de eclosão “*in vivo*”.

$$\text{Taxa de eclosão} = \frac{\text{larvas eclodidas} - \text{larvas não eclodidas}}{\text{Total de larvas}}$$

4.10 - Coleta dos ovos

Após a fertilização todos os ovos coletados foram individualizados em frascos devidamente identificados. Os ovos coletados das fêmeas de cada grupo foram fixados em solução de Karnovsky por 24h, lavados em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, pH 7,4 e conservados em álcool 70%. Em seguida, foram armazenadas na temperatura de 4°C até posterior análise.

4.11 - Observação em Estereomicroscópio, morfometria e microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.).

Os ovos foram observados e analisados quanto à sua morfologia externa, selecionados e fotografados em estereomicroscópio LEICA MZ8, acoplado ao equipamento automático de microfotografia LEICA CD 280, os ovos também foram analisados em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.). Após montagem das pranchas com as fotografias dos ovos, estes foram desenhados em escala com o intuito de facilitar a visualização e descrição dos estágios de desenvolvimento embrionário e larval da tilápia.

O diâmetro maior e menor dos ovos até sua eclosão (Figura 2) foram medidos em estereomicroscópio LEICA MZ8 através do programa IM 50 LEICA, sendo que o diâmetro médio foi calculado posteriormente. Foram medidos de 7 a 10 ovos em cada um dos tempos de coleta, sendo que devido ao formato ovóide dos ovos, foram obtidas duas medidas: o diâmetro maior (medida entre as extremidades do maior eixo, saindo da base ao pico do ovo) e diâmetro menor (região mais larga cortando horizontalmente o comprimento). Os valores obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($P=0,05$), no programa SAS.

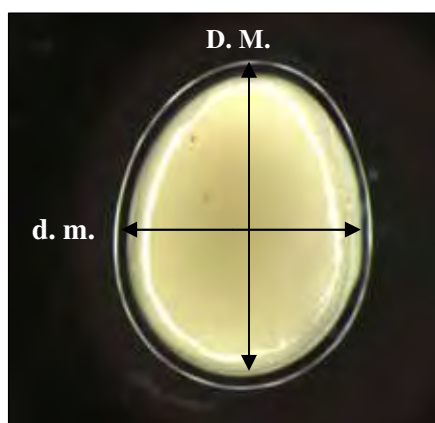


Figura 2: Ovócito de *O. niloticus* com setas mostrando como foram feitas as medidas de Diâmetro Maior (D.M.) em mm e Diâmetro Menor (d. m.) em mm.

Para análise dos eventos morfológicos externos em microscopia eletrônica de varredura, as amostras anteriormente fixadas em solução de Karnovsky e transferidas para tampão cacodilato de sódio, foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2 % por duas horas, lavadas novamente em tampão e submetidas à desidratação em bateria alcoólica de concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%); técnica modificada a partir da técnica utilizada pelo Reed, 1996. Em seguida as amostras foram secas em Secadora de Ponto Crítico com CO₂ líquido, em aparelho BAL-TEC, montadas em suporte de cobre, metalizadas com ouro-pálido em aparelho DENTON VACUM DESK II, analisadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

4.12 - Análise Estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com parcelas repetidas no tempo, tendo dois tratamentos (grupo 1 – 2 a 3 anos e grupo 2 – 3 e ½ a 4 anos) e quarenta e três tempos de coletas, com média de seis repetições por grupo. Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey pelo programa SAS (SAS INSTITUTE, 1991).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Parâmetros Limnológicos

A análise das variáveis limnológicas da água nas incubadoras durante o experimento teve valores médios de temperatura $30,4 \pm 0,75^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $5,5 \pm 1,26 \text{ mg/L}$ com saturação de oxigênio de $71,5 \pm 14,0\%$, condutividade elétrica $325,0 \pm 65 \mu\text{S/cm}$, alcalinidade $134,2 \pm 52,5 \text{ mg/L}$, amônia $38,3 \pm 52,3 \text{ mg/L}$ e pH $7,6 \pm 0,2$.

Os parâmetros limnológicos das incubadoras do presente estudo foram comparados com os de Neumann (2004), que trabalhou com o desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia e uma linhagem híbrida, encontrando valores similares em alguns parâmetros, como por exemplo, oxigênio dissolvido na água, alcalinidade e pH. Porém, alguns parâmetros apresentaram valores maiores comparados aos de Neumann, como a condutividade elétrica, a amônia e a temperatura. Provavelmente tal diferença tenha sido em decorrência da fonte de água cujas incubadoras do presente estudo foi abastecida com água recirculada, diferenciando da autora citada acima, cuja água foi provida de mina. Temperaturas de outros trabalhos também foram comparadas como as de Galman (1980) com $26\text{-}27^{\circ}\text{C}$, Galman e Avtalion (1989) num intervalo de $24\text{-}26^{\circ}\text{C}$, Rana (1990) com 30°C e Morrison et al. (2001) com $27\text{-}29^{\circ}\text{C}$, revelando que em temperaturas mais elevadas geralmente os ovos eclodem com menor tempo desenvolvimento.

5.2 - Desenvolvimento morfológico inicial

Como a maioria dos peixes ósseos, a tilápia do Nilo apresentou fertilização externa. O período embrionário da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da prole dos dois grupos se estendeu da fertilização à eclosão compreendendo um período de 60 a 84 horas, a uma temperatura média de $30,4 \pm 0,75^{\circ}\text{C}$.

Tanto os ovócitos quanto os ovos apresentaram formato ovóide, com grande esfera vitelina e pequeno espaço perivitelino entre o vitelo e o córion (Figura 3).



Figura 3: Ovo de *Oreochromis niloticus* evidenciando formato ovóide e pequeno espaço perivitelino (seta branca).

5.3 - Tamanho do Ovo

A análise morfométrica dos ovos das matrizes dos dois grupos de idades diferentes estudadas em tilápia do Nilo, representada pela distribuição de frequência de tempo (fertilização até eclosão) e pelo diâmetro dos mesmos, não mostrou diferença no tamanho dos ovos entre os dois grupos. As médias dos ovos amostrados em matrizes do grupo 1 tiveram um diâmetro médio de 2,58 mm e no grupo 2 o diâmetro médio dos ovos foi de 2,57mm. A figura 4 ilustra bem tais dados, mostrando o diâmetro maior, menor e médio dos ovos. O coeficiente de variância da subparcela foi de $CV\% = 3,44$ e $P > 0,05$. O desenvolvimento da tilápia, tanto das fêmeas do grupo 1 (2 a 3 anos), quanto do grupo 2 (3 e ½ a 4 anos), nas condições do presente experimento, o comprimento padrão (diâmetro maior) dos ovos não apresentou diferenças significativas até alcançar o período de eclosão. As larvas recém eclodidas apresentaram uma média de comprimento padrão (diâmetro maior) de 4,77 mm (Figura 4).

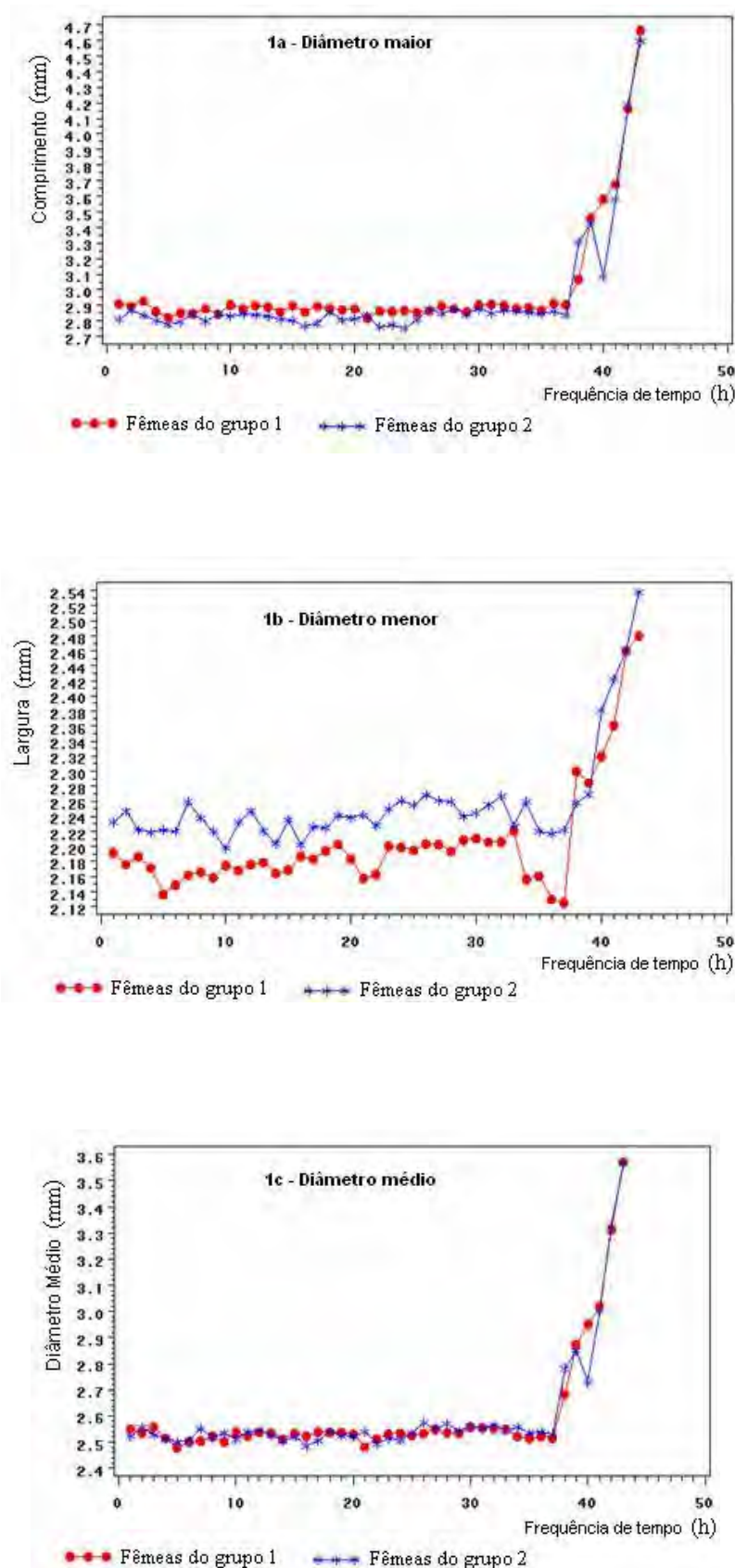


Figura 4: Diâmetro dos ovos relacionados com a distribuição de tempos obtidos das fêmeas do grupo 1 e grupo 2 de tilápia do Nilo. Diâmetro maior (1a), diâmetro menor (1b), diâmetro médio (1c).

Em relação ao tamanho do ovo, este estudo está de acordo com outros trabalhos em ovos demersais relatados por Neumann (2004) com diâmetro entre (2,41 x 2,70 mm) e Bern e Avtalion (1990) nos quais os ovos de peixes adultos de tilápia do Nilo apresentam um tamanho de (2,00 x 3,00 mm).

Segundo Duarte e Alcaraz (1989), devido à tática reprodutiva, peixes com ovos demersais, como as tilápias, produzem em menor número, porém ovos maiores, pois estes dependem mais da sobrevivência individual; enquanto espécies com ovos pelágicos precisam produzir em maior número e ovos menores, para aumentar as chances dos indivíduos da prole, que ficam a mercê das condições inóspitas do ambiente, para chegar à maturidade.

O tamanho do ovo pode afetar a taxa de eclosão segundo Coleman e Galvani (1998), porém no presente trabalho, o tamanho dos ovos nos dois grupos não afetou a taxa de fecundidade, à de fertilidade e nem à de eclosão.

Em relação à sobrevivência larval, (CHARNOV, 1993), cita que o tamanho do ovo e a idade de maturação do reprodutor também podem ter função na taxa de mortalidade das larvas pós-eclodidas. Segundo Gisbert et. al (2000), o tamanho do ovo não influencia na sua sobrevivência, porém Wootton (1994), relata que este pode influenciar no tamanho larval em peixes teleósteos. Já os autores Sprigate e Bromage (1985), dizem que o tamanho do ovo não afeta nem a sobrevivência dos ovos nem a das larvas, corroborando também com o presente estudo.

Vários autores afirmam que o tamanho de ovos em peixes pode ser influenciado pelas condições físicas e fisiológicas dos reprodutores, devido à idade, critérios de seleção e condições ambientais (ZHUKINSKIY e GOSH, 1988; KJORSVIK et al., 1990; BROOKS et al., 1997; BONISLAWSKA et al., 2000), no entanto, o tamanho dos ovos não foi influenciado pela idade dos reprodutores no presente experimento.

5.4 - Características na qualidade do ovo

5.4.1 - Fecundidade

A Tabela 1 mostra a média do comprimento e peso da fêmea, diâmetro médio dos ovos relacionados com a fecundidade do lote (F_L) e fecundidade relativa (F_R), evidenciando que não houve diferenças significativas ($P>0,05$) para todos os parâmetros citados acima.

Comprovando, portanto, não haver diferenças quanto ao diâmetro médio dos ovos entre os dois grupos de matrizes com idades diferentes e também quanto à média do número

total de ovos (F_L) e o número de ovos produzidos por peso de fêmea (F_R) no qual foi estatisticamente igual para fêmeas do grupo 1 e do grupo 2, de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 1: Valores do comprimento total das fêmeas (Comp. ♀), peso das fêmeas (Peso ♀), fecundidade por lote (F_L), fecundidade relativa (F_R), diâmetro médio de ovos (D.O.) e coeficiente de variação (CV%) das matrizes de tilápias do Nilo do grupo 1 e grupo 2.

	Variáveis					
	Matrizes	Comp. ♀ (cm)	Peso ♀ (g)	F_L	F_R	D.O.
Média (S^2)	Grupo 1	25,86	317	1198	3,76	2,58
	Grupo 2	27,10	385	1523	3,96	2,57
CV%		6,00	17,76	31,05	24,83	8,29

*Médias na mesma coluna e mesma linha não foram significativamente diferentes entre si ($P>0,05$).

A fecundidade do lote foi comparada com os resultados obtidos por Neumann (2004) e apresentou o dobro do número de ovos, já a fecundidade relativa foi menor e o diâmetro dos ovos foi equivalente.

Existem outros fatores além da idade do reprodutor que podem afetar os parâmetros citados acima, como por exemplo, peixes que possuem múltiplas desovas dentro da mesma estação, produzem uma fecundidade maior do que àqueles que possuem uma única desova na estação (WOOTON, 1979).

O grau de controle parental sobre as condições que serão vivenciadas pelas larvas durante o crescimento, pode influenciar tanto na variabilidade reprodutiva quanto no número e tamanho de ovos (DUARTE e ALCARAZ, 1989). O mesmo foi sugerido por Eyson (1979), afirmando que em tilápias, assim como em outros peixes de cuidado parental, a produção de ovos tende a ser baixa, apresentando uma fecundidade reduzida, principalmente os que incubam os ovos na boca como no gênero *Oreochromis*, que precisam alojar as larvas em um pequeno espaço, também corroborando com os resultados obtidos por Coleman e Galvani (1998).

Mesmo assim, o maior investimento por parte da fêmea para produzir ovos grandes é vantajoso por ter efeito benéfico sobre a sobrevivência da prole (EINUM e FLEMING, 2002).

Essas características também foram evidenciadas na presente pesquisa em fêmeas de *O. niloticus* nos dois grupos de idades diferentes.

5.4.2 - Taxa de fertilização e eclosão

Em relação à taxa de fertilização e a taxa de eclosão, estas não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos de matrizes com idades diferentes ($P>0,05$), conforme a tabela 2. A taxa de fertilização variou muito entre as fêmeas de mesma idade, com coeficiente de variação $CV\% = 28,57$, porém, tanto nas fêmeas do grupo 1 quanto nas fêmeas do grupo 2, cerca de 60% das fêmeas tiveram uma taxa de fertilização $\geq 70\%$. Quanto à taxa de eclosão os resultados também foram heterogêneos dentro do mesmo grupo de idade, apresentando $CV\% = 83,84$, entretanto, cerca de 60% das fêmeas tiveram uma taxa de eclosão $\geq 90\%$, porém, a média geral ficou num intervalo de 54,29 e 60,00% respectivamente para fêmeas do grupo 1 e fêmeas do grupo 2.

Tabela 2: Taxa de Fertilização e taxa de Eclosão das Fêmeas do grupo 1 e grupo 2 de tilápias do Nilo.

	Fêmea	Taxas	
		Fertilização %	Eclosão %
Grupo 1	1	86	100
	2	66	0
	3	34	0
	4	98	90
	5	86	90
	6	50	0
	7	86	100
Grupo 2	1	86	80
	2	50	20
	3	70	90
	4	66	10
	5	90	100
Média (S2)	Grupo 1	72,29	54,29
	Grupo 2	72,40	60,00
CV%		28,57	83,84

Segundo Kjorsvik et al. (1990), a taxa de fertilização é um parâmetro muito usado para avaliar a qualidade da prole, na qual se torna determinante quando os ovos de teleósteos deixados pela fêmea e o processo de fertilização é completo. Tal afirmação está de acordo também com a presente pesquisa, onde a taxa de fertilização foi diretamente relacionada com a qualidade dos ovos.

Quando o processo de ativação é incompleto pode resultar num menor espaço perivitelíneo e uma diminuição no aumento do diâmetro logo após a fertilização em ovos de bacalhau *Gadus morhua* (KJORSVIK et al., 1984), portanto, a fertilização e processo de ativação tem sido vitais para diversos aspectos do desenvolvimento embrionário (KJORSVIK et al., 1990).

Em alguns estudos, a taxa de fertilização nem sempre se relaciona com a sobrevivência e o desenvolvimento embrionário em estágio tardio em muitas espécies, assim como em linguado *Limanda yokohama* (HIROSE et al., 1979), carpas *Cyprinus carpio* (STATOVA et al., 1982), linguado *Scophthalmus maximus* (McEVOY, 1984), bacalhau *Gadus morhua* (KJORSVIK et al., 1984), sardinha *Clupea harengus pallasii* (HAY, 1986) e salmódídeos *Coregonus albula* (DABROWSKI et al., 1987).

No presente estudo, a taxa de fertilização influenciou na sobrevivência e no desenvolvimento embrionário, principalmente em relação à eclosão das larvas do que propriamente na idade do reprodutor. Embora a média geral das duas taxas estudadas tenham sido baixa, 60% das fêmeas dos dois grupos tiveram uma taxa de fertilização e de eclosão consideravelmente alta. Fêmeas que tiveram ovos com taxa de fertilização e eclosão baixa, talvez o problema tenha sido de manejo ou de extrusão precoce ou tardia das fêmeas.

Os resultados indicam que fêmeas numa faixa etária entre 2 a 4 anos que produzem uma média de 1300 ovos (fecundidade por lote) e possuem taxas de fertilização $\geq 70\%$ e eclosão $\geq 90\%$, estão de acordo com as expectativas quando se trata de produção de tilápias, portanto, não precisam serem descartadas.

Diante dos resultados obtidos nessa pesquisa, o produtor não deve descartar fêmeas acima de 24 meses. Apesar do desconforto em trabalhar com fêmeas maiores, em pisciculturas que se utilizam coletas por nuvem, podem ser mantidos os lotes de fêmeas grandes e com idade acima de dois anos. O manejo é uma importante ferramenta quando se trabalha com tilápias, portanto, é preciso mais atenção quanto às boas práticas de manejo principalmente quando se trata de fêmeas com idades acima de dois anos.

Charnov (1993), diz que o tamanho e a idade de maturação dos peixes pode ser um motivo de mortalidade em larvas pós-eclodidas, porém, no presente estudo os dois fatores citados acima não tiveram influência na baixa taxa de eclosão de algumas fêmeas dos grupos estudados. Bromage e Cumaranatunga (1988) também relataram uma sobrevivência maior em ovos de fêmeas de truta arco-íris, comparando a segunda desova (Três anos de idade) com a primeira desova (Dois anos de idade), respectivamente de 75 % para 58 % de sobrevivência.

5.5 - Fases do desenvolvimento embrionário em Estereomicroscópio

No presente experimento o tempo de desenvolvimento embrionário da tilápia não apresentou diferença entre fêmeas do grupo 1 e grupo 2.

- Estágio zigoto:

Depois da fertilização (Figuras 5 e 6A), foi observado um pequeno aumento do espaço perivitelino, com estabelecimento dos pólos vegetativo e animal. Compreendendo os dois grupos com idades diferentes, a média do início do desenvolvimento foi percebida com a célula zigoto ou célula ovo formada a partir de 45 minutos após a fertilização (Figuras 5 e 6B).

- Estágio de clivagem:

O estágio de clivagem foi caracterizado pelo início da divisão mitótica, e continuou até a formação de espaços irregulares entre células internas. Em *O. niloticus*, as clivagens são meroblásticas e podem ser descritas como a seguir: a primeira divisão mitótica é percebida entre 1:30 - 3 horas de desenvolvimento (Figuras 5 e 6C), a segunda divisão mitótica entre 2 - 3:30 horas (Figuras 5 e 6D), a terceira divisão (Figuras 5 e 6E) e quarta divisão à partir de 3 horas (Figuras 5 e 6F, 5 e 6G), tanto nas fêmeas do grupo 1, quanto do grupo 2. A fase de mórula (32-128 células) foi observada entre 3:30 - 7 horas (Figuras 5 e 6H e Figuras 7 e 8A). Ao longo das clivagens, o número de blastômeros aumentou e o tamanho deles diminuiu.

-Estágio de blástula:

As células continuam sob divisões mitóticas neste estágio, aumentando assim, o número de células. Uma das características deste estágio são os espaços irregulares entre os blastômeros e o início da formação do periblasto. Até no final deste estágio, o primeiro movimento de epibolia pode ser identificado. A blástula forma-se entre 5:30 - 14 horas (Figuras 7 e 8B, 7 e 8C).

- Estágio de gástrula:

O estágio de gástrula foi caracterizado pelo movimento de epibolia e a ocorrência dos movimentos morfogenéticos da convergência e migração das células que direcionam as primeiras camadas do eixo embriogênico como céfalo-caudal e latero-lateral. O início da gástrula foi entre 10 - 15 horas com 10% de epibolia (Figuras 7 e 8D), gástrula com 20% e 50% de epibolia entre 14 - 30 horas respectivamente de acordo com as figuras 7 e 8E, 7 e 8F; sendo que a gástrula no final da epibolia ocorreu entre 22 - 36 horas (Figuras 7 e 8G).

- Estágio de segmentação e organogênese:

Este estágio foi caracterizado pela caracterização da formação dos organismos rudimentares e sistemas, das camadas embriogênicas. Percebe-se um esboço da cabeça e a

pigmentação do vitelo (melanóforos) entre 24 - 42 horas como mostram as figuras 7 e 8H e figuras 9 e 10A respectivamente.

- Estágio larval e eclosão

Uma cauda livre, a presença de mais de 25 pares de somitos e uma larva pronta para eclodir caracteriza o estágio larval. Na fase de eclosão a larva demonstra movimentos de natação. A partir de 36 horas um primórdio da vesícula óptica pode ser observado, nas duas idades, ainda sem a pigmentação da retina, já é percebido também um primórdio da vesícula ótica sendo formada, a partir de 42 horas, e o cérebro é proeminente (Figuras 9 e 10B).

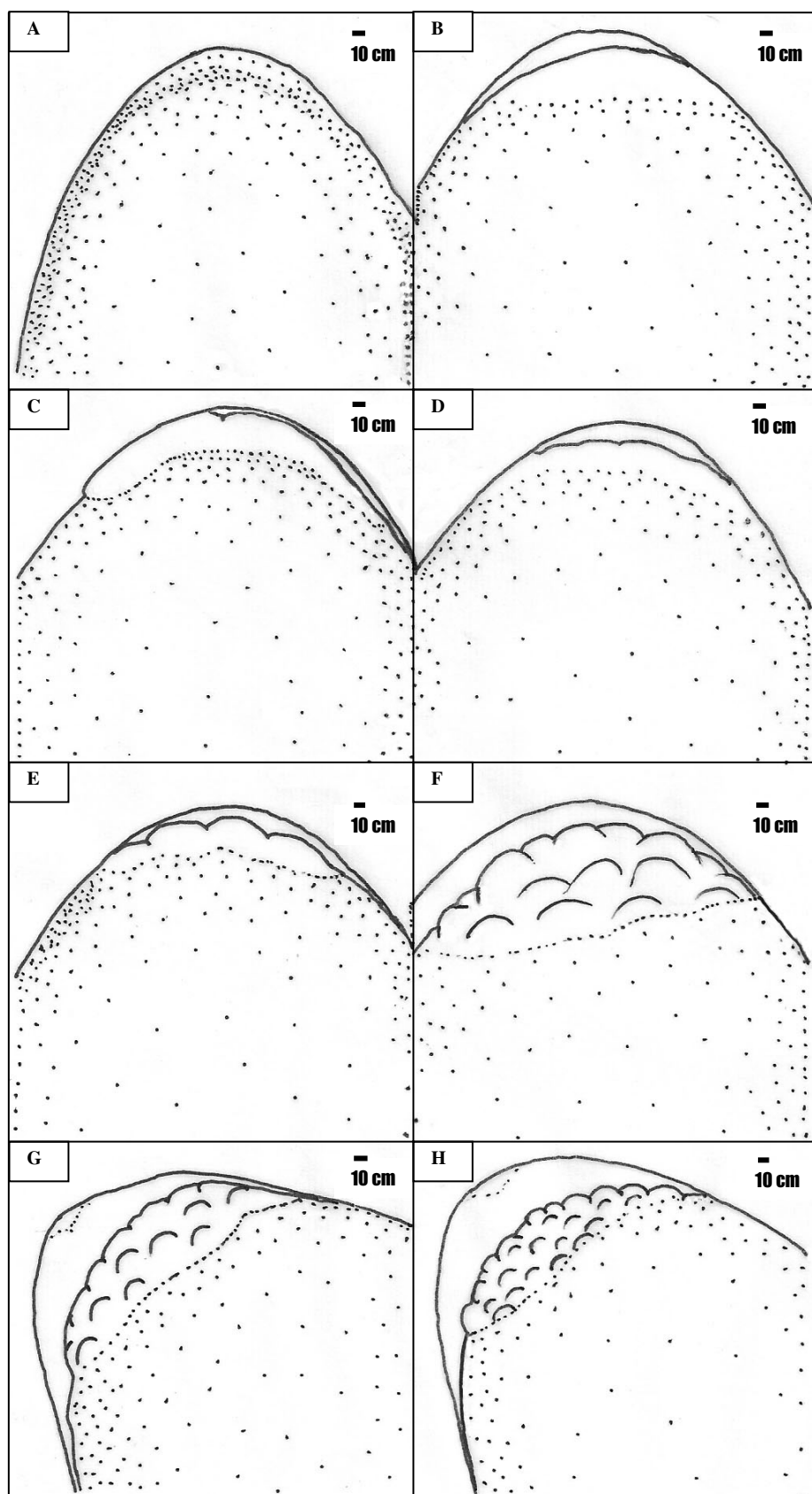


Figura 5: Desenho do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas velhas de *Oreochromis niloticus*. A - Fertilização; B - 45 minutos após a fertilização; C - primeira divisão mitótica; D - segunda divisão mitótica; E - terceira divisão mitótica; F e G - quarta divisão mitótica; H - fase de mórula.

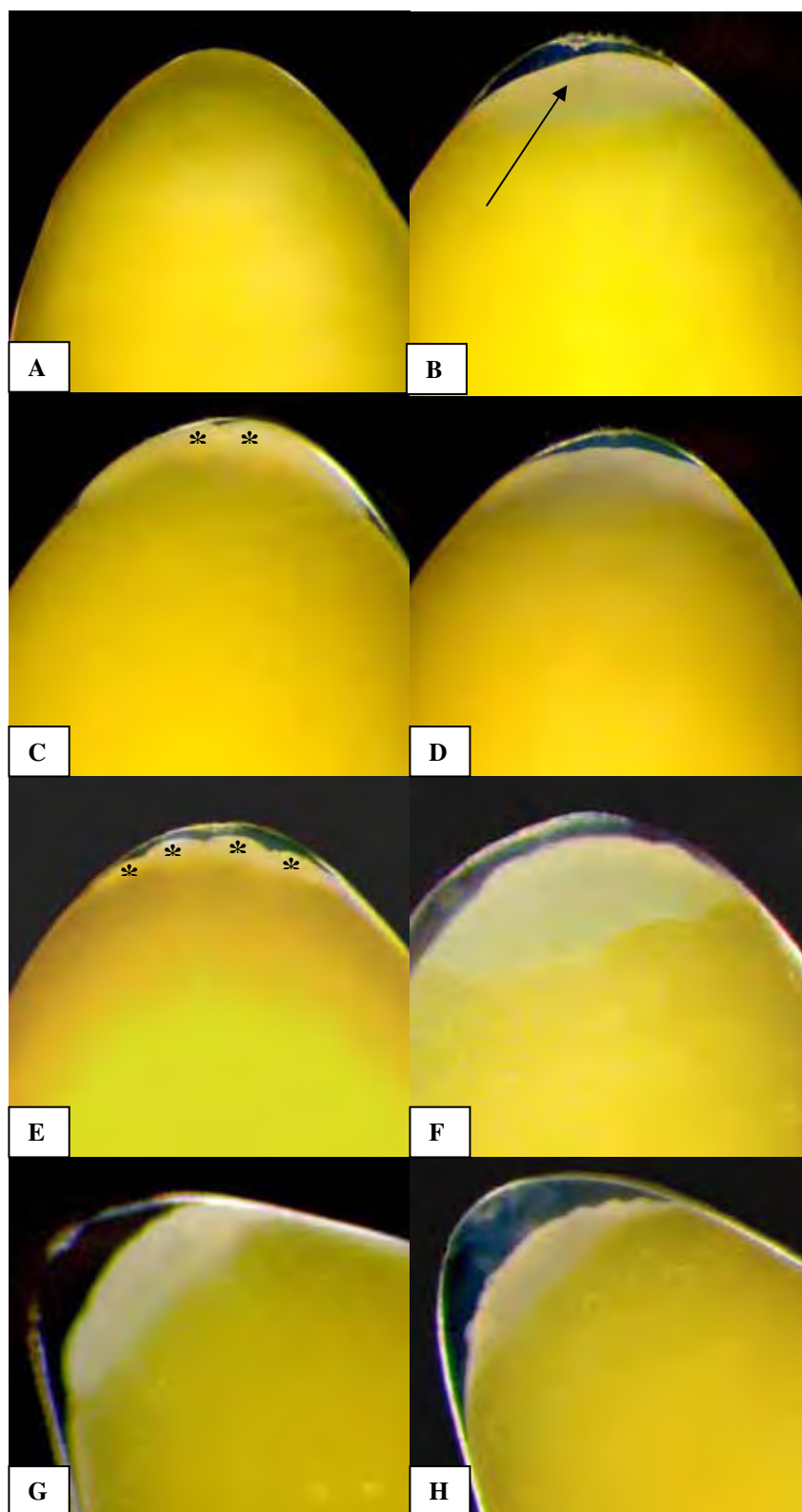


Figura 6: Fotografia em estereomicroscópio do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas velhas de *Oreochromis niloticus*. A - Fertilização; B - 45 minutos após a fertilização (Seta preta – célula ovo); C - primeira divisão mitótica (* preto - blastômeros); D - segunda divisão mitótica; E - terceira divisão mitótica (* preto - blastômeros); F e G - quarta divisão mitótica; H - fase de mórula. Aumento de 32x.

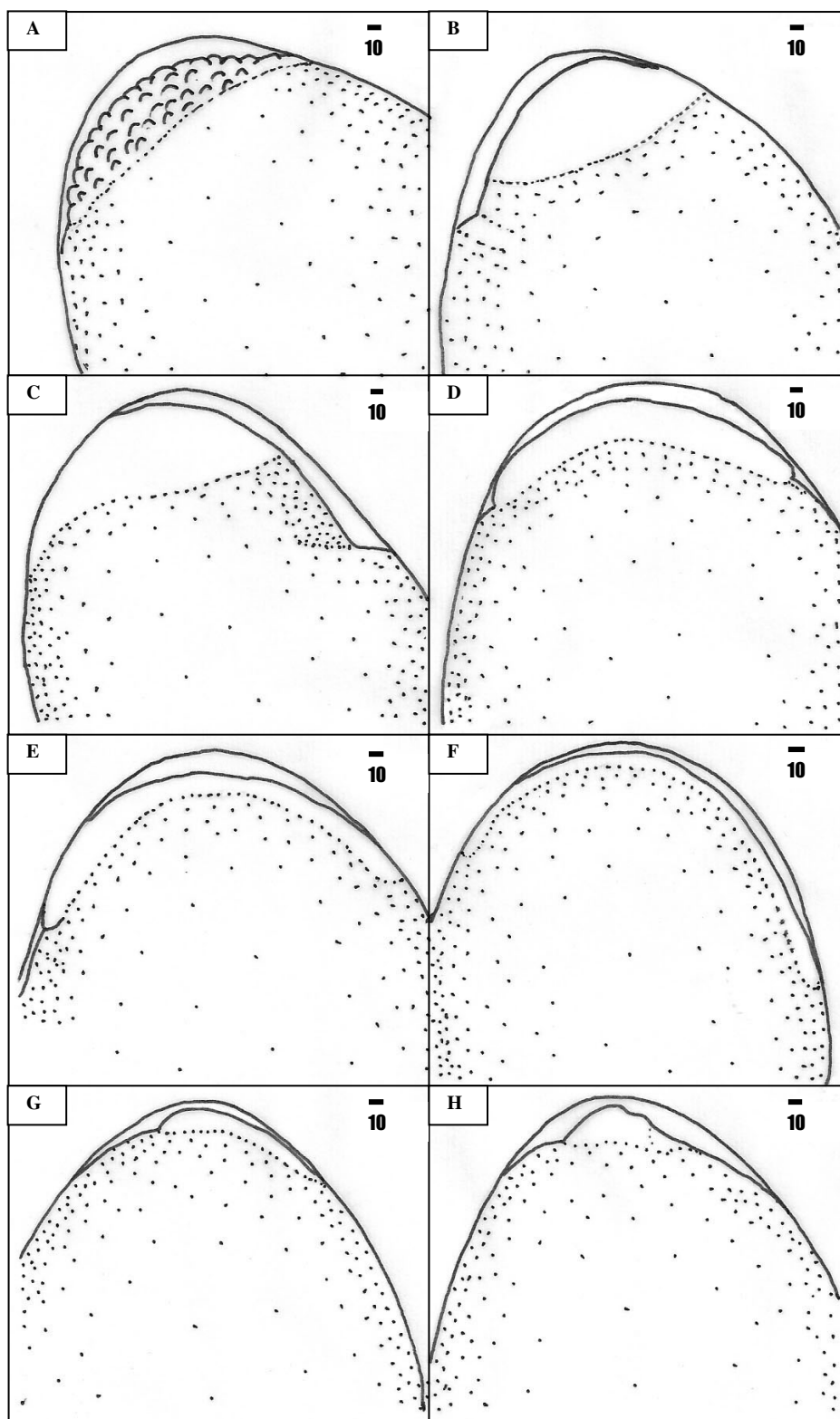


Figura 7: Desenho do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas velhas de *Oreochromis niloticus*. A - Fase de mórula; B - início da blástula; C - blástula; D - início da gástrula; E e F - gástrula; G - final da gástrula; H - esboço da cabeça.

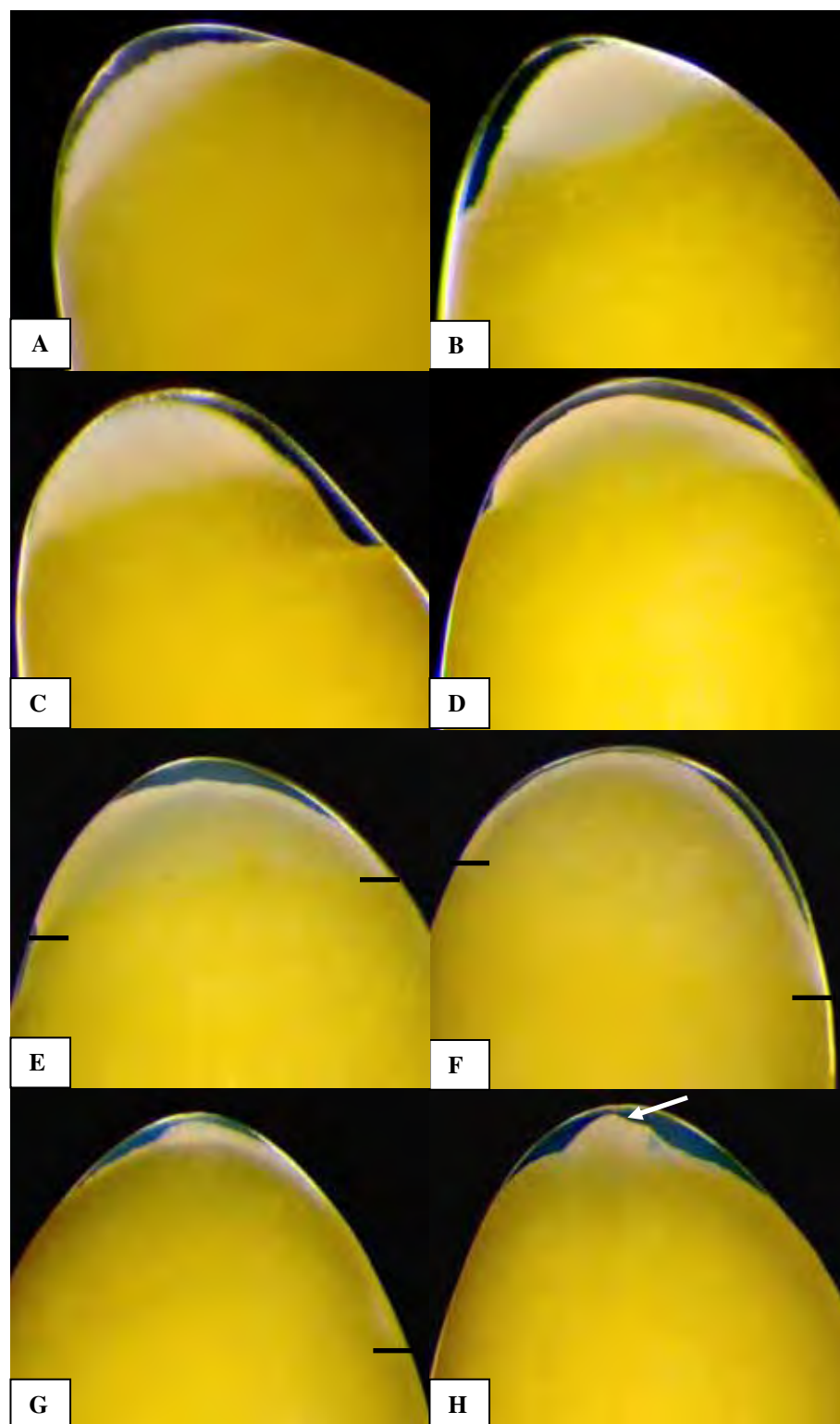


Figura 8: Fotografia do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas velhas de *Oreochromis niloticus*. A - Fase de mórula; B - início da blástula; C - blástula; D - início da gástrula; E e F - gástrula (traço preto – evidencia as extremidades céfalo-caudal); G - final da gástrula (traço preto – evidencia a extremidade caudal); H - esboço da cabeça (seta branca). Aumento 32x.

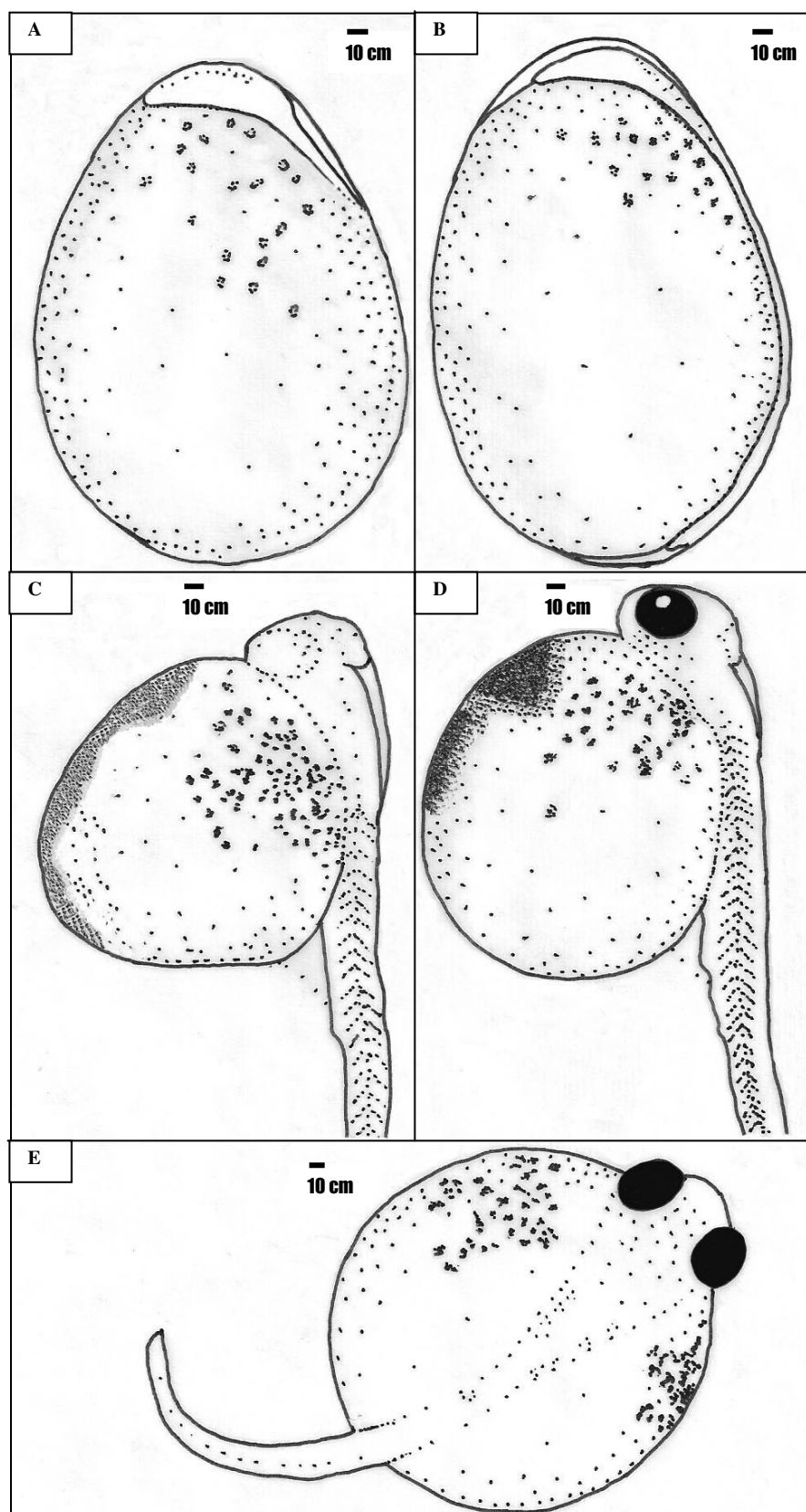


Figura 9: Desenho do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas velhas de *Oreochromis niloticus* no estágio de organogênese, larval e eclosão. A - Esboço de cabeça e início da pigmentação do vitelo; B - cabeça e cauda proeminente e pigmentação do vitelo evidente; C - início da pigmentação da retina; D e E - completa formação da larva e eclosão e circulação extra embrionária.



Figura 10: Fotografia do desenvolvimento embrionário dos dois grupos estudados de fêmeas velhas de *Oreochromis niloticus* no estágio de organogênese, larval e eclosão. A - Esboço de cabeça (seta branca) e início da pigmentação do vitelo (seta preta); B - cabeça e cauda proeminente (seta branca) e pigmentação do vitelo evidente (seta preta); C - início da pigmentação da retina (seta preta); D e E - completa formação da larva e eclosão (seta preta – somitos) e circulação extra embrionária (círculo branco). Aumento 32x.

Entre 42 - 54 horas vê-se o início da circulação extra-embrionária do vitelo e o início da pigmentação da retina (Figuras 9 e 10C). Entre 54 - 78 horas, tanto as fêmeas do grupo 1, quanto às do grupo 2, a circulação extra-embrionária é bem evidente e a cauda já está separada do vitelo caracterizando a completa formação da larva. A eclosão dos ovos ocorre entre 60 - 84 horas e com 84 horas a eclosão dos ovos é total, nas duas idades das matrizes (Figuras 9 e 10D, 9 e 10E).

A tabela 3 mostra uma comparação em relação aos tempos das fases embrionárias nas duas idades, com outros trabalhos já publicados com desenvolvimento embrionário de *Oreochromis niloticus*. Percebe-se como os tempos do desenvolvimento embrionário variam conforme a temperatura e condições experimentais de cada trabalho.

Tabela 3: Observações obtidas durante o desenvolvimento embrionário no presente estudo com outros trabalhos de *Oreochromis niloticus*.

Fases do Desenvolvimento	Horas depois da Fertilização					
	Presente estudo	Presente estudo	Galman e Avtalion, 1989	Rana, 1990	Morrison, 2001	Paes et al., 2005
	Fêmeas Grupo 1 (30,4±0,75°C) HORAS	Fêmeas Grupo 2 (30,4±0,75°C) HORAS	(24-26°C) HORAS	(28°C) HORAS	(27-29°C) HORAS	(28,7±1,5°C) HORAS
Célula ovo	0:45 - 2	0:45 - 2	0 - 1	-	1:30	1 - 2
2 células	1:30 - 2:30	2 - 3	1 - 5	2 - 3	1:30 - 2	1 - 2
4 células	2 - 3	2 - 3:30	2 - 3:30	4	2 - 3	2 - 3:30
8 células	3 - 3:30	3 - 3:30	2 - 3:30	4	2 - 3	3 - 3:30
Mórula	3:30 - 7	3:30 - 7	5:30 - 10:30	-	5:30	3:30 - 5:30
Blástula	5:30 - 14	5:30 - 14	10:30 - 12	10	5:30 - 14	4 - 11
Gástrula	10 - 15	10 - 15	24	10	22	7 - 23
Epibolia	14 - 24	14 - 30	24	14	22	10 - 23
Somitós	42	42	40	30	26 - 30	42
Vesícula óptica	36 - 42	48 - 54	52	30	31	30
Vesícula ótica	42 - 66	46 - 66	65	-	76	42
Eclosão	60 - 84	60 - 84	72	90 - 120	100 - 125	72 - 90

Não houve diferenças significativas em relação ao tempo e a fase de desenvolvimento até a eclosão nos dois grupos estudados, porém, ovos de *O. niloticus* da presente pesquisa eclodiram com menor tempo de desenvolvimento quando relacionado com os trabalhos de Galman e Avtalion, 1989; Rana, 1990; Morrison, 2001; cujos trabalhos foram realizados no exterior, no entanto, o tempo de eclosão foi similar à pesquisa de Paes et al. 2005, que foi realizada no Brasil. Fatores como a temperatura, o clima, a genética, provavelmente tenham influenciado no tempo de desenvolvimento e de eclosão.

As características morfológicas iniciais dos ovócitos e dos ovos apresentadas neste experimento foram às mesmas apresentadas por Neumann (2004) e Paes (2005); com formato ovóide, grande esfera vitelina e pequeno espaço perivitelino, de acordo também com a descrição de ovos em *O. niloticus* estudado por Morrison et al., 2001.

A morfologia externa dos ovos em estereomicroscópio, caracterizadas pelas fases da embriogênese de tilápias foi à mesma observada em peixes ósseos como em pacu *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu (RIBEIRO et al., 1995).

Logo após a fecundação foi observado um pequeno espaço perivitelino nos ovos de tilápia *Oreochromis niloticus*, como também foi observado em *Rhamdia hilarii* (GODINHO et al., 1978). Entretanto, este espaço nem sempre é reduzido, podendo apresentar-se de forma ampliada, como acontece em pacu *Piaractus mesopotamicus*, no tambaqui *Colossoma macropomum* e no híbrido tambacu (RIBEIRO et al., 1995).

Nos ovos estudados dos dois grupos com idades diferentes foram identificados dois pólos distintos: o pólo animal e o pólo vegetativo. Com tal peculiaridade, tais ovos são classificados como telolécitos. Eles são também considerados como polilécitos, devido a grande quantidade de vitelo existente nos mesmos. Tanto nos ovos da tilápia do presente estudo, quanto nos ovos de pacu, o processo de segmentação é parcial ou meroblástico, ocorrendo somente no pólo animal (LAGLER et al., 1977). A continuidade deste processo, que é típico dos teleósteos, leva de um lado à diminuição do tamanho dos blastômeros; de outro, à formação de dois tipos celulares (células blastodérmicas e células periblásticas) e de outro, ao início do movimento de epibolia.

Durante a clivagem das células embrionárias de peixes, o número de células aumenta, enquanto o tamanho celular diminui, uma característica também relatada por Castellane et al. (1994) em *Prochilodus lineatus*.

Foram observados no presente estudo os movimentos celulares que acompanham a formação do embrião como a epibolia e os movimentos convergentes.

O início da gástrula se dá com o primeiro movimento de epibolia (LEME DOS SANTOS e AZOUBEL, 1996), estas observações estão de acordo com aquelas observadas em *Oreochromis niloticus* no presente experimento. Ganeco (2003) relatou em *Brycon orbignyanus* que o fim da epibolia é completado pelo fechamento do blastóporo pela blastoderme e a formação do botão caudal. Tal fechamento não foi evidenciado neste trabalho devido ao maior tamanho do ovo, o embrião não consegue estender através de todo o pólo vegetativo, por isso, a organogênese rudimentar (segmentação de somitos) inicia antes de terminar o movimento de epibolia, corroborando com a descrição do desenvolvimento embrionário de *O. niloticus* estudado por Morrison et al., 2001.

Na presente pesquisa o desenvolvimento embrionário em tilápia nos dois grupos de idades estudadas, a uma temperatura de 30°C, ocorreu entre 45 a 120 minutos após a fertilização e o início da eclosão ocorreu 54 horas após a fecundação, com 84 horas a eclosão foi total e as larvas recém eclodidas apresentaram um comprimento padrão médio de 4,77 mm. Nakatani et al. (1999) mostraram que em tilápias, o desenvolvimento embrionário a uma temperatura de 24 a 26°C, iniciou 90 minutos após a fertilização e a eclosão ocorreu em 72 horas após a fecundação, sendo que as larvas recém eclodidas mediam cerca de 5,42mm comprimento.

Morrison et al. (2001) sugerem que as variações ocorridas na taxa de embriogênese e desenvolvimento embrionário, tais como assimetria e malformação, estão relacionados com a idade de reprodução e a temperatura de incubação. Kimmel et al. (1995) e Morrison et al. (2001) verificaram que até dentro da mesma desova fertilizada e incubada em condições favoráveis, ocorre assimetria do desenvolvimento embrionário. Vallin e Nissling (1998) complementam dizendo que embriões malformados na fase de blástula apresentam desenvolvimento normal, indicando oportunidades similares de sobrevivência futura comparada com embriões controle.

As matrizes do grupo 1 (2 a 3 anos) e as matrizes do grupo 2 (3 e ½ a 4 anos) de *O. niloticus*, demonstraram uma reduzida assimetria do desenvolvimento e pouca variação na divisão dos blastômeros nos dois grupos, isto provavelmente se deve pela temperatura constante de 30°C. O tempo de desenvolvimento também não foi diferente quando se comparou as duas idades de *O. niloticus*.

5.6 - Desenvolvimento embrionário em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)

As fases de desenvolvimento embrionário da tilápia do Nilo foram analisadas em M.E.V. nas duas idades e complementou as características observadas em lupa, mostrando não haver diferença entre as fêmeas do grupo 1 e grupo 2.

A micrópila (orifício em forma de cone), local de penetração do espermatozóide só foi evidenciada em M.E.V., tanto nas fêmeas do grupo 1 e 2. Esta se caracterizou por apresentar uma densa rede de microfilamentos (Figura 11A). A penetração do espermatozóide através da micrópila pode ser observada de acordo com a figura 11B. E após a penetração do espermatozóide e formação do zigoto, numerosos espermatozóides podem ser encontrados nas proximidades da micrópila, aparentemente presos na rede de microfilamentos (Figura 11C).

As clivagens são ilustradas pelas figuras 11D, 11E e fase de mórula figura 11F.

O estágio de blástula foi evidenciado na figura 11G e o estágio de gástrula de acordo com as figuras 11H (início da gástrula), 11I (gástrula com 25% de epibolia), 12A (gástrula com 50% de epibolia), 12B final da gástrula (80% de epibolia) também puderam ser evidenciados.

Na organogênese (Figuras 12C e 12D) notou o início da diferenciação das regiões cefálica e caudal; o cérebro proeminente (Figura 12E), e a presença da vesícula ótica também pôde ser evidenciada (Figura 12F). No estágio larval, a cauda já está separada do vitelo caracterizando a completa formação da larva (Figura 12G e 12H). A região da notocorda também pôde ser notada na larva (Figura 13A). Evidenciou que em *O. niloticus* a larva eclode com a boca fechada (Figuras 13B e 13C). Os tempos de desenvolvimento foram os mesmos verificados em estereomicroscópio.

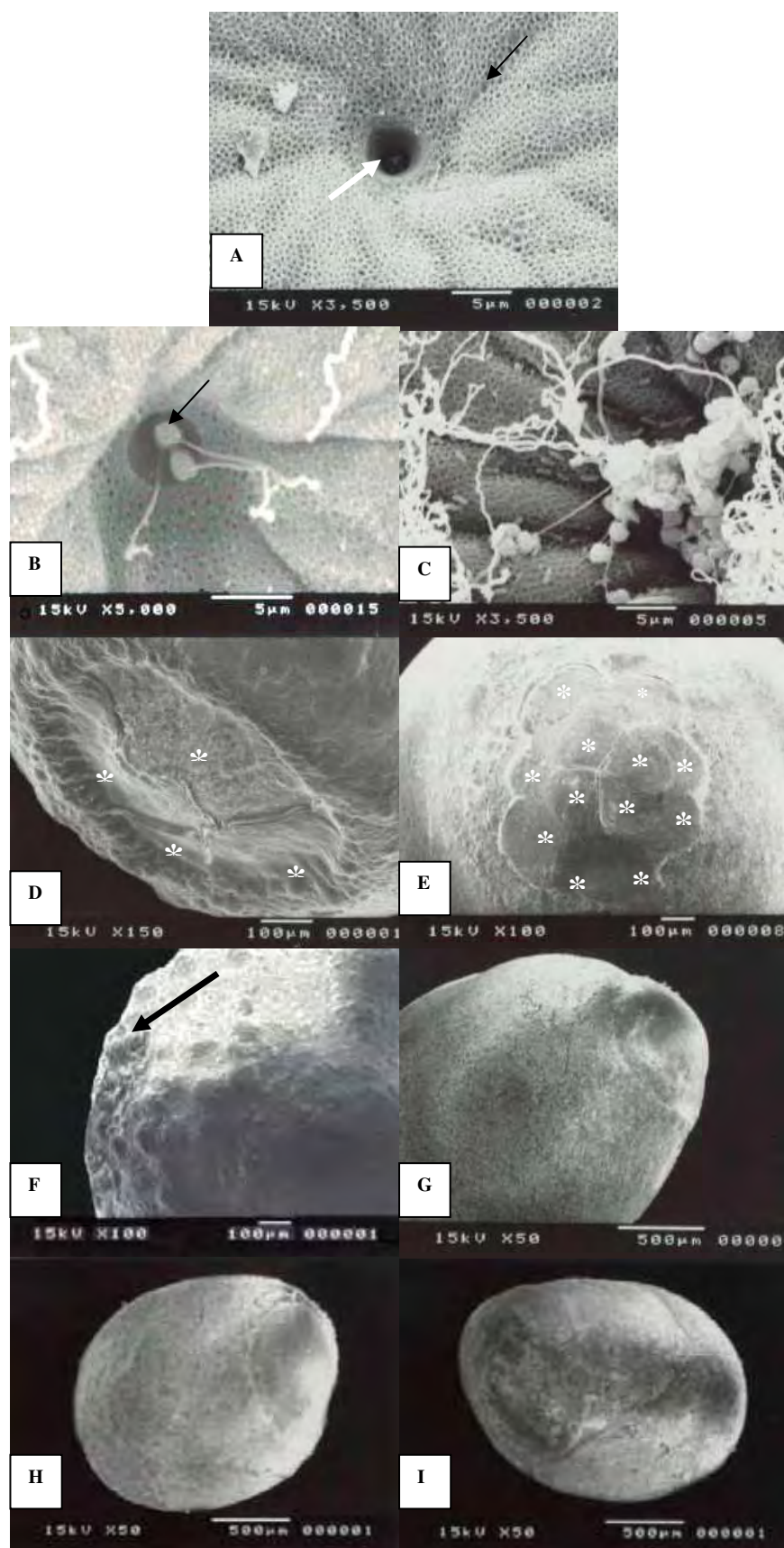


Figura 11: Eletromicrografia do desenvolvimento embrionário de *Oreochromis niloticus*. A - Extrusão (seta branca – micrópila, seta preta - microfilamento); B e C – fertilização (seta preta – espermatozóide); D e E - clivagens (* branco – blastômeros); F - mórula (seta preta - blastômero); G - blástula; H - início da gástrula; I - gástrula (25% de epibolia).

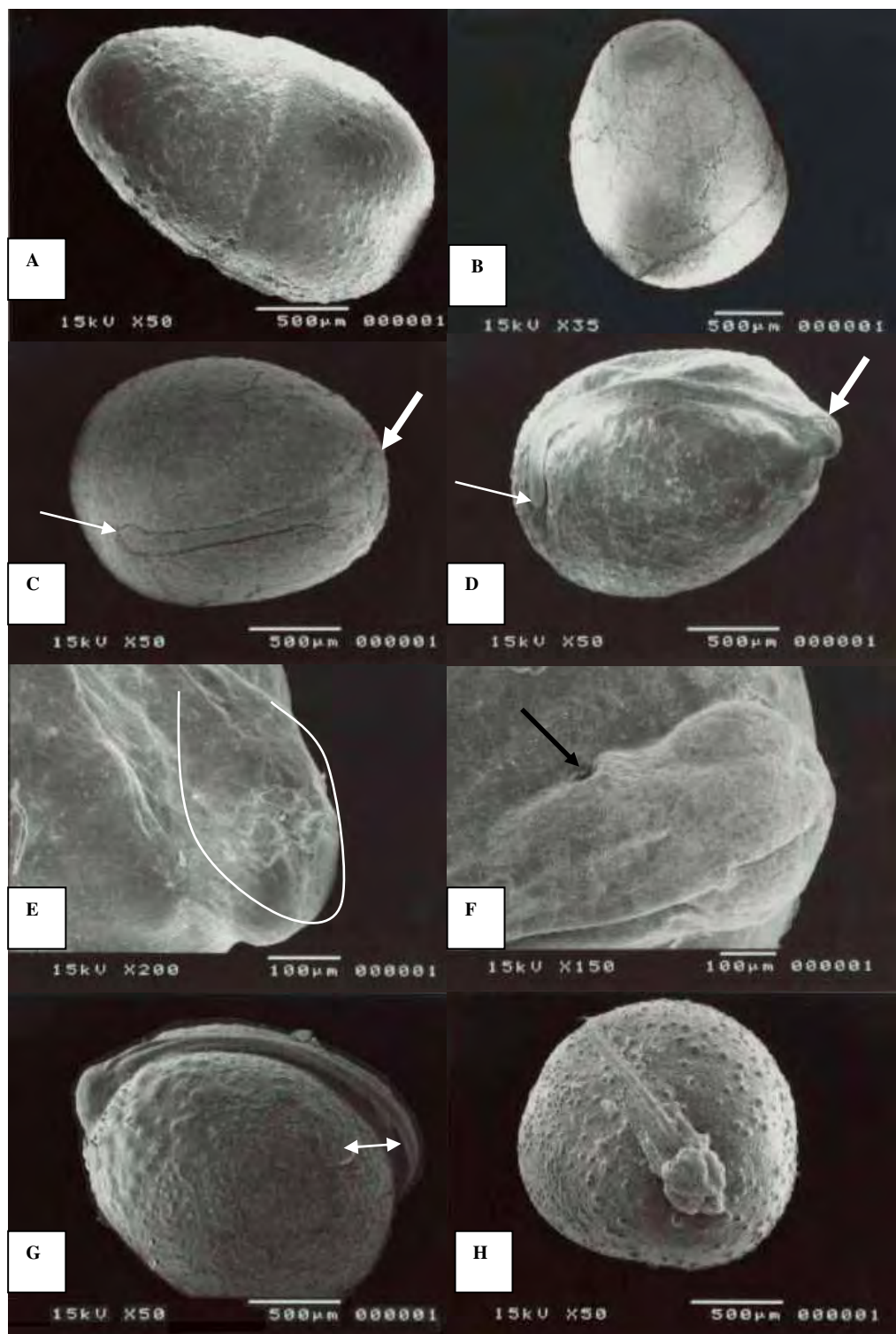


Figura 12: Eletromicrografia do desenvolvimento embrionário de *Oreochromis niloticus*. A - Gástrula (50% de epibolia); B - final da gástrula (80% de epibolia); C e D - diferenciação cefálica (seta branca grossa) e caudal (seta branca fina); E - cérebro proeminente (linha em círculo); F - vesícula ótica (seta preta); G e H - cauda separada do vitelo (seta branca com duas pontas) e completa formação da larva.

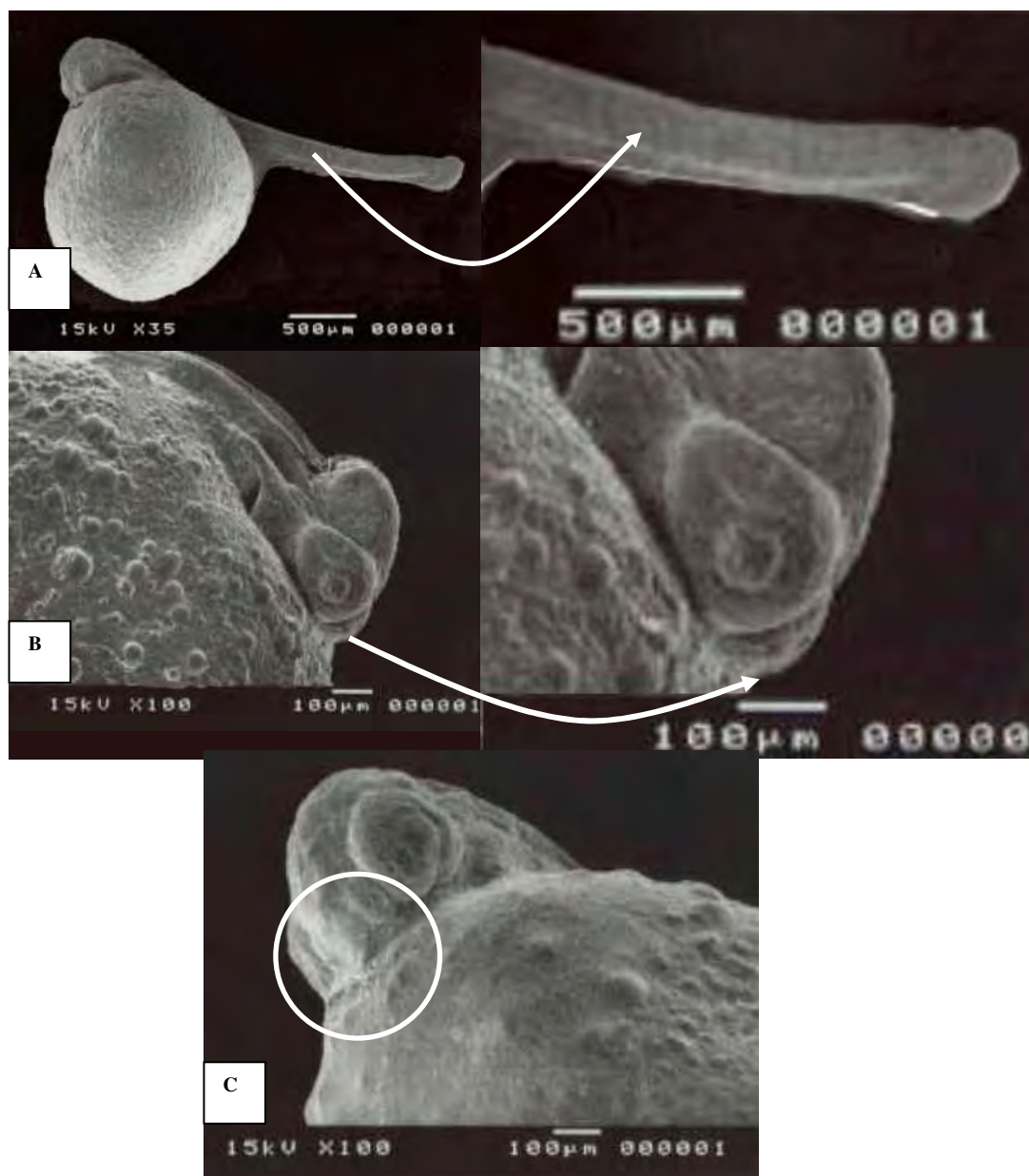


Figura 13: Eletromicrografia do desenvolvimento embrionário de *Oreochromis niloticus*. A - Larva eclodida e região da notocorda (seta branca no detalhe); B e C - boca fechada da larva (seta branca e círculo no detalhe).

A micrópila caracterizou-se no ovócito de *O. niloticus* como uma depressão na zona radiata ou abertura no pólo animal. O vestíbulo micropilar apresentou forma de funil com presença de vários sulcos ou pregas com disposição retilínea, permitindo a entrada de apenas um espermatozóide, também foi observado em M.E.V. que a larva eclode com a boca fechada, concordando com o observado por Morrison et al., 2001.

A superfície do ovócito em torno da abertura micropilar mostrou poros mais próximos uns dos outros em relação às outras áreas da superfície da zona radiata. Segundo Laale (1980), por esta pequena abertura o espermatozóide penetra no ovócito. A forma afunilada da micrópila revela que a abertura interna do canal permite a entrada de um único espermatozóide de acordo com estudos realizados por Kobayashi e Yamamoto, 1981; Hart e Donovan, 1983; Rizzo e Bazzoli, 1993. Sua morfologia varia em diferentes espécies de peixes (LAALE, 1980), entretanto, na maioria dos teleósteos apresenta forma de funil (HART, 1990).

No presente estudo depois da penetração do espermatozóide e formação do zigoto, ainda permaneceram numerosas células espermáticas próximas à micrópila, aparentemente presas nos filamentos da rede perimicropilar. Estas mesmas características também foram evidenciadas por Bern e Avtalion, 1990. Também foi evidenciado em M. E. V. que em *O. niloticus* a diferença de idade não influenciou no tempo de eclosão.

6 – CONCLUSÃO

A idade das fêmeas dos dois grupos estudados não influenciou para o produtor nas características em relação à qualidade do ovo e nem no tempo de desenvolvimento embrionário.

7 - REFERÊNCIAS

- BALINSKY, B. I. *An introduction to embryology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1970, p. 573-574.
- BERG, O. K.; THRONAES, E.; BREMSET, G. Energetics and survival of virgin and repeat spawning brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* v. 55, n. 1, p. 47-53, 1998.
- BERN, O., AVTALION, R. R. Some morphological aspects of fertilization in tilapias. *Journal of Fish Biology*, v. 36, p. 375-381, 1990.
- BONISLAWSKA, M.; FORMICKI, K.; WINNICKI, A. Size of eggs and duration of embryogenesis in fishes. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, v. 30, n. 1, p. 61-71, 2000.
- BONISLAWSKA, M.; FORMICKI, K.; KORZELECKA-ORKISZ, A.; WINNICKI, A. Fish egg size variability: biological significance. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries*, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2001.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128p.
- BRASIL. Ministério da agricultura e abastecimento. Secretaria executiva – Departamento de Pesca e Aqüicultura. *A tilápia – a escolha da espécie*. Disponível em: <http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias_tilapia.php?pag=apresentação>. Acesso em: 10 jan, 2007.
- BROMAGE, N. R.; CUMARANATUNGA, R. Egg production in the rainbow trout. In: MUIR, J. F., ROBERTS, R. (ed) *Recent advances in aquaculture*. London: Croom Helm, 1988, p. 63-138.
- BROOKS, S.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 7, p. 387-416, 1997.
- CASTELLANI, L. R.; TSE, H. G.; LEME DOS SANTOS, H. S. e FARIA, R. H. S. Desenvolvimento embrionário do curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas*, v. 11, p. 99–105, 1994.
- CHARNOV, E. L. *Life history invariants: some explorations of symmetry in evolutionary ecology*. Oxford: Oxford University Press, 1993.
- COLEMAN, R. M.; GALVÁNI, A. P. Egg size determines offspring size in neotropical cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae). *Copeia: American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, v. 1, p. 209-213, 1998.
- CRAIK, J. C. A. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, v. 47, p. 61-88, 1985.

- DABROWSKI, K.; LUCZYNSKI, M.; CZECZUGA, B.; FALKOWSKI, S. Relationships among coregonid fish reproductive effort, carotenoid content in egg and survival of embryos. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 79, suppl., p. 29-48, 1987.
- DEVAUCHELLE, N.; ALEXANDRE, J. C.; CORRE, N. L.; LETTY, Y. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, v. 69, p. 159-184, 1988.
- DINIS, M. T. *Methods of incubating Dover sole (Solea solea L.) eggs*. Relatorios de Atividades do Aquário Vasco da Gama, v. 2, 1982, 8 p.
- DUARTE, C. M.; ALCARAZ, M. To produce many small or few large eggs: a size-independent reproductive tactic of fish. *Oecologia*, v. 80, p. 401-404, 1989.
- DUSHKINA, L. A. Viability of herring (*Clupea*) eggs and fertilizing capacity of herring sperm stored under various conditions. *Journal of Ichthyology*, v. 15, p. 423-429, 1975.
- EINUM, S.; FLEMING, I. A. Maternal effects of egg size in Brown trout (*Salmo trutta*): norms of reaction to environmental quality. *Proceedings of the Royal Society of London B. Biological Sciences*, v. 266, p. 2095-2100, 1999.
- EINUM, S.; FLEMING, I. A. Does within-population variation in fish egg size reflect maternal influences on optimal values? *The American Naturalist*, v. 160, n. 6, p. 756-765, 2002.
- EYSON, K. N. Studies on egg production, spawning and fry development in Tilapia meleanotheron. *Grana Journal of Science*, v. 17, n. 1, p. 25-34, 1979.
- FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE. 50., 2000, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro: 2000, v. 1, p.3-8.
- GALMAN, O. R. Stages in early development of Tilapia nilotica. *Fish Res. J. Philipp*, v. 5, p. 7-16, 1980.
- GALMAN, O.R., AVTALION, R.R. Further study of the embryonic development of the *Oreochromis niloticus* (Ciclidae, teleostei) using scanning electron microscopy. *Journal of Fish Biology*, v. 34, p. 653-664, 1989.
- GANECO, L. N. *Análise dos ovos de piracanjuba, Brycon orbignyanos (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida*. Mestrado em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- GINZBURG, A. S. "Fertilization in fishes and the problem of polyspermy". Jerusalem: Keeter Press, 1971, 366 p.
- GISBERT, E.; WILLIOT, P.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Influence of egg size on growth and survival of early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. *Aquaculture*, v. 183, p. 83-94, 2000.

- GODINHO, H.M.; FENERICH, N. A.; NARAHARA, M. Y. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 38, p. 151-156, 1978.
- GOLTERMANN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*. London: Blackweel Science Publication, 1978, 214 p. (IBP Handbook 8).
- GUNASEKERA, R. M.; SHIM, K. F.; LAM, T. J. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v. 146, p. 121-134, 1996.
- HART, N. H. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *International Review of Cytology*, v. 121, p. 1-66, 1990.
- HART, N. H.; DONOVAN, M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of Brachydanio. *J. Exp. Zool.*, v. 227, p. 277-296, 1983.
- HAY, D. E. Effects of delayed spawning on viability of eggs and larvae of Pacific herring. *Transaction of the American Fisheries Society*, vol. 115, p. 155-161, 1986.
- HIROSE, K.; MACHIDA, Y.; DONALDSON, E. M. Induced ovulation of Japanese flounder (*Limanda yokohama*) with HCG and salmon gonadotropin, with special references to changes in the quality of eggs retained in the ovarian cavity after ovulation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v. 45, p. 31-36, 1979.
- IGARASHI, M. A. Cultivo de tilápia. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br>>, 1995. Acesso em: 10 jan. 2007.
- IWAMATSU, T. Egg activation. *Fish Biology Journal of Medaka*, v. 4, p. 1-10, 1992.
- IWAMATSU, T.; ISHIJIMA, S.; NAKASHIMA, S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 266, p.57-64, 1993.
- IWAMATSU, T.; OTHA, T.; OSHIMA, E.; SUGIURA, T. Requirement of extracellular calcium ions for the early fertilization events in the medaka egg. *Development Growth e Differentiation*, v.27, p.751-762, 1985.
- JONSSON, B. Life history patterns of freshwater resident and sea-run migrant brown trout in Norway. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 114, p. 182-194, 1985.
- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, v. 203, p. 253-310, 1995.
- KJORSVIK, E.; LONNING, S. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology*, v. 23, p. 1-12, 1983.

- KJORSVIK, E.; STENE, A.; LONNING, S. Morphological, physiological and genetical studies of egg quality in cod (*Gadus morhua* L.). *Flodevigen rapportserie* v. 1, p. 67-86, 1984.
- KJORSVIK, E.; MANGOR-JENSEN A.; HOLMEFJORD I. Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology*, v. 26, p. 71-113, 1990.
- KOBAYASHI, W.; YAMAMOTO, T. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 217, p. 265-275, 1981.
- KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: Acqua & Imagem, 2000. 289 p.
- KUDO, S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Development Growth e Differentiation*, v. 22, n. 3, p. 403-414, 1980.
- LAALE, W. H. The perivitelline space and egg envelopes of Bony fishes: A review. *Copeia* v. 2, p. 210-226, 1980.
- LAGLER, K. F.; BARDACH, J. E.; MILLER, R. R. and PASSINO, D. R. M. *Ichthyology*. Second Edition. John Wiley e Sons, New York, 506p., 1977.
- LEME DOS SANTOS, H.S.; AZOUBEL, R. *Embriologia comparada*. Jaboticabal: FUNEP, 1996, 189p.
- LIMA, M.B.S; PADUA, D.M.C.; SILVA, P.C. et al. Farelo de milho (*Pennisetum americanum*) em substituição ao milho moído (*Zea mays*) em dietas para tilápia *Oreochromis niloticus*. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 55, 2000, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro, 2000. v.1, p.120-124.
- LONGO, F. J. *Fertilization*. London: Chapman and Hall, 1987, 183 p.
- LÖNNING, S.; KJORSVIK, E.; PORT, J. The hardening process of the chorion of the cod, *Gadus morhua* L., and lamp sucker, *Cycloperus lumpus* L. *Journal of Fish Biology*, v. 24, p. 505-522, 1984.
- McEVOY, L. A. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot. *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology*, v. 24, p. 437-448, 1984.
- MOORE, K. L; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia clínica*. 5ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1994, p. 177-213.
- MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT Jr, J. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*, v. 247, p. 172-195, 2001.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A., SANCHES, P. V.; CAVICCHIOLI, M. *Os ovos e larvas de peixes de água doce, desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: UEM Nupléia, 1999, 359 p.

- NEUMANN, E. *Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia, Oreochromis niloticus e uma linhagem híbrida de Oreochromis sp.* 2004, 63f. Dissertação em Aquicultura- Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal.
- OHTA, T. Initial stages of sperm-egg fusion in the freshwater teleost, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *The Anatomical Record*, v. 229, p. 195-202, 1991.
- PAES, M. C. F.; NAKAGHI, L. S. O.; MAKINO, L. C. *Desenvolvimento de embriões e larvas de Oreochormis niloticus sob estereomicroscópio*. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 13., 2005, Ribeirão Preto-SP.
- PINTO, C. S. R. M. *Criação de Tilápias*. São Paulo: Instituto de Pesca (Boletim Técnico, v. 10, 13p.), 1998.
- PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. *Manual de piscicultura tropical*. Brasília: IBAMA, 1994, 195 p.
- RANA, K. J. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L.) eggs and fry.I. Gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development. *Aquaculture*, v. 87, p. 165-181, 1990.
- REED, S. J. B. *Electron microprobe analysis and scanning electron microscopy in geology*. New York, Cambridge University Press, 1996, 201 p.
- RIBEIRO, C. R.; LEME DOS SANTOS, H. S.; BOLZAN A. A. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacú, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido tambacú). *Revista Brasileira de Biologia*, v.55 (Supl. 1), p. 65-78, 1995.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of prochilodus affinis Reinhardt, 1874 (Pisces Characiformes). *European Archives of Biology, Bruxelles*, v. 104, p. 1-6, 1993.
- SAKAI, K.; NOMURA, M.; TAKASHIMA, F. Characteristics of naturally spawned eggs of red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v. 51, p. 1395-1399, 1985.
- SANCHES, P. V.; NAKATANI, K.; BIALETZKI, A. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná River. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 3, n. 59, p. 429-438, 1999.
- SARGENT, R. C.; TAYLOR P. D.; GROSS, M. R. Parental care and the evolution of egg size in fishes. *The American Naturalist*, v. 129, n. 1, p. 32-46, 1986.
- SAS INSTITUTE. *SAS/STAT user's guide: statistics*, version 5. Cary, 1991, 1028p.
- SCHATTEN, G. *Fertilization*. In: Encyclopedia of Reproduction. London: Academic Press, 1999, v. 2.
- SCHECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, v. 197, p. 3-24, 2001.

- SENTHILKUMARAN, B.; SUDHAKUMARI, C-C; CHANG, X-T; KOBAYAH, T.; OBA, Y.; GUAN, G.; YOSHIURA, Y.; YOSHIKUNI, M.; NAGAHAMA, Y. Ovarian carbonyl reductase-like 20b-hidroxysteroid dehydrogenase shows distinct surge in messenger RNA expression during natural and gonadotropin-induced meiotic maturation in Nile Tilapia. *Biology of reproduction*, v. 67, p. 1080-1086, 2002.
- SHARDO, J. D. Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the American Shad, *Alosa sapidissima* (Wilson, 1811). *Journal of Morphology*, v. 225, p. 125-167, 1995.
- SHIELDS, R. J.; BROWN, N. P.; BROMAGE, N. R. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*, v. 155, p. 1-12, 1997.
- SINERVO, B.; SVENSSON, E.; COMENDANT T. Density cycles and an offspring quantity and quality game driven by natural selection. *Nature*, v. 406, p. 985-988, 2000.
- SPRINGATE, J. C. R.; BROMAGE, N. R. Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (Salmon gairdneri Richardson). *Aquaculture*, v. 47, p. 163-172, 1985.
- STATOVA, M. P.; TALIKINA, M. G.; KALINICH, R. A. Physiological-chemical characteristics of the eggs of common carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae), under conditions of fish farming. *Journal of Ichthyology*, v. 22, p. 117-128, 1982.
- VALLIN, L.; NISSLING, A. Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs – results from an experimental study. *Fisheries Research*, v. 38, p. 247-255, 1998.
- VAZZOLER, A. E. M. Biologia e reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: CNPq – Nupélia, 1996, 169 p.
- WALLACE J. C.; AASJORD, D. An investigation of the consequences of egg size for the culture of Arctic char, *Salvelinus alpinus* L. *Journal Fish Biology*, v. 24, p. 427-435, 1984.
- WARGA, R. M. e KIMMEL, B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, v. 108, p. 569-580, 1990.
- WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M; FITZSIMMONS, K.; outros autores. Tilápia production systems in the Americas: technological advances trend and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, v. 10, p. 465-498, 2002.
- WOOTTON, R. J. Energy costs of egg production and environmental determinants of fecundity in teleost fishes. *Symposium of the Zoological Society of London*, v. 44, p. 133-159, 1979.
- WOOTTON, R. J. Life histories as sampling devices: optimum egg size in pelagic fishes. *Journal of Fish Biology*, v. 45, p. 1067-1077, 1994.
- ZHUKINSKIY, V. N.; GOSH, R. I. Criteria of biological quality of eggs of commercial fishes and a method for rapid assessment. *Journal of Ichthyology*, v. 28, n.6, p. 106-114, 1988.