



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



**ANÁLISE HISTOLÓGICA E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE JAÚ (*Zungaro jahu*)**

**Camila Marques
Bióloga**

**Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2008**

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

**“Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de
jaú (*Zungaro jahu*)”**

Camila Marques

Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para o exame de defesa de Mestrado em Aqüicultura.

**Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2008**

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE HISTOLÓGICA E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE JAÚ (Zungaro jahu)

AUTORA: CAMILA MARQUES

ORIENTADORA: Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AQUICULTURA
pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfol e Fisiol Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal/UNESP

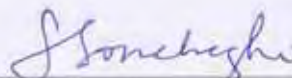
Prof. Dr. HUGO PEREIRA GODINHO

DEPTO. DE MORFOLOGIA/INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS - UFMG

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

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

Data da realização: 26 de junho de 2008.



Presidente da Comissão Examinadora
Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

**“A Deus, fonte de toda vida, que através dos
estudos biológicos, nos faz reconhecer a
maravilhosa perfeição de todo ser vivo”**

Dedicatória

*A Deus que pela presença infinita e
força diária em todos os momentos da minha vida*

Aos meus pais Alcir e Rosane por estarem sempre ao meu lado em todas as decisões, por todo amor, carinho, compreensão e dedicação a mim dispensado e me ajudarem a tornar os sonhos realidade. Aos meus irmãos Natália e Felipe pela amizade e apoio em todos os momentos.

*Ao meu Amor Bruno pelo amor, carinho,
apoio, paciência, incentivo e por toda a ajuda com este trabalho.*

HOMENAGEM ESPECIAL

À Profa. Laura Satiko Okada Nakaghi

Aqueles que quando deveriam ser simplesmente professores, foram mestres, nos transmitindo seus conhecimentos e experiências; que quando deveriam ser mestres foram amigos e em sua amizade nos compreenderam e nos incentivou a seguir nosso caminho, expressamos os nossos maiores agradecimentos e o nosso profundo respeito, que sempre serão poucos diante do muito que foi oferecido “. (autor desconhecido)

Agradecimentos

À Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP – Jupiá), na pessoa do Sr. René Belmont pelo fornecimento do material biológico necessário a esta pesquisa.

Aos técnicos da CESP que auxiliaram na reprodução induzida e desova dos reprodutores e coletas dos materiais.

À Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini-Vicentini e a Dra. Luciana Nakaghi Ganeco pelas valiosas sugestões dadas a este trabalho no momento da qualificação.

Ao Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho e Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira pela honrosa presença na banca de defesa, por todas as sugestões dadas e pelas experiências transmitidas.

Ao histotécnico e grande amigo, Sr. Orandi Matheus pelo auxílio nas técnicas histológicas para colorações das amostras e por todos os momentos de conversa e alegria compartilhados no laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini e Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini-Vicentini por possibilitarem o uso do espaço e equipamentos do Lab. de Morfologia de Organismos Aquáticos (FC-UNESP Bauru), ao Biólogo Bruno Bertolucci por se dispor a realizar a inclusão e os cortes histológicos.

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 técnicos do Lab. de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina – USP Ribeirão Preto, Tuca, pelo auxílio na preparação das amostras em microscopia eletrônica de transmissão.

À diretoria, coordenadores e funcionários da pós-Graduação do Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP, pelo carinho e atenção dispensados. Aos professores pelos ensinamentos e amizades estabelecidas.

Aos colegas do Lab. de Histologia e Embriologia do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV-UNESP Jaboticabal) Angélica, Bel, Érika, Érico, Francine, Fernanda, Lillian, Maria e Verônica, por toda a ajuda durante este trabalho, por todas as horas divertidas, pelas reuniões científicas e pelos conselhos que me auxiliaram sempre.

*Às minhas amigas (irmãs e meia-irmãs de República) Francine, Franzinha, Fernanda, Louise, Maria, Michelle,
Nani por todos os momentos que passamos, pela alegria, apoio, amizade, tristezas, conselhos, tapiocas,
brigadeiros..., por tudo, vocês estarão sempre no meu coração!*

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP

A Capes pelo auxílio concedido em forma de bolsa.

À todos, o meus Muito Obrigada!!!

Sumário

Lista de Figuras	x
Resumo	xi
Abstract	xii
Introdução Geral	13
Referências Bibliográficas.....	24
Artigo 1 – Morfologia dos ovócitos e ovos do jaú (<i>Zungaro jahu</i>) da extrusão à eclosão	34
Resumo.....	35
1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos.....	37
3. Resultados.....	39
4. Discussão.....	43
5. Referências Bibliográficas.....	46
Artigo 2 – Ontogenia das larvas do jaú (<i>Zungaro jahu</i>) da eclosão à absorção do vitelo	59
Resumo.....	60
1. Introdução.....	61
2. Material e Métodos.....	62
3. Resultados.....	63
4. Discussão.....	68
5. Referências Bibliográficas.....	73
Apêndice	85
Normas da Revista <i>Zygote</i>	86
Normas da Revista <i>The International Journal of Developmental Biology</i>	88

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1** – Fotomicrografias do ovócito e ovo de *Z. jahu*. **a**: ovócito; **b**: fase zigoto; **c-h**: fase clivagem; **i**: fase mórula; **j**: fase blástula..... 52
- Figura 2** – Fotomicrografias do ovo, embrião e larva eclodida de *Z. jahu*. **a-c**: fase gástrula; **d-e**: fase segmentação; **f**: fase eclosão..... 53
- Figura 3** – Eletronmicrografias do ovócito e ovo de *Z. jahu*. **a**: ovócito; **b**: detalhe da periferia do ovócito; **c**: detalhe do citoplasma cortical; **d**: micrópila com vários espermatozóides; **e**: presença de 2 blastômeros; **f**: presença de 4 blastômeros..... 54
- Figura 4** – Fotomicrografias do ovócito e ovo de *Z. jahu*. **a**: detalhe da micrópila; **b**: ovócito durante a fertilização; **c**: detalhe da periferia do ovócito; **d**: célula ovo; **e**: presença de 2 blastômeros; **f**: presença de 8 blastômeros..... 55
- Figura 5** – Eletronmicrografias do ovo, embrião e larva de *Z. jahu*. **a-c**: 8, 16, 32 blastômeros; **d**: fase mórula; **e**: diferenciação da região cefálica e caudal; **f**: larva eclodida..... 56
- Figura 6** – Fotomicrografias do ovo de *Z. jahu*. **a**: presença de 32 blastômeros; **b**: presença de 64 blastômeros; **c**: fase mórula; **d**: fase blástula, detalhe de mitoses; **e-f**: fase gástrula..... 57
- Figura 7** – Fotomicrografias do embrião e larva de *Z. jahu*. **a**: diferenciação da região cefálica e caudal; **b**: alongamento do embrião; **c**: diferenciação miômeros; **d**: prosencéfalo; **e**: larva eclodida..... 58

Artigo 2

- Figura 1** – Fotomicrografias do sistema digestório das larvas de *Z. jahu*. **a**: eclosão; **b**: 8 horas pós-eclosão (hpe); **c-d**: 36 hpe; **e**: 60 hpe..... 78
- Figura 2** – Foto e Eletronmicrografias da cavidade bucal das larvas de *Z. jahu*. **a**: 12 hpe; **b**: 20 hpe; **c-d**: 24 hpe; **e**: 24 hpe..... 79
- Figura 3** – Fotomicrografias do sistema digestório das larvas de *Z. jahu*. **a-b**: 28 hpe; **c**: 20 hpe; **d**: 60 hpe; **e**: 24 hpe..... 80
- Figura 4** – Foto e Eletronmicrografias das brânquias e coração das larvas de *Z. jahu*. **a**: 24 hpe; **b**: 8 hpe; **c**: 28 hpe; **d**: 60 hpe; **e**: 28 hpe; **f**: 32 hpe..... 81
- Figura 5** – Fotomicrografias do pronefro, bexiga natatória, tireóide e ouvido interno das larvas de *Z. jahu*. **a**: 16 hpe; **b**: 60 hpe; **c**: 48 hpe; **d**: 24 hpe; **e**: 56 hpe; **f**: 8 hpe; **g**: 60 hpe..... 82
- Figura 6** – Foto e Eletronmicrografias do olho e fossas nasais das larvas de *Z. jahu*. **a**: 12 hpe; **b**: 60 hpe; **c**: 0 hpe; **d**: 28 hpe; **e**: 48 hpe; **f**: 60 hpe..... 83
- Figura 7** – Foto e Eletronmicrografias do neuromastos e barbilhões das larvas de *Z. jahu*. **a**: 44 hpe; **b**: 16 hpe; **c**: 24 hpe; **d**: 40 hpe..... 84

Marques, Camila. (2008). Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de Jaú (*Zungaro jahu*). *Dissertação* (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o desenvolvimento embrionário e larval do *Zungaro jahu*, peixe nativo do Brasil, conhecido popularmente como jaú, pertencente à ordem Siluriforme e ameaçado de extinção. As coletas foram realizadas na Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias – Jupiá (CESP – Castilho, SP). As amostras foram coletadas em tempos pré-determinados da extrusão até à absorção total do vitelo, e destinadas ao processamento para análise em microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão. O desenvolvimento embrionário do *Z. jahu* foi dividido em 7 estágios: zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, organogênese e eclosão. Durante o período larval observou-se o desenvolvimento dos principais órgãos, dentre eles: órgãos do sistema digestório, coração, arcos branquiais, sistema nervoso/sensorial, tireóide, pronefro e bexiga gasosa. Os ovos na extrusão apresentaram diâmetro médio de $1,38 \pm 0,06$ mm, e as larvas eclodidas $3,79 \pm 0,11$ mm. Os ovócitos e ovos, após a fertilização, apresentaram formato discóide, coloração amarela e uma única micrópila. Aos 10 min pós-fertilização (mpf) houve diferenciação dos pólos animal e vegetativo. A formação da célula-ovo ocorreu aos 15 mpf. Dos 20 aos 75 mpf ocorreram sucessivas clivagens até a fase de mórula observada entre 90 e 105 mpf. Em seguida identificaram-se as fases de blástula e gástrula, com 120 e 180 mpf, respectivamente. O final da fase de gástrula, 360 mpf, caracterizou-se pela formação do tampão vitelino. A partir disso, iniciou-se a diferenciação das regiões cefálica e caudal, o alongamento do embrião, culminando na eclosão de larvas transparentes com pontos de pigmentação após 780 mpf. A absorção total do vitelo foi observada com 60 horas pós-eclosão (hpe) a uma temperatura média de $28,75 \pm 0,59$ °C. As larvas recém-eclodidas apresentaram esboço do trato digestório, olhos bem evidentes e primeiros movimentos natatórios. A abertura da boca ocorreu com 12 hpe e a ligação entre a cavidade bucal e o intestino anterior com 24 hpe. Todos os órgãos analisados tornaram-se mais desenvolvidos e funcionais com o crescimento da larva. O estudo do desenvolvimento inicial do *Z. jahu* é importante por fornecer informações necessárias para o desenvolvimento de planos de manejo na criação e exploração racional, identificação dos ovos e larvas na natureza, possibilitando a maior preservação desta espécie.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, jaú, larva, morfologia, peixe.

Marques, Camila. (2008). Histology and electron microscopy of early development of the Jaú (*Zungaro jahu*). Master Thesis (Master Degree in Aquaculture) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the early embryonic and larval development of *Zungaro jahu*, a Brazilian fish, commonly known as Jaú belonging to Siluriform Order and in danger of extinction. The collections were carried out at the Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias – Jupiá (CESP – Castilho/SP). The samples were collected in pre-established times at eggs extrusion until the yolk absorption and processed to analysis by light, scanning and transmission electron microscopy. Early embryonic development of *Z. jahu* was divided in seven stages: zygote, cleavage, morula, blastula, gastrula, organogenesis and hatching. During the larval period the main organs development was noted: digestive tract, heart, gills arches, nervous/sensorial systems, thyroid, kidney and swim bladder. The eggs dimensions in average diameters at extrusion were 1.38 ± 0.06 mm and the larvae were 3.79 ± 0.11 mm. The fertilized oocytes and eggs presented a discoid shape, yellowish colour and a single micropyle. At 10 minutes after fertilization (maf) there was the differentiation of animal and vegetative poles. The egg cell formation occurred at 15 maf. At 20 to 75 maf occurred successive cleavages until morula phase seen at 90 and 105 maf. Then blastula and the gastrula phases were identified at 120 and 180 maf, respectively. The end of gastrula phase at 360 maf was characterized by formation of the yolk plug. From this there was the differentiation of cephalic and caudal regions, embryo elongation, ending in the hatching of transparent larvae with pigmentation sites at 780 maf. The total yolk absorption was noted at 60 hours after hatching (hah) to an average temperature of 28.75 ± 0.59 °C. The newly hatched larvae presented a rudimentary digestive tract, developed eyes and first swimming movements. The mouth opening occurred at 12 hah and the linking among mouth cavity and the anterior intestine at 24 hah. All the analyzed organs had become more developed and functional with larvae growing. The study of early development of the *Z. jahu* is important by providing informations about rational management and rearing conditions in identification of eggs and larvae in nature, allowing the best preservation of this species.

Key-words: embryonic development, jaú, larvae, morphology, fish.

INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura mundial vem apresentando pleno desenvolvimento, sendo que em 1999 houve expansão ao redor de 9%, enquanto que nesse mesmo período o crescimento no Brasil foi de 35%. Esse aumento foi consequência, principalmente, dos mercados de pesque-pague e do pescado processado (Roubach *et al.*, 2003).

O aumento da produção de peixes, crustáceos e moluscos, em águas continentais, tem ocorrido a uma taxa média de 7% ao ano, em contraste com os 5,4% da aquicultura marinha, durante as últimas três décadas. Do total da produção continental no ano de 2000, os peixes constituíram o grupo mais representativo, com 97,7% de participação, com destaque para produção de carpas, tilápias, trutas, bagres e enguias (FAO, 2002).

O Brasil possui grande potencial hídrico, climático e a mais rica fauna de peixes de água doce do mundo se destacando como um dos países de maior potencial para a expansão da aquicultura. Contudo, a piscicultura ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento, devido aos processos de produção adotados e à falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico e deficiência de dados científicos acerca de sua biologia, especialmente a reprodutiva (Godinho, 2007). Mesmo com o aprimoramento das técnicas de reprodução, alimentação e manejo na piscicultura, muitos problemas precisam ainda ser resolvidos, principalmente com relação a larvicultura de peixes, que representa um forte ponto de estrangulamento na produção de grandes quantidades de alevinos (Beerli *et al.*, 2004).

Segundo Pezzato (1997 – *apud Luz et al.*, 2001) o sucesso da aquicultura está associado ao conhecimento das características morfofisiológicas e comportamental das espécies. Pinto & Castagnolli (1984 *apud Luz et al.*, 2001) afirmaram que o estudo dos primeiros dias de vida dos peixes é muito importante, especialmente de espécies selvagens, potencialmente viáveis para a piscicultura.

Com relação ao grande número de espécies nativas brasileiras, muito pouco se conhece acerca de seu desenvolvimento embrionário. A descrição dos estágios embrionários de uma espécie pode fornecer inúmeras vantagens, tais como: o reconhecimento dos embriões em ambientes naturais, o que permite uma melhor avaliação do local de desova daquela espécie, e a detecção das alterações relacionadas aos fatores ambientais nas incubadoras, as quais poderão acarretar más-formações larvais e baixa produtividade (Alves & Moura, 1992).

As espécies pertencentes à família Pimelodidae caracterizam-se por apresentar nadadeiras dorsal e peitorais geralmente providas de espinhos pungentes e a nadadeira adiposa sempre presente. Possuem um par de barbilhões maxilares e dois pares mentonianos, os dentes são viliformes e localizados em placas dentíferas no pré-maxilar e dentário, a abertura branquial estende-se além da base das nadadeiras peitorais. A maioria das espécies apresenta hábito noturno, passando o dia escondidas e saindo à noite para explorar o ambiente, muitas delas apresentam órgãos sensitivos (barbilhões e barbelas quimiorreceptoras) muito desenvolvidos, o que as torna capazes de explorar eficientemente o meio, mesmo na ausência de luz (Nakatani *et al.*, 2001).

Os bagres pimelodídeos são importantes componentes nas capturas de peixes de água doce da América do Sul. A família engloba cerca de 30 gêneros e 90 espécies com ampla variação de tamanhos – desde 20 até maiores que 200 cm. (Mateus & Penha, 2007). A espécie *Zungaro jahu* pertence a essa família, é conhecido no Brasil como *jaú* (*ya-ú* = grande comedor na língua indígena), sendo o maior peixe encontrado nas bacias Paraná-Paraguai e Uruguai, atingindo até 144 cm de comprimento e 150 kg de peso. (Agostinho *et al.*, 2004).

Silvergrip (1992) colocou o gênero *Paulicea* H. Von Ihering, 1898, na sinonímia de *Zungaro* Bleeker, 1958. O jaú, conhecido até pouco tempo como *Paulicea luetkeni*, seguindo as normas internacionais de nomenclatura zoológica passou a ser designado como *Zungaro jahu* (espécies do Sul, Sudeste e Centro-oeste) e *Zungaro zungaro* (espécie amazônica). Apesar de existirem poucos dados sobre seu real estado de conservação, o *Z. jahu* é oficialmente considerado ameaçado de extinção nos estados de Minas Gerais e Paraná. Em São Paulo e no Rio Grande do Sul não foram incluídos na lista oficial, e em Santa Catarina, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás não foi considerado, pois ainda não há lista oficial. Recentemente o Ministério do Meio Ambiente publicou a “Lista Nacional das espécies ameaçadas de extinção e Sobreexplotadas ou Ameaçadas de Sobreexploração” e agravou a situação do *Z. jahu*, pois a espécie publicada na lista foi a amazônica (*Z. zungaro*) ao invés do *Z. jahu*. Devido a esse erro o *Z. jahu* torna-se mais ameaçado, não podendo ser contemplado com projetos financiados pelo governo, pois seu nome não consta na lista oficial (Alves, 2006).

Nos rios Paraná e Amazonas, esses peixes cumprem todo o seu ciclo de vida, abrigando-se primeiramente em áreas profundas quando adultos e nas bocas de riachos e pequenos tributários quando

larvas. Ao contrário de outras espécies migradoras, as larvas desta espécie não têm sido encontradas em lagoas marginais e canais do Rio Paraná. Quase ausente nas altas regiões da bacia do Alto Paraná, era uma importante espécie na época da pesca no reservatório de Itaipu. Durante este período, juvenis foram capturados no reservatório e os adultos na zona fluvial. No entanto, a produção da espécie tem reduzido drasticamente durante a última década, provavelmente devido à sobrepesca de indivíduos de pequeno porte e assim impedindo o recrutamento adequado (Agostinho *et al.*, 2004).

Esta espécie apresenta cabeça larga e deprimida, o corpo relativamente roliço, o focinho amplo e a boca larga e terminal. A cor de fundo é castanho-escuro amarelada, com muitas pontuações castanho-escuras sobre o dorso e os flancos. Tem preferência pelos rios caudalosos, vivendo no fundo destes ou no pé das cachoeiras sendo um piscívoro noturno (Vaz *et al.*, 2000).

Atinge a primeira maturação com 70 cm de comprimento total. A desova ocorre entre os meses de dezembro e fevereiro. Realizam grandes deslocamentos na época da reprodução, sendo um migrador típico e os ovos são livres (Vaz *et al.*, 2000). Informações sobre sua biologia e ecologia são escassas, e a maioria está relacionada à nutrição, parasitologia ou morfologia (Agostinho *et al.*, 2004). É uma espécie vulnerável da fauna, sujeita à extinção devido à destruição de seu habitat. Sua criação em cativeiro está ainda em estágios preliminares (Vaz *et al.*, 2000), apesar de ser uma espécie que apresenta potencial para a aqüicultura (Godinho, 2007).

O desenvolvimento inicial de peixes compreende as etapas do ciclo biológico que abrange ovos, embriões e larvas até a reabsorção total do saco vitelino. O processo embrionário inicia-se com a fecundação do ovócito pelo espermatozóide via micrópila, e concentra-se basicamente na reorganização dos elementos do ovo. Para ser compreendido deve ser combinado com estudos da topologia dos ovos fertilizados (Depêche & Billard, 1994).

Alguns dos eventos que ocorrem após à fertilização incluem despolarização da membrana plasmática do ovo, penetração do espermatozóide, exocitose do conteúdo dos alvéolos corticais, formação do espaço perivitelino e posterior divisão meiótica (Iwamatsu, 1992).

Os ovos da maioria dos teleósteos são envolvidos por uma membrana vitelina relativamente espessa – o córion – e normalmente apresentam uma única micrópila no pólo animal, entretanto os ovos de *Polyodon sphenotulus* apresentaram de 4 a 12 micrópilas no pólo animal (Linhart & Kudo, 1997). A

micrópila consiste em uma depressão em forma de funil, presente no córion (Kudo, 1980; Laale, 1980; Kobayashi & Yamamoto, 1981; Hart, 1990; Iwamatsu, 2000) e existe nos peixes, pois, diferentemente dos espermatozóides dos mamíferos, os espermatozóides dos teleósteos não possuem acrossoma (Iwamatsu, 2000).

Chen *et al.* (1999) sugerem que a superfície externa do córion e microestrutura da micrópila são dignas de nota como ferramenta na identificação de ovos e estudos filogenéticos em peixes. Porém, os autores afirmam que a superfície externa do córion geralmente não apresenta diferenças notáveis na microestrutura entre espécies do mesmo gênero ou família, com estas diferenças sendo mais bem observadas na micrópila, que deve apresentar mecanismos para prevenir a hibridização interespecífica.

Brasil *et al.* (2002) observaram que nos peixes teleósteos o estudo morfológico da fertilização tem sido feito com diferentes enfoques, fato que dificulta a compreensão dos mecanismos e eventos que estão correlacionados como causa e efeito. Estes estudos são importantes para uma melhor compreensão da biologia comparada e podem contribuir na otimização do manejo reprodutivo na piscicultura.

Como a fertilização em ovos de peixes é normalmente monoespermática (Kobayashi & Yamamoto, 1981), após a entrada do primeiro espermatozóide ocorrem fenômenos de prevenção à poliespermia. Barreiras mecânicas como a abertura interna da micrópila (Brummett & Dumont, 1979; Kobayashi & Yamamoto, 1981; Hart & Donovan, 1983; Kudo *et al.*, 1994), formação do cone de fertilização (Kudo, 1980; Iwamatsu *et al.*, 1991; Brasil *et al.*, 2002) e ativação da reação cortical levando ao impedimento da penetração de espermatozóides supranumerários (Iwamatsu & Ohta, 1981; Iwamatsu *et al.*, 1993) são eventos que combatem a poliespermia.

Após a fertilização ocorre então a hidratação dos ovos, que juntamente com a exocitose dos alvéolos corticais, contribui para o aumento do espaço perivitelino. Ribeiro *et al.* (1995) sugerem que a morfologia do ovo, apresentando amplo espaço perivitelino logo após a fecundação, mostra que o embrião será protegido contra as injúrias do meio ambiente e terá desenvolvimento externo harmonioso. Kunz (2004) afirma que o espaço perivitelino se forma mesmo em ovos não fertilizados, ativados pelo contato do gameta feminino com a água, desencadeando a reação cortical.

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 & Azoubel, 1996).

Após os eventos desencadeados pela fertilização, o ovo passa a sofrer alterações que incluem clivagens, movimentação celular e formação dos esboços dos órgãos (Ganeco, 2003).

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 & Azoubel, 1996). A primeira clivagem divide o blastodisco em 2 células, de igual tamanho (Wourms & Evans, 1974; Carter & Wourms, 1991; Iwamatsu, 1994; Kimmel *et al.*, 1995). As clivagens iniciam do centro para as bordas do blastodisco (Matkovic *et al.*, 1985; Shardo, 1995) e o número de blastômeros aumenta enquanto seu tamanho diminui (Wourms & Evans, 1974; Castellani *et al.*, 1994, Nakaghi *et al.*, 2006).

Na fase de blástula em *Fundulus* (Trinkauss, 1984), *Brachidanio rerio* (Kimmel & Law, 1985; Kane *et al.*, 1992; Kimmel *et al.*, 1995) e *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2007), ocorre a formação da camada sincicial de vitelo, que é uma camada citoplasmática contínua localizada entre o disco da blastoderme e o vitelo, resultando de uma divisão incompleta dos blastômeros (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2007).

A fase de gástrula é caracterizada pelos movimentos de epibolia, migração celular e formação dos folhetos germinativos (Iwamatsu, 1994; Kimmel *et al.*, 1995; Shardo, 1995). A epibolia inicia no final da blástula (Solnica-Kresel & Driever, 1994) e no final do período de gástrula, o vitelo foi completamente coberto (Kimmel *et al.*, 1995). Com 50% de epibolia, iniciam-se os movimentos de migração (Warga & Kimmel, 1990; Kimmel *et al.*, 1995), formando duas camadas: a superior ou epiblasto e a inferior ou hipoblasto (Lagler *et al.*, 1977; Warga & Kimmel, 1990; Kimmel *et al.*, 1995; Shardo, 1995). No final da gástrula, a parede externa é a ectoderme que formará a epiderme e o sistema nervoso; a camada endodérmica formará o revestimento do tubo digestivo, fígado e pâncreas. A mesoderme que se desenvolve entre essas duas camadas formará dois folhetos: um prende-se a endoderme e o outro a ectoderme, formando uma cavidade interna chamada celoma ou cavidade do corpo e os demais órgãos (Garcia & Fernández, 2001).

O Sistema Nervoso Central origina-se a partir da ectoderme coincide com a formação deste sistema orgânico nos demais vertebrados (Romer & Parsons, 1985; Iwamatsu, 1994; Kimmel *et al.*, 1995; Shardo, 1995). Ao término da fase de gástrula surgem os tecidos mesodermis que se alongam em ambos os lados da notocorda organizando-se em segmentos denominados somitos (Hisaoaka & Firlit, 1960; Galman & Avtalion, 1989; Iwamatsu, 1994; Kimmel *et al.*, 1995). As regiões do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo são formadas pela expansão do tubo neural como descrito em *Brachidanio rerio* (Kimmel *et al.*, 1995) e em *Rhamdia sapo* (Cussac *et al.*, 1985).

Após esses eventos o embrião se encontra apto a eclodir e então se inicia a fase larval. As larvas, além de serem morfológicamente muito diferentes dos adultos, apresentam exigências ecológicas distintas, com particularidades quanto ao habitat, alimentação e comportamento (Leis & Trnski, 1989). Além disso, a grande similaridade entre larvas de espécies diferentes e a falta de literatura comparativa dificultam ainda mais os trabalhos dos taxonomistas. (Sanches *et al.*, 2001).

A diferenciação das células, tecidos, órgãos e sistemas persistem desde a fase embrionária até a metamorfose de acordo com as adaptações morfofuncionais. A maioria dos estudos publicados atualmente foca apenas a diferenciação de sistemas ou órgãos selecionados durante os períodos embrionário, larval ou durante a metamorfose (Timmermans, 1987).

O período larval inicia-se após a eclosão e termina com a reabsorção do vitelo e início da alimentação exógena (Helfman *et al.*, 2000). O grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende, entre outros fatores, da espécie e do tamanho do ovo (Blaxter, 1969; Woynarovich & Hórvath, 1983). A maioria das larvas de peixes de água doce eclode com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados e saco vitelino grande (Nakatani *et al.*, 2001). Poucas espécies, como o peixe-lobo, *Anarhichas lupus*, eclodem com características externas semelhantes aos juvenis, com os órgãos internos já diferenciados, apresentando poucas características larvais, como a presença do saco vitelino (Falk-Petersen & Hansen, 2001).

O padrão de desenvolvimento em teleósteos reflete sua necessidade de adaptação ao ambiente (Vanderwalle *et al.*, 2005). O tempo de desenvolvimento destes sistemas segue padrões ontogenéticos de cada espécie e determina o momento em que os peixes irão adquirir a capacidade natatória, de fuga e

captura de seu próprio alimento (Neumann, 2004), sendo diretamente influenciado pela temperatura ambiental (Kendall *et al.*, 1983; Fuiman *et al.*, 1998).

O tamanho do saco vitelino e seu tempo de absorção também são espécies-específicos e quanto maior for a quantidade de reservas endógenas disponíveis, mais longo será o período que as larvas de peixes possuem para se adaptar a captura de alimentos externos, enquanto são sustentados pelas reservas do saco vitelino (Blaxter, 1969; Woynarovich & Hórvath, 1983; Bonilawska *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2000). Para espécies reofílicas, que produzem ovos pequenos, com pouca reserva endógena e nenhum cuidado parental, o tempo de adaptação para enfrentar condições ambientais adversas é curto, sendo imprescindível às larvas chegarem rapidamente a forma juvenil e adquirirem características mínimas necessárias para sobreviver às duras condições ambientais e aos predadores (Vanderwalle *et al.*, 2005).

A morfogênese e a diferenciação são processos rápidos e complexos durante a ontogenia inicial dos peixes. As larvas recém-eclodidas sofrem mudanças drásticas em sua forma de corpo, morfologia, metabolismo, habilidades natatórias e comportamentais, normalmente em curto período (Maciel, 2006).

O desenvolvimento do sistema digestório tem grande importância prática na piscicultura, como determinar o tipo de alimentação a ser utilizado nessa fase (Tengjaroenkul *et al.*, 2002), o momento apropriado para iniciar esta alimentação, e tem sido pouco explorado para espécies brasileiras de importância comercial (Vega-Orellana *et al.*, 2006). Antes da abertura da boca, as larvas nutrem-se do vitelo, que é reabsorvido através da camada sincicial (Shahsavarani *et al.*, 2002). O trato digestório e as glândulas anexas fígado e pâncreas, originam-se das células do endoderma durante a embriogênese (Ober *et al.*, 2003). Alguns estudos mostraram que o fígado e pâncreas diferenciam-se cedo nas larvas, apresentando-se funcionais antes da absorção total do vitelo (Hamlin *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003). Gordon & Hecht (2002) relataram que ainda durante a ontogênese larval, ocorre proliferação de células secretoras de muco e aumento do tamanho do fígado e do pâncreas. As maiores alterações do aparelho digestório de peixes acontecem durante o período larval, resultando em um aparelho funcional que pode, em algumas espécies, ser estruturado antes mesmo do vitelo ser totalmente consumido (Maciel, 2006).

Mudanças morfofisiológicas durante o desenvolvimento larval são características que devem ser estudadas cuidadosamente, uma vez que o programa de alimentação adequado deveria ser planejado baseado no conhecimento de tais mudanças (García-Gasca *et al.*, 2006). Micale *et al.* (2006) relataram

que estudos relacionados com a ingestão, digestão e absorção do alimento, podem contribuir para aumentar o sucesso da criação de larvas de peixes em diferentes condições. Segundo Spedicato *et al.* (1998), esses estudos constituem a base de protocolos alimentares que envolvem exigências nutricionais das larvas.

Estes conhecimentos podem auxiliar na identificação de fatores limitantes, reduzindo entraves nos processos de mudanças de alimentação e sincronizando a fase de desenvolvimento com a tecnologia de criação e manejos alimentares (Hamlin *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2004).

Os peixes apresentam grande variedade de órgãos sensoriais que os capacitam a responder a condições ambientais, tanto ao seu redor, pela linha lateral e visão, quanto à distância, por sensores químicos e auditivos (Liao & Chang, 2003). Dessa forma, a presença dos órgãos sensoriais é importante, durante o desenvolvimento larval, para a procura de alimento e fuga de predadores, principalmente (Moorman, 2001).

O olho é o primeiro a se desenvolver, principalmente em larvas pelágicas (Shand, 1997). A visão adequada é fundamental para a sobrevivência durante e após a transição da alimentação endógena para exógena no desenvolvimento inicial dos peixes, pois a maioria deles se alimenta através da visão (Gerking, 1994) e usam o sinal visual para evitar predadores (Fuiman & Magurran, 1994). O conhecimento morfológico e funcional do olho é importante para entender o estudo do comportamento entre espécies biologicamente iguais ou distintas, pois os olhos dos peixes exibem adaptações específicas ao ambiente aquático, sendo uma delas a variedade de fotorreceptores que contém pigmentos visuais sensitivos (Vasques *et al.*, 1998).

O desenvolvimento dos botões gustativos em peixes é pouco conhecido, bem como a descrição completa de sua formação e morfologia. O padrão de distribuição dos botões gustativos varia entre as espécies, podendo ser encontrados, na cavidade orofaríngea, boca, lábios, superfície de barbatanas, cabeça ou cobrindo todo o corpo (Matsuoka, 2001; Hansen *et al.*, 2002). Em peixes, os neuromastos são constituídos por mecanorreceptores responsáveis por perceber movimentos na água, estando localizados superficialmente na epiderme, constituindo os neuromastos livres, e/ou em sulcos e canais, formando o sistema da linha lateral (Matsuoka, 2001; Diaz *et al.*, 2003; Cestarolli, 2005).

Com o surgimento do coração no período de somitogênese do embrião, inicia-se o desenvolvimento do sistema circulatório, continuando durante o desenvolvimento larval (Langeland & Kimmel, 1997; Yelon & Stainier, 1999; Hu *et al.*, 2000). O coração é formado a partir da mesoderme, as células do epi e miocárdio são nutridas pela esplacnopleura. A cavidade aparece e o tubo assume uma forma de S. A diferenciação do coração em partes é um processo gradual, inicia-se pela dilatação da parte anterior formando o sino-atrial, então o átrio, ventrículo e bulboarterial (Kunz, 2004).

A bexiga gasosa, ou natatória, pode estar localizada na parte dorsal do corpo, acima do centro de gravidade do animal. Este arranjo permite ao peixe manter a postura sem depender de esforço muscular (Hildebrand, 1995). A função desse órgão é a recepção e amplificação dos sons e pressão.

A respiração da maioria dos peixes ocorre através das brânquias, mas durante a fase larval as trocas gasosas acontecem através da pele. Este processo é possível, pois, na larva existe uma grande superfície em relação ao volume corporal e não há escamas ou outros tecidos que representem uma barreira contra a difusão de gases. Essa forma de respiração é adequada, uma vez que muitas dessas larvas são transparentes e habitam regiões pelágicas, onde o oxigênio é abundante e a hemoglobina não requerida poderia torná-las visível aos predadores (Maciel, 2006).

Algum tempo após a eclosão, a respiração cutânea das larvas de Teleostei torna-se inadequada fazendo com que as brânquias se desenvolvam (Blaxter, 1986). Segundo Maciel (2006), com o crescimento das larvas, a relação superfície/volume torna-se menor, resultando numa menor área respiratória cutânea e as rotas de difusão de gases tornam-se mais distantes. O crescimento ocorre quando a respiração branquial torna-se essencial para muitos peixes ativos e o desenvolvimento da hemoglobina, ao mesmo tempo ou mais tarde, aumenta a capacidade do sangue de transportar oxigênio.

As brânquias são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois além de serem o principal local de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados e desempenham ainda a função sensorial da gustação. Portanto qualquer alteração nessa estrutura certamente comprometerá a sobrevivência dos peixes (Morgan & Tovell, 1973; Leonardo *et al.*, 2001).

A embriogênese e o desenvolvimento larval são estágios importantes do ciclo biológico por prover informações sobre a biologia, sistemática e evolução dos peixes, especialmente aspectos

relacionados à ontogenia, alimentação, reprodução e comportamento. (Gomes *et al.*, 2007). A duração da embriogênese varia de acordo com a estratégia reprodutiva da espécie e é afetada por fatores ambientais, principalmente a temperatura (Reynalde-Tataje *et al.* 2001 *apud* Gomes *et al.* 2007). O tempo para a completa reabsorção do saco vitelino e a abertura da boca também varia entre as espécies e são estágios críticos na aquicultura, uma vez que indicam a necessidade de alimentação exógena. (Sato *et al.*, 2003).

O desenvolvimento inicial dos peixes é, portanto, um processo muito dinâmico, com mudanças ontogenéticas coincidindo freqüentemente com mudanças na alimentação, microhabitat, comportamento, desempenho ou a combinação entre qualquer um destes (Sagnes *et al.*, 1997; Gozlan *et al.*, 1999a, b). Habilidades de fugir de predadores e mudanças na capacidade natatória, as quais se desenvolvem durante a ontogenia, são características que podem também influenciar a habilidade de sobrevivência da larva (Fuiman & Higgs, 1997; Miklosi & Csanyi, 1999; Gozlan *et al.*, 1999a; Pinder & Gozlan, 2004). Informações relacionadas aos desenvolvimentos morfológico, morfométrico e comportamental dos peixes são fundamentais para entender as mudanças ecológicas requeridas por uma espécie (Baras & Nindaba, 1999; Kovac & Copp, 1999) e os fatores que afetam o recrutamento da população (Houde, 1994).

Esses dados podem ser usados para melhorar técnicas de larvicultura (Gonzáles *et al.*, 2002) por meio de modificações de parâmetros ambientais e manejos alimentares (Gisbert *et al.*, 2002, 2004). Além disso, permite estimar a qualidade dos juvenis e a sua conveniência para estocagem ou produção de matrizes (Maciel, 2006).

Assim para estabelecer métodos de criação que visam à produção de larvas e juvenis de qualidade, para estocagem nos viveiros artificiais ou cursos naturais de água, torna-se necessário o estudo da biologia das larvas de peixes, em particular, das espécies nativas, até o momento pouco estudadas (Maciel, 2006). Portanto a descrição morfológica dos acontecimentos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e ontogenia larval, numa faixa de tempo conhecida, contribuirá para uma melhor compreensão da reprodução do *Zungaro jahu* e seu manejo na piscicultura, bem como o melhor entendimento da biologia desta espécie, uma vez que esta se encontra ameaçada de extinção, apesar de não ser citada na lista oficial, e poucos trabalhos serem encontrados na literatura caracterizando-a.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo proporcionar conhecimentos a respeito da cronologia dos principais eventos morfológicos observados durante o desenvolvimento embrionário e

larval do Jaú (*Z. jahu*), enfatizando as principais fases do desenvolvimento embrionário e a ontogenia dos principais órgãos e sistemas das larvas. Para isto, a dissertação foi dividida em dois artigos: Artigo I, “Morfologia dos ovócitos e ovos do Jaú (*Zungaro jahu*) da extrusão à eclosão” e Artigo II, “Ontogenia das larvas do Jaú (*Zungaro jahu*) da eclosão à absorção do vitelo”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C.; Suzuki, H. I. & Júlio Jr., H. F. (2004). Migratory Fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFIELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). *Migratory fishes of the South America*. Victoria, Canada: World Fisheries Trust/Banco Mundial. p. 19-99.
- Alves, C. B. M. (2006). Jaú (*Zungaro jahu*): um peixe mais ameaçado que os outros? *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, n. 83, p. 4-5.
- Alves, M. S. D. & Moura, A. (1992). Estágios de Desenvolvimento embrionário de curimatã-pioa *Prochilodus affinis* (Reinhard, 1874) (Pisces, Prochilodontidae). In: Encontro Anual de Aqüicultura de Minas Gerais, 10, Belo Horizonte, 1992. *Anais...Três Marias: CODEVASF*. P. 61-71.
- Baras, E. & Nindaba, J. (1999). Seasonal and diel utilization of inshore microhabitats by larvae and juveniles of *Leuciscus cephalus* and *Leuciscus leuciscus*. *Environmental Biology of Fishes*, n. 56, p. 183-197.
- Balinsky, B. I. (1970). *An introduction to embryology*. Philadelphia: Saunders Company. 698p.
- Blaxter, J. H. S. (1969). Development: eggs and larvae, p.178-252. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, 485p.
- Blaxter, J. H. S. (1986). Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 115, p. 98-114.

- Brasil, D. F.; Nakaghi, L. S. O.; Leme dos Santos, H. S.; Quagio-Grassiotto, I. & Foresti, F. (2002). Estudo morfológico dos primeiros momentos da fertilização em curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), *CIVA 2002*, p. 733-747, <http://www.civa2002.org>.
- Beerli, E. L.; Logato, P. V. R. & Freitas, R. T. F. (2004). Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 1, p. 149-155.
- Bonilawska, M.; Formick, K. & Winnicki, A. (2000). Size of eggs and duration of embryogenesis in fishes. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, v. 30, n. 1, p. 61-71.
- Brummett, A. R. & Dumont, J. N. (1979), Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Experimental Zoology*, n. 201, p. 417-434.
- Carter, C. A. & Wourms, J. P. (1991). Cells behavior during early development in the South American annual fishes of the genus *Cynolebias*. *Journal of Morphology*, v. 210, p. 247-266.
- Castellani, L. R.; Tse, H. G.; Leme dos Santos, H. S.; Faria, R. H. S. & Santos, M. L. S. (1994). Desenvolvimento embrionário do curimatá *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). *Revista Brasileira Ciências Morfológicas*, v. 11, n. 2, p. 99-105.
- Cestarolli, M. A. (2005). Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (AGASSIZ, 1829): aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais. *Tese de Doutorado*. FCAV-UNESP. Jaboticabal. 110p.
- Chen, K. C.; Shao, K. T. & Yang, J. S. (1999). Using micropilar ultrastructure for species identification and phylogenetic inference among four species of Sparidae. *Journal of Fish Biology*, v. 55, p. 288-300.
- Cussac, V. E.; Matkovic, M. V. & Maggese, M. C. (1985). Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (VALENCIENNES, 1840) EIGENMANN Y EIGENMANN, 1888 (PISCES, PIMELODIDAE), I. Organogenesis media, organogenesis tardia y eclosion. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 45, n. 1/2, p. 149-160.
- Depêche, J. & Billard, R. (1994). *Embryology in fish: a review*. Paris: Société Française d'Ichtyologie. 123p.
- Diaz, J. P.; Prié-Granié, M.; Kentouri, M.; Varsamos, S. & Connes, R. (2003). Development of the lateral line system in the sea bass. *Journal of Fish Biology*, n. 62, p. 24-40.

- Falk-Petersen, I. B. & Hansen, T. K. (2001). Organ differentiation in newly hatched common wolfish. *Journal of Fish Biology*, v. 59, p. 1465-1482.
- Food and Agriculture Organization. (2002). Examen mundial de la pesca y la acuicultura. In: *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. FAO, 2002. p. 3–45 (parte 1).
- Fuiman, L. A. & Magurran, A. E. (1994). Development of predator defenses in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, n. 4, p. 145–183.
- Fuiman, L. A.; Poling, K. R. & Higgs, D. M. (1998). Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia*, v. 3, p. 602-611.
- Fuiman, L. E. & Higgs, D. M. (1997). Ontogeny, growth and the recruitment process. In: *Early Life History and Recruitment in Fish Populations* (Chambers, R. C & Tripell, E. A., eds) London: Chapman & Hall, p. 225–249.
- Galman, O. R. & Avtalion, R. R. (1989). 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.
- Ganeco, L. N. (2003). Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1894), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida. *Dissertação de Mestrado*. FCAV-UNESP. Jaboticabal. 66p.
- García-Gasca, A.; Galaviz, M. A.; Gutiérrez, J. N. & García-Ortega, A. (2006). Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, *Aquaculture*, v. 251, p. 366-376.
- Garcia, S. M. L. & Fernández, C. G. (2001) *Embriologia*. Segunda edição, Porto Alegre: Artmed Editora. 416p.
- Gerking, S. D. (1994). *Feeding Ecology of Fish*. San Diego, CA: Academic Press. 456p.
- Gisbert, E.; Williot, P. & Castelló-Orvay, F. (2000). Influence of egg size on growth and survival to early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. *Aquaculture*, v. 183, p. 83-94.

- Gisbert, E.; Merino, G.; Muguet, J. B.; Bush, D.; Piedrahita, R. H. & Conklin, D. E. (2002). Morphological development and growth patterns in the hatchery-read California halibut larvae. *Journal of Fish Biology*, v. 61, p. 1217-1229.
- Gisbert, E.; Piedrahita, R. H. & Conklin, D. E. (2004). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, v. 232, p. 455-470.
- Godinho, H. P. (2007). Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 3, p. 351-360.
- Gomes, B. V. C.; Scarpelli, R. S.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Bazzoli, N. & Rizzo, E. (2007). Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v. 70, p. 1412-1429.
- González, O. R. M.; Flores, J. D. C. B.; Domínguez, B. M. P. & Valle, M. D. R. G. (2002). Descripción histológica del sistema digestivo em larvas de *Chirostoma humboldtianum* em la primera alimentación exógena. In: *CIVA 2002* (<http://www.civa2002.org>), p. 313-322.
- Gordon, A. K. & Hecht, T. (2002). Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 18, p. 113-117.
- Gozlan, R. E., Copp, G. H. & Tourenq, J. (1999a). Early development of the sofie, *Chondrostoma toxostoma*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 56, p. 67-77.
- Gozlan, R. E., Copp, G. H. & Tourenq, J. (1999b). Comparison of growth plasticity in the laboratory and field, and implications for the onset of juvenile development in sofie, *Chondrostoma toxostoma*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 56, p. 153-165.
- Hamlin, H. J.; Hunt von Herbing, I. & Kling, L. J. (2000). Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, v. 57, p. 716-732.
- Hansen, A.; Klaus Reutter, K. & Zeiske, E. (2002). Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics*, v. 223, p. 483-496.

- Hart, N. H. & Donovan, M. (1983). Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *The Journal of Experimental Zoology*, n. 227, p. 277-296.
- Hart, N. H. (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *International Reviews of Cytology*, v. 121, p. 1-66.
- Helfman, G. S.; Collette, B. B. & Facey, D. E. (2000). *The diversity of fishes*. Massachusetts: Blackwell Science, USA, p. 117-134.
- Hisaoka, K. K. & Firlit, C. F. (1960). Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachidanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Journal of Morphology*, v. 107, p. 205-225.
- Hu, N.; Sedmera, D.; Post, H. J. & Clark, E. B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record*, v. 260, p. 148-157.
- Houde, E. D. (1994). Differences between marine and freshwater fish larvae: implications for recruitment. *Journal of Marine Science*, n. 51, p. 91-97.
- Iwamatsu, T. & Ohta, T. (1981). Scanning electron microscopic observation on sperm penetration in teleostean fish. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 218, p. 261-277.
- Iwamatsu, T.; Onitake, K.; Yoshimoto, Y. & Hiramoto, Y. (1991). Time sequence of early events in fertilization in the Medaka egg. *Development Growth & Differentiation*, n. 33, v. 50, p. 479-490.
- Iwamatsu, T. (1992). Egg activation. *Fish Biology Journal of Medaka*, n. 4, p. 1-10.
- Iwamatsu, T., Ishijima, S. & Nakashima, S. (1993). Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. *The Journal of Experimental Zoology*, n. 266, p. 57-64.
- Iwamatsu, T. (1994). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, v. 11, p. 825-839.
- Iwamatsu, T. (2000). Fertilization in fishes. In: *Fertilization in Protozoa and Metazoa Animals* (Tarin, J. J. & Cano A. Ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, p. 89-145.
- Kane, D. A.; Warga, R. A. & Kimmel, C. B. (1992). Mitotic domains in the early embryo of the zebrafish. *Nature*, n. 360, p. 735-737.
- Kendall, Jr., A. W.; Ahlstrom, E. H. & Moser, H. G. (1983). Early life stages of fishes and their characters. In: Moser, H. G.; Richards, W. J.; Cohen, D. M.; Fahay, M. P.; Kendall, Jr., A. W.; Richardson, S. L. (Ed.) *Ontogeny and systematic of fishes*, based on the International Symposium

- dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstron. Lawrence: American Society of Ichthyologist and Herpetologist, p. 11-22.
- Kimmel, C. B. & Law, R. D. (1985). Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk sincicial layer. *Developmental Biology*, n. 108, p. 86-93.
- Kimmel, C. B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S. R & Ullmann, B. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, v. 203, p. 253-310.
- Kobayashi, W. & Yamamoto, T. (1981). 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.
- Kovac, V. & Copp, G. H. (1999). Prelude: looking at early development of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, n. 56, p. 7-14.
- Kudo, S. (1980) Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Development Growth & Differentiation*, v. 22, n. 3, p. 403-414.
- Kudo, S.; Linhart, O. & Billard, R. (1994). Ultrastructural studies of sperm penetration in the egg of the European catfish, *Silurus glanis*. *Aquatic Living Resource*, v. 7, p. 93-98.
- Kunz, Y. W. (2004). *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Ed: Springer, Netherlands, 638p.
- Laale, W. H. (1980). The perivitelline space and egg envelopes of Bony fishes: A review. *Copeia*. v. 2, p. 210-226.
- Lagler, K. F.; Bardach, J. E.; Miller, R. R. & Passino, D. R. M. (1977). *Ichthyology*. Second Edition, New York: John Wiley & Sons, Inc. 506p.
- Langeland, J. A. & Kimmel, C. B. (1997). *Fishes*. In Embryology. Constructing the organism (Gilbert, S. F. & Raunio, A. M., eds), Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., p. 383-407.
- Leis, J. M. & Trnski, T. (1989). *The larvae of Indo-Pacific shorefishes*. Honolulu: University of Hawaii Press. 371p.
- Leonardo, J. M. L. O.; Vargas, L.; Ribeiro, R. P.; Moreira, H. L. M.; Natali, M. R. M.; Volski, T. & Cavichiolo, F. (2001). Histologia das brânquias de larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 4, p. 863-870.

- Leme dos Santos, H. S. & Azoubel, R. (1996). *Embriologia comparada*. Jaboticabal: FUNEP. 189p.
- Liao, I. C. & Chang, E. Y. (2003). Role of sensory mechanisms in predatory feeding behavior of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fisheries Science*, v. 69, p. 317-322.
- Linhart, O. & Kudo, S. (1997). Surface ultrastructure of paddlefish egg before and after fertilization. *Journal of Fish Biology*, v. 51, p. 573-582.
- Luz, R. K.; Reynalte-Tataje, D. A.; Ferreira, A. A. & Zaniboni-Filho, E. (2001). Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 1, p. 49-55.
- Maciel, C. M. R. R. (2006). Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignianus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Tese Doutorado*, UFV – Viçosa, 229p.
- Mateus, L. A. F. & Penha, J. M. F. (2007). Dinâmica populacional de quatro espécies de grandes bagres na bacia do rio Cuiabá, Pantanal norte, Brasil (Siluriformes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, n. 24, v. 1, p. 87-98.
- Matkovic, M. V.; Cussac, V. E. & Cukier, M. (1985). Desarrollo embrionário de *Rhamdia sapo* (VALENCIENNES, 1840) EINGENMANN Y EINGENMANN, 1888 (Pisces, Pimelodidae). I, Segmentación, morfogénesis y organogenesis temprana. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 45 n.1/2, p. 39-50.
- Matsuoka, M. (2001). Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries Science*, v. 67, p. 1036-1045.
- Micale, V.; Garaffo, M.; Genovese, L.; Spedicato, M. T. & Muglia, U. (2006). The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, n. 251, p. 354-365.
- Miklosi, A. & Csanyi, V. (1999). The ontogeny of antipredator behaviour in paradise fish larvae III. Size-related avoidance of predator models. *Journal of Fish Biology*, n. 54, p. 328–337.
- Moorman, S. J. (2001). Development of sensory system in zebrafish (*Danio rerio*). *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v. 42, n. 4, p.292-298.
- Morgan, M. & Tovell, P. W. A. (1973). The structure of the gill of the *Salmo gairdneri* (Richardson). *Zoology Zellforsh*, n. 142, p. 1-15.

- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialetzki, A.; Sanches, P. V. & Cavicchioli, M. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce, desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: UEM, Nupélia, 359p.
- Nakaghi, L. S. O.; Marques, C.; Faustino, F.; Ganeco, L. N. & Senhorini, J. A. (2006). Desenvolvimento embrionário do dourado (*Salminus brasiliensis*) por meio de microscopia eletrônica de varredura. *Boletim Técnico do CEPTA*, v. 19, p. 9-19.
- Neumann, E. (2004). Características do desenvolvimento de duas linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus* e uma linhagem híbrida de *Oreochromis* sp. 2004. 65p. *Dissertação de Mestrado*. CAUNESP-UNESP. Jaboticabal. 66p.
- Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F.; Azevedo, A.; Agostinho, C. A. & Veríssimo-Silveira, R. (2007). Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). *Zygote*, v. 15, p. 267-271.
- Ober, E. A.; Field, H. A. & Stainier, D. Y. R. (2003) From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development*, v. 120, p. 5-18.
- Peña, R.; Dumas, S.; Villalejo-Fuerte, M.; Ortiz-Galindo, J. L. (2003). Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, v. 219, p. 633-644.
- Pinder, A. C. & Gozlan, R. E. (2004). Early ontogeny of sunbleak. *J. Fish Biol.*, n. 64, p. 762-775.
- Reynalte-Tataje, D.; Zaniboni-Filho, E. & Muelbert, B. (2001). Stages of the embryonic development of the piaçu *Leporinus macrocephalus* (Garavelho & Britski, 1988). *Acta Scientiarum*, n. 23, p. 823-827.
- Ribeiro, C. R.; Santos, H. S. L. & Bolzan, A. A. (1995). Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotâmicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e o híbrido tambacu). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 55, p. 65-78.
- Romer, A. S. & Parsons, T. R. (1985). *Anatomia comparada dos vertebrados*. São Paulo: Atheneu. 559p.
- Roubach, R.; Correia, E. S.; Zaiden, S.; Martino, R. C. & Cavalli, R. O. (2003). Aqüicultura Brasileira. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 47-57.
- Sagnes, P., Gaudin, P. & Statzner, B. (1997). Shifts in morphometrics and their relation to hydrodynamic potential and habitat use during grayling ontogenesis. *Journal of Fish Biology*, n. 50, p. 846-858.

- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Nuñez, A. P. O.; Godinho, H. P. & Verani, J. R. (2003). Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, p. 229-274. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (Eds) *Água, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 468p.
- Sanches, P. V.; Baumgartner, G.; Bialetzki, A.; Subvierto, M. R.; Gomes F. D. C.; Nakatani K. & Barbosa, N. D. C. (2001). Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 383-389.
- Shahsavarani, I. A.; Thomas, Z. C.; Ballantyne, J. S. & Wright, P. A. (2002). A novel technique for the separation of yolk from the developing embryonic tissue in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 24, p. 321–326.
- Shand, J. (1997). Ontogenetic changes in retinal structure and visual acuity: a comparative study of coral-reef teleosts with differing post-settlement lifestyles. *Environmental Biology of Fishes*, v. 49, p. 307–322.
- Shardo, J. D. (1995). 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.
- Silvergrip, A. M. C. (1992). Zungaro, a senior synonym of *Paulicea* (Teleostei: Pimelodidae). *Ichthyological Exploration of Freshwater*, v. 3, n. 4, p. 305-310.
- Solnica-Kresel, L. & Driever, W. (1994). Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development*, v. 120, p. 2443-2455.
- Spedicato, M. T.; Contegiacomo, M.; Carbonara, P. & Lembo, G. (1998). Sistemi di produzione innovativi orientati alla maricoltura di nuove specie: *Pagellus erythrinus*, *Pagellus bogaraveo*. *Biol. Mar. Mediterr.*, n.5, p.1180-1185.
- Tengjaroenkul, B.; Smith, B. J.; Smith, S. A. & Chatreewogsin, U. (2002). Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, v. 211, p. 241-251.
- Timmermans, L. P. M. (1987). Early development and differentiation in fish. *Sarsia*; n. 72, p. 331-339.
- Trinkaas, J. P. (1984). Mechanism of *Fundulus* epiboly – a current review. *American Zoology*, v. 24, p. 673-688.

- Vanderwalle, P.; Germeau, G.; Besancenet, P.; Parmentier, E. & Baras, E. (2005). Early development of the head skeleton in *Brycon moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae). *Journal of Fish Biology*, v. 66, p. 996-1024.
- Vasques, L. H.; Leme dos Santos, H. S.; Nakaghi, L. S. O.; Souza, V. L. & Zaiden, S. F. (1998). Caracterização estrutural da retina da “piracanjuba” *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). In: Aqüicultura Brasil 98. Recife. *Resumos...*p.224.
- Vaz, M. M.; Torquato, V. C. & Barbosa, N. D. C. (2000). (Org.). *Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande*. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC.
- Vega-Orellana, O. M.; Fracalossi, D. M. & Sugai, J. K. (2006). Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture*, v. 252, p. 484-493.
- Warga, R. M. & Kimmel, C. B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, v. 108, p. 569-580.
- Wourms, J. P. & Evans, D. (1974). The embryonic development of the black prickleback, *Xiphister atropurpureus*, a Pacific Coast blennioid fish. *Canadian Journal Zoology*, v. 52, p. 879-887.
- Woynarovich, E. & Hováth, L. (1983). *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. Brasília, DF: FAO/CODEVASF – CNPq, (Manual de Extensão, 5), 220p.
- Yelon, D. & Stainier, D. Y. R. (1999). Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, V. 10, p. 93-98.

ARTIGO I

(Normas da Revista *Zygote*)

Morfologia dos ovócitos e ovos do jaú (*Zungaro jahu*) da extrusão à eclosão

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o desenvolvimento embrionário do *Zungaro jahu*, peixe nativo do Brasil. As coletas foram realizadas na estação de piscicultura da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias – Jupiá (CESP – Castilho, SP). As amostras foram coletadas em tempos pré-determinados até a eclosão, sendo fixadas em solução de Karnovsky para processamento em microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão. A eclosão ocorreu 13 horas após a fertilização, numa temperatura de $29,4 \pm 1,5^\circ\text{C}$. Os ovos na extrusão apresentaram diâmetro médio de $1,38 \pm 0,06$ mm, essa média se manteve estável até a eclosão das larvas, as quais possuíam em média $3,79 \pm 0,11$ mm. Os ovócitos e ovos nos primeiros momentos após a fertilização apresentaram formato discóide e coloração amarela. O desenvolvimento embrionário do jaú foi dividido em 7 estágios: zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, organogênese e eclosão. Nos primeiros momentos observou-se a presença da micrópila. Aos 10 min pós-fertilização (mpf) houve diferenciação dos pólos animal e vegetativo. A formação da célula-ovo ocorreu aos 15 mpf. Dos 20 aos 75 mpf ocorreram sucessivas clivagens formando 2, 4, 8, 16, 32 e 64 blastômeros. A fase de mórula foi observada entre 90 e 105 mpf. Em seguida identificaram-se as fases de blástula e gástrula, com 120 e 180 mpf, respectivamente. O final da fase de gástrula caracterizou-se pela formação do tampão vitelino, o que ocorreu com 360 mpf. A partir disso, iniciou-se a diferenciação das regiões cefálica e caudal, o alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal, culminando na eclosão da larva após 780 mpf. As larvas do Jaú na eclosão apresentaram-se transparentes e pigmentadas.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, estágios de desenvolvimento, estrutura, histologia e peixe.

1) INTRODUÇÃO

A espécie *Zungaro jahu*, pertence à ordem Siluriformes e conhecida no Brasil como jaú (*yaiú* = grande comedor na língua indígena), é o maior peixe encontrado nas bacias Paraná-Paraguai e Uruguai, atingindo até 144 cm de comprimento e 150 kg de peso (Agostinho *et al.*, 2004), sendo considerado, assim, um peixe de grande porte. Silvergrip (1992) colocou o gênero *Paulicea* (H. Von Ihering, 1898), na sinonímia de *Zungaro* (Bleeker, 1958).

Esta espécie apresenta cabeça larga e deprimida, o corpo relativamente roliço, o focinho amplo e a boca larga e terminal. A cor de fundo é castanho-escuro amarelada, com muitas pontuações castanho-escuras sobre o dorso e os flancos. Tem preferência pelos rios caudalosos, vivendo no fundo destes ou no pé das cachoeiras sendo uma espécie piscívora noturna (Vaz *et al.*, 2000).

Atinge a primeira maturação com 70 cm de comprimento total. A desova ocorre entre os meses de dezembro e fevereiro. Realiza migrações rio acima na época da reprodução, e os ovos são livres (Vaz *et al.*, 2000). Informações sobre sua biologia e ecologia são escassas, e a maioria está relacionada à nutrição, parasitologia ou morfologia (Agostinho *et al.*, 2004). É uma espécie vulnerável da fauna, sujeita à extinção devido à destruição de seu habitat. Nenhum trabalho foi encontrado relatando a criação desta espécie em cativeiro.

Apesar do fato das técnicas para a reprodução induzida e incubação estarem bem compreendidas em diferentes espécies de peixes (Shardo, 1995; Faustino *et al.*, 2007), há poucos grupos de pesquisa dedicados em estudar os aspectos básicos do período embrionário dos peixes, que se estende da fertilização à eclosão. O estudo das fases iniciais do ciclo da vida é de fundamental importância, tanto para o estudo da taxonomia quanto para o estudo da ecologia das espécies (Sanchez *et al.*, 1999).

O desenvolvimento embrionário é um processo complexo que permite estudar a ontogenia das espécies, podendo ser utilizado como objeto de experimentação em processos biotecnológicos, como bioindicadores da qualidade do ambiente e para avaliar o efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática, o que torna os embriões imprescindíveis a grande variedade de estudos (Flores *et al.*, 2002; Botero *et al.*, 2004; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006). Os processos iniciais da embriologia, que

compreendem a fertilização e ativação do ovócito, também são questões importantes na biologia reprodutiva dos peixes (Coward *et al.*, 2002).

O desenvolvimento embrionário de peixes foi estudado em diversas espécies, sendo classificado em fases. Entre os Siluriformes nativos foram estudados: *Rhamdia hilarii* (Godinho *et al.*, 1978), *Rhamdia sapo* (Matkovic *et al.*, 1985 e Cussac *et al.*, 1985); *Pseudoplatystoma coruscans*, (Cardoso *et al.*, 1995; Landines *et al.* 2003); *Pimelodus maculatus* (Luz *et al.*, 2001) e híbrido da fêmea de *P. coruscans* com o macho de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Faustino *et al.*, 2007).

Entretanto, na maioria dos trabalhos encontrados sobre este tema, a observação do desenvolvimento embrionário foi realizada sob estereomicroscópio e poucos em microscopia de luz. Alguns estudos também utilizaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como ferramenta por fornecer imagens tridimensionais das estruturas externas dos tecidos e órgãos, oferecendo desta forma uma nova perspectiva de análise, complementando dados que não foram obtidos em microscopia de luz.

Assim, a identificação estrutural dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento inicial numa faixa de tempo conhecida, contribuirá para uma melhor compreensão da reprodução dos peixes ósseos e seu manejo na piscicultura, além de permitir um melhor entendimento da biologia da espécie proposta, uma vez que esta se encontra ameaçada de extinção e poucos trabalhos foram encontrados caracterizando-a.

Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a morfometria dos ovócitos e ovos, análise estrutural e ultra-estrutural da extrusão, fertilização e desenvolvimento embrionário do jaú, *Z. jahu*, bem como fazer um estudo detalhado do ovócito da espécie, analisando a morfologia da micrópila.

2) MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na estação de piscicultura da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias – Jupiá, pertencente à Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP – Castilho, SP), e as amostras processadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP – Jaboticabal, SP), no Laboratório de

Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, Jaboticabal e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina (USP – Ribeirão Preto, SP).

As coletas foram realizadas em dezembro de 2006, durante o período reprodutivo da espécie que se estende de dezembro a fevereiro. Foi realizada a reprodução induzida do *Z. jahu* e a fertilização a seco, segundo as técnicas de Woynarovich & Hórvath (1983).

As amostras foram coletadas durante a extrusão dos ovócitos, no momento da mistura de ovócitos e sêmen (fertilização – tempo zero), e após a fertilização nos tempos 10 e 30 segundos, 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 minutos, a cada quinze minutos até completar 2 horas e a cada hora até o momento da eclosão.

Após a extrusão, os ovócitos foram acondicionados em bacia e, em seguida, receberam o sêmen, que foi homogeneizado suavemente. A hidratação dos ovos ocorreu logo após a fertilização. Os ovos foram transferidos para incubadoras, com capacidade de 60 L e fluxo contínuo, onde permaneceram durante todo o período experimental. Foram amostradas as seguintes variáveis físico-químicas da água: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (mg/L), alcalinidade (mg/L), condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e amônia ($\mu\text{g}/\text{L}$).

Cinco horas após a mistura dos gametas masculino e feminino (momento da fertilização), foi calculada a taxa de fertilização.

Foram coletados 25 ovócitos/ovos em cada um dos tempos determinados. Estes foram fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24 horas, lavados em solução tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4 e armazenados em álcool 70% para posterior análise de acordo com as seguintes metodologias:

Análise estereomicroscópica e morfometria: Os ovócitos e ovos coletados foram observados e fotografados em estereomicroscópio LEICA MZ8, acoplado ao equipamento fotomicrografia LEICA DC 280.

O diâmetro dos mesmos foi medido em estereomicroscópio acoplado ao programa IM 50-LEICA. Foram medidos 20 ovócitos/ovos de cada um dos tempos de coleta.

Microscopia de Luz (ML): As amostras foram processadas seguindo-se as técnicas para inclusão em historesina segundo recomendações do fabricante, kit Leica Historesin.

Os cortes histológicos tiveram 3 μm de espessura e foram corados com Hematoxilina-floxina (HF) (Tolosa *et al.*, 2003). A análise das lâminas e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio LEICA DM 2500.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): Os ovos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas e lavados novamente no mesmo tampão. A desidratação ocorreu em série crescente de etanol passando por cinco minutos em cada concentração. Em seguida foram processados em Secadora de Ponto Crítico com CO_2 líquido (BAL-TEC), montadas em suporte de cobre, metalizados com ouro-paládio, e observados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): Foram analisadas amostras coletadas durante a primeira hora de desenvolvimento. Tais amostras, após a fixação e lavagem, foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2 % por duas horas. Em seguida, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, a infiltração foi feita com araldite e acetona e a inclusão em araldite. Foram realizados cortes semi-finos em micrótomo com lâmina de vidro com 0,5 μm de espessura, e corados com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado. Os melhores cortes foram selecionados, obtendo-se os cortes ultrafinos com navalha de diamante a 60 nm de espessura, os quais foram contrastados, observados e eletronicografados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL - JEM 1010).

3) RESULTADOS

O período embrionário do *Z. jahu* se estendeu da fertilização à eclosão compreendendo um período de 13 horas, à temperatura de $29,4 \pm 1,5^\circ\text{C}$. A taxa de fertilização foi considerada alta, em média 95%. As variáveis físico-química da água foram: amônia = 11,13 $\mu\text{g/L}$; pH = 8,14 U.pH; condutividade = 34 $\mu\text{S/cm}$; oxigênio dissolvido = 7,26 mg/L e alcalinidade = 21 mg/L.

À extrusão, os ovócitos mostraram diâmetro médio de $1,38 \pm 0,06$ mm, e este diâmetro se manteve estável, até a eclosão das larvas, as quais apresentaram um diâmetro médio de $3,79 \pm 0,11$ mm.

Os ovos do *Z. jahu* apresentaram formato esférico, coloração amarelada, amplo espaço perivitelino (Figura 1a e 4b) e uma camada gelatinosa sobre o córion. Os ovos foram classificados como

telolécitos devido à distribuição e quantidade de vitelo, dessa forma a clivagem dos ovos foi do tipo meroblástica ou parcial, ocorrendo somente no pólo animal.

O desenvolvimento embrionário do *Z. jahu* foi dividido em 7 estágios. A Tabela 01 relaciona as principais fases e suas características durante o desenvolvimento dos ovos após a fertilização. Os estágios relacionados estão representados nas figuras 1 (b - j) e 2 (a - f).

“Tabela 1” (página 51)

Estágio Zigoto (0 – 15 mpf)

Este estágio se estendeu da fertilização à formação do pólo animal, conhecido como célula-ovo ou zigoto.

No momento da extrusão, observou-se a presença de uma única micrópila, sendo esta uma pequena abertura por onde o espermatozóide penetra durante a fertilização (Figura 3a). O aparelho micropilar do jaú encontrou-se constituído por dois vestíbulos e um canal micropilar curto (Figuras 3a e 4a).

No tempo zero (fertilização), em ML, notaram-se nos ovócitos coletados um movimento citoplasmático em direção à região da micrópila, caracterizando o pólo animal. O pólo vegetativo estava formado por vitelo e o pólo animal pela união dos pronúcleos masculino e feminino mais o citoplasma que se deslocou. O pólo animal mostrou-se basófilo, com aparência homogênea.

O córion apresentou aspecto de “peneira” ao corte transversal (MET) demonstrando a presença de poros responsáveis pela entrada de água e a troca de substâncias necessárias ao desenvolvimento embrionário (Figura 3b); bem como a presença de uma fina camada gelatinosa (Figura 4c).

Em ML e MET foram observados muitos alvéolos corticais, de tamanhos variados, alinhados em toda a periferia do ovócito na extrusão e fertilização, constituindo uma fina camada basófila (ML), formando o citoplasma cortical (Figuras 3c e 4c). Estes alvéolos se romperam após a fertilização, contribuindo com a elevação do córion e conseqüente aumento do espaço perivitelino. Com 5 mpf observou-se a ausência de alvéolos corticais. A formação do espaço perivitelino no jaú, e seu conseqüente aumento, resultou na separação do córion da membrana do ovo.

Constatou-se ainda que a região do citoplasma cortical, além dos alvéolos corticais, apresenta mitocôndrias, ribossomos e vesículas de secreção (Figura 3c).

Em MEV, desde a fertilização até 1 mpf, encontraram-se vários espermatozóides na entrada da micrópila (Figura 3d). Com 30 segundos após a fertilização, alguns ovos já estavam fecundados e protegidos da poliespermia pela formação de um cone de fertilização, estrutura esférica que extravasou pela micrópila, obstruindo sua abertura.

Após os eventos desencadeados pela fertilização, o ovo passou a sofrer alterações que incluíram clivagens, movimentação celular e formação dos esboços dos órgãos. A primeira fase, que ocorre antes da primeira clivagem, termina com a formação do zigoto ou célula-ovo, na qual o pólo animal está preparado para iniciar a segmentação. A célula-ovo foi encontrada com 15 mpf (Figura 1b e 4d).

Estágio Clivagem (20 – 75 mpf)

Este estágio se iniciou com a primeira clivagem, no plano vertical, que dividiu o blastodisco em duas células (blastômeros) de igual tamanho (Figuras 1c, 3e e 4e). Em seguida, ocorreu nova divisão no plano vertical, perpendicular ao primeiro, formando 4 blastômeros (Figuras 1d e 3f). A terceira divisão foi vertical e paralela à primeira, resultando em 8 blastômeros, mostrando arranjo 4X2 (Figuras 1e, 4f e 5a). A quarta foi vertical e paralela à segunda, originando 16 blastômeros num arranjo 4X4 (Figuras 1f e 5b). A quinta divisão foi vertical e paralela à primeira originando 32 blastômeros com formação 4X8 (Figuras 1g, 5c e 6a) e a sexta clivagem teve um plano horizontal, resultando duas camadas de células e 64 blastômeros (Figuras 1h e 6b).

Pôde-se observar que com o decorrer do tempo, o número de blastômeros aumentou enquanto o seu tamanho diminuiu. Verificou-se ainda que pequenos glóbulos de vitelo penetram na área dos blastômeros de uma forma fragmentada.

Estágio Mórula (90 – 105 mpf)

Com a presença de mais de 64 blastômeros, caracterizou-se o estágio de mórula, em que os blastômeros formaram um maciço celular semelhante a uma meia amora (Figuras 1i, 5d e 6c). Nesse

estágio também foi possível observar a formação da camada sincicial de vitelo chamada de periblasto (Figura 6c).

Estágio Blástula (120 mpf)

Este estágio caracteriza-se pela formação da blastoderme, formação de um grande espaço entre o vitelo e os blastômeros, a blastocele, e intensa divisão celular (Figuras 1j, 6d).

Estágio Gástrula (180 – 360mpf)

O estágio de gástrula caracterizou-se pelo início do movimento de epibolia, ou seja, a migração das células embrionárias (Figura 2a). Após a cobertura de 50% do vitelo iniciou-se o movimento de involução que se projetou abaixo e em sentido contrário ao movimento de epibolia da blastoderme, formando assim o epiblasto e o hipoblasto (Figuras 2b e 6e). Essa fase se completou com o fim da epibolia, tendo o envolvimento total do vitelo pelas células embrionárias, formando o tampão vitelino ou blastóporo (Figuras 2c e 6f).

Estágio Organogênese (420 – 720 mpf)

Iniciou-se com a diferenciação das regiões cefálica e caudal do embrião (Figuras 2d, 5e e 7a), seguindo com o aparecimento dos somitos, notocorda e vesículas óptica, ótica e de Kupffer. Ocorreu então o alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal (Figura 2e e 7b), a diferenciação dos mioblastos, com núcleos esféricos e grandes, em miômeros, com núcleos achatados (figura 7c) e a pigmentação do corpo e saco vitelino. A região anterior do tubo neural se expandiu formando as regiões do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Figura 7d). A cauda se tornou livre, iniciou-se a movimentação dos embriões e, assim, ao final deste estágio, estes se encontraram aptos para eclosão.

Estágio Eclosão (780 mpf)

Caracterizou-se pelo total rompimento do córion (Figuras 2f, 5f e 7e). No momento da eclosão observou-se em MEV: os primórdios do primeiro par de barbilhões maxilares, a cavidade oral, as brânquias inicialmente desenvolvidas, o órgão olfativo com pequena quantidade de cílios e a membrana

embrionária recobrando toda a região caudal (Figura 5f – destaque). Em estereomicroscópio visualizou-se um sistema digestório rudimentar, na região médio-posterior do embrião (Figura 2f), e em ML, o esboço do coração na região anterior ao vitelo (Figura 7e).

As larvas de *Z. jahu*, no presente trabalho, apresentaram corpo levemente pigmentado, esboço do trato digestório, olhos bem evidentes e primeiros movimentos natatórios.

“Figuras 1-7” (páginas 52 – 58)

4) DISCUSSÃO

As variáveis físico-químicas da água ficaram próximos a valores considerados bons para o desenvolvimento de peixes (Sipaúba-Tavares, 1995);

Os ovos de peixe são classificados como telolécitos, devido à grande quantidade e distribuição do vitelo (Ribeiro *et al.*, 1995; Leme dos Santos & Azoubel, 1996). Os ovos de *Z. jahu* encaixam-se nessa classificação, por isso apresentam clivagem do tipo meroblástica ou parcial, ocorrendo apenas no pólo animal. Tal clivagem é característica dos ovos de peixes (Lagler *et al.*, 1977; Leme dos Santos & Azoubel, 1996).

O tamanho dos ovócitos está associado ao comportamento reprodutivo e tanto a fecundidade quanto o diâmetro dos ovócitos maduros são variáveis, apresentando variações inter e intraespecíficas, entre períodos reprodutivos. Espécie migradoras, com desova total, de fecundação externa e sem cuidado parental possuem ovos menores e fecundidade maior (Vazzoler, 1996). Fato este também observado neste trabalho, pois o diâmetro médio dos ovócitos de *Z. jahu*, no momento da extrusão foi de $1,38 \pm 0,06$ mm, e na eclosão as larvas apresentaram diâmetro médio de $3,79 \pm 0,11$ mm. Nakatani *et al.* (2001) observaram para esta mesma espécie, um diâmetro médio de 1,97 mm para ovos recém-fecundados, e para as larvas eclodidas 3,52 mm. O diâmetro dos ovos também influencia no tempo de incubação, ou seja, ovos com um diâmetro maior apresentam um longo período de incubação (Sargent *et al.*, 1987), como ocorre em

Oreochromis niloticus, onde os ovócitos apresentaram diâmetro médio de 2,06 mm e a eclosão das larvas ocorreu 124 hpf (Morrison *et al.*, 2001). Tais estudos corroboram com o presente trabalho, pois sem apresentar cuidado parental e apresentando fertilização externa, o ovos de *Z. jahu* possuem um pequeno diâmetro, além de curto período de incubação.

Outro fator de grande influência sobre o tempo de incubação é a temperatura. O tempo de incubação é menor em temperaturas mais altas, esse tempo aumenta em temperatura mais baixas (Leme dos Santos & Azoubel, 1996; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006), fato este observado neste experimento.

Observou-se nos ovos de *Z. jahu*, durante todo o desenvolvimento embrionário um amplo espaço perivitelino, cuja função, segundo Lake (1967) e Matsumura (1972), é proteger o embrião contra as injúrias do meio ambiente e contribuir para maior sobrevivência em águas correntosas.

Analisando o aparelho micropilar dos ovócitos, percebeu-se que este apresentou dois vestíbulos, superfície lisa e canal micropilar curto e estreito. Segundo Rizzo *et al.* (2002) e Ganeco & Nakaghi (2003) a micrópila é uma região côncava localizada no córion, composta de um vestíbulo contínuo, com canal interno, que se afunila em direção à membrana plasmática do ovo. Segundo Rizzo & Bazzoli (1993), micrópilas com a forma afunilada são observadas na maioria dos teleósteos e permitem a passagem de apenas um espermatozóide pela abertura interna. Além desse meio de prevenção à poliespermia, ou seja, entrada de um único espermatozóide, há ainda outros meios como a formação do cone de fertilização, o qual obstrui o canal micropilar, bem como a liberação do conteúdo dos alvéolos corticais – processo denominado reação cortical (Hart, 1990), que aumenta o espaço perivitelino após a entrada do espermatozóide fertilizante. De acordo com Riehl (1980), a micrópila é espécie-específica e está presente no mecanismo inicial de isolamento na especiação simpátrica sendo uma característica utilizada na seleção espermática.

O *Z. jahu* é uma espécie migradora, portanto apresenta ovos livres e não adesivos e dessa forma o córion apresentou uma fina camada gelatinosa. Segundo Rizzo *et al.* (2002) esta camada gelatinosa é encontrada nos Siluriformes sendo constituída por um emaranhado de fibrilas delicadas, era fina nos ovócitos não-adesivos (*P. coruscans*, *Z. jahu*, *P. maculatus*) e mais grossa nos ovócitos adesivos (*Franciscodoras marmoratus*, *Lophiosilurus alexandri*).

No momento da fertilização iniciou-se, nos ovócitos, um movimento citoplasmático em direção à região da micrópila, caracterizando o pólo animal. O mesmo foi constatado por Kimmel *et al.* (1995), em zebrafish, e por Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) em *Prochilodus lineatus*, que relataram essa movimentação citoplasmática estimulada após a fertilização. Entretanto, Ganeco (2003) observou essa movimentação citoplasmática em ovos coletados durante a extrusão dos ovócitos, antes mesmo da fertilização, em *Brycon orbignyanus*.

O período embrionário estende-se da fertilização à eclosão e inclui clivagem, gastrulação e início da organogênese (Shardo, 1995). A primeira clivagem dividiu o blastodisco em dois blastômeros de igual tamanho. Esse mesmo fato também foi verificado em outras espécies como zebrafish (Kimmel *et al.*, 1995), *Oryzias latipes* (González-Doncel *et al.*, 2005) e também no *P. lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006). As clivagens iniciaram-se do centro para as bordas do blastodisco como observado em *Rhamdia sapo* e *Alosa sapidissima* (Matkovic *et al.*, 1985; Shardo, 1995). Ocorrem sucessivas clivagens até a fase de 64 blastômeros, sendo que o número de blastômeros aumenta, enquanto seu tamanho diminui, também analisado em *Xiphister atropurpureus* (Wourms & Evans, 1974), *P. lineatus* (Castellani *et al.*, 1994; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006). Notou-se que os glóbulos de vitelo fragmentam-se penetrando nos blastômeros, o que provavelmente facilita a sua absorção pelas células (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006).

Já na fase de mórula, observou-se a formação da camada sincicial de vitelo – periblasto. De acordo com Kimmel *et al.* (1995) esta camada constitui um órgão e é encontrada apenas em teleósteos, se posicionando de forma extra-embrionária, portanto, não contribuindo para a formação do embrião (Balinsky, 1970), sendo importante na quebra do vitelo tornando-o viável para o desenvolvimento do embrião. O periblasto é uma camada contínua citoplasmática, localizada entre o disco da blastoderme e o vitelo, é resultante da divisão incompleta dos blastômeros (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2007). O surgimento do periblasto também foi relatado na fase de mórula por Long & Ballard (1976) em *Catostomus commersoni* e Matkovic *et al.* (1985) em *R. sapo*; enquanto foi observado na fase de blástula por outros autores como Cardoso *et al.* (1995) em *P. coruscans*, Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) em *P. lineatus* e González-Doncel *et al.* (2005) em *Oryzias latipes*.

No *Z. jahu* observou-se que, após a fase de mórula, ocorreu a fase de blástula, caracterizada pela formação da blastocele e então a fase de gástrula que se caracteriza pelo movimento de epibolia (Leme

dos Santos & Azoubel, 1996) e se completa com o fechamento do blastóporo pela blastoderme e formação do botão da cauda (Kimmel *et al.*, 1995). Essas observações também foram descritas por Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) para *P. lineatus* e por Ganeco (2003) em *B. orbignyanus*.

O início da somitogênese, no *Z. jahu*, ocorreu após o término da epibolia e fechamento do blastóporo como também observado em *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001); *Leporinus piau* (Borçato *et al.*, 2004); *P. lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006) e três espécies de traíras (Gomes *et al.*, 2007).

No *Z. jahu*, a região anterior do tubo neural se expandiu formando as regiões do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, semelhante ao descrito em *B. rerio* por Kimmel *et al.* (1995), em *R. sapo* por Cussac *et al.* (1985), *B. orbignyanus* por Ganeco (2003), e *P. lineatus* por Ninhaus-Silveira *et al.* (2006).

O desenvolvimento embrionário de *Z. jahu* segue a mesma seqüência de eventos descrita em outras espécies da família, sendo dividido em 7 estágios, como no híbrido fêmea *P. coruscans* e macho *P. fasciatum* (Faustino *et al.*, 2007) e *P. coruscans* (Marques *et al.*, 2008) diferenciando-se apenas na cronologia dos eventos.

Diante de tais considerações acerca do desenvolvimento embrionário no *Z. jahu*, conclui-se que o desenvolvimento embrionário em todas as espécies de peixes segue os mesmos padrões, apresentando as principais fases descritas, divergindo apenas na duração destas fases e características específicas dos ovócitos e ovos.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, A. A.; Gomes, L. C.; Suzuki, H. I. & Júlio Jr., H. F. (2004). Migratory fishes of the upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFIELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (eds). *Migratory Fishes of the South America*. Victoria, Canada: World Fisheries Trust/Banco Mundial. p. 19-98.

- Andrade-Talmelli, E. F.; Kavamoto, E. T.; Romagosa, E. & Fenerich-Verani, N. (2001). Embryonic and larval development of the "piabanha", *Brycon insignis*, STEINDACHNER, 1876 (PISCES, CHARACIDAE). *Bol. Inst. Pesca.* v. 27, n. 1, p. 21-28.
- Balinsky, B. I. (1970). *An introduction to embryology*. Philadelphia: Saunders Company. 698p.
- Borçato, F. L.; Bazzoli, N. & Sato, Y. (2004). Embriogenesis and larval ontogeny of the "piau-gordura", *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. *Rev. Bras. Zool.*, v. 21, n. 1, p. 117-122.
- Botero, M.; Fresneda, A.; Montoya, A. F. & Ángel, M. O. (2004). 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*). *Rev. Col. Cienc. Pec.*, v. 17, p. 38-45.
- Cardoso, E. L.; Alves, M. S. D.; Ferreira, R. M. A. & Godinho, H. P. (1995). Embryogenesis of the neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquat. Living Res.*, v. 8, p. 343-346.
- Castellani, L. R.; Tse, H. G.; Leme dos Santos, H. S.; Faria, R. H. S. & Santos, M. L. S. (1994). Desenvolvimento embrionario do curimatá *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). *Rev. Bras. Cienc. Morf.*, v. 11, n. 2, p. 99-105.
- Coward, K.; Bromage, N. R.; Hibbitt, O. & Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, v. 12, n. 33-58.
- Cussac, V. E.; Matkovic, M. V. & Maggese, M. C. (1985). Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (VALENCIENNES, 1840) EIGENMANN Y EIGENMANN, 1888 (PISCES, PIMELODIDAE), I. Organogenesis media, organogenesis tardia y eclosion. *Rev. Bras. Biol.*, v. 45, n. 1/2, p. 149-160.
- Faustino, F.; Nakaghi, L. S. O.; Marques, C.; Makino, L. & Senhorini, J. A. (2007). Fertilização e desenvolvimento embrionario: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* X cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Acta Sci.*, v. 29, p. 49-55.
- Flores, J. C. B.; Araiza, M. A. F. & Valle, M. R. G. (2002). Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon indellus* (Carpa herbívora). *CIVA 2002* (<http://www.civa2002.org>), p. 792-797.

- Ganeco, L. N. (2003). Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1894), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida. *Dissertação de Mestrado*. FCAV-UNESP. Jaboticabal.
- Ganeco, L. N. & Nakaghi, L. S. O. (2003). Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci.*, v. 25, p. 227-231.
- Godinho, H. M., Fenerich, N. A. & Narahara, M. Y. (1978). Developing of embryos and larvae of *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 38, p. 151–156.
- Gomes, B. V. C.; Scarpelli, R. S.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Bazzoli, N. & Rizzo, E. (2007). Comparative oocyte morphology and early development em three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. *J. Fish Biol.*, v. 70, p. 1412-1429.
- González-Doncel, M.; Okihiro, M. S.; Villalobos, S. A.; Hinton, D. E. & Tarazona, J. V. (2005). A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *J. Appl. Ichthyol.*, v. 21, p. 39-52.
- Hart, N. H. (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.*, v. 121, p. 1-66.
- Kimmel, C. B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S. R & Ullmann, B.. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* v. 203, p. 253-310.
- Lagler, K. F.; Bardach, J. E.; Miller, R. R. & Passino, D. R. M. (1977). *Ichthyology*. Second Edition, New York: John Wiley & Sons, Inc, 506p.
- Lake, J. S. (1967). Rearing experiments with species of Australian freshwater fishes. II Morphogenesis and ontogeny. *J. Mar. Fres. Res.*, v. 18, p. 155-173.
- Landines, M. A.; Senhorini, J. A.; Sanabria, A. I. & Urbinati, E. C. (2003). Desenvolvimento Embrionário do Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829). *Bol. Tec. Cepta*, v. 6, p. 1-13.
- Leme dos Santos, H. S. & Azoubel, R. (1996). *Embriologia comparada*. Jaboticabal: FUNEP. 189p.
- Long, W. L. & Ballard, W. W. (1976). Normal embryonic stages of the white suckers, *Catostomus commersoni*. *Copeia*, v. 2, p. 342-351.

- Luz, R. K.; Reynalte-Tataje, D. A.; Ferreira, A. A. & Zaniboni-Filho, E. (2001). Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, n. 1, p. 49-55.
- Marques, C.; Nakaghi, L. S. O, Faustino, F; Ganeco, L. N. & Senhorini, J. A. (2008). Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. *Zygote*, p.1-10 (artigo no prelo).
- Matkovic, M. V.; Cussac, V. E. & Cukier, M. (1985). Desarrollo embrionário de *Rhamdia sapo* (VALENCIENNES, 1840) EINGENMANN Y EINGENMANN, 1888 (PISCES, PIMELODIDAE). I, Segmentación, morfogénesis y organogenesis temprana. *Rev. Bras. Biol.*, v. 45 n.1/2, p. 39-50.
- Matsumura, Y. (1972). Egg development of sacleed sardine *Harengula pensacolae* Goode & Bean (Pisces, Clupeidae). *Bol. Inst. Ocean.*, v. 21, p. 129-135.
- Morrison, C. M.; Miyake, T. & Wright Jr., J. R. (2001). Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Ciclidae). *J. Morphol.*, v. 247, n. 172-195.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P. V. & Cavicchioli, M. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce, desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: UEM, Nupélia, 359p.
- Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F. & Azevedo, A. (2006). Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote*, v. 14, p. 217-229.
- Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F.; Azevedo, A.; Agostinho, C. A. & Veríssimo-Silveira, R. (2007). Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). *Zygote*, v. 15, p. 267-271.
- Ribeiro, C. R.; Leme dos Santos, H. S. & Bolsan, A. A. (1995). Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (PACU, *Piaractus mesopotamicus*; TAMBACU, *Colossoma macropomum* e HÍBRIDO TAMBACU). *Rev. Bras. Biol.*, v. 55, Supl. 1, p. 65-78.
- Riehl, R. (1980). Micropyle of some salmonids and coregonins. *Env. Biol. Fish.*, v.5, p.59-66.
- Rizzo, E. & Bazzoli, N. (1993). Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis*, Reinhardt, 1874 (Pisces; Characiformes). *Eur. Arch. Biol.*, v. 104, p. 1-6.

- Rizzo, E.; Sato, Y.; Barreto, B. P. & Godinho, H. P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, n. 61, p.615-632.
- Sanches, P. V.; Nakatani, K. & Bialezki, A. (1999). Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná River. *Rev. Bras. Biol.*, v. 59, n. 3, p. 429-438.
- Sargent, R. C.; Taylor, P. D. & Gross, M. R. (1987). Parental care and evolution of egg size in fishes. *Am. Nat.*, v. 121, n. 1, p. 32-46.
- Shardo, J. D. (1995). Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the American Shad, *Alosa sapidissima* (Wilson, 1811). *J. Morphol.*, v. 225, p. 125-167.
- Silvergrip, A. M. C. (1992) Zungaro, a senior synonym of *Paulicea* (Teleostei: Pimelodidae). *Ichthyol. Explor. Fres.*, v. 3, n. 4, p. 305-310.
- Sipaúba-Tavares, L. H. (1995). *Limnologia aplicada à aqüicultura*. Jaboticabal, São Paulo: FUNEP-UNESP. 70 p.
- Tolosa, E. M. C.; Behmer, O. A. & Freitas-Neto, A. G. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Barueri – SP: Manole, 331p.
- Vaz, M. M.; Torquato, V. C. & Barbosa, N. D. C. (2000). (Org.). *Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande*. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. NUPÉLIA. Maringá: EDUEM. 169p.
- Wourms, J. P. & Evans, D. (1974). The embryonic development of the black prickleback, *Xiphister atropurpureus*, a Pacific Coast blennioid fish. *Can. J. Zool.*, v. 52, p. 879-887.
- Woynarovich, E. & Hováth, L. (1983). *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. Brasília, DF: FAO/CODEVASF – CNPq, (Manual de Extensão, 5), 220p.

Tabela 01 – Descrição do desenvolvimento embrionário do *Z. jahu*, a 29,4°C.

Tempo (min)	Estágio	Descrição
0 a 15	Zigoto	Migração do citoplasma com a formação do pólo animal
20	Clivagem	100% com 2 blastômeros
30	Clivagem	100% com 4 blastômeros
45	Clivagem	100% com 8 blastômeros
60	Clivagem	13% com 16 blastômeros; 87% com 32 blastômeros
75	Clivagem	45% com 32 blastômeros; 55% com 64 blastômeros
90	Mórula	70% mórula inicial; 30% mórula final
105	Mórula	14% mórula inicial; 86% mórula final
120	Blástula	100% blástula
180	Gástrula	100% gástrula (25% epibolia)
240	Gástrula	20% gástrula (25% epibolia); 80% gástrula (50% epibolia)
300	Gástrula	19% gástrula (50% epibolia); 81% gástrula (75% epibolia)
360	Gástrula	100% tampão vitelino
420	Organogênese	Diferenciação das regiões cefálica e caudal
480	Organogênese	Região cefálica se destacando
540	Organogênese	100% vesícula óptica e Kupffer, 9 somitos
600	Organogênese	100% alongamento caudal, início pigmentação corpo e vitelo, 17 somitos
660	Organogênese	100% cauda livre, 24 somitos
720	Organogênese	100% cauda livre, 30 somitos, aumento da pigmentação
780	Eclosão	100% eclodidas

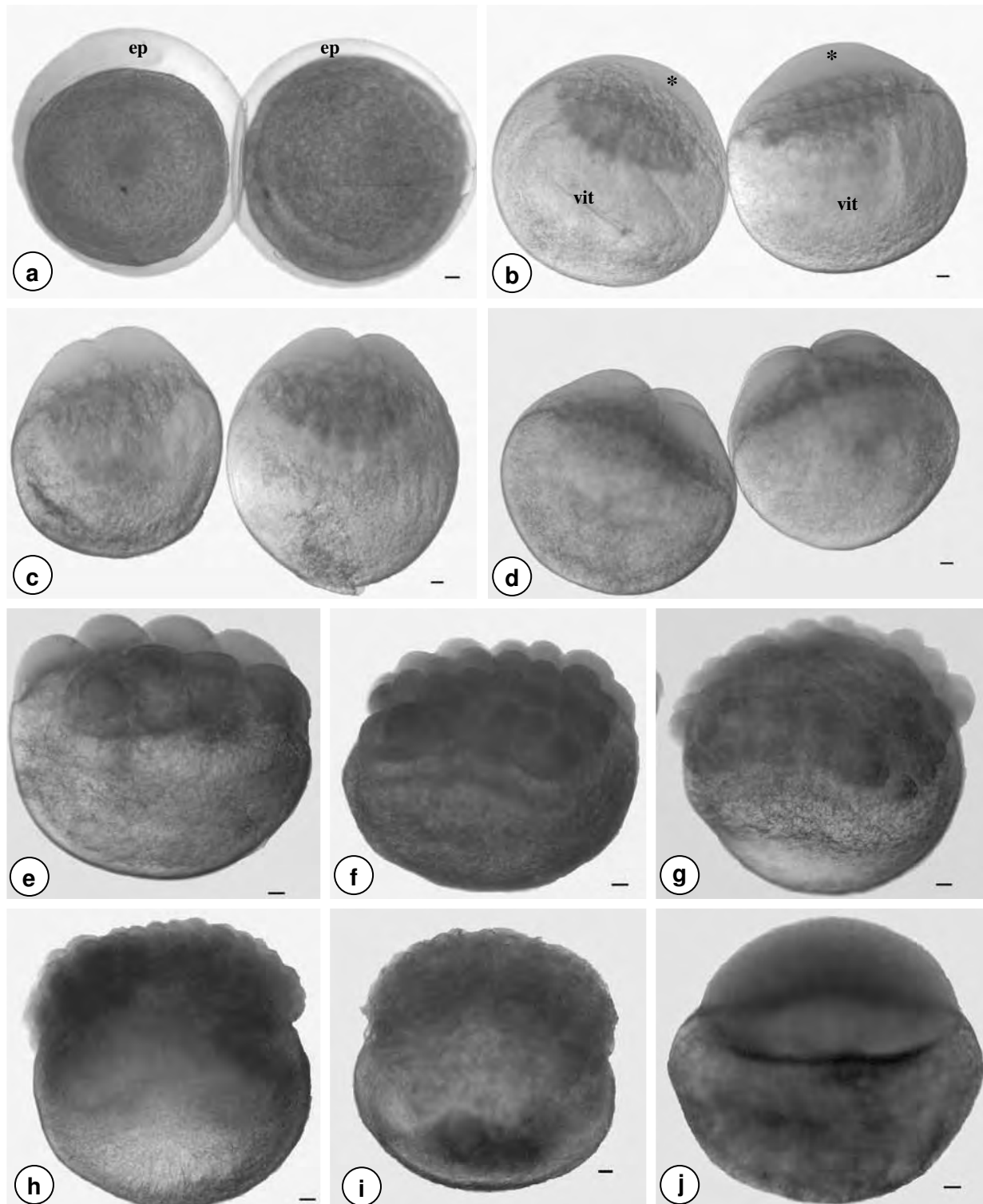


Figura 1. Fotomicrografias do ovócito (a) e ovo (b – j) de *Z. jahu*. **a:** Ovócito; **b:** Fase zigoto, visualiza-se a formação da célula-ovo ou zigoto (*); **c – h:** Fase clivagem: c – presença de 2 blastômeros, d – 4 blastômeros, e – 8 blastômeros, f – 16 blastômeros, g – 32 blastômeros, h – 64 blastômeros; **i:** Fase mórula; **j:** Fase blástula (ep = espaço perivitelino, vit = vitelo) (barras = 100 μ m).

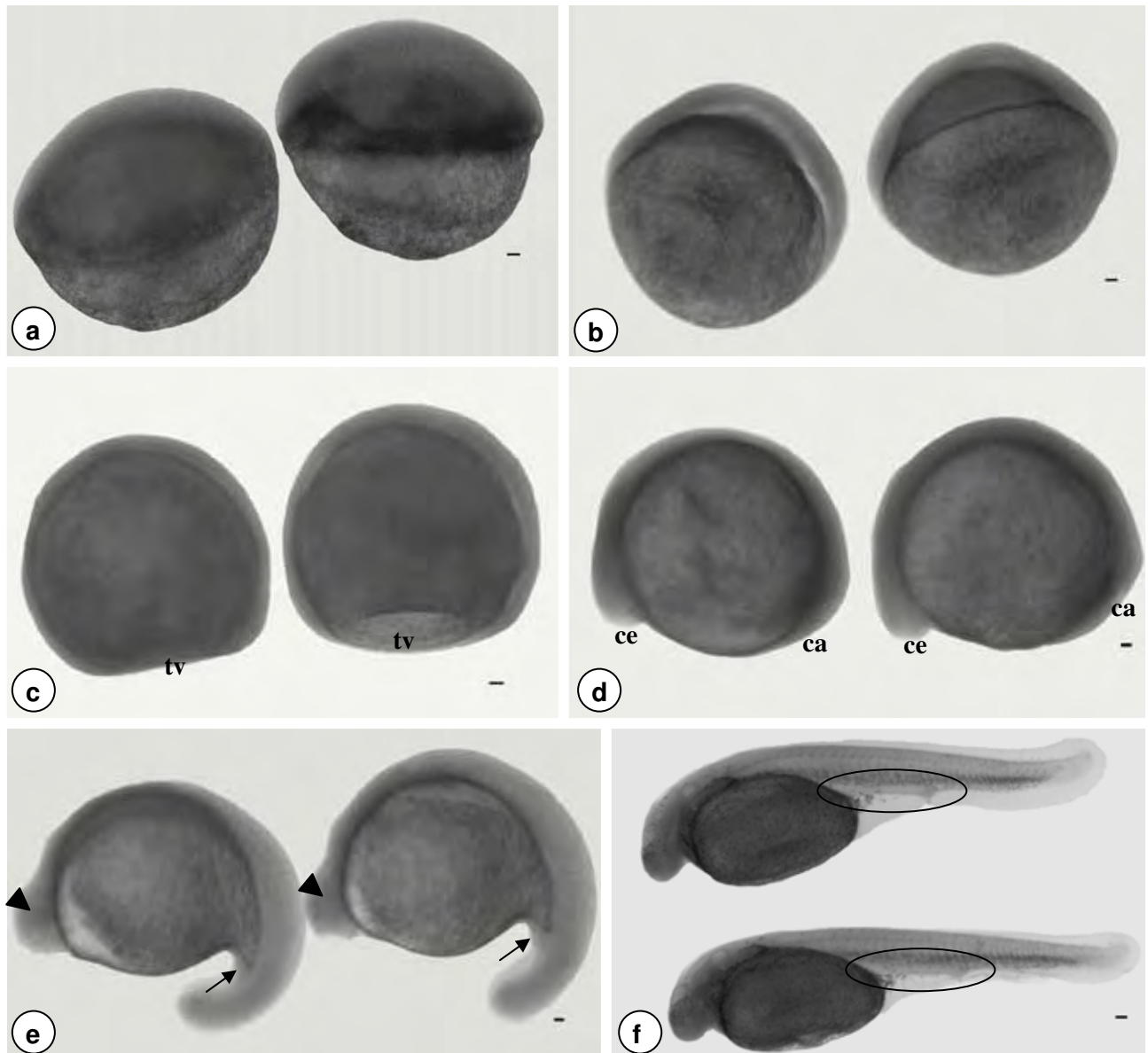


Figura 2. Fotomicrografias do ovo (a – c), embrião (d, e) e larva eclodida (f) de *Z. jahu*. **a – c:** Fase gástrula: a – início da epibolia (25%), b – 50% epibolia, c – formação do tampão vitelino; **d – e:** Fase organogênese: d – diferenciação da região cefálica e caudal, e – alongamento caudal do embrião, presença dos somitos, vesículas óptica (cabeças de seta) e de Kupffer (setas) e início da pigmentação; **f:** Fase eclosão, detalhe do intestino primitivo (círculo) (ca = região caudal, ce = região cefálica, tv = tampão vitelino) (barras = 100 μ m).

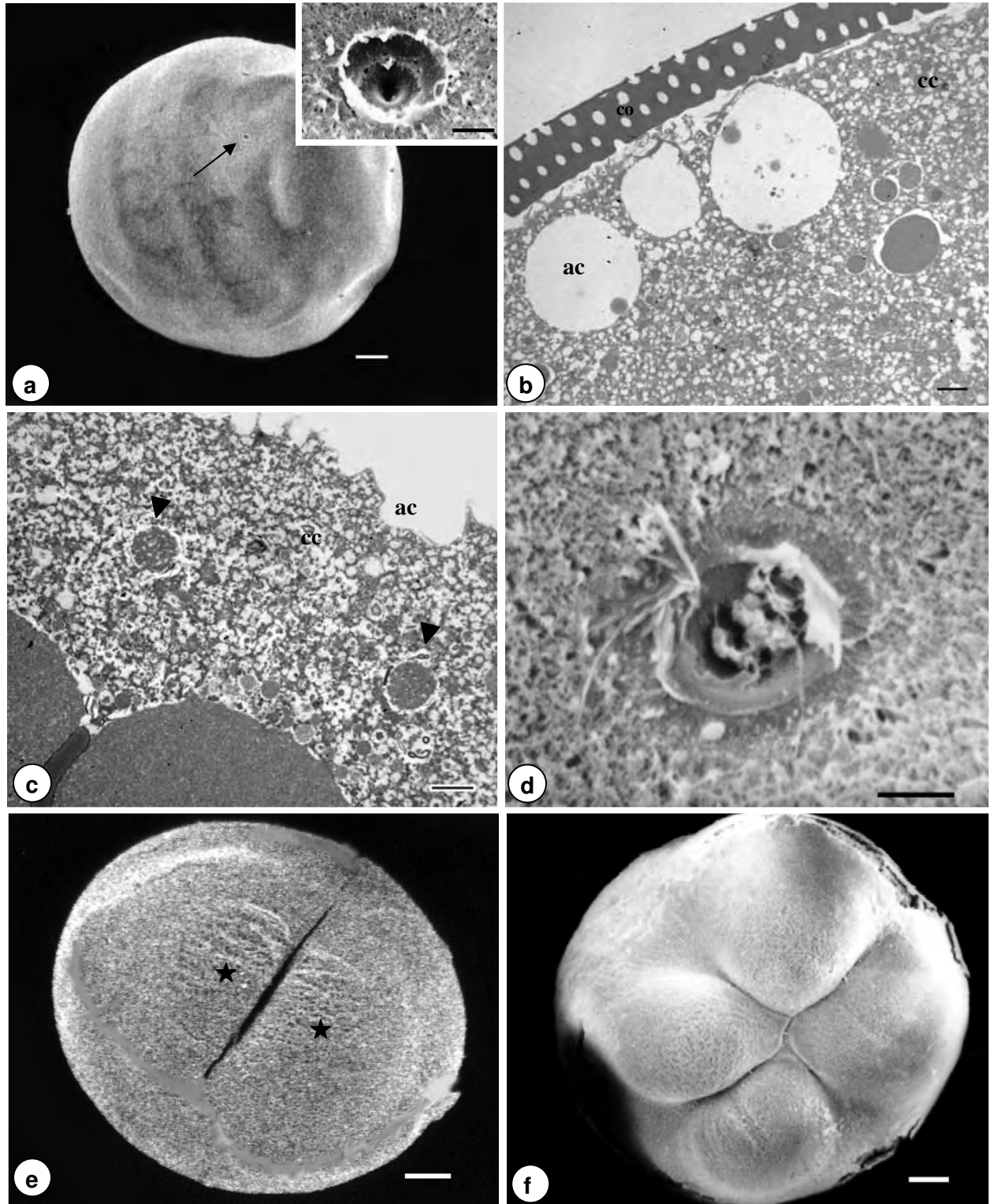


Figura 3: Eletromicrografias de varredura (a,d,e,f) e transmissão (b,c) do ovócito (a – d) e ovos (e, f) de *Z. jahu*. **a:** ovócito, mostrando a presença de uma micrópila (seta e destaque); **b:** visualiza-se o citoplasma cortical com alvéolos corticais dispostos na periferia, córion com poros; **c:** nota-se o citoplasma cortical com a presença de mitocôndrias (cabeça de seta) e alvéolos corticais já rompidos; **d:** presença de vários espermatozoides na entrada da micrópila do ovócito; **e:** presença de 2 blastômeros (★); **f:** presença de 4 blastômeros. (ac = alvéolo cortical, cc = citoplasma cortical, co = córion)(barras: a = 100 μm ; b, e, f = 10 μm ; destaque, d = 2 μm).

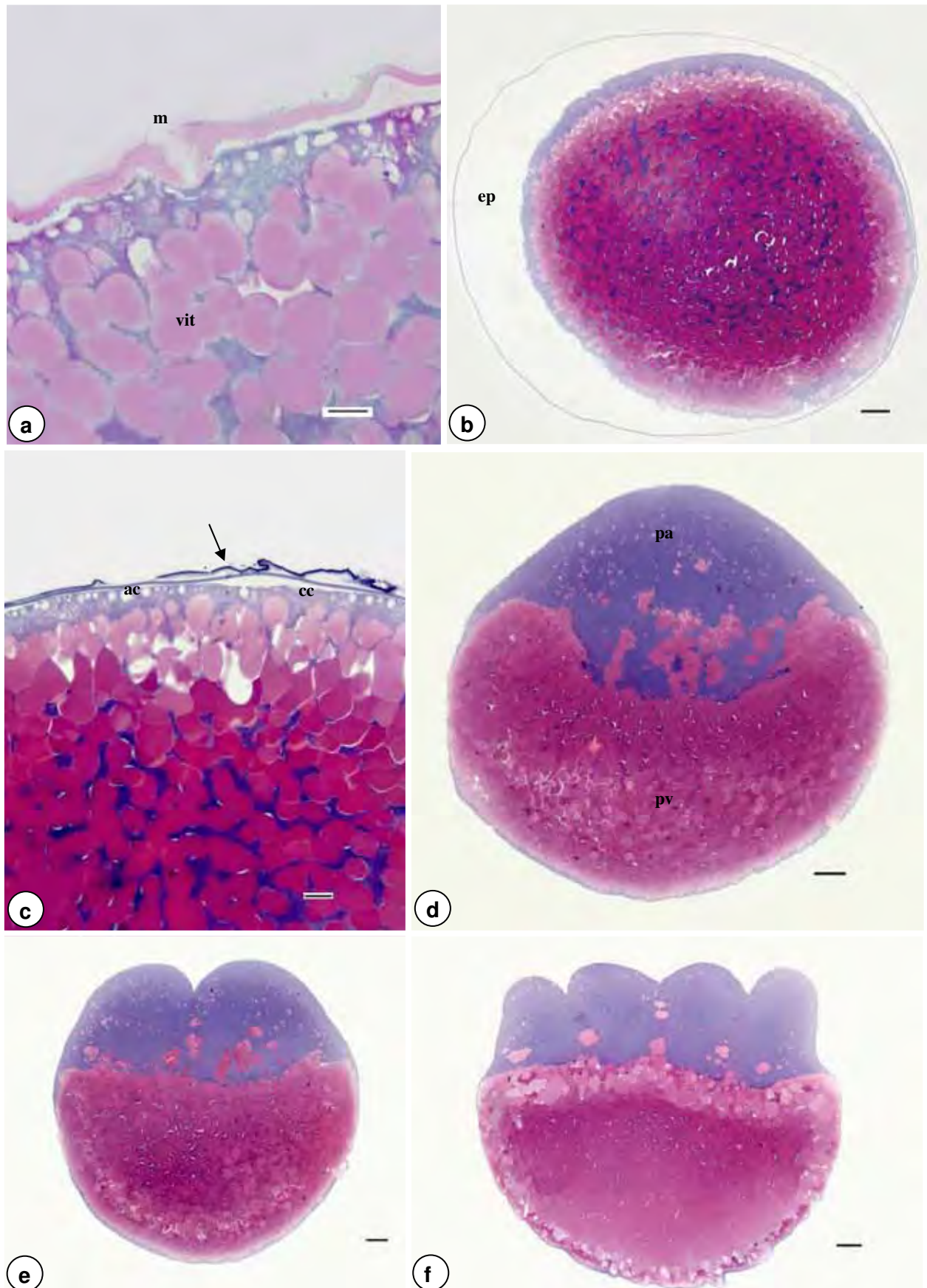


Figura 4: Fotomicrografias do ovócito (a – c) e ovo (d – f) de *Z. jahu.*. **a:** detalhe da micrópila; **b:** ovócito durante a fertilização; **c:** visualiza-se o citoplasma cortical com alvéolos corticais dispostos na periferia, córion com fina camada gelatinosa (seta); **d:** formação da célula-ovo; **e:** presença de 2 blastômeros; **f:** presença de 8 blastômeros (ac = alvéolo cortical, cc = citoplasma cortical, ep = espaço perivitelino, m = micrópila, pa = pólo animal, pv = pólo vegetativo, vit = vitelo)(barras: a = 20 μ m; b, d – f = 100 μ m; c = 30 μ m).

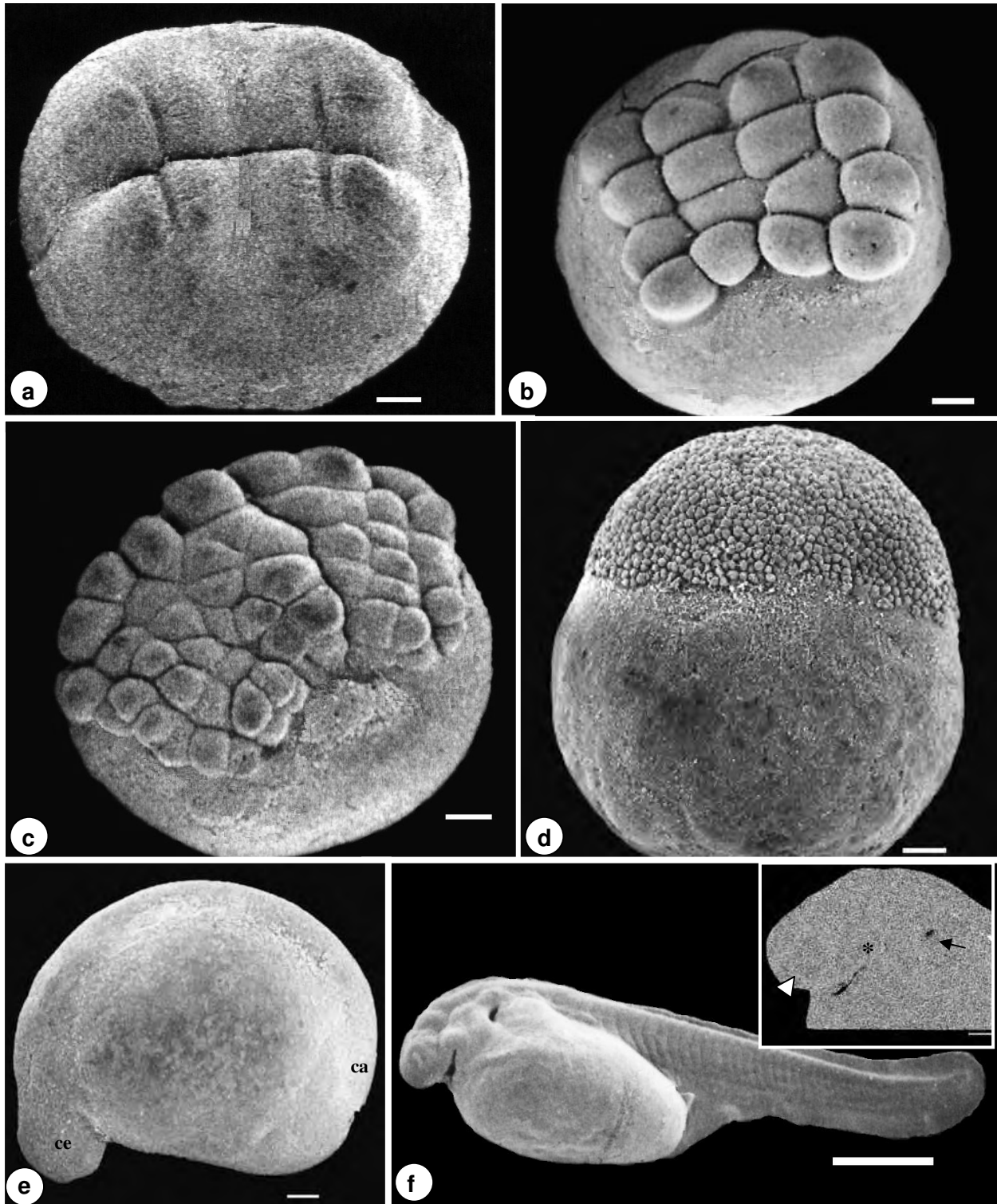


Figura 5: Eletronmicrografias de varredura do ovo (a – d), embrião (e) e larva (f) de *Z. jahu*. a – c: presença de 8, 16, 32 blastômeros, respectivamente; d: fase de mórula; e: diferenciação da região cefálica e caudal; f: larva eclodida visualiza-se no destaque os primórdios dos barbilhões (*), cavidade bucal, cavidade respiratória (seta) e região da narina (cabeça de seta) (ca = região cefálica, ce = região caudal)(barras: a – e, destaque = 100 μ m, f = 500 μ m).

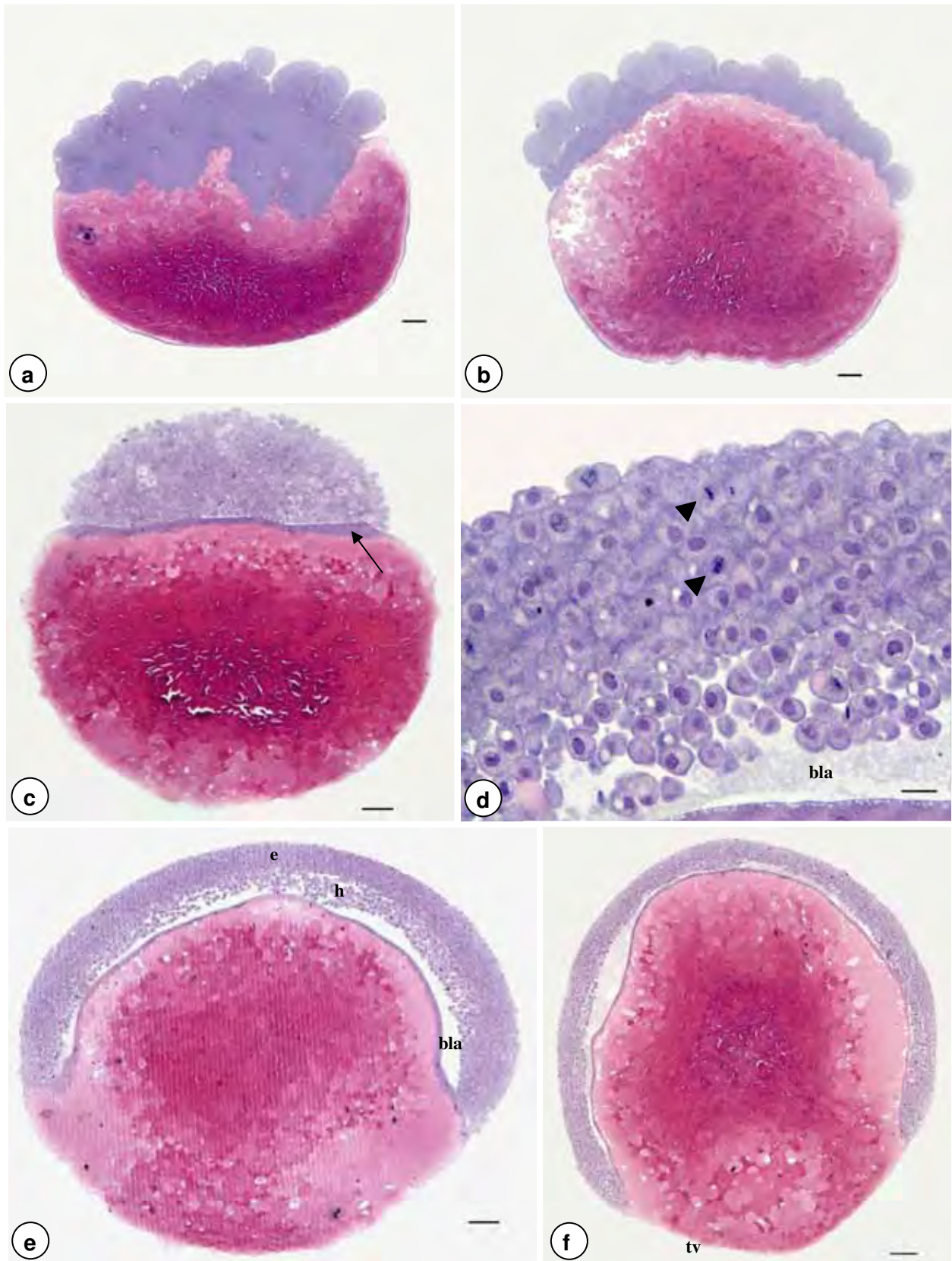


Figura 6: Fotomicrografias do ovo de *Z. jahu*, **a:** presença de 32 blastômeros; **b:** presença de 64 blastômeros; **c:** fase de mórula, visualização da camada sincicial de vitelo (seta), **d:** grande número de mitoses (cabeças de seta); **e – f:** fase de gástrula, e – destacando o movimento de epibolia com a formação do epiblasto e hipoblasto; f – formação do tampão vitelino (bla = blastocele, e = epiblasto, h = hipoblasto, tv = tampão vitelino) (barras: a – c; e, f = 100 μ m, d = 20 μ m).

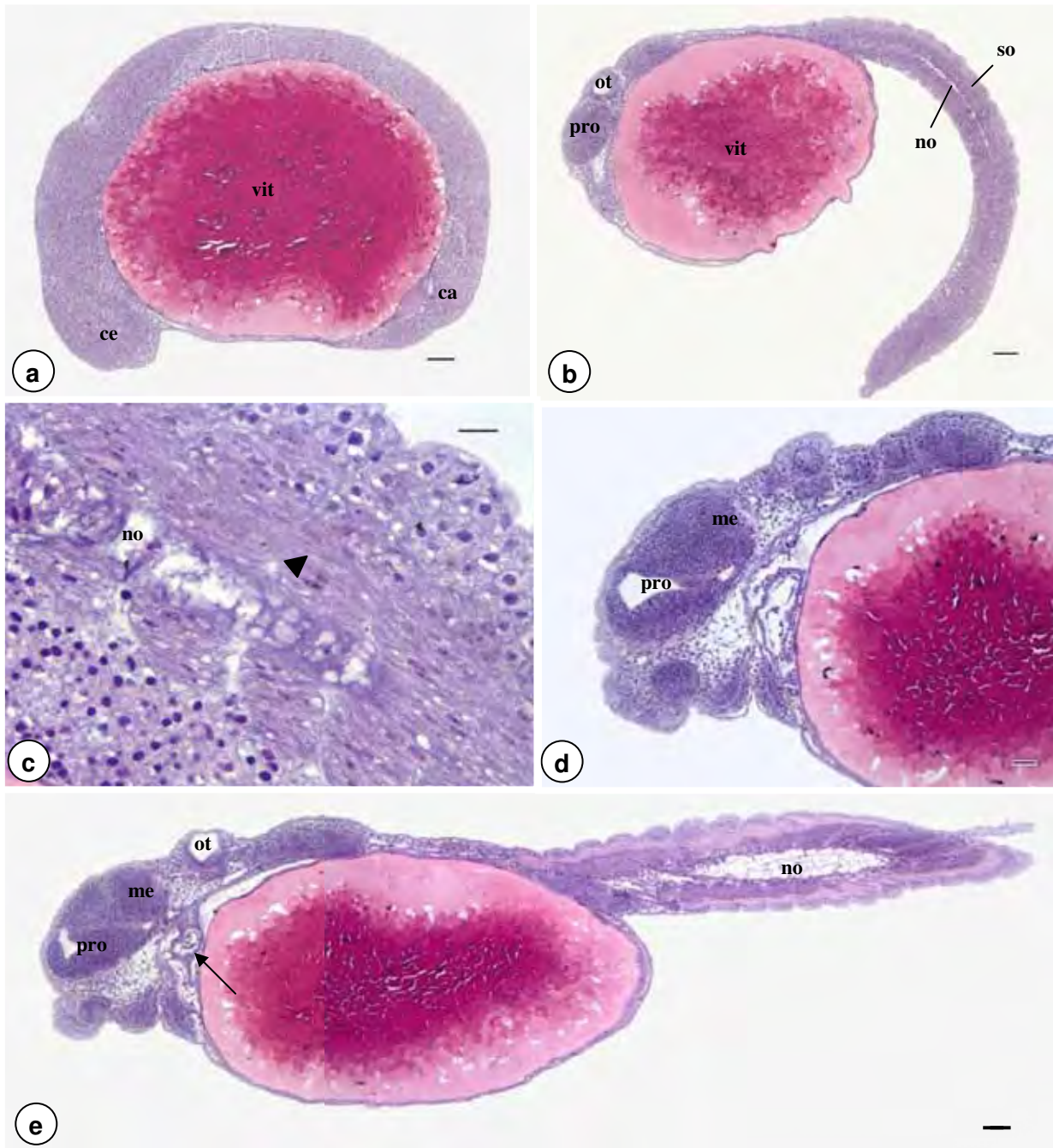


Figura 7: Fotomicrografias do embrião (a – d) e larva (e) de *Z. jahu*. **a:** diferenciação da região cefálica e caudal; **b:** alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal; **c:** diferenciação dos miômeros (cabeça de seta); **d:** detalhe do prosencéfalo; **e:** larva eclodida, visualização do coração rudimentar (seta). (ca = região caudal, ce = região cefálica, me = mesencéfalo, no = notocaorda, ot = vesícula ótica, pr = prosencéfalo, so = somitos, vit = vitelo) (barras: a, b, e = 100 μ m; c = 20 μ m; d = 50 μ m).

ARTIGO II

(Normas da Revista *The International Journal of Developmental Biology*)

Ontogenia de larvas de jaú (*Zungaro jahu*) da eclosão à absorção do vitelo

RESUMO

A espécie *Zungaro jahu* pertence à ordem Siluriforme, é encontrada nas bacias dos rios Amazonas e do Prata. É uma espécie vulnerável da fauna, sujeita à extinção devido à destruição de seu habitat. O objetivo deste estudo foi caracterizar o desenvolvimento larval do *Z. jahu*. As coletas foram realizadas na estação de piscicultura da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias – Jupia (CESP – Castilho, SP). As amostras foram coletadas em tempos pré-determinados desde a eclosão da larva até a absorção total do vitelo, e fixadas em solução de Karnovsky para processamento em microscopia de luz e eletrônica de varredura. A absorção total do vitelo foi observada com 60 horas pós-eclosão (hpe) a uma temperatura média de $28,75 \pm 0,59$ °C. As larvas recém-eclodidas apresentaram corpo levemente pigmentado, esboço do trato digestório, olhos bem evidentes e primeiros movimentos natatórios. A abertura da boca ocorreu 12 hpe e a ligação entre a cavidade bucal e o intestino primitivo com 24 hpe. Foi observado o desenvolvimento dos principais sistemas das larvas, dentre eles: os órgãos do sistema digestório, coração, arcos branquiais, sistema nervoso/sensorial, tireóide, pronefro e vesícula gasosa. (Todos estes órgãos tornaram-se mais desenvolvidos e funcionais com o desenvolvimento da larva. Este trabalho pode servir como base para muitos estudos, como por exemplo taxonomia, ecologia, preservação e cultivo, fornecendo informações sobre a ontogenia do jaú.

Palavras-chave: Desenvolvimento inicial, Ultra-Estrutura, Histologia, Peixe.

1) INTRODUÇÃO

O desenvolvimento inicial dos peixes é um processo altamente dinâmico, com mudanças ontogenéticas refletindo em mudanças morfofuncionais dos principais sistemas orgânicos, consequência da rápida evolução morfológica e fisiológica pela qual atravessam os embriões e larvas de peixes durante seu desenvolvimento (Osse *et al.*, 1997).

O estágio larval em peixes pode durar de alguns dias a meses. Durante esse período, a larva duplica seu comprimento e aumenta o peso em até 100 vezes. Ocorre diferenciação progressiva dos caracteres adultos, passando por um processo de morfogênese até o período juvenil, quando se torna igual ao adulto (Nakatani *et al.*, 2001). Portanto, muitos peixes teleósteos sofrem grandes mudanças na forma do corpo, afetando diretamente o crescimento e a sobrevivência dos espécimes jovens (Blaxter, 1969; Gisbert *et al.*, 2000).

Larvas de peixes, além de serem morfológicamente diferentes dos adultos, apresentam exigências ecológicas distintas, com particularidades quanto ao habitat, alimentação e comportamento (Leis & Trnski, 1989 *apud* Sanches *et al.*, 2001). Dessa forma, estudos sobre a ecologia de peixes não podem ser considerados adequados sem o conhecimento prévio do desenvolvimento inicial das espécies (Sanches *et al.*, 2001). Além disso, a grande similaridade entre larvas de espécies diferentes e a falta de literatura comparativa dificultam os trabalhos de identificação.

A espécie *Zungaro jahu*, popularmente conhecida como jaú, ocorre nas bacias Paraná-Paraguai e Uruguai. É um dos maiores peixes neotropicais, sendo considerado de grande porte, por alcançar até 150 kg e 144 cm de comprimento (Agostinho *et al.*, 2004). Realiza migração durante o período reprodutivo, possui ovos livres, atinge a primeira maturação com 70 cm de comprimento total e a desova ocorre entre os meses de dezembro e fevereiro. Tem preferência pelos rios caudalosos, vivendo no fundo destes ou no pé das cachoeiras sendo uma espécie piscívora noturna (Vaz *et al.*, 2000). Informações sobre sua biologia e ecologia são escassas, e a maioria está relacionada à nutrição, parasitologia ou morfologia (Agostinho *et al.*, 2004). É uma espécie vulnerável, sujeita à extinção devido à destruição de seu habitat.

O acompanhamento da morfogênese, em condições controladas, de larvas obtidas por meio de técnicas de reprodução artificial, permite o monitoramento de diferenciações morfológicas ocorridas, fornecendo informações sobre as exigências ambientais e alimentares dos peixes durante as fases iniciais. Portanto, estudos que atentem para a compreensão do desenvolvimento dos sistemas orgânicos em larvas estão dentre os mais úteis para a aplicação de melhores técnicas de produção de larvas e juvenis que, conseqüentemente, propiciarão maiores chances de sucesso nos processos de incubação, larvicultura e produção de juvenis.

Este estudo, portanto, teve como objetivo descrever a ontogenia de sistemas do jaú, *Z. jahu*, utilizando análises em estereomicroscópio, microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2) MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na estação de piscicultura da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias – Jupiá, pertencente à Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP – Castilho, SP). As amostras foram processadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) – Jaboticabal, SP.

As coletas foram realizadas em dezembro de 2006. Peixes da espécie *Z. jahu* em período reprodutivo, que ocorre no verão, foram submetidos à reprodução induzida e a fertilização a seco, segundo as técnicas de Woynarovich & Hórvath (1983).

As proles foram alojadas em incubadoras com capacidade de 60 L, de fluxo contínuo, onde permaneceram durante todo o período amostrado, sendo alimentadas com artêmia e plâncton existentes na água no 2º dia e com larvas de lambari e curimbatá a partir do 3º dia pós-eclosão.

Foram amostradas as seguintes variáveis físico-químicas da água: pH, oxigênio dissolvido (mg/L), alcalinidade (mg/L), condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e amônia ($\mu\text{g}/\text{L}$). A temperatura da água foi monitorada diariamente às 8:00 e 20:00 horas.

As amostras foram obtidas no momento da eclosão (tempo zero) e posteriormente de quatro em quatro horas pós-eclosão (hpe) das larvas, até o momento da absorção total do vitelo. Em cada coleta, 10 amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24 horas, lavadas em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 e armazenadas em álcool 70% para posterior análise de acordo com as seguintes metodologias:

Análise estereomicroscópica e morfometria: As larvas foram observadas e fotomicrografadas em estereomicroscópio LEICA MZ8, acoplado ao equipamento de fotomicrografia LEICA DFC 280. O comprimento total das mesmas foi medido em estereomicroscópio acoplado ao programa IM 50-LEICA.

Microscopia de Luz (ML): As amostras foram processadas para inclusão em historesina segundo recomendações do fabricante, kit Leica Historesin. Obtiveram-se cortes semi-seriados, com 4 μ m de espessura, desprezando-se 4 cortes, montados em lâminas e corados com Hematoxilina-floxina (HF) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Tolosa *et al.*, 2003). A análise das lâminas e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio LEICA DM 2500.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): Após lavagem em tampão Cacodilato de Sódio, as larvas foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas, lavadas novamente no mesmo tampão, desidratadas em série crescente de etanol, secas em secadora de ponto crítico, com CO₂ líquido (BAL-TEC), montadas em suporte de cobre, metalizadas com ouro-paládio, observadas e elétronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

3) RESULTADOS

As larvas de *Z. jahu* eclodiram 13 horas após a fertilização. À eclosão, mediram em média 3,79 \pm 0,11mm e no momento da absorção total do vitelo apresentaram 7,05 \pm 0,33mm de comprimento total. A absorção total do saco vitelino ocorreu 60 hpe.

À eclosão, as larvas apresentaram-se transparentes, com pigmentação no saco vitelino e nas regiões cefálica e ventral (Figura 1a), sendo que esta pigmentação foi aumentando conforme o desenvolvimento das larvas. Também se observou a nadadeira embrionária bem desenvolvida em toda a extensão dorsal e ventral do corpo (Figura 1a).

A temperatura da água durante toda a ontogênese larval foi de $28,75 \pm 0,59$ °C. As médias das variáveis físico-químicas da água apresentaram os seguintes valores: amônia = $12,47 \pm 1,79$ µg/L; pH = $8,18 \pm 0,035$ U.pH; condutividade = 32 ± 2 µS/cm; oxigênio dissolvido = $7,33 \pm 0,21$ mg/L e alcalinidade = $19,00 \pm 1,73$ mg/L. Durante a ontogênese larval observam-se o desenvolvimento dos seguintes sistemas e estruturas:

Sistema Digestório

O sistema digestório foi dividido em intestino cefálico (cavidade bucal e faringe), intestino anterior (esôfago e estômago, quando presentes), intestino médio (intestino propriamente dito), intestino posterior (reto e ânus).

No tempo zero, visualizou-se um tubo reto e simples na região ventral da larva, representando o esboço do intestino primitivo (Figura 1a). Em ML, este apresentou uma única camada de células prismáticas em toda a sua extensão, sem conexão com a cavidade bucal. Com 8 hpe, o intestino começou a apresentar pequenas invaginações (Figura 1b) e com 36 hpe, constatou-se a primeira dobra do trato digestório, após a região proximal do intestino médio (Figuras 1c, d). De 24 hpe até 60 hpe, observou-se um aumento das invaginações, resultando num intestino médio com muitas pregas. Após a total absorção do vitelo, o intestino médio apresentou epitélio de revestimento simples, prismático, com borda estriada e células produtoras de muco (Figura 1e).

A abertura da cavidade bucal da larva ocorreu com 12 hpe (Figura 2a). A partir de 16 hpe houve o início do alongamento da fenda bucal. Em MEV, visualiza-se o epitélio de revestimento da fenda bucal sofrendo elevação devido à formação dos dentes, bem como um elevado número de botões gustativos visualizados nas bordas labiais e no interior da boca com 20 hpe (Figura 2b). Com 24 hpe, pequenos dentes foram observados na maxila e mandíbula em fase inicial de desenvolvimento (Figuras 2c, d). Em ML, notou-se um grande número de células produtoras de muco nas bordas labiais (Figura 2d).

Com 24 hpe identificou-se a comunicação entre o intestino cefálico e o intestino anterior, com a abertura do esôfago (Figura 2e). Também teve início a diferenciação da porção proximal do intestino médio, que apresentou um aumento de sua luz, e com 28 hpe, visualizaram-se algumas células produtoras de muco, cujo número aumentou com o progresso da diferenciação (Figura 3a). O esôfago, constituído

por uma única camada de células globosas, apresentou algumas células produtoras de muco, coradas em PAS. A faringe, também formada por células globosas, não teve modificações consideráveis em sua estrutura. Com 28 hpe visualizaram-se os primeiros dentes faríngeos (Figura 3b). A abertura anal ocorreu 16 hpe.

O fígado surgiu 16 hpe, tornando-se mais evidente com 20 hpe e ocupando toda a extensão anterior ao saco vitelino, atrás da cavidade pericardial (Figura 3c). Este apresentou reação positiva ao PAS, nas larvas com 37 hpe, como um sinal de armazenagem de glicogênio. Com o decorrer do tempo, houve um aumento no número de hepatócitos e na quantidade de glicogênio hepático (Figura 3d).

O pâncreas, localizado entre o fígado e o saco vitelino, também visualizado com 16 hpe, inicialmente apresentou poucos grânulos de zimogênio (Figura 3d), sendo que este número aumentou consideravelmente até a absorção total do vitelo. A primeira ilhota pancreática foi visualizada com 24 hpe (Figura 3e).

A reabsorção do saco vitelino ocorreu através da camada sincicial de vitelo, mas antes da completa reabsorção notaram-se sinais de alimento no tubo digestório das larvas, indicando sobreposição de alimentação endógena e exógena.

Não houve durante o período estudado, diferenciação do estômago e das glândulas gástricas.

Arcos Branquiais

O esboço dos arcos branquiais em *Z. jahu* formou-se logo após a eclosão. O início da condrogênese e da irrigação sanguínea deu-se com 20 hpe, e com 24 hpe as brânquias estavam se ramificando (Figura 4a). Com 8 hpe iniciou-se o desenvolvimento da membrana branquiostegial, estando totalmente formada e cobrindo os arcos branquiais com 28 hpe (Figuras 4b, c, respectivamente). Os arcos branquiais encontravam-se bem desenvolvidos após a absorção total do saco vitelino (Figura 4d).

Coração

Um coração rudimentar, já presente no momento da eclosão da larva, encontrava-se localizado na cavidade pericardial, anteriormente ao saco vitelino e à cavidade abdominal. Foram visualizadas duas câmaras no coração (átrio e ventrículo) com 24 hpe. O átrio apresentou uma fina parede, enquanto três

camadas de células formavam o miocárdio do ventrículo, que apresentou o início da formação de trabéculas 28 hpe (Figura 4e). Com 32 hpe o sangue percorria o caminho completo no coração chegando através do orifício sinoatrial ao átrio, seguindo pelo orifício atrioventricular e atingindo o ventrículo, alcançando então o bulbo-arterial pelo orifício ventrículo-bulbar (Figura 4f), e saindo do coração através da aorta ventral, indo para os arcos branquiais para ser oxigenado.

Pronefro: rim primitivo

O pronefro estava presente logo após a eclosão, na forma de dois túbulos laterais retos, formados por epitélio simples cúbico. Encontravam-se acima do intestino e acompanhavam toda a extensão deste. A região cranial começou a se tornar enovelada com 16 hpe, enquanto a região caudal continuava retilínea (Figura 5a). Com o desenvolvimento larval, o pronefro tornou-se mais enovelado e seu lúmen mais aparente (Figura 5b). Os túbulos do pronefro se uniram e desembocaram na papila urogenital, juntamente com o intestino (Figura 5c).

Bexiga Natatória

Com a abertura do esôfago, 24 hpe, notou-se a presença de bexiga natatória reduzida situada entre o estômago e o pronefro (Figura 5d) sendo formada por uma fina camada de células pavimentosas, com um ducto pneumático ligando-a com o esôfago. Esta não apresentou grandes alterações ao longo do desenvolvimento.

Tireóide

Os primeiros folículos tireoideanos foram visualizados com 56 hpe, em ML. Estavam localizados acima da aorta ventral e apresentaram uma única camada de células cúbicas, com colóide em seu interior (Figura 5e).

Sistema nervoso/ sensorial

Encéfalo: A diferenciação das regiões do tubo neural em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo ocorreram simultaneamente a somitogênese. Com 24 hpe notou-se a diferenciação das

regiões do telencéfalo e diencéfalo da porção anterior do cérebro, porção mediana ventral e dorsal do cérebro, e cerebelo transverso proeminente que separa o cérebro médio do cérebro posterior (Figura 2e).

Ouvido interno: o ouvido interno se desenvolveu a partir da vesícula ótica. Com 8 hpe iniciou-se, no interior do ouvido, o desenvolvimento de estruturas semelhantes a neuromastos livres (Figura 5f). Estes estavam formados 24 hpe. Ao mesmo tempo o ouvido começava a desenvolver seus canais anterior e posterior. No momento da absorção total do saco vitelino, o ouvido interno já apresentava os canais anterior, lateral e posterior definidos (Figura 5g).

Olho: a vesícula ótica se desenvolveu durante a somitogênese. Com 8 hpe, em estereomicroscópio, visualizou-se o início da pigmentação, que apresentava-se intensa ao final da absorção total do vitelo. Com 12 hpe, em MEV, observou-se o início da proeminência da vesícula ótica, e a formação de um sulco ou ranhura estreita e profunda na epiderme, ao redor do olho (Figura 6a). No momento da absorção total do vitelo, o olho estava bem desenvolvido, apresentando a camada pigmentada, as camadas nucleares (interna e externa), que estavam conectadas através da camada plexiforme, esta última ainda pouco espessa (Figura 6b), enquanto núcleos dos cones e bastonetes começavam a diferenciar-se em duas camadas.

Fossas nasais: logo após a eclosão notou-se o desenvolvimento inicial das fossas nasais, que apresentavam células olfativas contendo poucos e pequenos cílios (Figura 6c). Com 8 hpe, a fossa nasal tornou-se mais evidente, tendo início a formação da dobra nasal (Figura 4b). Após 16 hpe, os órgãos olfativos estavam bem desenvolvidos, com feixes de cílios na placa sensorial. Com 28 hpe ocorreu o aparecimento de uma protuberância no interior das fossas nasais, início da formação das lamelas (Figura 6d). Com 48 hpe iniciou-se a divisão destas e muitos botões sensoriais foram visualizados ao seu redor (Figura 6e) e 60 hpe as fossas nasais eram revestidas por um neuroepitélio pseudoestratificado prismático ciliado (Figura 6f).

Neuromastos: Em ML, foram visualizados alguns neuromastos, principalmente na região cefálica de larvas com 44 hpe (Figura 7a). Estas estruturas caracterizavam-se como um grupo de células sensitivas recobertas externamente por uma cúpula gelatinosa, e uma camada simples de células suporte sobre a lâmina basal.

Barbilhões: os primórdios do primeiro par de barbilhões (barbilhões maxilares) foram visualizados logo após a eclosão (Figura 6c). Com 4 hpe surgiram primórdios do segundo par de barbilhões (primeiro par mentoniano). Estes começaram a se alongar e, com 16 hpe, visualizou-se os primórdios do terceiro par de barbilhões (segundo par de mentoniano) (Figura 7b). Com 28 hpe os dois primeiros pares de barbilhões estavam alongados e afilados, sendo que os barbilhões maxilares eram pouco mais longos que o primeiro par mentoniano (Figura 4c), enquanto que o terceiro par de barbilhões começou a se afilar no último momento analisado. Com 24 hpe foi possível notar muitas papilas na superfície ventral dos barbilhões, onde se formaram botões gustativos (Figura 7c). Em ML, os barbilhões apresentaram uma camada de células epiteliais e três camadas de células, duas longitudinais externas à uma transversal (Figura 7d).

“Figuras 1- 7” (páginas 78 – 84)

4) DISCUSSÃO

As médias das variáveis físico-químicas da água ficaram próximas a valores considerados bons para o desenvolvimento inicial de peixes (Sipaúba-Tavares, 1995).

As larvas recém-eclodidas de *Z. jahu* apresentaram pequeno tamanho ($3,79 \pm 0,11$ mm), corpo levemente pigmentado, trato digestório rudimentar, rápida absorção do saco vitelínico, natação vertical errática, ausência de esboços das nadadeiras peitorais podendo, dessa forma, serem classificadas como altriciais (Balon, 1990 *apud* Clavijo-Ayala 2006).

O grau de diferenciação da larva recém-eclodida varia entre as espécies, dependendo do tamanho do ovo (Blaxter, 1969). Espécies que apresentam ovos pequenos e alta fecundidade têm o desenvolvimento embrionário mais rápido e larvas menos desenvolvidas, enquanto as que apresentam ovos grandes e baixa fecundidade possuem desenvolvimento embrionário prolongado e maior grau de desenvolvimento das larvas (Sato *et al.*, 2003). Por outro lado, algumas espécies como o peixe-lobo,

Anarchias lupus, apresentam ovos grandes e larvas recém-eclodidas semelhantes aos juvenis, mantendo poucas características larvais como a presença do saco vitelino (Falk-Petersen & Hansen, 2001). Nesse sentido as larvas da espécie estudada apresentam desenvolvimento embrionário rápido e larvas menos desenvolvidas, como também ocorre em *Pimelodus maculatus* (Luz *et al.*, 2001), *Leporinus piau* (Borçato *et al.*, 2004), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006), híbrido de *Pseudoplatystoma coruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum* (Faustino *et al.*, 2007).

O desenvolvimento das estruturas corporais das larvas de peixes, juntamente com o início da alimentação exógena, são eventos importantes que garantem sua sobrevivência (Balon, 1986). A abertura da boca das larvas no presente trabalho ocorreu 12 hpe, próximo ao tempo encontrado por Reynalte-Tataje *et al.* (2004) em *Brycon orbignyanus*, 10,5 hpe. Já Pereira *et al.* (2006) observaram essa fase em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) 24 hpe, Pérez *et al.* (2001) em *P. fasciatum*, 48 hpe, e Osman *et al.* (2008) em African catfish (*Clarias gariepinus*) 104 hpe. A reabsorção do saco vitelino ocorreu com 60 hpe, semelhante ao obtido por Landines *et al.* (2003) em larvas de pintado (*P. coruscans*). Esta reabsorção ocorreu através da camada sincicial de vitelo, como também observado por Gomes *et al.* (2007) em larvas de três espécies de traíras (*Erythrinidae* sp).

A mudança da alimentação endógena para exógena é uma fase crítica do desenvolvimento inicial, apresentando, freqüentemente, altos índices de mortalidade (Gordon & Hecht, 2002). Na maioria das espécies de peixes as larvas apresentam trato digestório simples e indiferenciado, desenvolvendo mais tarde os órgãos digestórios (Govoni *et al.*, 1986). Tal fato foi observado nas larvas de jaú, que na eclosão apresentavam um tubo digestório rudimentar, e na absorção total do vitelo já se encontrava mais desenvolvido, podendo ser dividido em intestino cefálico, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, mesma classificação adotada por Bértin (1958).

Até 60 hpe, nas larvas do *Z. jahu*, não foi verificada a formação do estômago e das glândulas gástricas. Nesse período, segundo Watanabe & Kiron (1994), os peixes dependem da capacidade de seleção do alimento, digestão mecânica e enzimas pancreáticas e intestinais, que agem em meio alcalino, para compensar a falta de enzimas gástricas.

De acordo com Gonzáles *et al.* (2002), a eficiência da digestão e absorção dos alimentos no intestino é decorrente da presença de pregas e microvilosidades, mesmo assim a presença de fígado e

pâncreas maduros ajuda na digestão do alimento, uma vez que elas podem produzir secreções digestivas que digerem as proteínas, gorduras e açúcares.

Encontrou-se no esôfago algumas células produtoras de muco, logo após a conexão deste com o intestino médio. A presença precoce dessas células nas larvas de jaú indica que este encontra-se morfológicamente preparado para se proteger contra a ação abrasiva de alimentos (Galvão *et al.*, 1997). A ocorrência crescente dessas células mucosas, também foram relatadas por Gonzáles *et al.* (2002) em *Chirostoma humboldtianum*; Maciel (2006) em *B. orbignyanus* e Mangetti (2006) em *P. coruscans*. Até a absorção total do vitelo, o esôfago não apresentou diferenciação significativa.

Os dentes faríngeos, nos peixes carnívoros, possuem a função de auxiliar na apreensão do alimento evitando o escape da presa (Rodrigues *et al.*, 2006). Assim em *Z. jahu*, tais dentes apareceram com 28 hpe, logo após a abertura do esôfago, momento em que as larvas iniciaram a alimentação exógena.

A diferenciação e morfogênese do fígado iniciaram com 16 hpe. Em *Brycon orthoataenia* e *Salminus brasiliensis* essa fase foi notada nas larvas recém-eclodidas, já em *Leporinus obtusidens* e *Prochilodus argenteus* observou-se em larvas com 1 dia pós-eclosão (Sampaio, 2006). Alguns autores verificaram que os hepatócitos possuem atividade de armazenar glicogênio na fase larval (Hamlin *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003; Micale *et al.*, 2006). Segundo Hamlin *et al.* (2000), o armazenamento de glicogênio no fígado pode ser considerado um início da funcionalidade dos hepatócitos que permanece ao longo dos estágios larvais e juvenis. Em larvas de *Z. jahu*, houve um aumento na quantidade de glicogênio hepático, com o decorrer do desenvolvimento sugerindo o aprimoramento do funcionamento do fígado.

No atual estudo, as larvas apresentavam pâncreas com porção exócrina e endócrina diferenciadas antes da absorção total do vitelo, semelhantemente ao relatado por Sampaio (2006) nas larvas de *B. orthoataenia*, *S. brasiliensis*, *L. obtusidens* e *P. argenteus*. A porção endócrina do pâncreas é representada pelas ilhotas de Langerhans, segundo Gonzáles *et al.* (2002). Em razão da presença dessas ilhotas pode-se inferir que as larvas podem assimilar açúcares eficientemente. Fígado e pâncreas já diferenciados são observados em larvas que iniciam a alimentação exógena logo após a eclosão, apresentando-se funcionais antes do término da absorção do vitelo, tais como em *Paralabrax maculofasciatus* (Peña *et al.*, 2003),

Amphirion percula (Gordon & Hecht, 2002), *A. lupus* (Falk-Petersen & Hansen, 2001) e *Melanogrammus aeglefinus* (Hamlin *et al.*, 2000).

Observou-se o esboço dos arcos branquiais em *Z. jahu* logo após a eclosão, estando estes bem desenvolvidos após a absorção total do vitelo. De acordo com Maciel (2006), as brânquias são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois além de serem o principal local de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados.

O desenvolvimento do coração de *Z. jahu* foi semelhante ao observado em zebrafish, com seu aparecimento durante a somitogênese, e espessamento somente do miocárdio do ventrículo ao longo da ontogênese larval (Yelon & Stainier, 1999; Hu *et al.*, 2000). Segundo Hu *et al.* (2000), o coração é o primeiro órgão definitivo a se desenvolver e tornar-se funcional durante a embriogênese.

O pronefro estava presente desde a eclosão das larvas de jaú. De acordo com Kimmel *et al.* (1995), o pronefro desenvolve-se na fase inicial da somitogênese entre o segundo e o terceiro somito. Nos peixes, o pronefro se diferencia em mesonefro apenas em indivíduos juvenis/adultos (Drummond *et al.*, 1999).

O esboço da bexiga natatória surgiu 24 hpe, após a abertura do esôfago em larvas de jaú. Segundo Gatz Jr. (1981) bexiga natatória desenvolvida aparece em espécies comuns em águas calmas e distantes do fundo. Todavia no *Z. jahu* esta vesícula é de tamanho reduzido por se tratar de uma espécie de águas correntosas e de fundo.

Em larvas da espécie em estudo, os olhos, o ouvido interno e a fossa nasal foram as primeiras estruturas sensitivas a serem visualizadas, enquanto os botões gustativos foram os últimos, sendo identificados após a abertura da boca e com o crescimento dos barbilhões. Os botões gustativos podem estar situados no epitélio dos lábios, cavidade orofaríngea, barbilhões, cabeça e algumas vezes por todo o corpo (Hansen *et al.*, 2002). De acordo com Falk-Petersen & Hansen (2001) a presença dessa estrutura indica que as larvas de *A. lupus* já estão prontas para iniciar a alimentação exógena. Em zebrafish, os botões gustativos foram observados com 3-4 dias nos lábios e com 4-5 dias nos arcos branquiais (Hansen *et al.*, 2002).

A presença de lamelas no assoalho da cavidade olfatória, visualizada em *Z. jahu*, também teve sua formação inicial observada em *B. orbignyianus* (Maciel, 2006). Matsuoka (2001) e Uyan *et al.* (2006) verificaram que cada lamela é recoberta por epitélio sensorial na base e nas laterais, e não sensorial na margem. Os autores sugerem que este tipo de estrutura indica que o peixe tem alta acuidade olfatória.

Os olhos de *Z. jahu* tornaram-se totalmente pigmentados a partir de 12 hpe, o que, de acordo com Blaxter (1969), coincide com a funcionalidade do receptor visual. Na absorção total do vitelo, último momento analisado, o olho encontrava-se desenvolvido com as principais camadas formadas e os núcleos dos cones e bastonetes começando a formar duas camadas, assim como observado em larvas de *Oreochromis niloticus* (Morrison *et al.*, 2001).

O desenvolvimento dos órgãos sensoriais é importante para a sobrevivência das larvas e está intimamente relacionado com o início da alimentação exógena, fuga de predadores e migração vertical na coluna d'água, contribuindo na coleta de dados ambientais (Matsuoka, 2001). Kawamura *et al.* (2003) sugerem que o desenvolvimento de órgãos sensoriais acompanham mudanças comportamentais com importantes implicações para ecologia e criação das espécies, pois altas taxas de mortalidade em larvas em situações de criação podem estar relacionadas ao estresse causado por forte agitação na água, aeração e fluxo exagerados, entre outros distúrbios ambientais que atuam sobre a sensibilidade química e mecânica em diferentes fases do ciclo de vida.

A absorção total do vitelo ocorreu com 60 hpe, apresentando desse modo um desenvolvimento larval rápido como o das espécies de teleósteos de água doce. Romagosa *et al.* (2001) observaram em larvas de matrinxã (*B. cephalus*), um desenvolvimento mais rápido, com um período larval de 36 horas, já em *C. gariepinus* esta fase foi observada 124 hpe (Osman *et al.*, 2008) e em *P. fasciatum* as larvas se encontram com o saco vitelino totalmente reabsorvido com quatro dias de vida (Pérez *et al.*, 2001).

O padrão de desenvolvimento do *Z. jahu* foi rápido, priorizando as estruturas alimentares que permitem a expressão da piscivoria já no início do desenvolvimento antes da exaustão das reservas energéticas endógenas, assegurando um crescimento acelerado e aumentando as chances de sobrevivência durante a fase larval.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C.; Suzuki, H. I. & Júlio Jr., H. F. (2004). Migratory fishes of the upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFIELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (eds). *Migratory Fishes of the South America*. Victoria, Canada: World Fisheries Trust/Banco Mundial, p. 19-98.
- Balon, E. K. (1986). Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life-history model. In: Simenstad, C. A.; Cailliet, G. M. (Eds.) *Contemporary studies on fish feeding: the proceedings of Gutshop '84*. Dr. Junk Publ. Dordrecht, p. 11-23.
- Blaxter, J. H. S. (1969) Development: eggs and larvae, p.178-252. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds.). *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, 485p.
- Bértnin, L. (1958). Appareil digestif. In: Grassé, P. P. (Ed.). *Traité de zoologie*. Paris: Masson, v. 13, p. 1249-1301.
- Borçato, F. L.; Bazzoli, N. & Sato, Y. (2004). Embriogenesis and larval ontogeny of the “piau-gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 1, p. 117-122.
- Clavijo-Ayala, J. A.; Vetorelli, M. P. & Portella, M. C. (2006). Desenvolvimento inicial e caracteres de identificação de larvas vitelinas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Civa 2006*. (<http://www.civa2006.org>), p. 819-827.
- Drummond, I. A.; Majumdar, A.; Hentschel, H.; Elger, M.; Solnika-Krezel, L.; Schier, A. F.; Neuhaus, S. C. F.; Stemple, D. L.; Zwartkruis, F.; Rangini, Z.; Driever, W. & Fishman, M. C. (1999). Early development of the zebrafish pronefros and analysis of mutations affecting pronefric function. *Development*, v. 125, p. 4655-4667.
- Falk-Petersen, I. B. & Hansen, T. K. (2001). Organ differentiation in newly hatched common wolfish. *Journal of Fish Biology*, V. 59, p. 1465-1482.
- Faustino, F.; Nakaghi, L. S. O.; Marques, C.; Makino, L. C. & Senhorini, J. A. (2007). Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de

- surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Acta Scientiarum*, v. 19, n. 1, p. 49-55.
- Galvão, M. S. N.; Fenerich-Verani, N.; Yamanaka, N. & Oliveira, I. R. (1997). Histologia do sistema digestório da tainha *Mugil platanus* (Günter, 1880) (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, p. 91-100, 1997.
- Gatz Jr., A. J. (1981). Community organization in fishes as indicated by morphological features. *Ecology*, v. 60, n. 4, p. 711-718.
- Gisbert, E.; Williot, P. & Castelló-Orvay, F. (2000). Influence of egg size on growth and survival in early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. *Aquaculture*, v. 183, p. 83-94.
- Gomes, B. V. C.; Scarpelli, R. S.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Bazzoli, N. & Rizzo, E. (2007). Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v. 70, p. 1412-1429.
- González, O. R. M.; Flores, J. C. B.; Domínguez, B. M. P. & Valle, M. R. G. (2002). Descripción histológica del sistema digestivo em larvas de *Chirostoma humboldtianum* em la primera alimentación exógena. *I Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Civa 2002*. (<http://www.civa2002.org>), p. 313-322.
- Gordon, A. K. & Hecht, T. (2002). Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 18, p. 113-117.
- Govoni, J. J.; Boehlert, G. W. & Watanabe, Y. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fish*, v. 16, p. 59-77.
- Hamlin, H. J.; Hunt Von Herbing, I. & Kling, L. J. (2000). Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, v. 57, p. 716-732.
- Hansen, A.; Klaus Reutter, K. & Zeiske, E. (2002) Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics*, v. 223, p. 483-496.
- Hu, N.; Sedmera, D.; Post, H. J. & Clark, E. B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record*, v. 260, p. 148-157.

- Kawamura, G.; Masuma, S.; Tezuka, N.; Koiso, M.; Jinbo, T. & Namba, K. (2003). Morphogenesis of sense organs in the bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *The Big Fish Bang*, Proceedings of the 26th Annual Larval Conference, p. 123-135.
- Kimmel, C. B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S. R & Ullmann, B.. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* v. 203, p. 253-310.
- Landines, M. A.; Senhorini, J. A.; Sanabria, A. I. & Urbinati, E. C. (2003). Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829). *Bol. Tec. Cepta*, v. 6, p. 1-13.
- Luz, R. K.; Reynalte-Tataje, D. A.; Ferreira, A. A. & Zaniboni-Filho, E. (2001). Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, n. 1, p. 49-55.
- Maciel, C. M. R. R. (2006). Ontogenia das larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de Viçosa, 229p.
- Mangetti, A. J. (2006). Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 94p.
- Matsuoka, M. (2001). Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries Science*, v. 67, p. 1036-1045.
- Micale, V.; Garaffo, M.; Genovese, L.; Spedicato, M. T. & Muglia, U. (2006). The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, v. 251, p. 354-365.
- Morrison, C. M.; Miyake, T. & Wrigth Jr., J. R. (2001). Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*, v. 247, p. 172-195.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P. V. & Cavicchioli, M. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce, desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: UEM, Nupélia, 359p.

- Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F. & Azevedo, A. (2006). Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote*, v. 14, p. 217-229.
- Osman, A. G. M; Wuertz, S.; Mekkawy, I. A.; Verrth, J. & Kirschbaum, F. (2008). Early development of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), focusing on the ontogeny of select organs. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 24, p.187-195.
- Osse, J. W. M.; Van Den Boogart, J. G. M.; Van Snik, G. M. J. & Van Der Sluys, L. (1997). Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture*, v. 155, p.249-258.
- Peña, R.; Dumas, S.; Villalejo-Fuerte, M. & Ortíz-Galindo, J. L. (2003). Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, v. 219, p. 633-644.
- Pereira, C. R.; Barcellos, L. J. G.; Kreutz, L. C.; Quevedo, R. M.; Ritter, F. & Silva, L. B. (2006). Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, pisces, teleostei), a south American catfish. *Brazilian Journal of Biology*, v.66, p. 1057-1063.
- Pérez, P. P. P.; Bocanegra, F. A. & Orbe, R. I. (2001). Reproducción inducida de la doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* y desarrollo embrionario – larval. *Folia amazónica*, v. 12, p. 141-154.
- Reynalte-Tataje D.; Zaniboni-Filho, E. & Esquivel, J. R. (2004). Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Scientiarum*, v. 26, n. 1, p. 67-71.
- Rodrigues, S. S.; Navarro, R. D. & Menin, E. (2006). Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringiana de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Pisces, Characiformes, Anostomidae) em relação ao hábito alimentar. *Biotemas*, v. 19, n. 1, p. 51-58.
- Romagosa, E.; Narahara, M. Y. & Fenerich-Verani, N. (2001). Stages of embryonic development of the “Matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pises, Characidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 1, p. 27-32.
- Sampaio, K. H. (2006). Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 53p.

- Sanches, P. V.; Baumgartner, G.; Bialetzki, A.; Subvierto, M. R.; Gomes F. D. C.; Nakatani K. & Barbosa, N. D. C. (2001). Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 383-389.
- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Nuñez, A. P. O.; Godinho, H. P. & Verani, J. R. (2003). Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, p. 229-274. In: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (Eds) *Água, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 468p.
- Sipaúba-Tavares, L. H. (1995). *Limnologia aplicada à aqüicultura*. Jaboticabal, São Paulo: FUNEP-UNESP. 70 p.
- Tolosa, E. M. C.; Behmer, O. A. & Freitas-Neto, A. G. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Barueri – SP: Manole, 331p.
- Uyan, S.; Kawamura, G. & Vasques-Archdale, M. (2006). Morphology of the sense organs of anchova *Engraulis japonicus*. *Fisheries Science*, Tokyo, v. 72, p. 540-545.
- Vaz, M. M.; Torquato, V. C. & Barbosa, N. D. C. (2000). (Org.). *Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande*. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC.
- Watanabe, T. & Kiron, V. (1994). Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, v. 124, p. 223-251.
- Woynarovich, E. & Hováth, L. (1983). *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. Brasília, DF: FAO/CODEVASF – CNPq, (Manual de Extensão, 5), 220p.
- Yelon, D. & Stainier, D. Y. R. (1999). Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, V. 10, p. 93-98

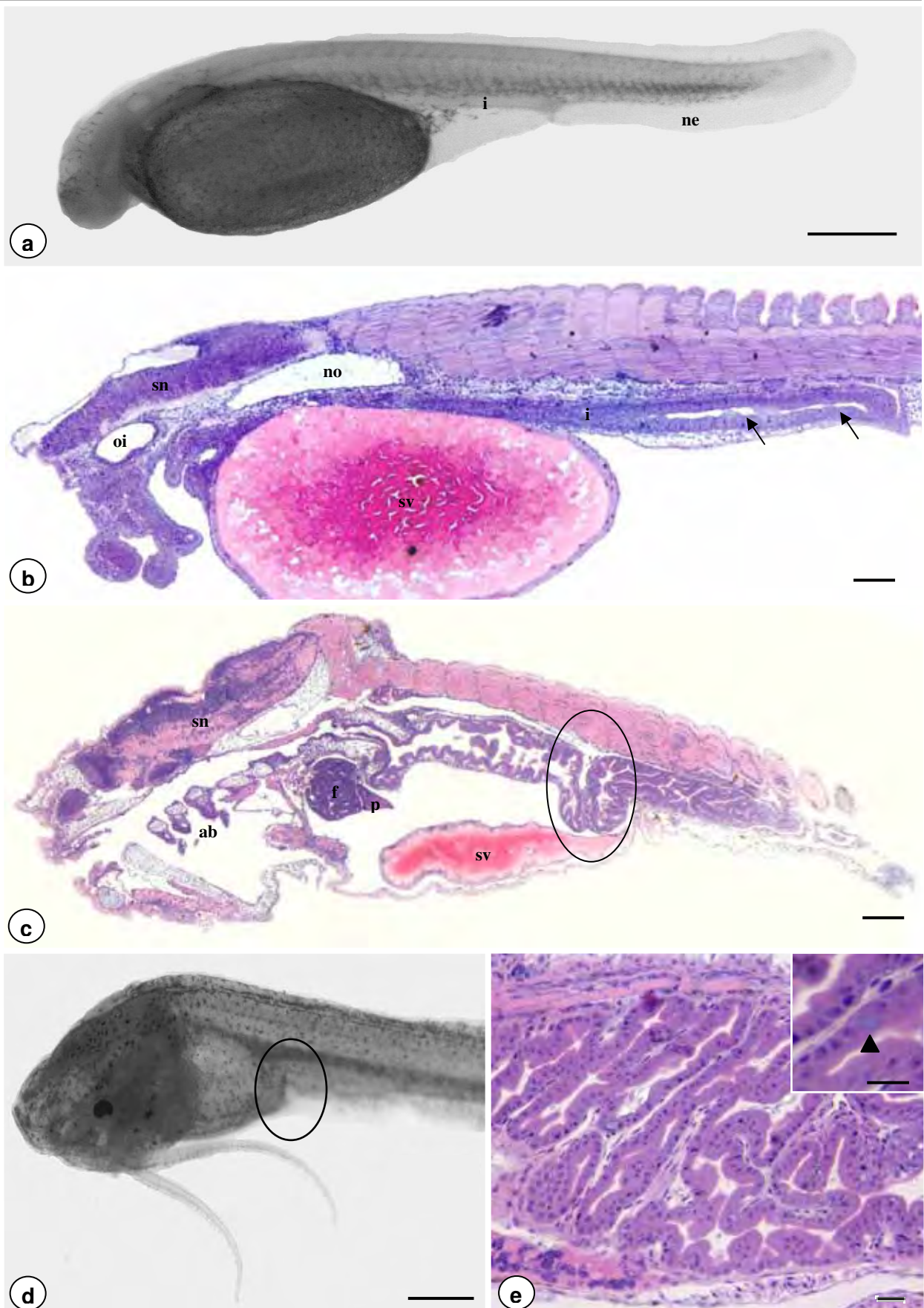


Figura 1. Fotomicrografias (a – e) das larvas de *Z. jahu*. **a:** Eclosão – intestino primitivo; **b:** 8 hpe – intestino primitivo, com pequenas invaginações (setas); **c, d:** 36 hpe – primeira dobra do trato digestório (círculos); **e:** 60 hpe – detalhe da parede do intestino, célula produtora de muco (cabeça de seta) (ab = arcos branquiais, f= fígado, i = intestino, ne = nadadeira embrionária, no = notocorda, oi = ouvido interno, p = pâncreas, sn = sistema nervoso, sv = saco vitelino) (barras: a, d = 500 μ m; b = 100; c = 50 μ m; e e destaque = 30 μ m, ; coloração: b, c = HF; e = PAS).

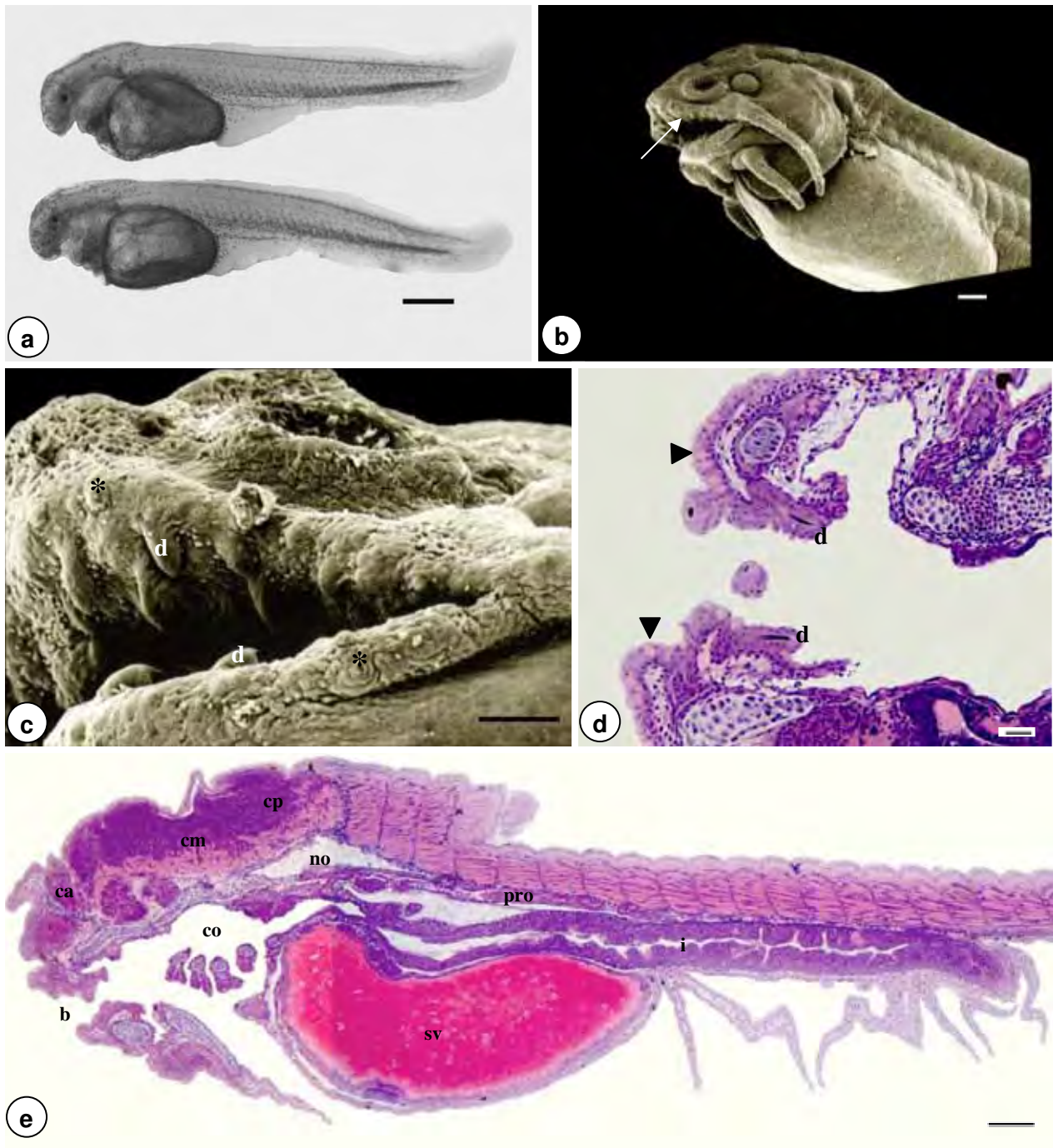


Figura 2. Fotomicrografias (a, d, e), eletronicografias (b, c) das larvas *Z. jahu*. **a:** 12 hpe – abertura da cavidade bucal; **b:** 20 hpe – formação dos dentes, botões gustativos nas bordas labiais e interior da boca (seta); **c, d:** 24 hpe – dentes na maxila e mandíbula, botões gustativos (*), células produtoras de muco (cabeça de seta); **e:** 24 hpe – abertura do esôfago. (b = boca, ca = cérebro anterior, cm = cérebro médio, co = cavidade oral, cp = cérebro posterior, d = dente, i = intestino, no = notocorda, pro = pronefro, sv = saco vitelino) (barras: a = 500 μ m; b, e = 100 μ m; c = 50 μ m; d = 30 μ m; coloração: d, e = HF).

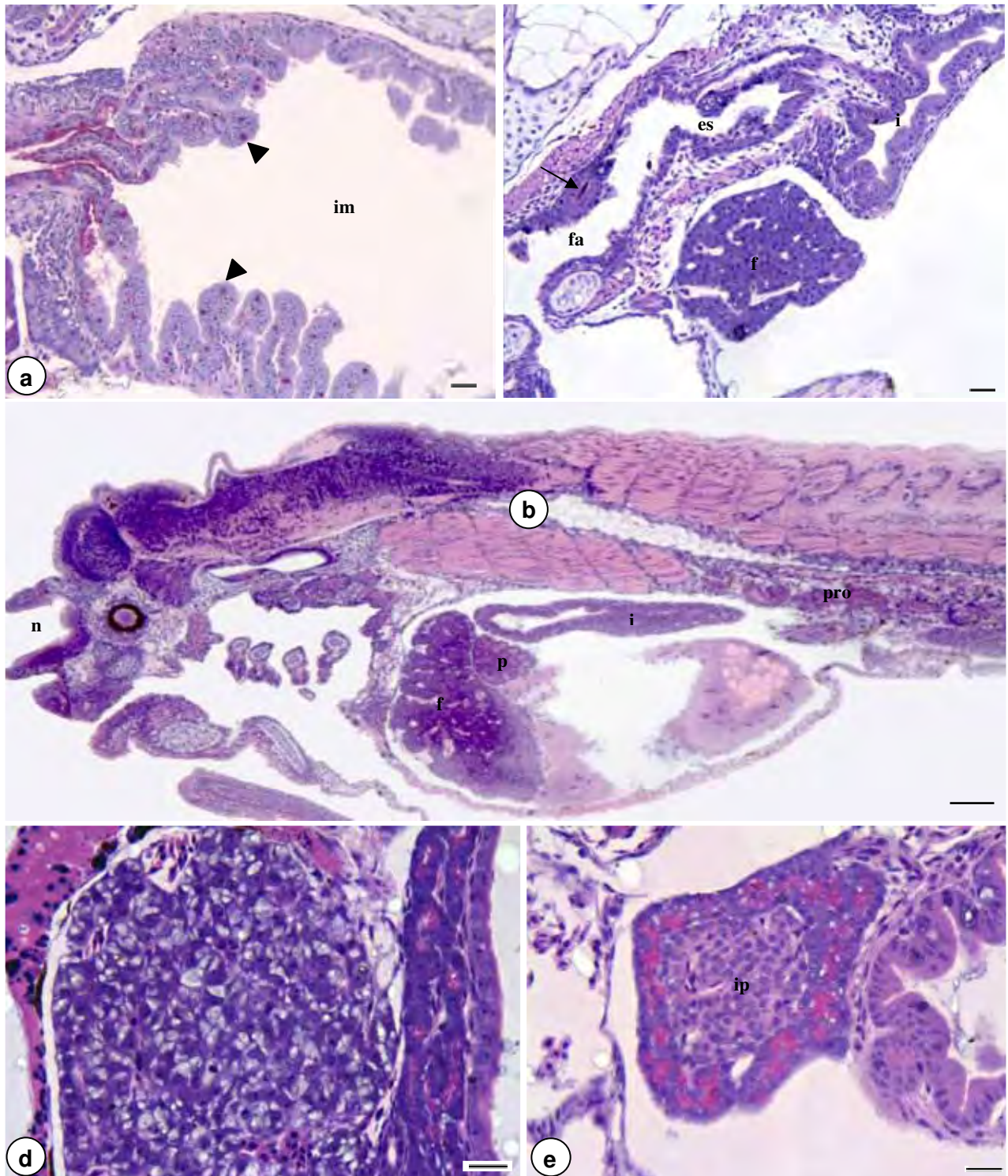


Figura 3. Fotomicrografias das larvas *Z. jahu*. **a:** 28 hpe – células produtoras de muco (cabeça de seta, coradas em rosa); **b:** 28 hpe – dentes faringianos (seta); **c:** 20 hpe – fígado e pâncreas; **d:** 60 hpe – detalhe do fígado; **e:** 24 hpe: ilhota pancreática (es = esôfago, f = fígado, fa = faringe, i = intestino, im = intestino médio, ip = ilhota pancreática, n = narina, no = notocorda, p = pâncreas, pro = pronefro, sv = saco vitelino) (barras: c = 100 μ m; a, b = 30, d, e = 20 μ m; colorações: b – e = HF; a = PAS)

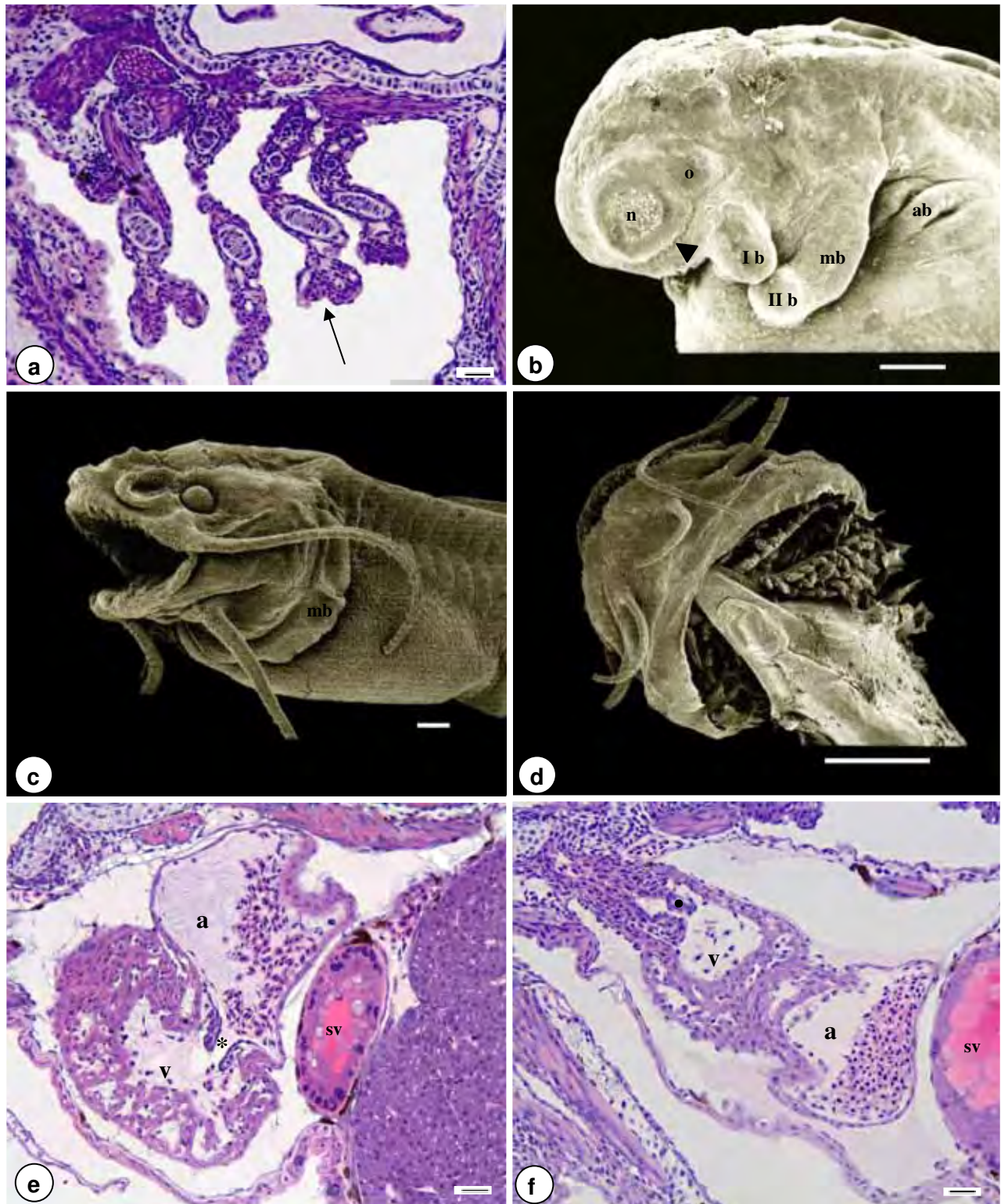


Figura 4. Eletronmicrografias (b, c, d) e fotomicrografias (a, e, f) das larvas *Z. jahu*. **a:** 24 hpe – brânquias se ramificando (seta); **b:** 8 hpe – membrana branquiostegial, dobra nasal (cabeça de seta); **c:** 28 hpe – membrana branquiostegial cobrindo os arcos branquiais, dois primeiros pares de barbilhões; **d:** 60 hpe – arcos branquiais; **e:** 28 hpe – coração, detalhe do átrio e ventrículo com trabéculas e orifício átrio-ventricular (*); **f:** 32 hpe – coração, detalhe do orifício ventrículo-bulbar (•). (a = átrio, ab = arcos branquiais, I b = primeiro par de barbilhões, II b = segundo par de barbilhões, mb = membrana branquiostegial, n = narina, o = olho, v = ventrículo, sv = saco vitelino) (barras: b, c = 100 µm; a, e, f = 30 µm, d = 500 µm; coloração: a, e, f = HF).

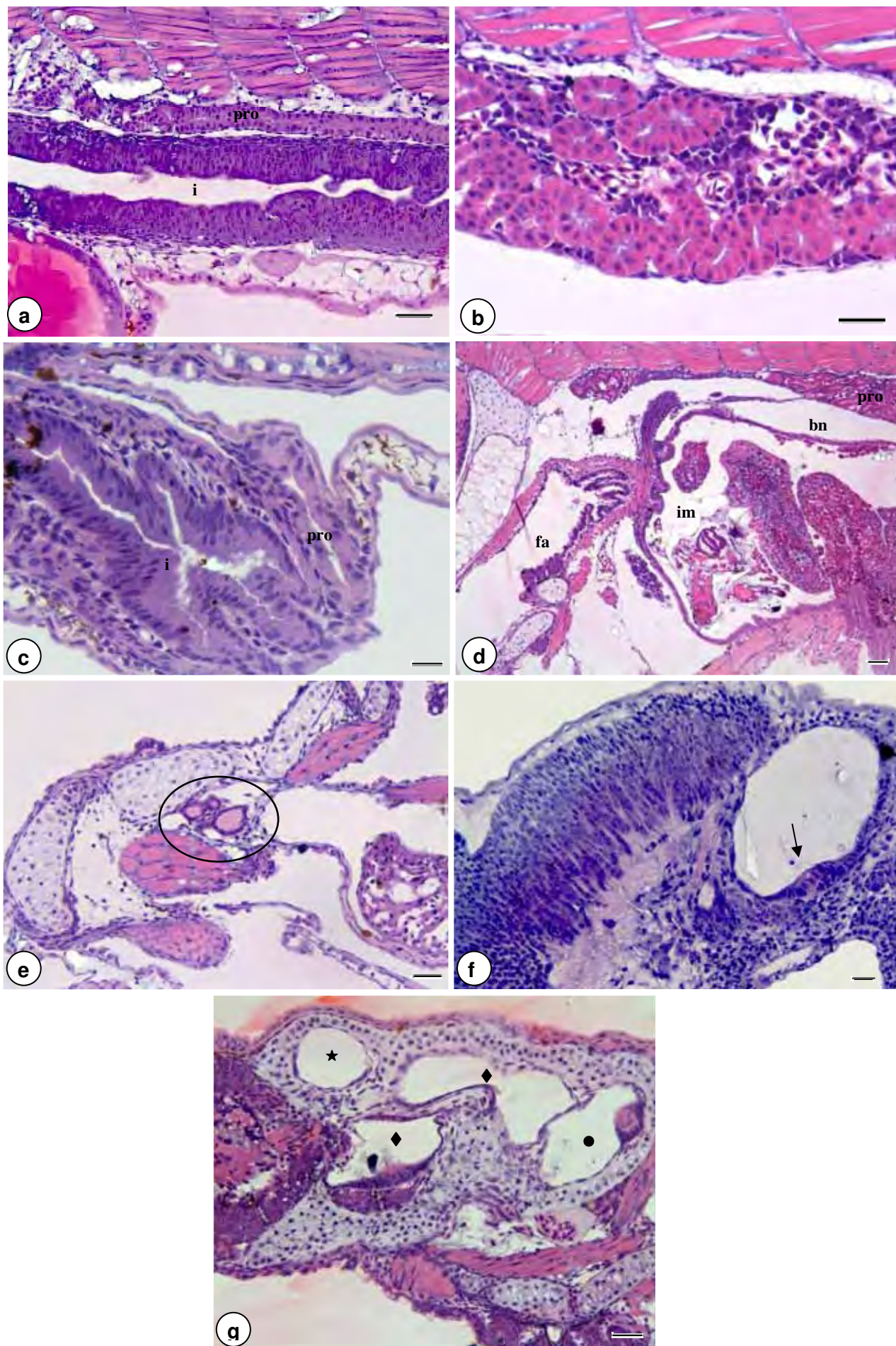


Figura 5. Fotomicrografias das larvas *Z. jahu*. **a:** 16 hpe – pronefro; **b:** 60 hpe – pronefro com lúmen aparente; **c:** 48 hpe – papila urogenital; **d:** 24 hpe – bexiga natatória; **e:** 56 hpe – folículos da tireóide (círculo); **f:** 8 hpe – ouvido interno, detalhe do neuromasto (seta); **g:** 60 hpe – ouvido interno apresentando os canais anterior (★), laterais (◆) e posterior (●). (i = intestino, im = intestino médio, fa = faringe, pro = pronefro, bn = bexiga natatória) (barras: a, d = 50 µm; b, e, f = 30 µm; c, g = 20 µm; coloração: a – g = HF).

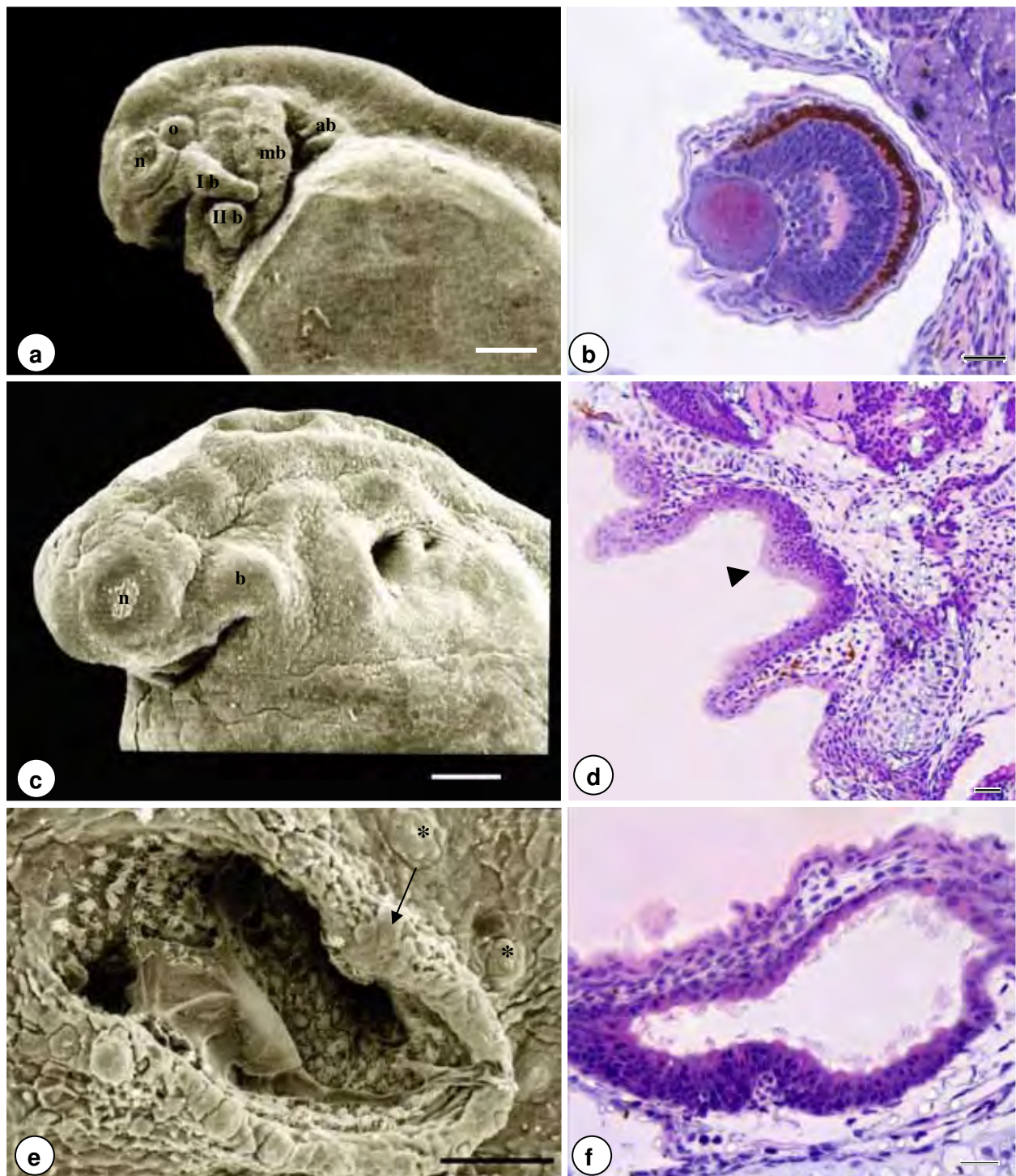


Figura 6. Elétronmicrografias (a, c, e) e fotomicrografias (b, d, f) das larvas *Z. jahu*. **a:** 12 hpe – abertura da boca; **b:** 60 hpe – olho; **c:** 0 hpe – fossas nasais com cílios (cabeça de seta), primórdios de barbilhões (seta); **d:** 28 hpe –fossas nasais com detalhe da protuberância (seta); **e:** 48 hpe – divisão das fossas nasais (seta), com botões sensoriais ao redor (cabeças de seta); **f:** 60 hpe – camada celular ciliada das fossas nasais (ab = arcos branquiais, I b = primeiro par de barbilhões, II b = segundo par de barbilhões, mb = membrana branquiostegial, n = narina, o = olho) (barras: a, c = 100 μ m; b, d = 30 μ m; e = 50 μ m; f = 20 μ m; coloração: b, d, f = HF).

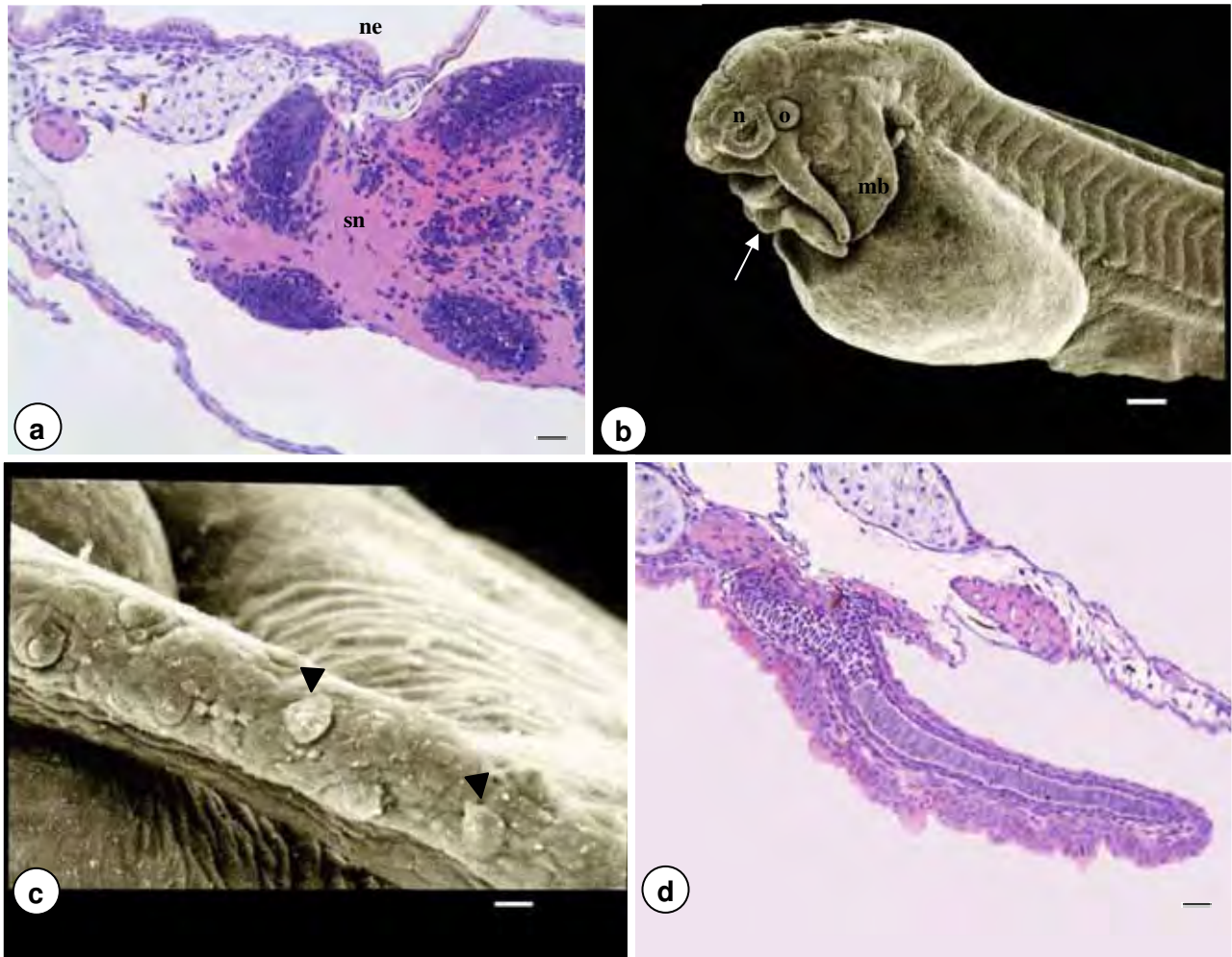


Figura 7. Fotomicrografias (a, d) e elétronmicrografias (b, c) das larvas *Z. jahu*. **a:** 44 hpe – neuromastos; **b:** 16 hpe – primórdios do terceiro par de barbilhões (seta); **c:** 24 hpe – detalhe do barbilhão com papilas saciformes na superfície ventral (cabeças de seta); **d:** 40 hpe – barbilhão. (mb = membrana branquiostegial, n = narina, ne = neuromasto, o = olho, sn = sistema nervoso) (barras: a, d = 30 μ m; b = 100 μ m, c = 50 μ m; coloração: a, d = HF).

APÉNDICES

Zygote

Zygote will publish original papers on all aspects of early development from gametogenesis to gastrulation. Studies on plants, invertebrates, lower vertebrates, mammals and humans at the molecular and cellular levels will be accepted. Topics include gametogenesis, fertilisation, sperm-egg interaction, activation of gametes, polarity in oocytes and zygotes, cell cycle control, cleavage, cell-cell interactions, and the generation of primary cell lineages. Review articles, short communications and News and Views Commentaries are also welcomed.

To submit a manuscript, send three complete copies, including figures and illustrations to:

- Brian Dale, Editor-in-Chief, *Zygote*, Centre for Reproductive Biology, Clinica Villa del Sole, Via Manzoni 15, Naples 80123, Italy. Telephone: + 39 081 641 689, Fax: + 39 081 5479 251, Email: brian.dale@virgilio.it, or to
- Jacques Cohen, North American Editor, *Zygote*, The Institute for Reproductive Medicine and Science at Saint Barnabas Medical Centre, 101 Old Short Hills Road, West Orange, NJ 07052 USA; or to
- Professor Norio Suzuki, Asian Pacific Editor, *Zygote*, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Kita-10, Nishi-8, 060-0810, Japan. Telephone: +81-11-706-4908, Fax: +81-11-706-4461, Email: norio-s@sci.hokudai.ac.jp

Submission of a paper will be taken to imply that it is unpublished and it is not being considered for publication elsewhere. Authors of articles published in the journal assign copyright to Cambridge University Press (with certain rights reserved) and you will receive a copyright assignment form for signature on acceptance of your paper.

There is no formal restriction on length; however, original articles and reviews of less than 15000 words are likely to appear sooner than longer ones. Short communications should not exceed 1500 words and News and Views Commentaries 500 words.

Preparation of manuscripts

Manuscripts should be organised as follows: Title page (with full names and addresses of all authors, a running headline of up to 35 characters, and a contact address with telephone and fax numbers), an Abstract of not more than 250 words followed by 5 Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (combined Results and Discussion may be used for short papers), Acknowledgements, References, Endnotes, Tables and Figure Legends.

Type double-spaced throughout on one side only and number all pages consecutively. When an article has been accepted for publication, the author is strongly encouraged to send a copy of the final version on computer disk (Apple Macintosh or IBM compatible PC) together with the hard copy typescript, giving details of the wordprocessing software used (Microsoft Word, Word or Word Perfect). However, the publisher reserves the right to typeset material by conventional means if an author's disk proves unsatisfactory. Disks will not be returned.

Manuscripts should be prepared using SI units.

Figures

Figures should be numbered consecutively as they appear in the text. Mark each figure with the first author's name and figure number on the reverse, and indicate its orientation. Any indication of features of special interest should also be included. Authors should submit three copies of each illustration. Figures should be drawn or produced by computer to about twice the final size. Whenever possible they will be reproduced with the author's original lettering. Photographs should be submitted with proposed reduction or magnification indicated, when relevant, by a scale line on, or beside, the illustration. The places for insertion into the text should be indicated in the text as 'Fig. 1' etc, and in the margin of the typescript for insertion. Legends for all illustrations should be typed together, separately from the main text. A charge of £500 per figure will be made for colour photograph reproduction and printing.

Tables

Tables with concise headings should be typed on separate sheets and numbered consecutively. Each table must have a text reference, in the form 'Table 1' etc. Indicate where tables are to be placed by means of a note in the margin.

References

References should be cited in the text as Conklin (1905) showed or as shown (Conklin, 1905). For papers with three or more authors use *et al.* A full list of references in alphabetical order should be given at the end of the text: surname of author and initials; year of publication (in parentheses); title of paper; journal or book name (the former being abbreviated in accordance with the World List of Scientific Periodicals); volume number; first and last page of the reference. For books and conference proceedings, place of publication and publisher (and editor(s) if appropriate) should be included.

Proofs

Proofs will be sent to the author for checking. Typographical or factual errors only may be changed at proof stage. The publisher reserves the right to charge authors for correction of non-typographical errors.

Offprints

25 offprints of each article will be supplied free to each first named author. Extra offprints may be purchased from the publisher if ordered at proof stage.

(Revised 13/2/06)

Instructions for Authors

AIMS AND SCOPE

The *International Journal of Developmental Biology* (ISSN: 0214-6282) is an independent, scholarly journal, published by scientists, for scientists. The *Int. J. Dev. Biol.* publishes papers which throw light on our understanding of animal and plant developmental mechanisms in health and disease. Technical, historical or theoretical approaches also fall within the scope of the journal. Criteria for acceptance include scientific excellence, novelty and quality of presentation of data and illustrations. Advantages of publishing in the journal include: rapid publication; free unlimited color reproduction; no page charges; free publication of online supplementary material; free publication of audio files (MP3 type); one-to-one personalized attention at all stages during the editorial process; an easy online submission facility and an open online access option, by means of which papers can be published without any access restrictions. In keeping with its mission, the journal offers free online subscriptions to academic institutions in developing countries.

Copyright and Pubmed Central Repository: Accepted manuscripts will immediately be deposited in the Pubmed Central repository on behalf of authors, if the corresponding Open Access fee is paid. Otherwise, authors are granted permission to deposit their accepted manuscripts in the repository, six months after publication.

MANUSCRIPT PREPARATION

Papers can be submitted as one of the following article types (preferably in PDF format) with the indicated principal headings:

Original Article: Abstract, Introduction, Results, Discussion, Materials & Methods, Acknowledgements, References, Tables and Figure Legends.

Review: Table of Contents, Text, Summary, Acknowledgements, References, Tables and Figure Legends.

Technical Article: Abstract, Introduction, Experimental Protocols, Results & Discussion, Acknowledgements, References, Tables and Figure Legends.

Developmental Expression Pattern: Same format as Original Article, but presenting concise descriptions of a new developmentally relevant gene or protein and discussing its potential relevance for development. DNA and amino acid sequences and corresponding accession numbers should be provided.

Short Communication: Same format as Original Article, but presenting preliminary results with potentially outstanding relevance. Should not exceed 4 journal pages (approx. 800 words per page) including illustrations and references.

Essay, Special Contribution, Developmental Perspective or Meeting Report: Must include a Summary, but there are no structural restrictions.

Essays typically include theoretical considerations, whereas Special Contributions are devoted, for instance, to the update of tables of development of different organisms.

Examples of each of these types of articles can be downloaded from the IJDB web page at <http://www.intjdevbiol.com>. No detailed formatting requirements have to be fulfilled for manuscripts initially submitted for publication. They should simply conform with the following points. (When submitting a revised version of a paper, which incorporates the comments of editors and referees, the manuscript must then conform strictly with specific formatting requirements which will be sent to you by e-mail).

- 1. Title page** must include: title of the paper; names of authors (including full first names), abbreviated institutional affiliations, running title (not more than 50 characters), key words (max. 5), DDBJ/EMBL/GenBank or Pothbase accession numbers (if applicable) and the postal address, telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author. The e-mail addresses of all authors should be included on a separate sheet.
- 2. List of 5 candidate referees.** You should indicate the names, addresses and e-mails of 5 referees who you consider would be competent to independently evaluate your work. You should not have co-authored papers with them in the last 5 years.
- 3. Abstract** should consist of a maximum of 250 words summarizing the aim of the report, the methodological approach used and the significance of the results obtained.
- 4. Text** must be written in clear, concise English and typed double-spaced throughout. Non-English speaking authors should have their papers revised by a native English speaking scientist. Our Editorial Office can facilitate contact with recommended agencies if required. Manuscripts should be checked with your software "Spelling" function, to detect typographical errors, before submitting to the Editorial Office. Avoid complex formatting as this will be done by our copy editors.
- 5. References** No specific format is required before paper acceptance.
- 6. Illustrations** Each figure should be presented individually on a separate page. Only carefully produced, high quality images will be considered for publication. Unlimited color illustrations are reproduced FREE OF CHARGE.
- 7. Electronic Supplementary Material:** Videos, pod casts, long nucleotide or peptide sequences and other complementary material can be considered for electronic publishing on the Web of the journal. The format and application used to view the material should be specified.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts can be submitted to either the Editor-in-Chief or to one of the Associate Editors listed below.

Online submission: Instructions for submitting manuscripts online are available at: <http://www.ijdb.ehu.es/webonline.php> Essentially, files can be sent by e-mail attach or by FTP, indicating the Editor whom you would prefer to oversee peer review. The preferred initial format is PDF.

Postal submission: Alternatively, send four high quality copies of the complete manuscript and illustrations together with a copy of the text of the manuscript on diskette to either the Editor-in-Chief or to one of the Associate Editors shown below.

Editor-in-Chief

Juan M. Arechaga . Dept. of Cell Biology, Faculty of Medicine, University of the Basque Country, E-48940 Leioa, Vizcaya, SPAIN. Tel: +34-94-601-2874. Fax: +34-94-601-3268. e-mail: ijdb@ehu.es.

Associate Editors for the Americas

Edward M. De Robertis. Department of Biological Chemistry, University of California, 5748 Mac Donald Building, 675 Charles Young Drive South, Los Angeles, CA 90095-1662, USA. Tel: +1-310-206-1463. Fax: +1-310-206-2028. e-mail: derobert@nhm.ucla.edu

Roberto Mayor. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Casilla 653, Santiago, CHILE. Fax: +562-376-3802. e-mail: mayor@uchile.cl

Angie Rizzino. Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, University of Nebraska Medical Center, 986805 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6805. Tel: +1-402-559-6338. Fax: +1-402-559-4651. e-mail: arizzino@unmc.edu

Christopher Wylie. Cincinnati Children's Hospital Medical Centre, 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, Ohio 45229-3039, USA. Tel: +1-513-636-2093. Fax: +1-513-636-4317. e-mail: christopher.wylie@cchmc.org

Associate Editors for Europe

Giulio Cossu. Stem Cell Research Institute, DIBit, H. San Raffaele, Via Olgettina 58, Milan 20132, ITALY. Tel: +39-02 2643 4954. Fax: +39-02 2643 4621. e-mail: cossu.giulio@hsr.it

Brigitte Galliot. Department of Zoology and Animal Biology, Faculty of Science, 30 quai Ernest Ansermet, CH-1211 Geneva 4, SWITZERLAND. Tel: +41 22 379 67 74. Fax: +41 22 379 33 40. e-mail: Brigitte.Galliot@zoo.unige.ch

Christine Mummery. Hubrecht Laboratory, Netherlands Institute for Developmental Biology, Uppsalalaan 8, 3584 CT, Utrecht, The NETHERLANDS. Tel: +31-30-251-0211. Fax: +31-30-251-6484. e-mail: christin@h99.nib.knaw.nl

Isabel Palmeirim. Life & Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, 4710-057 Braga, PORTUGAL. Tel: +351-253-604-865. Fax: +351-253-604-831. e-mail: ipalmeirim@ecsaude.unimho.pt

Associate Editors for the Pacific / Asia

Makoto Asashima. Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, JAPAN. Tel: +81-3-5454-6632. Fax: +81-3-5454-6998. e-mail: asasha@bc.u-tokyo.ac.jp

Patrick Tam. Embryology Unit, Children's Medical Research Institute, Locked Bag 23, Wentworthville, NSW 2145, AUSTRALIA. Tel: +61-2-9887-2800. Fax: +61-2-9887-2120. e-mail: PTam@cml.usyd.edu.au

PAPERS ACCEPTED FOR PUBLICATION, PROOFS AND REPRINTS

Once an article has been considered to be acceptable for publication by the Editor the author will be requested to format the corresponding manuscript in accordance with a series of **Guidelines**

(see: <http://www.intjdevbiol.com/mechechidist.rtf>)

before sending for final publishing to the Editorial Office by e-mail (to ijdb@ehu.es) or

FTP (request password by e-mail) or

by post to the following address:

The International Journal of Developmental Biology,

Editorial Office,

Department of Cell Biology and Histology,

Faculty of Medicine,

University of the Basque Country,

E-48940 Leioa, Vizcaya, SPAIN.

Tel: +34-94-601-2874. Fax: +34-94-601-3268.

e-mail: ijdb@ehu.es

Journal Cover Authors are encouraged to submit illustrations, together with a corresponding legend, as candidates for the Journal Cover. The illustration does not necessarily have to be directly from the author's paper but must be related to the subject matter. Cover illustrations will be chosen on the basis of their scientific content, esthetic quality and resolution. The author who submits the definitive cover illustration will receive higher reprints bound with the cover picture at no extra cost.

Press Releases Authors are invited to accompany the revised version of their paper with a short (250 word) paragraph, written for the general public, in which the objectives of the study and the significance of the results are presented. This can also be optionally presented as an audio file (MP3 or similar) for publishing with the online abstract of your paper.

Reprints can be ordered in the form of a "Reprint Package" (including options to purchase copies of the journal, Open Online Access etc.) when corrected proofs are returned to the IJDB Editorial Office.

Rejection Policy Peer-review has occasionally been reported to be susceptible to impartiality and subjectivity. If you feel your paper has been unfairly rejected, please do consider appealing the decision, by concisely stating why you think the evaluation of your paper has been unfair. When such appeals are accompanied by sufficient evidence, the Editor-in-Chief may seek further evaluations of your work.

Read and Cite Int. J. Dev. Biol!
Send your best papers to Int. J. Dev. Biol!
Subscribe to Int. J. Dev. Biol!