



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)**

São Paulo State University - Aquaculture Center



Desenvolvimento embrionário e larval de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae)

Bióloga: Francine Faustino

Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

**Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DE Brycon gouldingi
(Teleostei, Characidae)"

AUTORA: FRANCINE FAUSTINO

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

Profa. Dra. HEID SUELI LEME DOS SANTOS

Universidade de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina, UNAERP

Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

Centro de Pesquisa Em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca de São Paulo

Data da realização: 25 de fevereiro de 2010.

“... Um tempo em que aprendi a entender as coisas do mar, a conversar com as grandes ondas e não disculpir com o mau tempo.

A transformar o medo em respeito, o respeito em confiança.

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, aonde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”.

(Amyr Klink)



“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”.

(Lao Tsé)

Ofereço e Dedico

Aos meus pais, Maria Luiza e Amador Carlos, pelo apoio constante e incondicional, por sempre me incentivarem nesta jornada.

À minha queridíssima irmã, Fernanda, pela amizade, conselhos, ajuda em vários momentos, pela companhia até a Faculdade e horas divertidas de conversas.

*A vocês, o meu agradecimento mais que especial
por todo o amor, carinho, compreensão e dedicação,
pela paciência nas horas difíceis,
por estarem ao meu lado nos momentos de decisões.*

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz.

*Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva,
o que mais nos valoriza e também nos torna mais conscientes
de nossas responsabilidades é saber que os outros creem em nós.*

*E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber
dos sacrifícios a que eles se impõem por crearem não apenas em nós, mas
também no que cremos.”*

(Albert Einstein)

Homenagem especial

Laura Satiko Okada Nakaghi

Pelos valiosos ensinamentos, dedicação, credibilidade, amizade e apoio desde a graduação... Meu eterno reconhecimento!

“Ele divide o seu tempo, caminha despertando sabedoria, é parceiro da alegria de tantos. Abre portas de um novo amanhã, questiona a vida e desperta uma realidade. Nas fórmulas, de raciocínios e regras.

Mestre!

Que estende a mão, tem o diálogo da nova caminhada para a aventura da vida. Faz germinar a missão de ensinar não só letras, mas paz, esperança, solidariedade e coragem para um novo amanhã que virá.

Um exemplo para vencer na vida...”

(Marinês Bonacina)

Agradecimentos

Talvez a parte mais difícil seja agradecer a todos que, de alguma forma, tiveram um papel decisivo para que este trabalho fosse concretizado...

Devo agradecer, acima de tudo, a Deus, que permitiu que as realizações e alegrias sobrepujassem as frustrações e tristezas, fazendo com que esta jornada tenha sido compensadora e gratificante.

Agradeço também:

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) que me trouxe a oportunidade de ingressar no mundo da pós-graduação.

À Piscicultura Buriti, na pessoa de José Mário Ribeiro Mendes e funcionários, por ter fornecido o material biológico necessário a este estudo.

À Doutora Érika Neumann, que realizou as coletas do material biológico na Piscicultura Buriti, pela atenção e pelos momentos de conversa que me proporcionaram muito conhecimento.

Ao Dr. Flávio César Thadeo de Lima, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – USP, pela gentileza em identificar taxonomicamente a espécie de peixe estudada.

A todos os profissionais do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAVJ/UNESP, em especial, àqueles do Laboratório de Histologia com os quais convivi durante todo esse período.

Ao Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAVJ/UNESP (e grande amigo) pelo esforço, atenção e apoio para conseguirmos bons cortes histológicos para meu trabalho, e também pelos momentos de alegria e experiências transmitidas.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da FCAVJ/UNESP, em especial à Cláudia Aparecida Rodrigues (Cláudia) pelo auxílio durante o processamento das amostras de microscopia eletrônica de varredura.

À Profa. Dra. Márcia Rita F. Machado por gentilmente conceder a utilização do equipamento de captura de imagens do Laboratório de Anatomia.

À Lilian Cristina Maçino e Márcio Alves dos Santos pelos maravilhosos momentos de descontração, pela ajuda e, principalmente, pela amizade!!!

À Lilian Cristina Maçino pela ajuda na leitura das lâminas de desenvolvimento larval, por ser sempre tão prestativa, atenciosa, dando sugestões valiosíssimas ao meu trabalho.

À Dra. Luciana Nakaghi Ganeco, mesmo de longe, sempre auxiliando e contribuindo com seus conhecimentos!!!

Ao Prof. Dr. Sergio Fonseca Zaiden e Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni por colaborarem com suas valiosíssimas dicas no momento da qualificação!!!

À Profa. Dra. Elizabeth Romagosa e Profa. Dra. Heid Sueli Leme dos Santos pelas preciosas sugestões durante a defesa!!!

Às ex-companheiras de laboratório Camila Marques, Daniella Almada Silva, Érika Neumann, Leila Buttler, Luciana Nakaghi Ganeco, Verônica Regina de Oliveira Lobato Bahia e Wanessa Kelly Batista pelos bons momentos e eternas lembranças...

Aos atuais companheiros de laboratório Angélica Cristina Gimenez, Érico Luis Hoshiba Takahashi, Felipe Mateus, Fernanda Nogueira Valentin, Maria Isabel Mataqueiro, Lílian Cristina Makino, Maria do Carmo Faria Paes, Marcelo Henrique Correa Assunção, Nivaldo Ferreira do Nascimento e Regiane Cristina da Silva pelas horas de convivência, amizade, momentos de descontração e momentos de aprendizagem!!!

À diretoria, coordenadores e funcionários da Pós-Graduação do CAUNESP, especialmente à Veralice Cappatto, pelo carinho e atenção dispensados.

Aos professores do CAUNESP por transmitir experiências de vida e formação profissional.

Aos amigos e colegas de pós-graduação do CAUNESP pela companhia, festas, viagens e amizade!!!

À FAPESP, pelo auxílio concedido, em forma de bolsa de Mestrado e ao CNPq pela contribuição neste trabalho na forma de Auxílio financeiro.

A todos aqueles que, de uma ou de outra forma, participaram de minha formação, aqui omitidos, mas não esquecidos... o meu Muito Obrigada!!!

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante".

(Albert Schweitzer)

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xiv
Resumo geral.....	xv
General abstract.....	xvi

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância do estudo.....	18
2. Referências.....	22

ARTIGO I: Morfologia externa das fases iniciais de vida de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae) – Submissão do artigo: *Frontiers in Zoology*

Resumo.....	28
1. Introdução.....	29
2. Material e métodos.....	30
3. Resultados.....	31
4. Discussão.....	45
5. Agradecimentos.....	49
6. Referências.....	49

ARTIGO II: *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspectos do desenvolvimento embrionário de uma nova espécie de peixe com potencial para aquicultura – Submissão do artigo: *Zygote*

Resumo.....	54
1. Introdução.....	55
2. Material e métodos.....	57
3. Resultados.....	58
4. Discussão.....	69
5. Agradecimentos.....	73
6. Referências.....	73

ARTIGO III: Ultraestrutura das larvas de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): uma abordagem voltada à aquicultura – Submissão do artigo: *The International Journal of Developmental Biology*

Resumo.....	79
1. Introdução.....	80
2. Material e métodos.....	81
3. Resultados.....	82
4. Discussão.....	91
5. Agradecimentos.....	95
6. Referências.....	95

ARTIGO IV: Desenvolvimento ontogenético das larvas de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae) – Submissão do artigo: *The International Journal of Developmental Biology*

Resumo.....	99
1. Introdução.....	100

2. Material e métodos.....	101
3. Resultados.....	103
4. Discussão.....	114
5. Agradecimentos.....	118
6. Referências.....	118
CONCLUSÕES.....	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Exemplar de <i>Brycon gouldingi</i> utilizado durante o experimento.....	22
---	----

ARTIGO I

Fig. 1. Diâmetro dos ovócitos e respectivo desvio padrão das dez fêmeas de <i>B. gouldingi</i> no momento da liberação dos ovócitos (extrusão).....	32
--	----

Fig. 2. Frequência de ocorrência de ovócitos por classes de diâmetro no momento da liberação dos ovócitos (extrusão) em <i>B. gouldingi</i> . N=10.....	32
--	----

Fig. 3. Morfologia externa de ovos (A - F) e embriões (G e H) de <i>B. gouldingi</i> nas diferentes fases de desenvolvimento. 0,75hpf: A: pólo animal e vegetativo. 2 hpf: B: mórula. 3 hpf: C: blástula. 5 hpf: D: gástrula com vitelo recoberto em cerca de 50%. 6 hpf: E: gástrula com vitelo recoberto em 70%. 7 hpf: F: gástrula com vitelo recoberto em cerca de 90% com formação do tampão vitelínico. 8 hpf: G: formação do eixo embrionário com diferenciação das regiões cefálica e caudal; H: vista dorsal do embrião evidenciando-se a presença de sulco neural, região cefálica e caudal. Barra: 0,25 mm.....	36
---	----

Fig. 4. Morfologia externa de embriões (A - D) e larvas (E, F e G) de <i>B. gouldingi</i>. 9 hpf: A: primeiros somitos e vesícula óptica. 10 hpf: B: vesícula ótica e vesícula de Kupffer. 11 hpf: C: tubo neural. 12 hpf: D: alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal. 14 hpf: E: eclosão da larva evidenciando nadadeira embrionária e apêndice tubular no vitelo; F: região cefálica da larva eclodida - cálice óptico, cristalino, coração, vesícula ótica, protuberância de onde surgirão os arcos braquiais, epífise e sistema nervoso central com distinção das três vesículas primárias, prosencéfalo subdividido em telencéfalo e diencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo subdividido em metencéfalo, que originará o cerebelo, e mielencéfalo; G: vista dorsal da larva eclodida destacando-se o sistema nervoso central. Barra: A-E= 0,25 mm; F e G= 0,2 mm.....	37
---	----

Fig. 5. Comprimento total e volume do saco vitelínico das larvas de *B. gouldingi* a partir da eclosão das larvas até a absorção total do vitelo..... 38

Fig. 6. Morfologia externa das larvas de *B. gouldingi*. 2 hpe: **A**: início da pigmentação dos olhos, canal do ânus. 7 hpe: **B**: pigmentação mais intensa dos olhos, esboço dos arcos branquiais, membrana branquiostegial e início da abertura da boca. 10 hpe: **C**: arcos branquiais e membrana branquiostegial. 12 hpe: **D**: cabeça em posição ventral e abertura da boca. Barra: 0,5 mm..... 42

Fig. 7. Morfologia externa das larvas de *B. gouldingi*. 16 hpe: **A**: pigmentação restrita à região ventral do corpo, primórdio da nadadeira peitoral, coração, deslocamento da cabeça, canal do ânus. 18 hpe: **B**: canal do ânus, cabeça em posição semiventral. 24 hpe: **C**: cabeça em posição final. 32 hpe: **D**: pigmentação mais intensa do corpo e presença de dentes na boca. Barra: 0,5 mm..... 43

Fig. 8. Morfologia externa das larvas de *B. gouldingi*. **A**: 37 hpe; **B**: 40 hpe; **C**: 52 hpe; **D**: 55 hpe. **A, B, C** - olhos da larva forrageira ingerida; **B**: excreção de material fecal; **C**: dilatação do abdome e ampla abertura da boca; **D**: vitelo absorvido. Barra: 0,5 mm..... 44

ARTIGO II

Fig. 1. Eletronmicrografias de varredura (A e B) e fotomicrografias (C e D) dos ovócitos de *B. gouldingi*. Extrusão: **A**: ovócito com micrópila; **B**: micrópila do ovócito em forma de funil com pregas longitudinais; **C**: ovócito com córion; **D**: ovócito com vitelo, citoplasma cortical, alvéolos corticais e córion..... 63

Fig. 2. Eletronmicrografias de varredura (A - C) e fotomicrografias (D - H) de ovos de *B. gouldingi*. **A**: Fertilização (tempo zero) - espermatozóides no vestíbulo da micrópila. 1 mpf: **B**: espermatozóides no vestíbulo da micrópila; 30 spf: **C**: formação do cone de fertilização; 3 mpf: **D**: início da movimentação citoplasmática para definição do pólo animal e vegetativo; **E**: pólo animal do ovo; **F**: pólo vegetativo do ovo com alvéolos corticais. 10 mpf: **G**: movimentação citoplasmática definindo o pólo animal e o pólo vegetativo. 45 mpf: **H**: completa formação do pólo animal e vegetativo..... 64

Fig. 3. Fotomicrografias de ovos de *B. gouldingi*. 4 hpf: **A**: início do movimento de epibolia; **B**: blastoderme e periblasto. 6 hpf: **C**: movimento de epibolia e de involução com formação do anel germinativo; **D**: células embrionárias sofrendo várias mitoses. 7 hpf: **E**: gástrula final destacando-se os movimentos de epibolia e

involução sofridos pelas células embrionárias e formação do tampão vitelínico; F: formação das duas camadas: epiblasto e hipoblasto..... 65

Fig. 4. Eletronmicrografias de varredura (B, D, G e H) e fotomicrografias (A, C, E, F) de embriões de *B. gouldingi*. 8 hpf: A e B: formação do eixo embrionário com diferenciação das regiões cefálica e caudal e presença do sulco neural; 9 hpf: C e D: observação dos primeiros somitos e da notocorda; E: detalhe dos somitos; F: detalhe da notocorda; 10 hpf: G: vesícula óptica; 11 hpf: H: destacamento da região caudal..... 66

Fig. 5. Eletronmicrografias de varredura (A e B) e fotomicrografias (C - H) de embriões de *B. gouldingi*. 12 hpf (A - F) e 13 hpf (G e H): A: alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal e desenvolvimento das placas olfatórias; B: placa olfatória; C: sistema nervoso central e vesícula ótica. D: notocorda; E: vesícula ótica; F: cálice óptico e primórdio do cristalino; G: região cefálica da larva: vesícula ótica, coração; sistema nervoso central com divisão em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, epífise e primórdio do cerebelo; H: região cefálica da larva: cálice óptico, cristalino, primórdio da boca, placa olfatória..... 67

Fig. 6. Eletronmicrografias de varredura (A - D) e fotomicrografias (E - G) de larvas de *B. gouldingi*. 14 hpf: Eclosão larval. A: postura distendida, saco vitelínico e nadadeira embrionária; B: vista dorsal da larva eclodida com saco vitelínico; C: região cefálica da larva eclodida com esboço dos arcos branquiais, vesícula ótica, membrana branquiostegial e sistema nervoso central; D: placa olfatória preenchida por células ciliadas; E: postura distendida, saco vitelínico; F: região cefálica da larva com primórdio da boca, cálice óptico, cristalino, sistema nervoso central; G: diferenciação dos miômeros, pronefro e intestino..... 68

ARTIGO III

Fig. 1. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. Eclosão: A: vista lateral completa; B: região cefálica; C: placa olfatória; D: região cefálica dorsal com sulco neural. 5 hpe: E: vista lateral completa; F: região cefálica; G: neuromasto primordial; H: placa olfatória..... 86

Fig. 2. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 9 hpe: A: região cefálica lateral; B: região cefálica ventral; C: região cefálica dorsal com órgãos adesivos; D: detalhe dos órgãos adesivos. 15 hpe: E: vista lateral completa; F: região cefálica lateral; G: detalhe da placa olfatória; H: região cefálica ventral..... 87

Fig. 3. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 21 hpe: A: região cefálica lateral com órgãos adesivos (círculo); B: detalhe dos órgãos

adesivos; **C:** placa olfatória; **D:** corpo das larvas com neuromastos; **E:** detalhe dos neuromastos; **F:** detalhe de um neuromasto. 23 hpe: **G:** vista lateral completa; **H:** detalhe da boca..... 88

Fig. 4. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 29 hpe: **A:** vista lateral completa; **B:** porção anterior do corpo; **C:** detalhe de um neuromasto da linha lateral; **D:** detalhe da boca com botão gustativo. 33 hpe: **E:** região cefálica dorsal com órgãos adesivos em regressão; **F:** detalhe da placa olfatória. 45 hpe: **G:** lateral do corpo; **H:** região cefálica ventral..... 89

Fig. 5. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 54 hpe: **A:** região cefálica lateral; **B:** região cefálica dorsal com órgãos adesivos em regressão; **C:** detalhe dos órgãos adesivos em regressão; **D:** região ventral cefálica; **E:** detalhe de um neuromasto da região cefálica; **F:** detalhe da placa olfatória; **G:** porção mediana do corpo; **H:** porção final do corpo..... 90

ARTIGO IV

Fig. 1. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. Eclosão: **A:** epitélio do tegumento penetrando e demarcando o local da cavidade bucofaríngea, coração rudimentar; **B:** pronefro e intestino sendo delimitados. 1 hpe: **C:** primórdio da cavidade bucofaríngea e incisura oral demarcando o local da separação dos lábios. 2 hpe: **D:** pronefro e intestino com pequena luz visível; **E:** porção final do pronefro e intestino. 5 hpe: **F:** cavidade bucofaríngea formada, lábios aderidos, região anterior do tubo digestivo fechada (destaque), coração com duas câmaras..... 108

Fig. 2. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 9 hpe: **A:** lábios separados, região anterior do tubo digestivo fechada (destaque); **B:** região dos lábios demonstrando primórdio dos dentes. 11 hpe: **C:** desenvolvimento dos arcos branquiais, coração se deslocando; **D:** primórdio dos dentes. 13 hpe: **E:** faringe, esôfago, intestino e pâncreas; **F:** porção final do tubo digestivo aberta..... 109

Fig. 3. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 17 hpe: **A:** arcos branquiais se ramificando, ouvido interno com neuromasto. **B:** 21 hpe: esôfago, intestino, pâncreas, neuromasto superficial e vesícula gasosa (destaque). 23 hpe: **C:** desenvolvimento dos dentes e neuromasto próximo à vesícula óptica; **D:** pronefro e circunvoluções do intestino. 29 hpe: **E:** faringe, esôfago, intestino, fígado, pâncreas e vesícula gasosa; **F:** porção mediana do intestino dilatada..... 110

Fig. 4. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 31 hpe: **A:** olho **B:** cavidade olfatória. 33 hpe: **C:** faringe com prolongamentos citoplasmáticos, esôfago, fígado, arcos branquiais e dente faríngeo; **D:** vesícula gasosa, pâncreas; **E:** fígado; **F:** material digerido no intestino..... 111

Fig. 5. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 39 hpe: A: ingestão de larva forrageira; B: dentes e botão gustativo (destaque); vesícula gasosa parcialmente inflada. 45 hpe: material digerido no intestino..... 112

Fig. 6. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. A: vitelo absorvido, com presença de larvas forrageiras no intestino; B: olho bem desenvolvido com lente bem delimitada, camada de pigmento e plexiforme bem proeminentes; C: cavidade olfatória e neuromastos ao redor dos olhos..... 113

Lista de Tabelas

ARTIGO I

Tabela 1. Características estruturais do desenvolvimento embrionário de *B. gouldingi* desde o momento da formação do pólo animal até a eclosão da larva de acordo com o tempo de desenvolvimento (em horas pós-fertilização= hpf), à temperatura de 25,5°C..... 33

Tabela 2. Características estruturais do desenvolvimento larval de *B. gouldingi* desde o momento da eclosão da larva até absorção total do vitelo de acordo com o tempo de desenvolvimento (em horas pós-eclosão= hpe)..... 39

Faustino, Francine (2010). Desenvolvimento embrionário e larval de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae). Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

Resumo geral

Brycon gouldingi é uma espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia e estudos acerca de sua biologia e desenvolvimento ontogenético não se encontram na literatura. Análises morfométrica e morfológica dos períodos embrionário e larval desta espécie contribuirão para o conhecimento de sua biologia e potencial para o cultivo. Para este trabalho, foram capturados exemplares adultos da espécie, provenientes do Rio das Mortes - MT, principal afluente do Rio Araguaia e adaptados em cultivo por cerca de sete meses. Dez coletas foram realizadas na Piscicultura Buriti, Nova Mutum – MT, nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008, após a reprodução induzida dos exemplares, sendo feitas amostragens nos seguintes tempos: extrusão, fertilização (tempo zero), 10, 20 e 30 segundos, 1min, 1min e 30s, a cada minuto até completar 10min, a cada 5min até atingir 30min, aos 45min, de hora em hora até completar 24 horas, a cada 2 horas até completar 48 horas e a cada 3 horas até a absorção total do vitelo. Ovócitos, ovos, embriões e larvas foram observados em estereomicroscópio, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. Foi realizada também a morfometria dos ovócitos liberados por cada fêmea e das larvas desde o momento da eclosão até a absorção total do vitelo, registrando-se valores de comprimento total da larva, altura e comprimento do saco vitelínico. A temperatura média da água nas incubadoras foi de $26,4 \pm 1,12$ °C. O diâmetro dos ovócitos foi de $1,13 \pm 0,06$ mm e 54% deles possuíam entre 1,11 e 1,20 mm. O período embrionário teve uma duração média de $13,9 \pm 0,06$ horas pós-fertilização (hpf) sendo dividido em sete fases (zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, histogênese/organogênese e eclosão). No momento da eclosão, as larvas possuíam $3,40 \pm 0,07$ mm de comprimento total e o volume do saco vitelínico era de $0,46 \pm 0,08$ µL. Durante o desenvolvimento larval, foi registrado o aparecimento de órgãos adesivos na região dorsal cefálica, formação do coração, pronefro, fígado, pâncreas e, principalmente, do sistema digestório. A abertura da boca foi constatada às 9 hpe e o tubo digestivo encontrou-se aberto com 13 hpe. Os dentes começaram a perfurar o epitélio com aproximadamente 21 hpe. A absorção do saco vitelínico ocorreu entre 54 e 55 horas pós-eclosão (hpe), quando as larvas possuíam, em média, $6,68 \pm 0,65$ mm de comprimento total. O desenvolvimento embrionário e larval de *B. gouldingi* pode ser considerado rápido, com larvas apresentando uma diferenciação acelerada e simultânea de estruturas relacionadas especialmente à habilidade natatória e à captura de alimento.

Palavras-chave: *Brycon*, morfologia, ovócitos, desenvolvimento inicial.

Faustino, Francine (2010). Embryonic and larval development of *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae). Master Thesis (Master Degree in Aquaculture) – Aquaculture Center of São Paulo State University, Jaboticabal, SP.

General abstract

Brycon gouldingi is an endemic species of Tocantins-Araguaia basin and studies about its biology and ontogenetic development are not available in the literature. Morphometric and morphological analyses of embryonic and larval stages of this species will increase the knowledge about its biology and aquaculture potential. To perform this work, adult specimens from Mortes River- MT, the main tributary of Araguaia River were collected and adapted to captivity for seven months. Ten collections were carried out at Buriti Fishculture, Nova Mutum – MT, between December 2007 and January 2008, after induced spawning, comprising samplings in the following periods: extrusion, fertilization (time zero), 10, 20 and 30 seconds, 1min, 1min e 30s, at each minute up to 10min, each 5min up to 30min, at 45min, each hour up to 24 hours, each 2 hours up to 48 hours and each 3 hours up to total yolk absorption. Oocytes, eggs, embryos and larvae were observed under stereomicroscope, scanning electron microscope and light microscope. Morphometry analyses were also performed in the oocytes released by each female and in the oocytes up to total yolk absorption taking into account total larval length, yolk sac height and length values. The mean water temperature in the incubators was 26.4 ± 1.12 °C. The oocyte diameter was equal to 1.13 ± 0.06 mm and 54% of them were between 1.11 and 1.20 mm. The mean duration of the embryonic period was 13.9 ± 0.06 hours post-fertilization (hpf) being divided into seven stages (zygote, cleavage, blastula, gastrula, histogenesis/organogenesis and hatching). At hatching, the total larval length was equal to 3.40 ± 0.07 mm and the yolk sac volume was $0.46 \pm 0.08 \mu\text{L}$. During the larval development, the appearance of adhesive organs on the cephalic dorsal region plus heart, pronephro, liver, pancreas and, mainly, the digestive tract formation could be noticed. Mouth opening took place at 9 hph and the digestive tube opened at 13 hph. The teeth started perforating the epithelium at about 21 hph. The yolk sac absorption occurred between 54 and 55 hours post-hatching (hph), when the larvae were, in average, 6.68 ± 0.65 mm in total length. The larval and embryonic development of *B. gouldingi* might be regarded as fast, with the larvae presenting an accelerating differentiation simultaneously to structures particularly related to swimming abilities and food intake.

Key-words: *Brycon*, morphology, oocytes, early development

INTRODUÇÃO GERAL

1. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, existindo ainda muitas espécies desconhecidas (Buckup et al. 2007), dificuldade de seu reconhecimento pelo leigo e a utilização de mesmo nome popular para espécies diferentes, sendo alguns grupos, como os gêneros *Leporinus*, *Brycon*, *Salminus*, *Hypostomus*, *Pimelodus* e *Cichla*, mais problemáticos do que outros quanto à identificação (Godinho, 2007).

O gênero *Brycon* possui mais de 60 espécies de peixes, dentre as quais aproximadamente 40 ocorrem na América Central e América do Sul (Howes, 1982), difundidas do sul do México até a Argentina e dos rios da costa do Pacífico até a Colômbia, Equador e Peru, com o seu potencial para aquicultura sendo enfatizado há mais de duas décadas (Lima e Castro, 2000). Os estudos sobre os peixes do gênero *Brycon* iniciaram-se em 1927, com Rodolpho von Ihering, mas até hoje muitos aspectos de sua biologia ainda são desconhecidos.

Segundo o IBAMA (2009), o gênero *Brycon* apresenta muitas espécies na Lista de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção. São elas: *Brycon devillei*, *Brycon insignis*, ambos conhecidos como piabanha, *Brycon nattereri*, vulgarmente chamado pirapitinga, *Brycon opalinus*, denominado também pirapitinga ou pirapitinga-do-sul, *Brycon orbignyanus*, chamado piracanjuba, picaranjuva ou bracanjuba, *Brycon vermelha*, conhecido como vermelha.

Os peixes da subfamília Bryconinae (Characiformes, Characidae) possuem hábitos alimentares herbívoros ou onívoros, são de porte médio a grande e caracterizam-se pela presença de três séries de dentes no pré-maxilar, dois no dentário e um no maxilar, o qual apresenta dentes por toda extensão. A linha lateral localiza-se abaixo do meio do flanco. A nadadeira anal é longa e a caudal bifurcada (Britski et al., 1999).

A espécie do gênero *Brycon* enfocada neste trabalho foi descrita sistematicamente por Lima (2004). Trata-se de *Brycon gouldingi* (**Fig. 1**) e, segundo o autor, esta espécie possui como características que o difere dos demais *Brycon* spp. o quinto osso infra-orbital mais alto que largo, várias listras estreitas longitudinais e sinuosas (não-retas) ao longo do corpo, nadadeiras

peitorais e pélvicas escurecidas, distinta mancha em forma de V no pedúnculo caudal e nadadeira caudal, e cerca de 66-82 escamas na linha lateral.

Há relatos de que, na natureza, peixes desta espécie possam atingir 10 kg, porém em cativeiro, observou-se peso médio de 700g a 1Kg no período de um ano (comunicação pessoal). É conhecido pelas comunidades ribeirinhas do Rio das Mortes - MT como “piabanha”. Entretanto, esta denominação também é utilizada regionalmente para *Brycon devillei*, que ocorre nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais, e para *Brycon insignis*, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Brycon gouldingi é uma espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, cuja alimentação é baseada em frutos e insetos, vive em ambiente bentopelágico de água doce, em clima tropical (Lima, 2004). A Bacia Tocantins-Araguaia é a maior localizada inteiramente em território brasileiro abrangendo os estados de Goiás, Mato Grosso, Pará, Maranhão e Tocantins, sendo muito rica em espécies aquáticas, das quais algumas ainda não foram identificadas (IBAMA, 2007).

Há um projeto que visa a construção de hidrovias e hidrelétricas na Bacia Tocantins-Araguaia, especialmente no Araguaia, mas a sua execução depende de uma maior análise sobre os impactos que esse empreendimento poderá causar como perda de muitas espécies aquáticas e de reservas ambientais. De acordo com Junk e Nunes de Mello (1990), a construção de uma represa representa um impacto fundamental na perda de espécies da fauna e flora.

Além disso, o fato do peixe ser um dos principais alimentos para pessoas de menor poder aquisitivo, principalmente as que moram onde o abastecimento de grandes centros comerciais é inexistente (como as comunidades ribeirinhas que praticam a pesca artesanal) contribui para o impacto de perda de espécies de peixes. Segundo Santos et al. (1991), a exploração deste recurso natural deve ser racional. De acordo com Pereira Filho et al. (1991) e Honczaryk (1995), uma das alternativas para evitar a sobrepesca dos bancos pesqueiros naturais é a criação de peixes em confinamento, que é limitada pela falta de conhecimento sobre a biologia de espécies com potencial para cultivo, incluindo espécies do gênero *Brycon*.

Mesmo com o aprimoramento das técnicas de reprodução, alimentação e manejo na piscicultura, muitos problemas precisam ainda ser resolvidos, principalmente com relação à larvicultura de peixes, que representa um forte ponto de estrangulamento na produção de larvas e juvenis (Beerli et al., 2004).

O desenvolvimento inicial em teleósteos compreende o período embrionário e larval, tendo início no momento da fertilização e finalizando com a completa absorção do vitelo (Kunz, 2004). O período embrionário estende-se da fertilização à eclosão da larva (Shardo, 1995), enquanto o período larval inicia-se após a eclosão e termina com a reabsorção do vitelo e início da alimentação exógena (Helfman et al., 2000).

A maioria das larvas de peixes recém-eclodida não possui boca aberta, intestino, ânus, brânquias, vesícula gasosa, nadadeiras pares, pigmentação e acuidade visual (Blaxter, 1969; Woynarovich e Horváth, 1983). O tempo de desenvolvimento dos sistemas orgânicos segue padrões ontogenéticos de cada espécie e determina o momento em que os peixes irão adquirir a capacidade natatória, de fuga e de captura de seu próprio alimento (Neumann, 2004).

De acordo com Ricker (1979), devido ao fato do padrão de crescimento em peixes mudar rapidamente no início do ciclo de vida, este deve ser mensurado em curtos intervalos de tempo. Ehlinger (1991) afirma que o desafio funcional é, na maioria das vezes, a discriminação morfométrica do crescimento que, quando combinada com a descrição de variações morfológicas, aumenta a probabilidade de observar transformações correlacionadas que levam a diferenciação em jovens e adultos dentro de populações.

O estudo do desenvolvimento inicial dos peixes pode ter várias perspectivas (Kendall et al. 1983). Segundo Nakatani et al. (2001), trabalhos sobre a biologia das formas iniciais fornecem dados relevantes à sistemática, monitoramento de estoques e biologia pesqueira. Por sua vez, Reynalte-Tataje et al. (2004) e Ninhaus-Silveira et al. (2006) relatam que a descrição dos estágios embrionários em teleósteos traz informações necessárias para a produção em grande escala de peixes em laboratório, além de contribuir com a sistemática e inventário ambiental. Pode contribuir também para avaliar a qualidade da água de determinado ambiente e efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna (Flores et al. 2002).

Devido à importância dos estudos em relação aos estágios iniciais do desenvolvimento de peixes, encontram-se na literatura trabalhos com diferentes espécies de peixes, dentre elas: *Brachidanio rerio* (Hisaoaka e Firlit, 1960; Wargha e Kimmel, 1990; Kimmel et al., 1995), *Catostomus commersoni* (Long e Ballard, 1976), *Rhamdia sapo* (Matkovic et al., 1985, Cussac et al., 1985), *Oreochromis niloticus* (Galman e Avtalion, 1989), *Oryzias latipes* (Iwamatsu, 1994) e *Alosa sapidissima* (Shardo, 1995).

No Brasil, encontram-se, dentre outras pesquisas, as realizadas com *Rhamdia hilarii* (Godinho et al., 1978), *Prochilodus lineatus* (Castellani et al., 1994), *Colosoma macropomum* (Albuquerque et al., 1994; Ribeiro et al., 1995), *Piaractus mesopotamicus* (Ribeiro et al., 1995), *Pseudoplatystoma corruscans*, (Cardoso et al., 1995), *Brycon cephalus* (Lopes et al., 1995; Romagosa et al., 2001), *Pimelodus maculatus* (Luz et al., 2001), *Brycon orbignyanus* (Nakatani et al., 2001) e *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli et al., 2001).

Mais recentemente, foram realizados estudos com a descrição dos estágios iniciais em *Brycon orbignyanus* (Ganeco, 2003; Maciel, 2006; Ganeco et al., 2008), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira et al., 2006), *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (Nakaghi et al., 2006; Sampaio, 2006), híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum* (Faustino et al. 2007), *Brycon amazonicus* (Neumann, 2008), *Pseudoplatystoma corruscans* (Landines et al. 2003; Marques et al., 2008), *Zungaro jahu* (Marques, 2008).

Diante destas considerações, e não havendo na literatura informações acerca de *B. gouldingi*, o presente estudo teve como objetivo proporcionar conhecimentos a respeito dos principais eventos morfológicos observados durante o desenvolvimento inicial desta espécie, enfatizando as fases do período embrionário e suas características e a ontogenia dos principais órgãos e sistemas das larvas.

Para elucidar os resultados, a dissertação foi dividida em quatro artigos:

Artigo I: “Morfologia externa das fases iniciais de vida de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae)”.

Artigo II: “*Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspectos do desenvolvimento embrionário de uma nova espécie de peixe com potencial para a aquicultura”.

Artigo III: “Ultraestrutura das larvas de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): uma abordagem voltada à aquicultura”.

Artigo IV: “Histologia das larvas de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae)”.



Fig. 1. Exemplar de *Brycon gouldingi* utilizado durante o experimento.

2. REFERÊNCIAS

- Albuquerque, M. O.; Bezerra e Silva, J. W.; Kóvacs, G. Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. *Boletim Técnico DNOCS* 47/52, 1/2:1-240, 79-100, 1994.
- Andrade-Talmelli, E. F.; Kavamoto, E. T.; Romagosa, E.; Fenerich-Verani, N. Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis* Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 21-27. 2001.
- Beerli, E. L.; Logato, P. V. R.; Freitas, R. T. F. Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 1, p. 149-155, 2004.
- Blaxter, J. H. S. Development: eggs and larvae. In *Fish Physiology* Edited by Hoar WS, Randall DJ, New York: Academic Press, 1969.
- Britski, H. A.; Silimon, K. S. S.; Lopes, B. S. *Peixes do Pantanal: Manual de Identificação*. Brasília: EMBRAPA - SPI. 1999.

- Buckup, P.A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S. (Ed.). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.
- Cardoso, E. L.; Alves, M. S. D.; Ferreira, R. M. A.; Godinho, H. P. Embryogenesis of the neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquat. Living Res.*, v. 8, p. 343-346, 1995.
- Castellani, L. R.; Tse, H. G.; Leme Dos Santos, H. S.; Faria, R. H. S.; Santos, M. L. S. Desenvolvimento embrionário do curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). *Rev. Bras. Cienc. Morf.*, v. 11, n. 2, p. 99-105, 1994.
- Cussac, V. E.; Matkovic, M. V.; Maggese, M. C. 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, 1985.
- Ehlinger, T. J. Allometry and analysis of morphometric variation in the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Copeia*, v. 2, p. 347-357. 1991.
- Faustino, F.; Nakaghi, L. S. O.; Marques, C.; Makino, L.; Senhorini, J. A. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* X cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Acta Sci.*, v. 29, p. 49-55, 2007.
- Flores, J. C. B.; Araiza, M. A. F.; Valle, M. R. G. Desarrollo embrionario *Ctenopharyngodon idellus* (Carpa herbívora). CIVA, 2002. (<http://www.civa2002.org>), p.792-797.
- Galman, O. R.; Avtalion, R. R. Further study of the embryonic development of the *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, teleostei) using scanning electron microscopy. *J. Fish Biol.*, v. 34, p. 653-664, 1989.
- Ganeco, L. N. 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, 2003.
- Ganeco L. N.; Franceschini-Vicentini I. B.; Nakaghi L. S. O. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*, *Zygote*, v. 17, p. 93-99. 2008
- Godinho, H. M.; Fenerich, N. A.; Narahara, M. Y. Developing of embryos and larvae of *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 38, p. 151-156, 1978.
- Godinho, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.
- Helfman, G. S.; Collette, B. B.; Facey, D. E. *The diversity of fishes*. Massachusetts: Blackwell Science, USA, p. 117-134, 2000.
- Hisaoka, K. K.; Firlit, C. F. Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachidanio rerio* (Hamilton-Buchanan), *J. Morphol.*, v. 17, p. 205-225, 1960.

- Honczaryk, A. A reprodução de peixes em cativeiro. In: Val, A. L.; Honczaryk, A. *Criando peixes na Amazônia*. Manaus: INPA, 1995. p. 97-120.
- Howes, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bulletin of the British Museum Natural History (Zoology)*, v. 43, n. 1, p. 1-47. 1982.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Bacia Tocantins-Araguaia. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pndpa/>. Acesso em: 3 set. 2007.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Listas de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/list_extincao.pdf. Acesso em: 22 jul. 2009.
- Iwamatsu, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, v. 11, p. 825-839, 1994.
- Junk, W. J.; Nunes de Mello, J. A. S. *Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. Estudos avançados*, v.4, n.8, p.126-143, 1990.
- Kendall, Jr., A. W.; Ahlstrom, E. H.; Moser, H. G. Early life history 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 Ahlstrom*. Lawrence: American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 1983c. p. 11-22.
- Kimmel, C. B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, v. 203, p. 253-310, 1995.
- Kunz, Y. W. *Developmental biology of teleosts fishes*. Dordrecht, Springer, 2004, 652p.
- Landines, M. A.; Senhorini, J. A.; Sanabria, A. I.; Urbinati, E. C. Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829). *Bol. Tec. Cepta*, v. 6, p. 1-13, 2003.
- Lima, F. C. T. *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, Alemanha, v. 15, n. 3, p. 279-287, 2004.
- Lima, F. C. T; Castro, R. M. C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyological Exploration of Freshwater*, Alemanha, v. 11, p. 155-162. 2000.
- Long, W. L.; Ballard, W. W. Normal embryonic stages of the white suckers, *Catostomus commersoni*. *Copeia*, v. 2, p. 342-351, 1976.
- Lopes, R. N. M.; Senhorini, J. A.; Soares, M. C. F. Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869, (Pisces, Characidae). *Bol. Tec. Cepta*, Pirassununga, v. 8, p. 25-39. 1995.

- Luz, R. K.; Reynalte-Tataje, D. A.; Ferreira, A. A.; Zaniboni-Filho, E. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, n. 1, p. 49- 55, 2001.
- Maciel, C. M. R. R. Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignianus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characide, Bryconinae). 2006. 229p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa. 2006.
- Marques, C. Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de jaú (*Zungaro jahu*). 2008. 89p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2008.
- Marques, C.; Nakaghi, L. S. O, Faustino, F; Ganeco, L. N.; Senhorini, J. A. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. *Zygote*, v. 16, p.333-342, 2008.
- Matkovic, M. V.; Cussac, V. E.; Cukier, M. Desarrollo embrionario 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, 1985.
- Nakaghi, L. S. O.; Marques, C.; Faustino, F.; Senhorini, J. A. Desenvolvimento embrionário do dourado (*Salminus brasiliensis*) por meio de microscopia eletrônica de varredura. *Bol. Téc. CEPTA*, v.19, p. 9-19, 2006.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P. V.; Cavicchioli, M. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM/Nupélia, 2001, 359p.
- Neumann, E. Características do desenvolvimento de duas linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus* e uma linhagem híbrida de *Oreochromis* sp. 2004. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2004.
- Neumann, E. Desenvolvimento inicial da jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). 2008. 125p. Tese (Doutorado em Aquicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2008.
- Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F.; Azevedo, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote*, v. 14, p. 217-229, 2006.
- Osse, J. W. M.; Van Den Boogaart, J. G.; Van Snik, G. M. J.; Van Der Sluys, L. Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture*, v. 155, p. 249-258. 1997.
- Pereira Filho, M.; Guimarães, S. F.; Storti Filho, A.; Graef, E. W. Piscicultura na Amazônia brasileira: entraves ao seu desenvolvimento. In: Val, A. L.; Figliuolo, R.; Feldberg, E. *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas*. Manaus: INPA. V. 1, p. 373-380. 1991.

- Reynalte-Tataje, D.; Zaniboni-Filho, E.; Esquivel, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Sci.*, Maringá, v. 26, n. 1, p. 67-71. 2004.
- Ribeiro, C. R.; Leme Dos Santos, H. S.; Bolsan, A. A. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu). *Rev. Bras. Biol.*, v. 55, Supl. 1, p. 65-78, 1995.
- Ricker, W. E. Growth rates and models. In: Hoar, W. S.; Randall, D. J.; Brett, J. R. (eds). *Fish Physiology, Bioenergetics and Growth*. New York: Academic Press, 1979. v. III, 786 p.
- Romagosa, E.; Narahara, M. Y.; Fenerich-Verani, N. Stages of embryonic development of the “Matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pises, Characidae). *Bol. Instit. Pesca*, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2001.
- Sampaio, K. H. Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 53p. 2006.
- Santos, G. M. Dos; Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S. Ecologia de peixes da Amazônia. In: Val, A. L.; Figliuolo, R.; Feldberg, E. *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas*. Manaus: INPA.v.1, p. 263-280. 1991.
- Shardo, J. D. Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the American shad, *Alosa sapidissima* (Wilson, 1811). *J. Morphol.*, v. 225, p. 125-167. 1995.
- Warga, R. M.; Kimmel, C. B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, v. 108, p. 569-580, 1990.
- Woynarovich, E.; Horváth, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 1983. 225p.

ARTIGO I

Morfologia externa das fases iniciais de vida de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae)**F. Faustino, L. S. O. Nakaghi, E. Neumann and L. C. Makino**Submissão do artigo: *Frontiers in Zoology* (Impact Factor 2,82)**RESUMO**

Brycon gouldingi é uma espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, recentemente identificada, com potencial para aquicultura, e cuja produção em cativeiro vem sendo realizada por piscicultores. Por não haver na literatura informações acerca desta espécie, tampouco dados relacionados à morfologia, caracterizou-se, por meio de estereomicroscópio, o desenvolvimento inicial de *B. gouldingi* após captura dos exemplares provenientes do Rio das Mortes, adaptação em cativeiro e reprodução induzida na Piscicultura Buriti, Nova Mutum, ambos no estado de Mato Grosso, Brasil, nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008. As amostragens ocorreram em momentos pré-determinados desde a extrusão dos ovócitos até a absorção total do vitelo. Foram realizadas medidas do diâmetro dos ovócitos, assim como do comprimento total das larvas e do volume do saco vitelínico desde a eclosão até o momento da absorção total do vitelo. O diâmetro dos ovócitos na extrusão apresentou média de $1,13 \pm 0,06$ mm e 54% deles tinham entre 1,11 e 1,20 mm. O período médio de desenvolvimento embrionário de *B. gouldingi* foi de $13,9 \pm 0,06$ horas pós-fertilização (hpf) à temperatura de $26,4 \pm 1,12^\circ\text{C}$. Caracterizando este período foram encontradas sete fases: zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, histogênese e organogênese e eclosão, sendo possível observar características intrínsecas à cada fase. No momento da eclosão, as larvas possuíam $3,40 \pm 0,07$ mm de comprimento total, postura distendida, volume de saco vitelínico de $0,46 \pm 0,08$ μL , sem capacidade natatória e acuidade visual. Durante a fase larval observou-se, principalmente, a pigmentação dos olhos, desenvolvimento da boca e arcos braquiais, além de se constatar a ocorrência de predação de larvas forrageiras com sobreposição de alimentação exógena e endógena. Quando ocorreu a absorção total do vitelo, 55 horas pós-eclosão, as larvas apresentavam comprimento total de $6,68 \pm 0,65$ mm, olhos com pigmentação intensa e boca provida por dentes. As características observadas durante o desenvolvimento inicial de *B. gouldingi* são comuns às espécies do gênero *Brycon*. Os dados deste trabalho são inéditos para a espécie *B. gouldingi* e poderão subsidiar questões relacionadas à produção em cativeiro, assim como embasar estudos filogenéticos e de conservação.

Running title: Fases iniciais de vida de *B. gouldingi***Key-words:** *Brycon*, morfologia, morfometria, embriões, larvas.

INTRODUÇÃO

A família Characidae possui em sua subfamília Bryconinae o gênero *Brycon*, que compreende espécies de porte médio e grande, com ampla distribuição pela América do Sul e Central, cuja alimentação é baseada em insetos e vegetais, sendo denominadas espécies onívoras. É considerado um dos mais numerosos gêneros de Characiformes neotropicais, com mais de 60 espécies nominais das quais aproximadamente 40 se distribuem pela América Central e América do Sul (Howes, 1982).

As espécies deste gênero destacam-se na piscicultura nacional por apresentarem excelentes características para criação como sabor da carne, fácil propagação artificial e rápido crescimento na fase larval e juvenil, resistência à manipulação e boa aceitação de alimentos artificiais, fatores que permitem uma comercialização rápida (Lopes et al. 1995). Porém, na fase larval, apresentam uma alta taxa de canibalismo, o que dificulta seu cultivo, sendo um fator limitante da produção, causador de prejuízos econômicos para aquicultura (Woynarovich e Sato, 1990; Senhorini et al., 1998).

Brycon gouldingi, espécie enfocada neste estudo, foi recentemente descrita por Lima (2004) e, apesar de já ser produzida em cativeiro e fonte de alimento para comunidades ribeirinhas (comunicação pessoal), não são encontrados na literatura relatos com este *Brycon*, tampouco relacionados com seu desenvolvimento inicial. Segundo Lima (2004), *B. gouldingi* é endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia. Esta bacia é a maior localizada inteiramente em território brasileiro rica em espécies aquáticas, sendo que algumas ainda não foram identificadas (IBAMA, 2007). Este *Brycon* possui como características o quinto osso infra-orbital mais alto que largo, várias listras estreitas longitudinais e sinuosas (não-retas) ao longo do corpo, nadadeiras peitorais e pélvicas escurecidas, distinta mancha em forma de V no pedúnculo caudal e nadadeira caudal, e cerca de 66-82 escamas na linha lateral (Lima, 2004).

O sucesso no cultivo de uma espécie de peixe depende da compreensão de sua biologia inicial, incluindo características da fertilização e desenvolvimento embrionário, que influenciam diretamente nas taxas de fertilização e eclosão das larvas (Matkovic et al., 1985).

Com a finalidade de fornecer um conhecimento básico da morfologia externa dos momentos iniciais de vida desta espécie, realizou-se a análise estereomicroscópica dos ovócitos, ovos, embriões e larvas de *B. gouldingi*, após reprodução induzida da espécie, além da morfometria das larvas e do saco vitelínico a fim de acompanhar o crescimento larval simultaneamente à absorção da reserva endógena.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas na Piscicultura Buriti, Nova Mutum - Mato Grosso, Brasil, entre dezembro de 2007 e janeiro de 2008. Reprodutores de *Brycon gouldingi*, provenientes do Rio das Mortes - MT e adaptados em cativeiro por cerca de sete meses, foram submetidos à reprodução induzida, segundo as técnicas de Woynarovich e Horváth (1983).

Nas fêmeas, a primeira dose de hipófise aplicada foi de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e a segunda dose, após um intervalo de 10 horas, de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$. A dose única dos machos foi de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, no momento da segunda dose das fêmeas. A base da nadadeira peitoral foi o local de aplicação do hormônio. Dez fêmeas da espécie tiveram seus descendentes (geração F1) analisados, considerando-se cada desova uma repetição.

Após a extrusão, os ovócitos foram acondicionados em bacia e, em seguida, receberam o sêmen, que foi homogeneizado suavemente (Woynarovich e Horváth, 1983). Após alguns segundos, foi adicionada água à mistura para a hidratação dos ovos, sendo posteriormente lavados com água para a retirada do excesso de sêmen. Os ovos foram transportados para incubadoras cônicas de fibra de vidro, com capacidade de 200 litros e renovação de água de 6 L.s^{-1} .

As amostragens ocorreram nos seguintes tempos: extrusão, fertilização (tempo zero), 10, 20 e 30 segundos, 1min, 1min e 30s, a cada minuto até completar 10min, a cada 5min até atingir 45min, de hora em hora até o momento da eclosão da larva, de hora em hora até completar 24 horas, a cada 2 horas até completar 48 horas e, depois disso, a cada 3 horas até absorção do vitelo. As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado e transferidas para

álcool 70% após 24 horas. As análises ocorreram no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP de Jaboticabal-SP.

Foi analisada a morfologia externa em estereomicroscópio dos ovos, embriões e larvas. Para a distribuição de frequência percentual dos ovócitos em classes de comprimento, foi verificado o diâmetro dos ovócitos (em milímetros) utilizando-se uma amostragem de 30 ovócitos de cada desova (=repetição). Por apresentarem formato ovóide, nestes ovócitos foram registrados valores de diâmetro maior e menor e, posteriormente, a média entre os dois (medida considerada o diâmetro dos ovócitos). Mensurou-se também os valores do comprimento total das larvas, altura e comprimento do vitelo utilizando-se 10 larvas de cinco desovas, desde o momento da eclosão larval até a absorção do vitelo e, posteriormente, calculado o volume do saco vitelínico, em μL , por meio da fórmula $V = (\pi/6)LH^2$, onde V é o volume, L o comprimento e H a altura, de acordo com Blaxter (1969). Vale salientar que, para este cálculo do volume, não foi levado em consideração o apêndice tubular presente no vitelo.

As medidas lineares e as fotodocumentações foram realizadas em estereomicroscópio LEICA MZ 8, acoplado à câmera digital LEICA DFC 280 utilizando-se o programa IM 50-LEICA.

RESULTADOS

Para este estudo, foi utilizada a classificação de Faustino et al. (2010) ou seja, a expressão “ovócito” refere-se ao gameta feminino, antes da fertilização. O termo “ovo” referiu-se aos estágios compreendidos entre a fertilização até o final da gastrulação, quando então ocorre a formação do eixo embrionário passando a ser denominado “embrião”. A denominação “larva” foi utilizada desde o momento da eclosão até a absorção total do vitelo.

Os ovócitos de *B. gouldingi* apresentaram formato levemente ovóide e coloração verde-acinzentada no momento da liberação dos ovócitos (extrusão). A **Fig. 1** mostra que, no momento da extrusão, o diâmetro dos ovócitos das dez fêmeas de *B. gouldingi* variou entre $1,06 \pm 0,07\text{mm}$ (Fêmea 3) e $1,19 \pm 0,06\text{mm}$ (Fêmea 4). A média dos diâmetros das dez fêmeas foi

de $1,13 \pm 0,06$ mm. A **Fig. 2** representa a frequência de ocorrência destes ovócitos em classes de comprimento e mostra que a maioria dos gametas femininos da espécie (54%) possuía entre 1,11 e 1,20 mm.

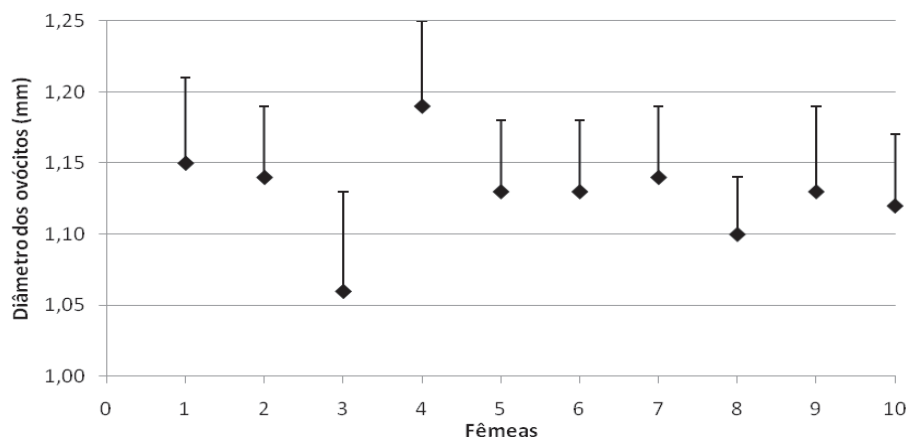


Fig. 1. Diâmetro dos ovócitos e respectivo desvio padrão das dez fêmeas de *B. gouldingi* no momento da liberação dos ovócitos (extrusão).

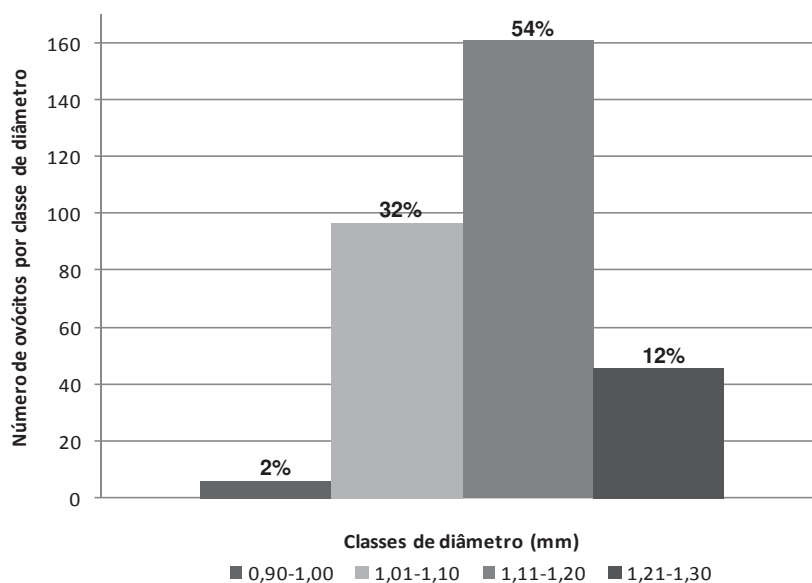


Fig. 2. Frequência de ocorrência de ovócitos por classes de diâmetro no momento da liberação dos ovócitos (extrusão) em *B. gouldingi*. N=10.

Durante o desenvolvimento embrionário de *B. gouldingi* (da fertilização à eclosão da larva) observou-se que, quando a água das incubadoras apresentava temperatura maior (28°C), a sucessão dos eventos morfológicos ocorreu mais rapidamente (13 horas pós-fertilização), e em temperaturas inferiores (25,5 e 26°C) o tempo foi mais lento (14 ou 15 horas pós-fertilização). Esta diferença de temperatura da água deve-se ao fato das coletas terem ocorrido nos sucessivos

meses de dezembro e janeiro, ambas no verão, época reprodutiva de *B. gouldingi*. Em média, o tempo de embriogênese foi de 13,9 horas à temperatura de $26,4 \pm 1,12^\circ\text{C}$. Durante o desenvolvimento foram observadas sete fases, conforme mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1. Características estruturais do desenvolvimento embrionário de *B. gouldingi* desde o momento da formação do pólo animal até a eclosão da larva de acordo com o tempo de desenvolvimento (em horas pós-fertilização= hpf), à temperatura de $25,5^\circ\text{C}$.

Tempos (hpf)	Fases	Descrição
0 - 0.75	Zigoto	Migração do citoplasma e formação do pólo animal.
1.0	Clivagem	Divisões celulares resultando em inúmeros blastômeros.
2.0	Mórula	Blastômeros formam um maciço celular semelhante a uma “meia amora”.
3.0	Blástula	Blastômeros dispostos regularmente em forma de cúpula sem identificação nítida dos limites celulares.
4.0	Gástrula	30% epibolia (migração das células embrionárias).
5.0	Gástrula	50% epibolia (migração das células embrionárias).
6.0	Gástrula	70% epibolia (migração das células embrionárias).
7.0	Gástrula	90 % epibolia - Gástrula final - formação do tampão vitelínico (porção de vitelo não recoberta pelas células embrionárias).
8.0	Histogênese e Organogênese	Formação do eixo embrionário; diferenciação das regiões cefálica e caudal.
9.0	Histogênese e Organogênese	Aparecimento da vesícula óptica e dos primeiros somitos.
10.0	Histogênese e Organogênese	Aparecimento da vesícula ótica e da vesícula de Kupffer.
11.0	Histogênese e Organogênese	Destacamento da região caudal, tubo neural visível.
12.0	Histogênese e Organogênese	Alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal
13.0	Histogênese e Organogênese	Alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal.
14.0	Eclosão	Eclosão das larvas - total rompimento do córion – observação do sistema nervoso central.

Após a fertilização, o pólo animal começou a se definir aos 15 minutos (0.25 hpf), ocorrendo seu término aos 45 minutos pós-fertilização (0.75 hpf) (**Fig. 3A**).

As clivagens ocorreram entre 0.75 e 1 hpf, dividindo o pólo animal em dois blastômeros (células embrionárias) de igual tamanho que, em seguida, sofreram divisão formando quatro blastômeros e assim sucessivamente até a presença de 32 células.

Posteriormente, com 2 hpf, observou-se a fase de mórula, caracterizada pela presença de mais de 64 blastômeros. A **Fig. 3B** mostra a mórula em seu estágio final, em que os blastômeros formaram um maciço celular semelhante a uma “meia amora”. Em seguida, às 3 hpf, a fase de blástula, caracterizada por apresentar forma de cúpula acima da massa do vitelo (**Fig. 3C**).

Na fase de gástrula, pôde-se visualizar o movimento de epibolia das células embrionárias, as quais realizaram um movimento de divergência (epibolia) do pólo animal em direção ao pólo vegetativo. O início desta fase (movimento de epibolia) foi observado com 4 hpf, quando aproximadamente 30% do vitelo foi recoberto. Com 5 hpf, visualizou-se 50% de epibolia (**Fig. 3D**), às 6 hpf, cerca de 70 e 80% de epibolia (**Fig. 3E**) e, com 7 hpf, o final do movimento, que se completou com a formação de uma porção de vitelo não recoberta pelo blastoderme após os movimentos celulares, denominada de tampão vitelínico (**Fig. 3F**).

No início da fase de histogênese e organogênese, com 8 hpf, notou-se o desenvolvimento das regiões cefálica e caudal (**Fig. 3G**), assim como a presença de um sulco neural ao se observar o embrião dorsalmente (**Fig. 3H**). Às 9 hpf, observaram-se os primeiros somitos e a vesícula óptica (**Fig. 4A**). Às 10 hpf, o primórdio da vesícula ótica era visualizado assim como a vesícula de Kupffer (**Fig. 4B**). Com 11 hpf, houve o desprendimento da região caudal, podendo ser notado também o tubo neural (estrutura embrionária que dará origem ao sistema nervoso central) (**Fig. 4C**) e o início da diferenciação dos miômeros (segmentos musculares). O crescimento e alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal pôde ser constatado com 12 hpf (**Fig. 4D**). Com 13 hpf, o alongamento do embrião tornou-se mais evidente e, finalmente, às 14 hpf, as larvas eclodiram, após rompimento do córion.

No momento da eclosão, as larvas apresentaram-se transparentes, postura distendida. Eram desprovidas de pigmentos, boca, acuidade visual e capacidade natatória (já que havia ausência total de nadadeiras, havendo apenas uma nadadeira embrionária recobrimdo toda a região caudal) (**Fig. 4E**). A cabeça encontrava-se em posição ventral, aderida à região anterior do saco vitelínico, o qual apresentava forma elipsóide com apêndice tubular (**Fig. 4E**). Foram constatados os esboços do coração, vesícula ótica, formação do cristalino e cálice óptico, além da epífise (primórdio da glândula pineal) (**Fig. 4F**).

A região anterior do tubo neural desenvolveu-se dando origem às três vesículas primárias: cérebro anterior (prosencefalo) que se subdividiu em telencefalo (mais anterior) e diencefalo (mais posterior), cérebro médio (mesencefalo) e cérebro posterior (rombencefalo) que se subdividiu em metencefalo (mais anterior) que formará o cerebelo e mielencefalo (mais posterior) que dará origem à medula espinhal (**Fig. 4F e 4G**).

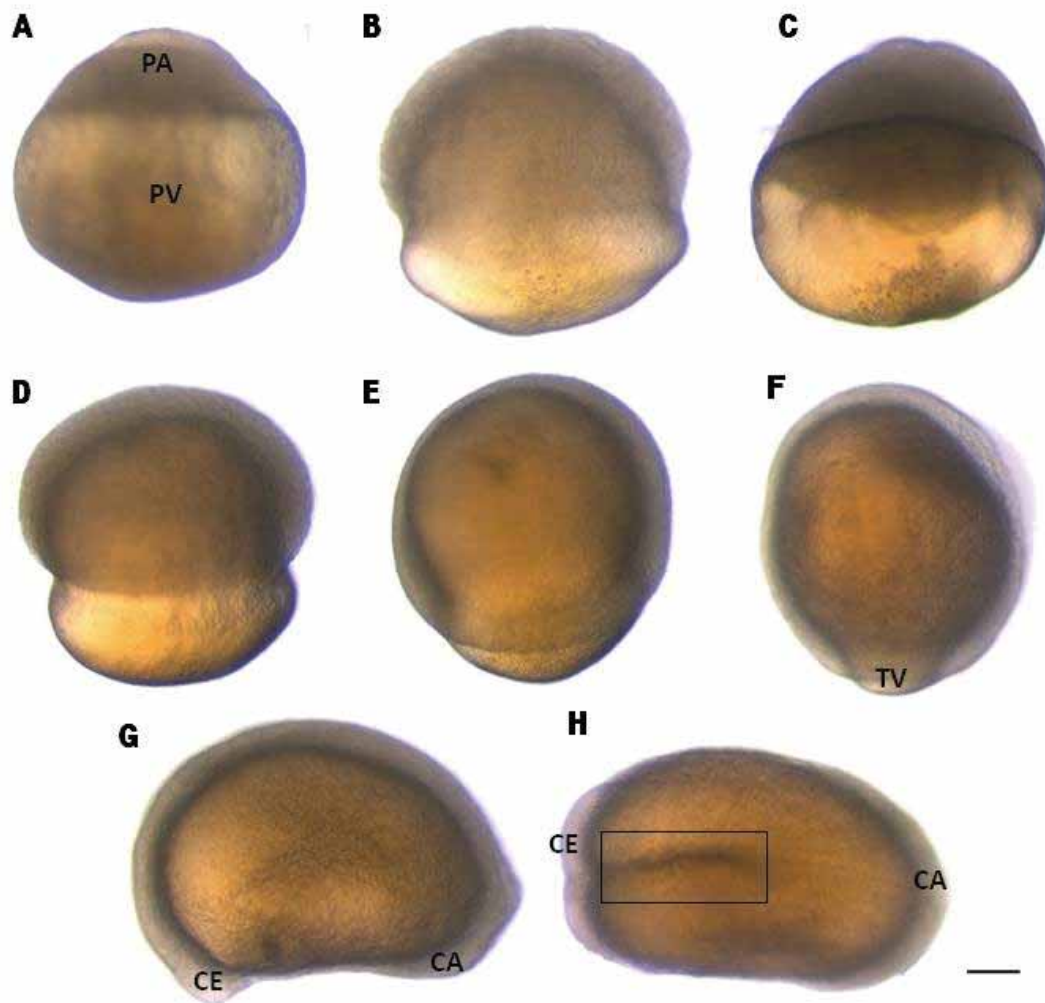


Fig. 3. Morfologia externa de ovos (A - F) e embriões (G e H) de *B. gouldingi* nas diferentes fases de desenvolvimento. 0,75hpf: A: pólo animal (PA) e vegetativo (PV). 2 hpf: B: mórula. 3 hpf: C: blástula. 5 hpf: D: gástrula com vitelo recoberto em cerca de 50%. 6 hpf: E: gástrula com vitelo recoberto em 70%. 7 hpf: F: gástrula com vitelo recoberto em cerca de 90% com formação do tampão vitelínico (TV). 8 hpf: G: formação do eixo embrionário com diferenciação das regiões cefálica (CE) e caudal (CA); H: vista dorsal do embrião evidenciando-se a presença de sulco neural (destaque), região cefálica (CE) e caudal (CA). Barra: 0,25 mm.

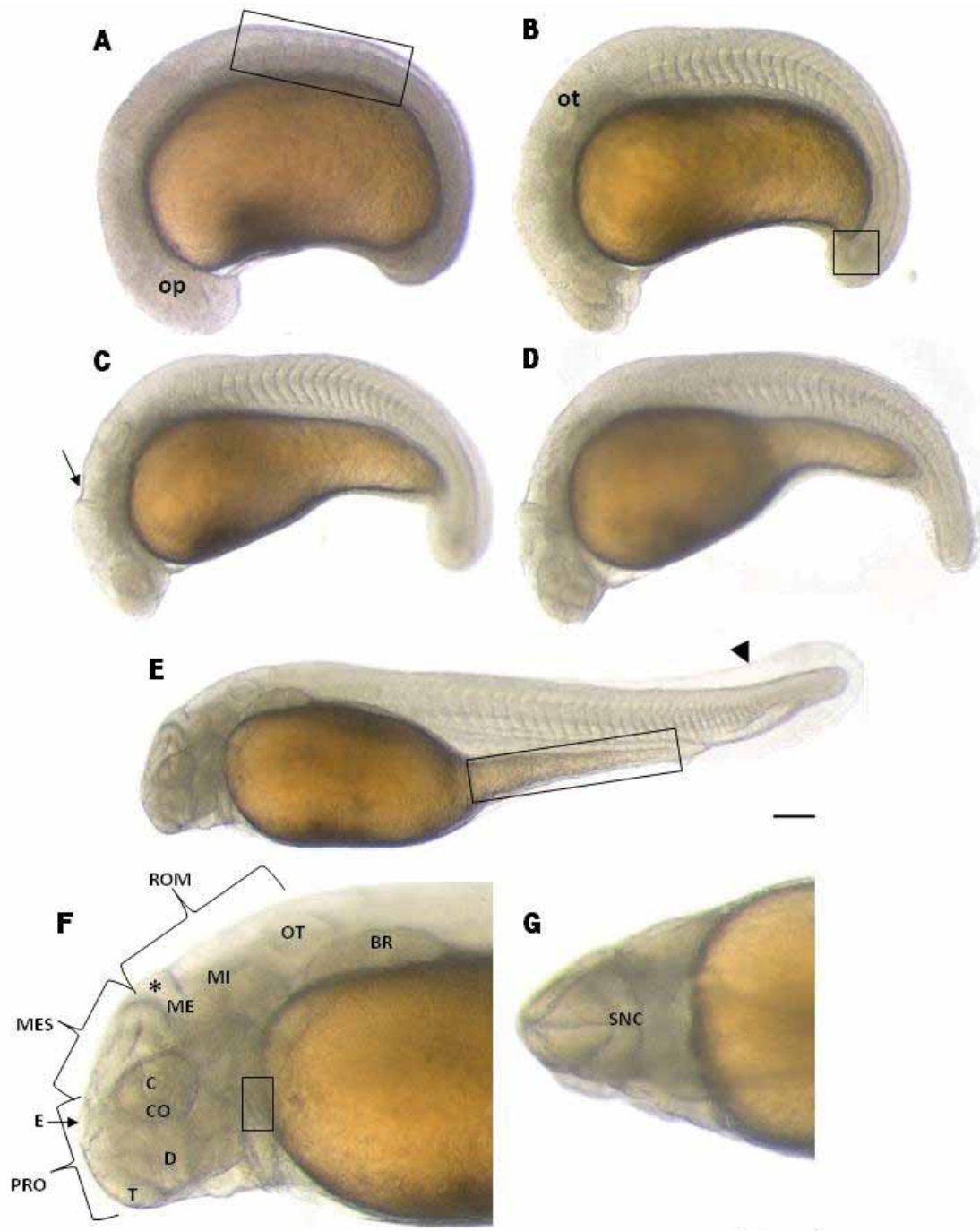


Fig. 4. Morfologia externa de embriões (A - D) e larvas (E, F e G) de *B. gouldingi*. 9 hpf: A: primeiros somitos (destaque) e vesícula óptica (OP). **10 hpf: B:** vesícula ótica (OT) e vesícula de Kupffer (destaque). **11 hpf: C:** tubo neural (→). **12 hpf: D:** alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal. **14 hpf: E:** eclosão da larva evidenciando nadadeira embrionária (▼) e apêndice tubular no vitelo (destaque); **F:** região cefálica da larva eclodida - cálice óptico (CO), cristalino (C), coração (destaque), vesícula ótica (OT), protuberância de onde surgirão os arcos braquiais (BR), epífise (E) e sistema nervoso central com distinção das três vesículas primárias, prosencéfalo (PRO) subdividido em telencéfalo (T) e diencéfalo (D) mesencéfalo (MES) e rombencéfalo (ROM) subdividido em metencéfalo (ME), que originará o cerebelo (*), e mielencéfalo (MI); **G:** vista dorsal da larva eclodida destacando-se o sistema nervoso central (SNC). Barra: A-E= 0,25 mm; F e G= 0,2 mm.

No momento da eclosão, o comprimento total das larvas foi de $3,40 \pm 0,07$ mm, enquanto no momento da absorção total do vitelo atingiu $6,68 \pm 0,65$ mm, verificando-se que o comprimento total das larvas aumentava continuamente com o decorrer do desenvolvimento e à medida que o vitelo era absorvido (**Fig. 5**). Após a eclosão (14 hpf), o volume do saco vitelínico das larvas de *B. gouldingi* diminuiu atingindo $0,46 \pm 0,08$ μ L, no momento da eclosão, para $0,42 \pm 0,06$ μ L às 13 hpe e, após isso, verificou-se uma diminuição acentuada até 45 hpe, quando apresentou volume de $0,03 \pm 0,05$ μ L. Com 52 hpe, o volume do saco vitelínico era quase inexistente ($0,01 \pm 0,01$ μ L), apresentando valor zero às 55 hpe (**Fig. 5**).

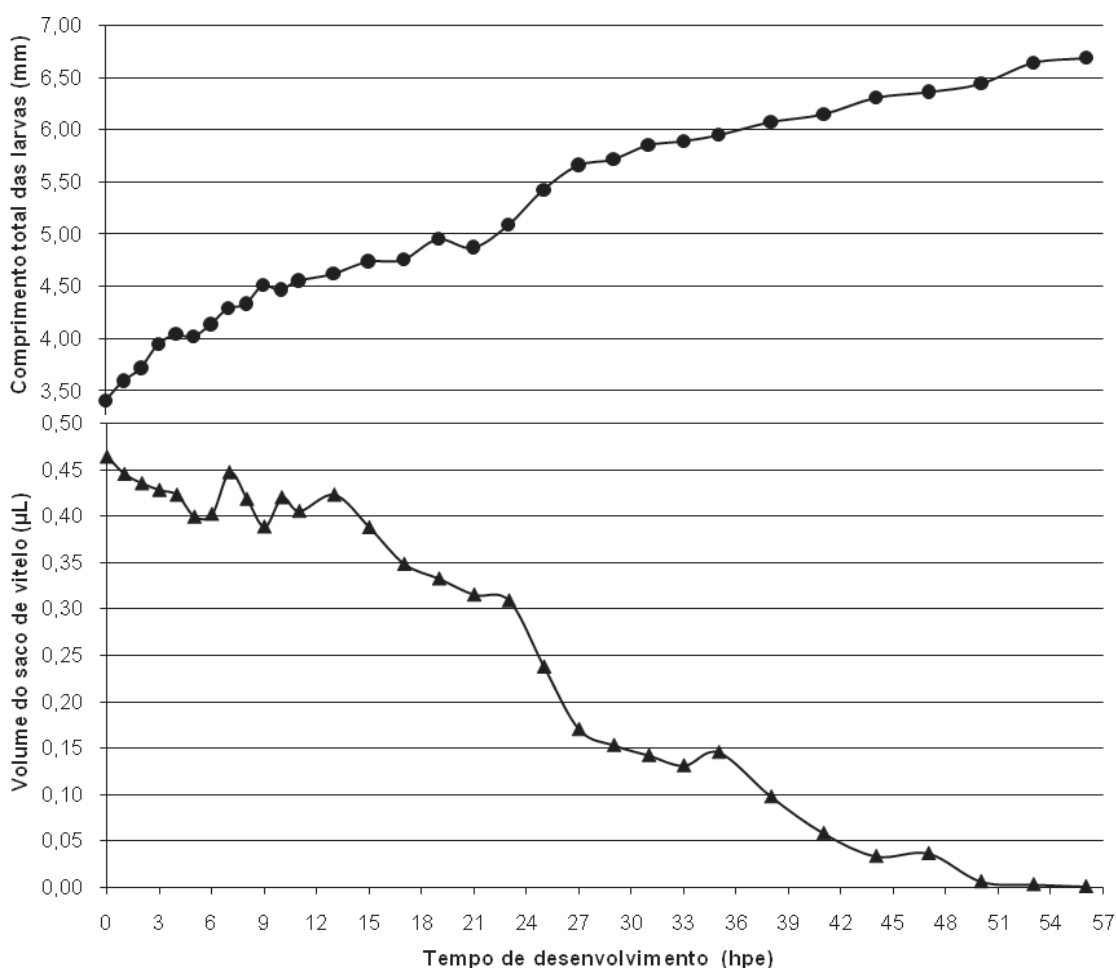


Fig. 5. Comprimento total e volume do saco vitelínico das larvas de *B. gouldingi* a partir da eclosão até a absorção total do vitelo.

Durante o desenvolvimento larval de *B. gouldingi* (desde a eclosão da larva até a absorção do vitelo), 55 horas pós-eclosão (hpe), pôde-se registrar o desenvolvimento de

estruturas como olhos, arcos branquiais, boca e também o consumo de larvas forrageiras. A classificação das larvas nas fases de desenvolvimento seguiu de acordo com Nakatani et al. (2001), que caracterizam o estágio larval vitelínico desde o momento da eclosão até o início da alimentação exógena (abertura do ânus e da boca) e pré-flexão entre o início da alimentação exógena até o início da flexão da região terminal da notocorda. A **Tabela 2** mostra tais características observadas durante a fase larval.

Tabela 2. Características estruturais do desenvolvimento larval de *B. gouldingi* desde o momento da eclosão da larva até absorção do vitelo de acordo com o tempo de desenvolvimento (em horas pós-eclosão= hpe).

Tempos (hpe)	Fases	Descrição
2.0	Larval vitelínico	Início da pigmentação dos olhos na região do cálice óptico.
7.0	Larval vitelínico	Visualização do esboço de um arco branquial. Início do desenvolvimento da membrana branquiostegial. Início da abertura da boca.
10.0	Larval vitelínico	Visualização do esboço de dois arcos branquiais e maior desenvolvimento da membrana branquiostegial.
12.0	Larval vitelínico	Cabeça desprendida do vitelo com posição ventral. Abertura da boca. Pigmentação dos olhos em todo o cálice óptico e cristalino.
16.0	Larval vitelínico	Coração visível. Presença de melanóforos dendríticos na região do tubo digestivo. Surgimento do botão da nadadeira peitoral.
18.0	Larval vitelínico	Cabeça em posição semiventral.
24.0	Larval vitelínico	Cabeça em posição final (terminal).
32.0	Pré-flexão	Visualização dos dentes. Maior distribuição de melanóforos na região do tubo digestivo. Consumo de larvas forrageiras.
34.0	Pré-flexão	Consumo de larvas forrageiras.
40.0 – 52.0	Pré-flexão	Consumo de larvas forrageiras. Excreção de material fecal.
55.0	Pré-flexão	Absorção total do vitelo.

Com 2 hpe, as larvas apresentavam comprimento total de $3,71 \pm 0,09$ mm e volume do saco vitelínico de $0,44 \pm 0,03$ μ L sendo observado o início da pigmentação dos olhos da larva primeiramente na região do cálice óptico. Visualizou-se também o tubo digestivo reto, longo, não-funcional, curvando-se dorsoventralmente em sua região posterior desembocando no local onde se formará o ânus (**Fig. 6A**).

Com 7 hpe, o comprimento total das larvas era de $4,29 \pm 0,12$ mm e volume de vitelo de $0,45 \pm 0,06$ μ L. A pigmentação dos olhos tornou-se distribuída por todo o cálice óptico, sendo possível visualizar também o esboço do primeiro arco branquial, além da membrana branquiostegial que futuramente, cobrirá os arcos braquiais (**Fig. 6B**). Foi possível observar também o início da abertura da boca. Às 10 hpe, quando as larvas apresentavam comprimento total de $4,46 \pm 0,17$ mm e volume de vitelo de $0,42 \pm 0,05$ μ L, eram visíveis os esboços de dois arcos braquiais, assim como o desenvolvimento da membrana branquiostegial que recobria parte destes arcos (**Fig. 6C**). Com 12 hpe, a cabeça começava a se deslocar para atingir sua posição final (terminal) e as larvas atingiram comprimento total de $4,62 \pm 0,10$ mm com volume de vitelo de $0,42 \pm 0,06$ μ L. A pigmentação dos olhos era mais intensa, ocorrendo tanto na vesícula óptica quanto no cálice óptico (**Fig. 6D**). A boca encontrava-se aberta.

Às 16 hpe, notou-se a presença de melanóforos dendríticos na parte superior e inferior do tubo digestivo. O primórdio da nadadeira peitoral e o coração eram visíveis (**Fig. 7A**). As larvas apresentavam $4,75 \pm 0,27$ mm de comprimento total com volume de vitelo de $0,35 \pm 0,06$ μ L. Com 18 hpe, a cabeça encontrava-se em posição semiventral (**Fig. 7B**). O comprimento total das larvas perfazia $4,95 \pm 0,15$ mm e o volume do saco vitelínico $0,33 \pm 0,04$ μ L.

Com 24 hpe, a cabeça encontrava-se em sua posição final (terminal) (**Fig. 7C**), com larvas apresentando um comprimento total de $5,42 \pm 0,41$ mm e volume de saco vitelínico de $0,24 \pm 0,06$ μ L, e às 32 hpe, foi constatada a presença de dentes orais e o corpo apresentava uma maior distribuição de melanóforos na região do tubo digestivo. Neste momento, as larvas estavam com $5,89 \pm 0,27$ mm de comprimento total e $0,13 \pm 0,09$ μ L de volume de saco vitelínico (**Fig. 7D**).

O fornecimento de larvas forrageiras às larvas de *B. gouldingi* (como fonte de alimentação exógena) ocorreu por volta de 24 hpe e o seu consumo foi registrado em vários momentos, a partir de 32 hpe, como registrado nas **Fig. 8A** (37 hpe), **8B** (40 hpe) e **8C** (52 hpe). Às 40 hpe, visualizou-se também a excreção de material fecal e as larvas alcançavam um comprimento total de $6,14 \pm 0,29$ mm com volume de vitelo de $0,06 \pm 0,05$ μ L (**Fig. 8B**). O consumo de larvas forrageiras iniciou-se quando larvas de *B. gouldingi* ainda possuíam saco

vitelínico, indicando uma sobreposição de alimentação endógena e exógena. Com 52 hpe, a presença de material digerido no intestino da larva era bem evidente (**Fig. 8C**).

Certamente, a presença de olhos bem desenvolvidos e pigmentados, a ampla abertura da boca repleta por dentes e a capacidade de dilatação do abdome foram essenciais para captura das presas. A diminuição do saco vitelínico pôde ser observada ao longo do desenvolvimento das larvas de *B. gouldingi*, e às 55 hpe, o vitelo havia sido absorvido (**Fig. 8D**). A absorção do vitelo ocorreu primeiramente com o desaparecimento do apêndice tubular no sentido postero-anterior, seguindo para a redução do vitelo em ambos os sentidos: postero-anterior e ântero-posterior.

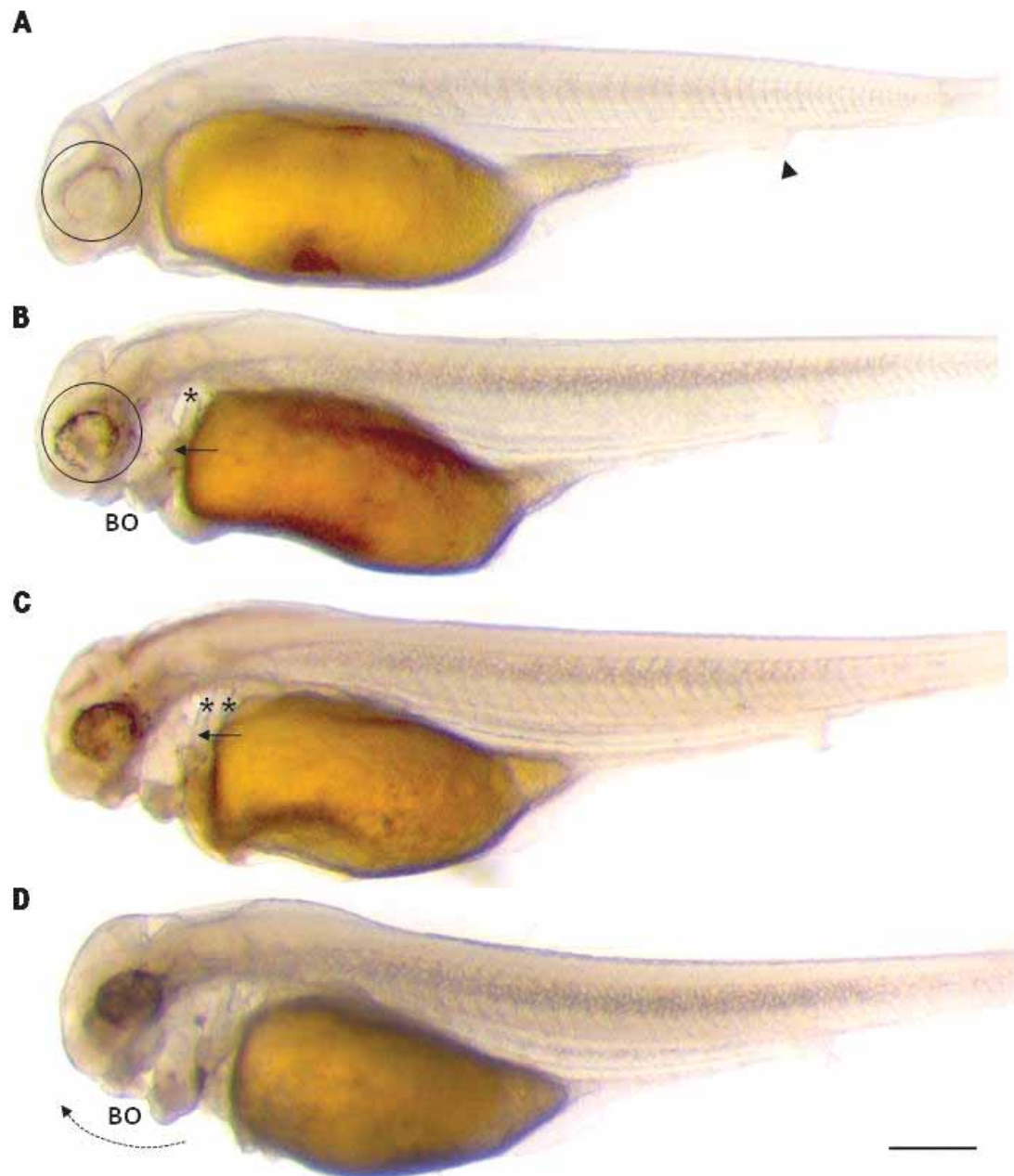


Fig. 6. Morfologia externa das larvas de *B. gouldingi*. 2 hpe: **A**: início da pigmentação dos olhos (círculo), canal do ânus (▲). 7 hpe: **B**: pigmentação mais intensa dos olhos (círculo), esboço dos arcos branquiais (*), membrana branquiostegial (→) e início da abertura da boca (BO). 10 hpe: **C**: arcos branquiais (*) e membrana branquiostegial (→). 12 hpe: **D**: cabeça em posição ventral (seta pontilhada) e abertura da boca (BO). Barra: 0,5 mm.



Fig. 7. Morfologia externa das larvas de *B. gouldingi*. 16 hpe: **A:** pigmentação restrita à região ventral do corpo (destaque), primórdio da nadadeira peitoral (→), coração (círculo), deslocamento da cabeça (seta pontilhada), canal do ânus (▲). 18 hpe: **B:** canal do ânus (▲), cabeça em posição semiventral (seta pontilhada). 24 hpe: **C:** cabeça em posição final (retilínea). 32 hpe: **D:** pigmentação mais intensa do corpo (destaque) e presença de dentes na boca. Barra: 0,5 mm.



Fig. 8. Morfologia externa das larvas de *B. gouldingi*. A: 37 hpe; B: 40 hpe; C: 52 hpe; D: 55 hpe. A, B, C - olhos da larva forrageira ingerida (círculo); B: excreção de material fecal (→); C: dilatação do abdome e ampla abertura da boca; D: vitelo absorvido. Barra: 0,5 mm.

DISCUSSÃO

O diâmetro dos ovócitos de *B. gouldingi*, com média de $1,13 \pm 0,06$ mm, é considerado pequeno e típico de espécies migradoras, com desova total, de fecundação externa e sem cuidado parental (Vazzoler, 1996). O valor apresentado foi similar ao observado para outras espécies do mesmo gênero como *Brycon cephalus* (Romagosa et al. 2001 e *Brycon orbignyanus* (Ganeco et al. 2008).

Segundo Falk-Petersen (2005), o tempo de duração dos eventos durante o desenvolvimento dos teleósteos é influenciado por fatores genéticos, como tamanho do ovo (saco vitelínico), e por fatores ambientais, principalmente temperatura de incubação.

O tamanho do saco vitelínico interfere no tempo de desenvolvimento, pois larvas com maior quantidade de reservas endógenas dispõem de um período mais longo para se adaptar à captura de alimentos externos enquanto são sustentadas pelas reservas do saco vitelínico (Blaxter, 1969; Woynarovich e Horváth, 1983; Gisbert et al. 2000; Bonislawski et al. 2004).

A observação de uma temperatura mais elevada culminando num tempo de desenvolvimento embrionário menor, no presente estudo, confirma o fato do desenvolvimento dos teleósteos ser muito sensível à temperatura. Bonislawski et al. (2004) observaram, em *G. cernuus*, que diferentes tipos de temperatura de incubação afetam diretamente na duração de cada fase da embriogênese.

Ninhaus-Silveira et al. (2006), ao estudarem *Prochilodus lineatus*, também constataram a sensibilidade da espécie à temperatura, pois observaram que a eclosão das larvas ocorreu após 22 horas de desenvolvimento à temperatura de 24°C e com 14 horas de desenvolvimento à 28°C. Faustino et al. (2007) encontraram, para híbrido de *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*, um desenvolvimento de 13 horas à 28/29°C e de 14 horas à 27°C. Da mesma forma, Marques et al. (2008) também verificaram essa sensibilidade em relação à temperatura para *Pseudoplatystoma corruscans*, pois à 28/29°C o período embrionário foi de 13 horas, enquanto à 27°C, 18 horas.

A sequência de eventos observada durante o período de embriogênese da espécie deste

trabalho é similar à descrita para outras espécies do gênero, como *B. insignis* (Andrade-Talmelli et al. 2001), *B. cephalus* (Lopes et al. 1995; Romagosa et al. 2001), *B. orbignyanus* (Reynalte-Tataje et al. 2004) e também em outros teleósteos como híbrido de *Pseudoplatystoma corruscans* com *Pseudoplatystoma fasciatum* (Faustino et al. 2007), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira et al. 2006) e *Zungaro jahu* (Marques, 2008). Os mecanismos básicos de desenvolvimento dos teleósteos são similares, diferenciando-se apenas na cronologia dos eventos (Falk-Petersen, 2005).

As clivagens nos ovos de *B. gouldingi* ocorreram somente no pólo animal, enquanto o pólo vegetativo era constituído por vitelo. Este tipo de divisão é típico dos ovos de peixes, conhecida como meroblástica ou parcial (Balinsky, 1970). A relação nucleocitoplasmática existente no pólo animal é um estímulo para que ocorram as divisões mitóticas da clivagem para que o embrião atinja um novo equilíbrio entre núcleo e citoplasma. Durante a clivagem embrionária, o volume citoplasmático não aumenta, e o enorme volume do citoplasma zigótico é dividido cada vez mais em células menores (Gilbert, 2003). No presente estudo, este fato foi registrado, já que o número de blastômeros aumentava enquanto seu tamanho diminuía corroborando os relatos de Wourms e Evans (1974) e Marques et al. (2008).

O movimento de epibolia, no qual as células embrionárias divergiam no sentido do pólo vegetativo, caracterizou a fase de gástrula. O início da fase de histogênese e organogênese no *B. gouldingi*, ocorreu após o término da epibolia e formação do tampão vitelínico como também observado em *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli et al. 2001), *Leporinus piau* (Borçato et al. 2004), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira et al. 2006).

A vesícula de Kupffer observada nos embriões de *B. gouldingi* também foi visualizada por Hall et al. (2004) em *Gadus morhua*, Faustino et al. (2007) em híbrido *Pseudoplatystoma* spp. e por Neumann (2008) em *B. amazonicus*. Kimmel et al. (1995) estudando *Danio rerio* (zebrafish) relataram que esta vesícula apresenta-se como uma depressão no broto da cauda, sendo uma estrutura encontrada apenas em embriões de teleósteos, transitória. Recentemente, estudos mostram que esta vesícula, uma estrutura embrionária e transitória, possui fluido e cílios, os quais proporcionam um fluxo direcional sempre da direita para a esquerda,

imprescindível para a assimetria dos órgãos durante o desenvolvimento (Essner et al. 2005). Perturbações na estrutura ou motilidade dos cílios, durante a organogênese, resultam em defeitos da assimetria dos órgãos (Kramer-Zucker et al. 2005).

Durante a fase de histogênese e organogênese, ocorreu o processo de formação do tubo neural, rudimento do sistema nervoso central. Este processo é chamado neurulação e o tubo neural se origina de um sólido cordão de células da placa neural formando uma estrutura com aspecto de cordão que migra dentro do embrião fechando-se para formar o tubo (Gilbert, 2003). Segundo o autor, a porção mais anterior do tubo sofre mudanças drásticas, expandindo-se em três vesículas primárias, cérebro anterior (prosencéfalo), cérebro médio (mesencéfalo) e cérebro posterior (rombencéfalo). No *B. gouldingi*, a região anterior do tubo neural se expandiu formando estas três regiões, semelhante ao descrito em *Danio rerio* por Kimmel et al. (1995), em *Gadus morhua* por Hall et al. (2004), em *Prochilodus lineatus* por Ninhaus-Silveira et al. (2006) e por Marques et al. (2008) em *Pseudoplatystoma corruscans*.

Neste estudo, foi possível observar a epífise, derivada do diencéfalo. Esta estrutura é o primórdio da pineal (Kimmel et al. 1995) e aparece na região do teto do diencéfalo (Hall et al. 2004). Ademais, a região do primórdio do cerebelo também foi identificada em *B. gouldingi* originado do metencéfalo, porção mais anterior do rombencéfalo, conforme constatado por Kimmel et al. (1995) e Hall et al. (2004). Os autores também relatam que a vesícula ótica surge nas proximidades do rombencéfalo e que os primórdios ópticos desenvolvem-se no início da formação do prosencéfalo, na região lateral do futuro diencéfalo. A posição das vesículas ótica e ótica em *B. gouldingi* seguiu os relatos dos autores.

A maioria das larvas de peixes de água doce eclode com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados, saco vitelínico grande e nadadeira embrionária estendendo-se por todo o corpo (Nakatani et al. 2001), como observado para larvas recém-eclodidas de *B. gouldingi*. Önal et al. (2009) relataram que larvas que eclodem com grande saco vitelínico e trato digestório indiferenciado, como *B. gouldingi*, podem ser classificadas como larvas altriciais.

Assim como a espécie deste estudo, a maioria das larvas de Teleostei apresenta-se

despigmentada dando um aspecto transparente nas larvas recém-eclodias, característica importante para o animal nesta fase que está mais susceptível a predadores, havendo, com o decorrer do desenvolvimento, uma pigmentação corporal aumentada (Bone et al. 1995).

Durante o desenvolvimento larval, a presença dos órgãos sensoriais é importante para a procura de alimento e fuga de predadores (Moorman, 2001). Levando-se em consideração a função fundamental do olho na visualização e captura de presas, a rápida pigmentação desta estrutura e consequente desenvolvimento da acuidade visual é prioridade durante a fase larval.

B. gouldingi, logo após a eclosão, teve a pigmentação dos olhos iniciada progredindo de forma rápida. Segundo Ceccarelli (1997), peixes do gênero *Brycon* possuem olhos bem desenvolvidos e pigmentados, característica que indicam maior facilidade em direcionar visualmente o ataque às suas presas.

Lasker et al. (1970) citam que a pigmentação dos olhos e a abertura da boca são eventos que ocorrem simultaneamente e estão diretamente relacionados com a preparação das larvas para receberem alimentação exógena. De fato, em *B. gouldingi*, olhos e boca desenvolveram-se simultaneamente e foram imprescindíveis para a captura das presas. *B. gouldingi* apresentou-se voraz predador de larvas forrageiras a partir de 32 hpe, quando foi registrado o consumo. Um dos grandes problemas na fase larval para o gênero *Brycon*, segundo relatos na literatura (Senhorini et al. 1998; Romagosa et al. 2001), ocorre entre 32 e 36 horas pós-eclosão, momento em que as larvas iniciam o canibalismo dizimando até 95% da população. Segundo Ceccarelli (1997), é fundamental conhecer o horário apropriado para início da alimentação exógena para evitar alimentação exógena precoce, que causa prejuízo na qualidade da água, ou tardia, o que acentuaria o canibalismo com consequente baixa taxa de sobrevivência.

A presença de alimento no intestino, verificada nas larvas de *B. gouldingi* que ainda possuíam saco vitelínico, caracteriza um período de alimentação mista e este tipo de aquisição de alimento é uma característica importante para o desenvolvimento podendo ter consequências diretas no crescimento e sobrevivência, especialmente na fase terminal de absorção do vitelo (Bialezki et al. 2001). Esta sobreposição de alimentação endógena é provavelmente necessária para o desenvolvimento da habilidade de captura de alimento e aumento da eficiência digestiva

antes da exaustão das reservas endógenas (Neumann, 2008). Este fato também foi registrado para outras espécies do gênero *Brycon*, como *B. cephalus* (Lopes et al. 1995; Romagosa et al. 2001), *B. orbignyanus* (Reynalte-Tataje et al. 2004), *B. moorei* (Vandewalle et al. 2005) e *B. insignis* (Andrade-Talmelli et al. 2001).

Os dados deste trabalho são inéditos para a espécie *B. gouldingi* e poderão subsidiar questões relacionadas à produção em cativeiro, assim como embasar estudos filogenéticos e de conservação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Piscicultura Buriti – Nova Mutum/MT, na pessoa do Sr. José Mário Ribeiro Mendes e funcionários, pelo fornecimento do material biológico. À FAPESP pela Bolsa Mestrado (2007/57826-7) e ao CNPq (473712-2007-5).

REFERÊNCIAS

- Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Romagosa E, Fenerich-Verani N: **Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis* Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae).** *Bol Inst Pesca* 2001, **27(1)**: 21-27.
- Balinsky BI: **An introduction to embryology.** Philadelphia: W. B. Saunders pp. 353, 1970.
- Bialecki A, Baumgartner G, Sanches PV, Galuch AV, Luvisuto MA, Nakatani K, Cavicchioli-Makrakis M, Borges MEE: **Caracterização do desenvolvimento inicial de *Auchenipterus osteomystax* (Osteichthyes, Auchenipteridae) da bacia do rio Paraná, Brasil.** *Acta Sci* 2001, **23(2)**: 377-382.
- Blaxter JHS: **Development: eggs and larvae.** In *Fish Physiology* Edited by Hoar WS, Randall DJ, New York: Academic Press, 1969.
- Bone, Q, Marshall, NB, Blaxter, JHS. **Biology of Fishes.** 2ed. Blackie Academic & Professional, 1995. 332p.
- Bonislawska M, Korzelecka-Orkisz A, Winnicki A, Formicki K, Szaniawska D: **Morphophysiological aspects of the embryonic development of ruffe, *Gymnocephalus cernuus* (L.) under different thermal conditions.** *Acta Ichth Piscat* 2004, **34(1)**: 51-72.
- Borçato FL, Bazzoli N, Sato Y: **Embryogenesis and larval ontogeny of the “piau-gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning.** *Rev Bras Zool* 2004, **21(1)**: 117-122.

- Ceccarelli PS: **Canibalismo em larvas de matrinxã, *Brycon cephalus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista – UNESP: Botucatu. 1997.
- Ceccarelli, PS, Senhorini, JA, Volpato, GL: **Dicas em piscicultura: perguntas e resposta**. Botucatu: Santana Gráfica Editora, 2000. 247p.
- Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ: **Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut**. *Development* 2005, **132**: 1247-1260.
- Falk-Petersen IB: **Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish**. *Fish Shell Immunol* 2005, **19**: 397-412.
- Faustino F, Nakaghi LSO, Marques C, Makino LC, Senhorini JA: **Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* X cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*)**. *Acta Sci* 2007, **29**(1): 49-55.
- Faustino F, Nakaghi LSO, Marques C, Ganeco LN, Makino LC: **Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids**. *Int J Dev Biol* 2010, **54**: 723-730.
- Ganeco LN, Franceschini-Vicentini IB, Nakaghi LSO: Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. *Zygote* 2008, **17**: 93-99.
- Gilbert SF: **Biologia do Desenvolvimento**. Quinta edição. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003, 962p.
- Gisbert E, Williot P, Castelló-Orvay F: **Influence of egg size on growth and survival to early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions**. *Aquaculture* 2000, **183**: 83-94.
- Hall TE, Smith P, Johnston IA: **Stages of Embryonic Development in the Atlantic Cod *Gadus morhua***, *Journal Morphol* 2004, **259**: 255-270.
- Howes, G. **Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei)**. *Bulletin of the British Museum Natural History (Zoology)* 1982, **43**(1): 1-47.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Bacia Tocantins-Araguaia. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pndpa/>. Acesso em: 3 set. 2007.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B: **Stages of embryonic development of the zebrafish**. *Dev Dyn* 1995, **203**: 253-310.
- Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF, Drummond IA: **Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis**. *Development* 2005, **132**: 1907-1921.
- Lasker R, Feder HM, Theilacker GH, May RC: **Feeding, growth and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory**. *Mar Biol* 1970, **5**: 345-353.
- Lima FCT: ***Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage**. *Ichthyol Expl Freshwaters* 2004, **15**(3): 279-287.

- Lopes RNM, Senhorini JA, Soares MCF: **Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869, (Pisces, Characidae).** *Bol Tec CEPTA* 1995, **8**: 25-39.
- Marques C, Nakaghi LSO, Faustino F, Ganeco LN Senhorini JA: **Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy.** *Zygote* 2008, **16**: 333-342.
- Marques C: **Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de jaú (*Zungaro jahu*).** 2008. 89p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2008.
- Matkovic M, Cussac VE, Cukier M, Guerrero GA, Maggese MC: **Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae). I. Segmentación, morfogénesis y organogénesis temprana.** *Rev Bras Biol* 1985, **45**(1/2): 39-50.
- Moorman SJ: **Development of sensory system in zebrafish (*Danio rerio*).** *Institute for Laboratory Animal Resourch Journal* 2001, **42**(4): 292-298.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P. V.; Cavicchioli, M. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Maringá: EDUEM/Nupélia, 2001, 359p.
- Neumann E: **Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae).** Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2008.
- Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Azevedo A: **Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae).** *Zygote* 2006, **14**: 217-229.
- Önal U, Çelik I, Cirik S: **Histological development of digestive tract in discus, *Symphysodon* spp. larvae.** *Aquacult Int*, 2009, **23**(4): 321-333.
- Reynalte-Tataje D, Zaniboni-Filho E, Esquivel JR: **Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae).** *Acta Sci* 2004, **26**(1): 67-71.
- Romagosa E, Narahara MY, Fenerich-Verani N: **Stages of embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae).** *Bol Inst Pesca* 2001, **27**(1): 29-32.
- Senhorini JA, Mantelatto FLM, Casanova SMC: **Growth and survival of larvae of Amazon species “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae), in larviculture ponds.** *Bol Tec CEPTA* 1998, **11**: 13-28.
- Shand J: **Ontogenetic changes in retinal structure and visual acuity: a comparative study of coral-reef teleosts with differing post-settlement lifestyles,** *Env Biol Fish* 1997, **49**: 307-322.
- Vandewalle P, Germeau G, Besancenet P, Parmentier E, Baras E: **Early development of the head skeleton in *Brycon moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae).** *J Fish Biol* 2005, **66**: 996-1024.
- Vazzoler AEM: **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM. 1996. 169 p.

Wourms JP, Evans D: **The embryonic development of the black prickleback, *Xiphister atropurpureus*, a Pacific Coast blennioid fish.** *Can J Zool* 1974, 52: 879-887.

Woynarovich E, Horváth L: **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão.** Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 1983. 225p.

Woynarovich E, Sato Y: **Special rearing of larvae and post-larvae of matrinxã (*Brycon lundii*) and dourado (*Salminus brasiliensis*).** In *Workshop on larval rearing of finfish* Edited by Harvey B, Carosfeld J, 1990.

ARTIGO II

Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspectos do desenvolvimento embrionário de uma nova espécie de peixe com potencial para aquicultura*F. Faustino, L. S. O. Nakaghi and E. Neumann**Submissão do artigo: *Zygote* (Impact Factor 1,067)**RESUMO**

Brycon gouldingi é uma espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, fonte de alimento para comunidades ribeirinhas e torna-se importante para a aquicultura com produção em cativeiro. Informações acerca da morfologia inicial de *B. gouldingi*, espécie recentemente descrita, são inexistentes, sendo realizada, neste estudo, a análise do processo de fertilização e do desenvolvimento embrionário sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Após captura dos exemplares provenientes do Rio das Mortes – Mato Grosso, Brasil, adaptação em cultivo e reprodução induzida na Piscicultura Buriti, Nova Mutum - Mato Grosso, Brasil, nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008, foram realizadas coletas de amostragens em momentos pré-definidos desde a extrusão dos ovócitos até a eclosão da larva que ocorreu, em média, com $13,9 \pm 0,06$ horas pós-fertilização (hpf). No momento da extrusão, os ovócitos apresentavam formato levemente ovóide com presença de micrópila única em cada ovócito, com canal micropilar em forma de funil e vestíbulo repleto de pregas longitudinais, característico do gênero *Brycon*. Caracterizou-se o desenvolvimento embrionário do *B. gouldingi* em sete fases com características peculiares: zigoto (desde a fertilização até formação da célula-ovo), clivagem (divisões celulares), mórula (células embrionárias arrançadas em forma de “meia amora”), blástula (células embrionárias em forma de cúpula, sem identificação nítida dos limites celulares.), gástrula (movimentação celular), histogênese e organogênese (formação de tecidos e órgãos) e eclosão (ruptura do córion pela larva). Ao eclodirem, as larvas apresentaram-se sem capacidade natatória e sem acuidade visual, com o tubo digestivo ainda indiferenciado. As informações biológicas de *B. gouldingi* fornecidas pelo presente trabalho são inéditas para elucidar diversas questões, especialmente relacionadas à taxonomia, ecologia, conservação e criação em cativeiro desta nova espécie de peixe.

Running title: Embriogênese de *Brycon gouldingi***Key-words:** *Brycon*, microscopia, ovos, embriões, ultraestrutura.

INTRODUÇÃO

A família Characidae é a maior e mais complexa dentre os Characiformes e engloba um número de espécies maior que de todas as demais famílias desta ordem (Howes, 1982; Nakatani *et al.*, 2001), compreendendo um grande número de subfamílias com características bem distintas uma das outras. A subfamília Bryconinae compreende muitas espécies de porte mediano a grande. Estas espécies têm ampla distribuição pela América do Sul e em parte da América Central (Britski *et al.*, 1999).

Peixes do gênero *Brycon*, por serem de piracema (reofílicos) e dependentes de alimentação alóctone, como frutos e sementes, são muito prejudicados com a construção de barragens e desmatamento da mata ciliar nos rios (Castagnolli, 1992). Segundo o IBAMA (2009), o gênero *Brycon* consta da Lista de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção. Entre elas: *Brycon devillei*, *Brycon insignis*, ambos conhecidos como piabanha, *Brycon nattereri*, vulgarmente chamado pirapitinga, *Brycon opalinus*, denominado também pirapitinga ou pirapitinga-do-sul, *Brycon orbignyanus*, chamado piracanjuba, picaranjuva ou bracanjuba, *Brycon vermelha*, conhecido como vermelha.

De acordo com Junk & Nunes de Mello (1990), a construção de represas nos rios representa impacto fundamental na perda de espécies da fauna e flora, algumas ainda desconhecidas pela ciência ou pouco estudadas, como é o caso de *Brycon gouldingi*, fonte de estudo desta pesquisa.

É uma espécie que foi recentemente descrita por Lima (2004) como endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, cuja alimentação é baseada em frutos e insetos, vive em ambiente bentopelágico de água doce, em clima tropical. Na literatura, ainda não há relatos acerca desta espécie que vem sendo fonte de alimento para comunidades ribeirinhas e também criada em cativeiro (comunicação pessoal).

De acordo com Lima (2004), esta espécie é caracterizada por possuir o quinto osso infra-orbital mais alto que largo, com listras estreitas longitudinais e sinuosas (não-retas) ao

longo do corpo, nadadeiras peitorais e pélvicas escurecidas, distinta mancha em forma de V no pedúnculo caudal e nadadeira caudal, e cerca de 66-82 escamas na linha lateral.

O sucesso no cultivo de uma espécie de peixe depende da compreensão de sua biologia inicial por trazer informações imprescindíveis para a produção em massa em laboratório (Matkovic *et al.*, 1985). 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).

No Brasil, encontram-se pesquisas realizadas com *Rhamdia hilarii* (Godinho *et al.*, 1978), *Prochilodus lineatus* (Castellani *et al.*, 1994), *Colosoma macropomum* (Albuquerque *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1995), *Piaractus mesopotamicus* (Ribeiro *et al.*, 1995), *Pseudoplatystoma coruscans*, (Cardoso *et al.*, 1995), *Brycon cephalus* (Lopes *et al.*, 1995; Romagosa *et al.*, 2001), *Pimelodus maculatus* (Luz *et al.*, 2001), *Brycon orbignyanus* (Nakatani *et al.*, 2001) e *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001).

Recentemente, pesquisas com *Brycon orbignyanus* (Maciel, 2006; Ganeco *et al.*, 2008), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006), *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (Nakaghi *et al.*, 2006; Sampaio, 2006), híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum* (Faustino *et al.*, 2007), *Brycon amazonicus* (Neumann, 2008), *Pseudoplatystoma corruscans* (Landines *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2008), *Zungaro jahu* (Marques, 2008).

O conhecimento dos aspectos básicos do desenvolvimento embrionário dos peixes é especialmente importante para a filogenética, biologia, produção. Não havendo estudos dedicados ao *B. gouldingi*, esta pesquisa teve a finalidade de proporcionar informações a respeito da estrutura e ultraestrutura dos ovócitos e desenvolvimento embrionário desta espécie com potencial para aquicultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas dez coletas nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008, na Piscicultura Buriti, Nova Mutum, estado do Mato Grosso, Brasil, após a reprodução induzida de exemplares de *B. gouldingi* provenientes do Rio das Mortes - MT e adaptados em cativeiro por cerca de sete meses.

Dez fêmeas da espécie tiveram seus descendentes (geração F1) analisados, considerando-se cada desova uma repetição. Seguiu-se a metodologia utilizada por Woynarovich e Horváth (1983), sendo a base da nadadeira peitoral o local de aplicação do hormônio. Nas fêmeas, a primeira dose de hipófise aplicada foi de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e a segunda dose, após um intervalo de 10 horas, de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$. A dose única dos machos foi de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, no momento da segunda dose das fêmeas.

A fertilização foi realizada a seco adicionando-se sêmen aos ovócitos e, após alguns segundos, foi adicionada água, homogeneizando-os para obter a hidratação dos ovos. Em seguida, estes ovos foram suavemente lavados com água para a retirada do excesso de sêmen e cada lote experimental foi individualizado em incubadoras cônicas de fibra de vidro, com capacidade de 200 litros e renovação de água de 6 L.s^{-1} .

As amostragens ocorreram nos momentos de liberação dos ovócitos (extrusão), fertilização (tempo zero), nos tempos 10, 20 e 30 segundos, 1min, 1min e 30s, a cada minuto até completar 10min, a cada 5min até atingir 45min, de hora em hora até o momento da eclosão da larva. As amostras foram fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5%) durante 24 horas. Após este período foram lavadas e transferidas para tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4 e armazenadas sob baixas temperaturas.

Este material foi transportado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal - SP. O processamento das amostras para análise em microscopia de luz foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal enquanto o processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura ocorreu no Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Microscopia de luz

Foram selecionadas amostras e processadas de acordo com a seguinte metodologia: desidratadas por 24 horas em álcool 80% e por 30 minutos cada em álcool 95% e 100%. Permaneceram, posteriormente, 4 horas na solução de pré-infiltração GMA (Glycol Methacrylate) + álcool 100% na proporção 1:1, 16 horas na etapa de infiltração (GMA). A inclusão ocorreu com GMA + endurecedor em histomoldes, sendo as amostras levadas para estufa a 50°C, por 24 horas. Os cortes semi-seriados, com 2 µm de espessura, foram obtidos em micrótomo LEICA RM2255, descartando-se 5 cortes, utilizando-se navalha de tungstênio. A coloração foi feita com Hematoxilina-Floxina (Tolosa *et al.*, 2003). A análise das lâminas e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Leica DM 5000 B utilizando o software Leica Application Suite (LAS).

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram selecionadas e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas, e lavadas novamente no mesmo tampão. A desidratação ocorreu em série crescente de álcool: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e três banhos a 100% por 7 minutos em cada concentração. Em seguida, foram levadas para Secadora de Ponto Crítico com CO₂ líquido (aparelho BAL-TEC), montadas em suporte de cobre, metalizadas com ouro (aparelho DENTON VACUM DESK II) e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

RESULTADOS

Para este estudo, foram utilizada a classificação de Faustino et al. (2010), ou seja, a expressão “ovócito” refere-se ao gameta feminino, antes da fertilização. O termo “ovo” referiu-se aos estágios compreendidos entre a fertilização até o final da gastrulação, quando então ocorre a formação do eixo embrionário passando a ser denominado "embrião". A denominação “larva” foi utilizada desde o momento da eclosão até a absorção total do vitelo.

Os ovócitos de *B. gouldingi* apresentaram formato levemente ovóide, com média do diâmetro de $1,13 \pm 0,06$ mm, e coloração verde-acinzentada no momento da extrusão. Visualizou-se uma única micrópila (região de entrada do espermatozóide) em cada ovócito (**Fig. 1A**), a qual se constituiu por canal micropilar e vestíbulo, este em forma de depressão com pregas dispostas longitudinalmente em suas paredes (**Fig. 1B**). Na análise destes ovócitos foi possível constatar a presença de alvéolos corticais de tamanhos variados na região periférica (citoplasma cortical) e córion (que confere proteção ao ovócito) (**Fig. 1C e 1D**).

O tempo de desenvolvimento embrionário de *B. gouldingi* nas dez coletas (do momento da fertilização à eclosão das larvas) foi, em média, 13,9 horas, à $26,4 \pm 1,12^\circ\text{C}$ e durante este desenvolvimento foram observadas sete fases: zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, histogênese/organogênese e eclosão, cada uma com características intrínsecas descritas a seguir:

Zigoto

Esta fase estendeu-se desde o momento da fertilização até a formação do zigoto (ou célula-ovo), com distinção dos pólos animal e vegetativo. No tempo zero (momento da homogeneização de espermatozóides e ovócitos), os espermatozóides foram observados penetrando no vestíbulo da micrópila em direção ao canal micropilar (**Fig. 2A**), sendo visíveis até 1 minuto pós-fertilização (mpf) (**Fig. 2B**). Com 30 segundos pós-fertilização (spf) já eram visíveis cones de fertilização obstruindo a entrada do canal micropilar (**Fig. 2C**), demonstrando que vários ovos estavam fecundados e protegidos da poliespermia pela formação deste tampão atravessando o canal micropilar. Estes cones mostraram-se externamente semelhante a uma estrutura esférica.

Com 1 minuto e 30 segundos pós-fertilização, os espermatozóides não era mais visualizados e os ovos apresentavam aspecto achatado devido à movimentação citoplasmática em direção ao pólo animal, sugerindo que os espermatozóides tenham fertilizado os ovócitos até este momento.

Aos 3 mpf, os ovos encontravam-se acentuadamente achatados devido à movimentação citoplasmática (**Fig. 2D**), que predefiniu os pólos animal e vegetativo, sendo que a concentração dos alvéolos corticais na região do pólo vegetativo era maior quando comparada à do pólo animal (**Fig. 2E e 2F**). Este fato permite inferir que a reação cortical (quebra dos alvéolos), em *B. gouldingi*, teve início no pólo animal seguindo em direção ao pólo vegetativo, sendo este também um bloqueio à polispermia. Com 5 mpf, não era possível visualizar os alvéolos corticais. Aos 10 mpf, a diferenciação dos pólos animal e vegetativo era bem evidente (**Fig. 2G**) e aos 45 mpf os dois pólos estavam completamente diferenciados, formando-se então a célula-ovo (**Fig. 2H**).

Clivagem

Esta fase ocorreu entre 45 mpf e 1 hora pós-fertilização (hpf), na região do pólo animal, que primeiramente foi dividido em dois blastômeros (células embrionárias) que sofreram divisão resultando em quatro blastômeros, e assim sucessivamente até o total de 32 células, sendo observado um número cada vez maior de células de tamanho menor.

Mórula

Às 2 hpf, as sucessivas divisões celulares (característico da fase de clivagem) resultaram em camadas sobrepostas de blastômeros (superior a 64 blastômeros) arranjados em forma de “meia amora”, caracterizando a fase de mórula.

Blástula

A fase de blástula foi visualizada com 3 hpf, sendo possível distinguir as regiões da blastoderme (células embrionárias) e periblasto. Esta fase se estendeu desde o momento em que o pólo animal apresentou-se em forma de cúpula, não se identificando o limite de cada célula embrionária, até o momento em que se iniciou a movimentação celular.

Gástrula

Esta fase foi caracterizada pela movimentação celular entre 4 e 7 hpf. As **Fig. 3A e 3B** mostram as regiões da blastoderme (células embrionárias) e do periblasto no início da movimentação celular. Este primeiro movimento observado é chamado epibolia, no qual as células blastodérmicas envolvem o ovo. A partir de aproximadamente metade do ovo recoberto pelas células blastodérmicas, o segundo movimento, o de involução das células mais superficiais, teve início (**Fig. 3C**). Este movimento, chamado involução, produziu um espessamento ao longo da margem do ovo conhecido como anel germinativo (**Fig. 3D**). O movimento de involução seguiu em direção ao pólo animal, enquanto a epibolia seguiu em sentido contrário (para o pólo vegetativo), levando à formação de duas camadas: epiblasto (camada externa) e hipoblasto (camada interna), finalizando com a formação do tampão vitelínico (porção do vitelo não recoberta pelas células embrionárias) (**Fig. 3E e 3F**). Durante esta fase, constatou-se intensa divisão celular (**Fig. 3D**).

Histogênese e organogênese

A formação do eixo embrionário, assim como a diferenciação das regiões cefálica e caudal foram observadas 8 hpf (**Fig. 4A e 4B**), caracterizando-se a fase de histogênese e organogênese. Na região cefálica era visível um sulco neural (**Fig. 4B**). A visualização dos primeiros somitos ocorreu 9 hpf (**Fig. 4C, 4D e 4E**) e a notocorda também pôde ser visualizada (**Fig. 4C**). A vesícula óptica foi constatada às 10 hpf (**Fig. 4G**) e com 11 hpf, notou-se o destacamento da região caudal, o alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal (**Fig. 4H**) e início da diferenciação dos miômeros. Às 12 hpf, observou-se o desenvolvimento das placas olfatórias (**Fig. 5A e 5B**), desenvolvimento do sistema nervoso central (**Fig. 5C**) e vesícula ótica (**Fig. 5C e 5E**), além da visualização da notocorda em uma grande extensão do corpo (**Fig. 5D**). Neste momento, o cálice óptico envolvia o primórdio do cristalino (**Fig. 5F**).

Às 13 hpf, constatou-se a presença de um coração rudimentar (**Fig. 5G**), e o epitélio idêntico ao tegumento penetrava continuamente logo à frente do saco vitelínico (**Fig. 5H**), marcando o local onde ocorrerá o desenvolvimento da boca. O cristalino estava totalmente

envolvido pelo cálice óptico (**Fig. 5H**). Neste momento também foi observado o desenvolvimento do sistema nervoso central originando as três vesículas primárias: cérebro anterior (prosencefalo), cérebro médio (mesencefalo) e cérebro posterior (rombencefalo). O local de formação do cerebelo (região anterior do rombencefalo) também foi observado, assim como a epífise, derivada da região mais posterior do prosencefalo (**Fig. 5G**).

Eclosão larval

A eclosão das larvas ocorreu com 14 hpf e, neste momento, possuíam cabeça aderida à região anterior do saco vitelínico, postura distendida, (**Fig. 6A e 6B**) e ausência total de nadadeiras, havendo apenas uma nadadeira embrionária recobrindo toda a região caudal (**Fig. 6A**). Na região dorsal anterior, o sistema nervoso central encontrava-se em desenvolvimento sendo visualizado como um sulco neural (**Fig. 6C e 6E**).

As larvas possuíam o esboço dos arcos branquiais e o primórdio da membrana branquiostegial, que futuramente cobrirá tais arcos, encontrava-se em formação (**Fig. 6C**). As placas olfatórias, em forma de depressão circular rasa, encontravam-se preenchidas por pequenos cílios rudimentares (**Fig. 6D**). O trato digestório era indiferenciado, havendo apenas um epitélio demarcando o local do posterior desenvolvimento da cavidade bucofaríngea (**Fig. 6F**) reduzindo-se a uma camada simples de células acompanhando a extensão do saco vitelínico, transformando-se em várias camadas de células indiferenciadas no local onde se diferencia o intestino (**Fig. 6E**). O pronefro (rim primitivo) encontrava-se em formação, ventralmente ao intestino (**Fig. 6E**). Foi possível observar a diferenciação dos miômeros (segmento muscular) (**Fig. 6E**).

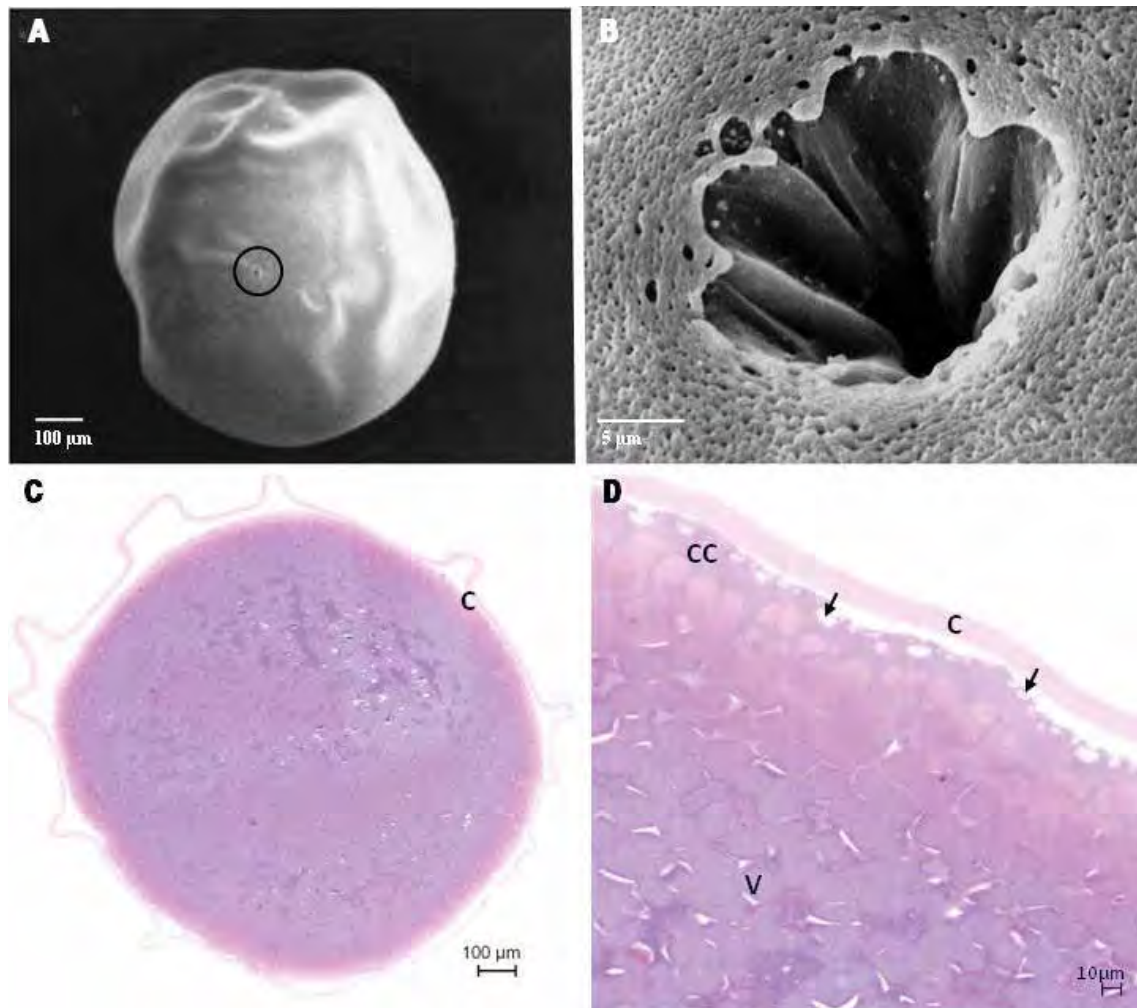


Fig. 1. Eletronmicrografias de varredura (A e B) e fotomicrografias (C e D) dos ovócitos de *B. gouldingi*. Extrusão: **A:** ovócito com micrópila (círculo); **B:** micrópila do ovócito em forma de funil com pregas longitudinais; **C:** ovócito com córion (C); **D:** ovócito com vitelo (V), citoplasma cortical (CC), alvéolos corticais (→) e córion (C).

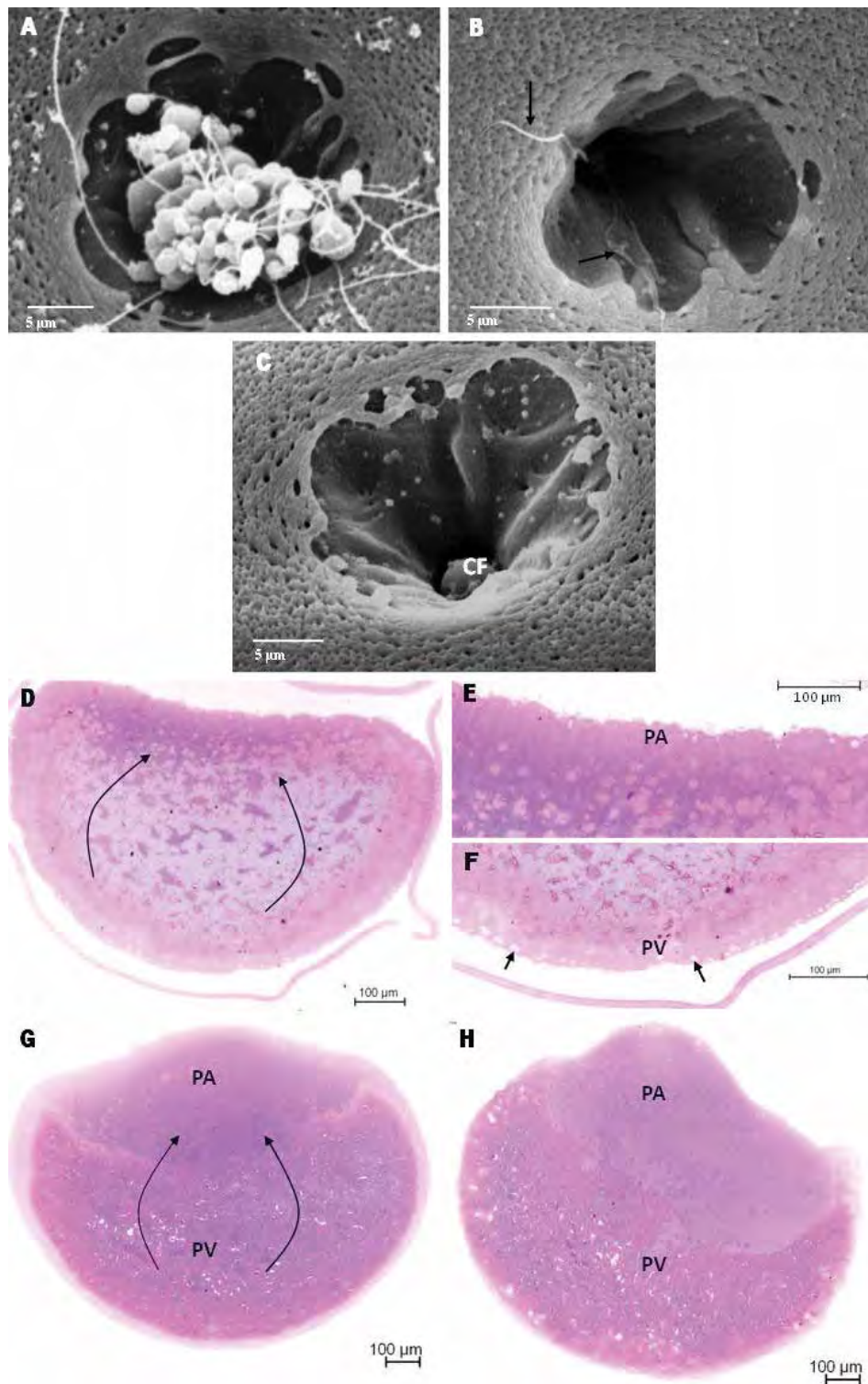


Fig. 2. Eletronmicrografias de varredura (A - C) e fotomicrografias (D - H) de ovos de *B. gouldingi*. **A:** Fertilização (tempo zero) - espermatozóides no vestíbulo da micrópila. 1 mpf; **B:** espermatozóides no vestíbulo da micrópila; 30 spf; **C:** formação do cone de fertilização (CF); 3 mpf; **D:** início da movimentação citoplasmática (setas) para definição do pólo animal e vegetativo; **E:** pólo animal (PA) do ovo; **F:** pólo vegetativo (PV) do ovo com alvéolos corticais (→). 10 mpf; **G:** movimentação citoplasmática definindo o pólo animal (PA) e o pólo vegetativo (PV). 45 mpf; **H:** completa formação do pólo animal (PA) e vegetativo (PV).

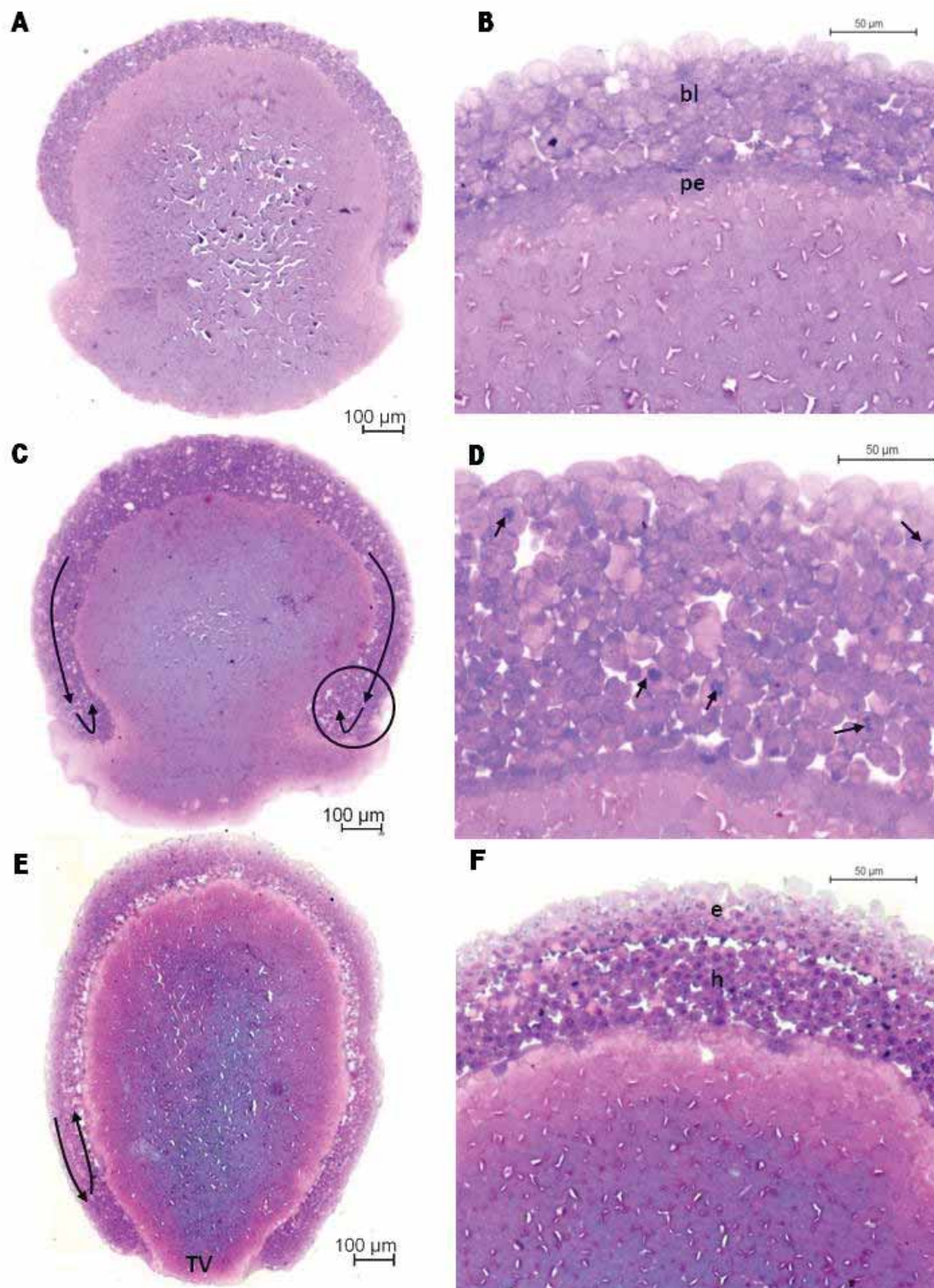


Fig. 3. Fotomicrografias de ovos de *B. gouldingi*. 4 hpf: A: início do movimento de epibolia; B: blastoderme (bl) e periblasto (pe). 6 hpf: C: movimento de epibolia (↓) e de involução (↑) com formação do anel germinativo (círculo); D: células embrionárias sofrendo várias mitoses (→). 7 hpf: E: gástrula final destacando-se os movimentos de epibolia (↓) e involução (↑) sofridos pelas células embrionárias e formação do tampão vitelínico (TV); F: formação das duas camadas: epiblasto (e) e hipoblasto (h).

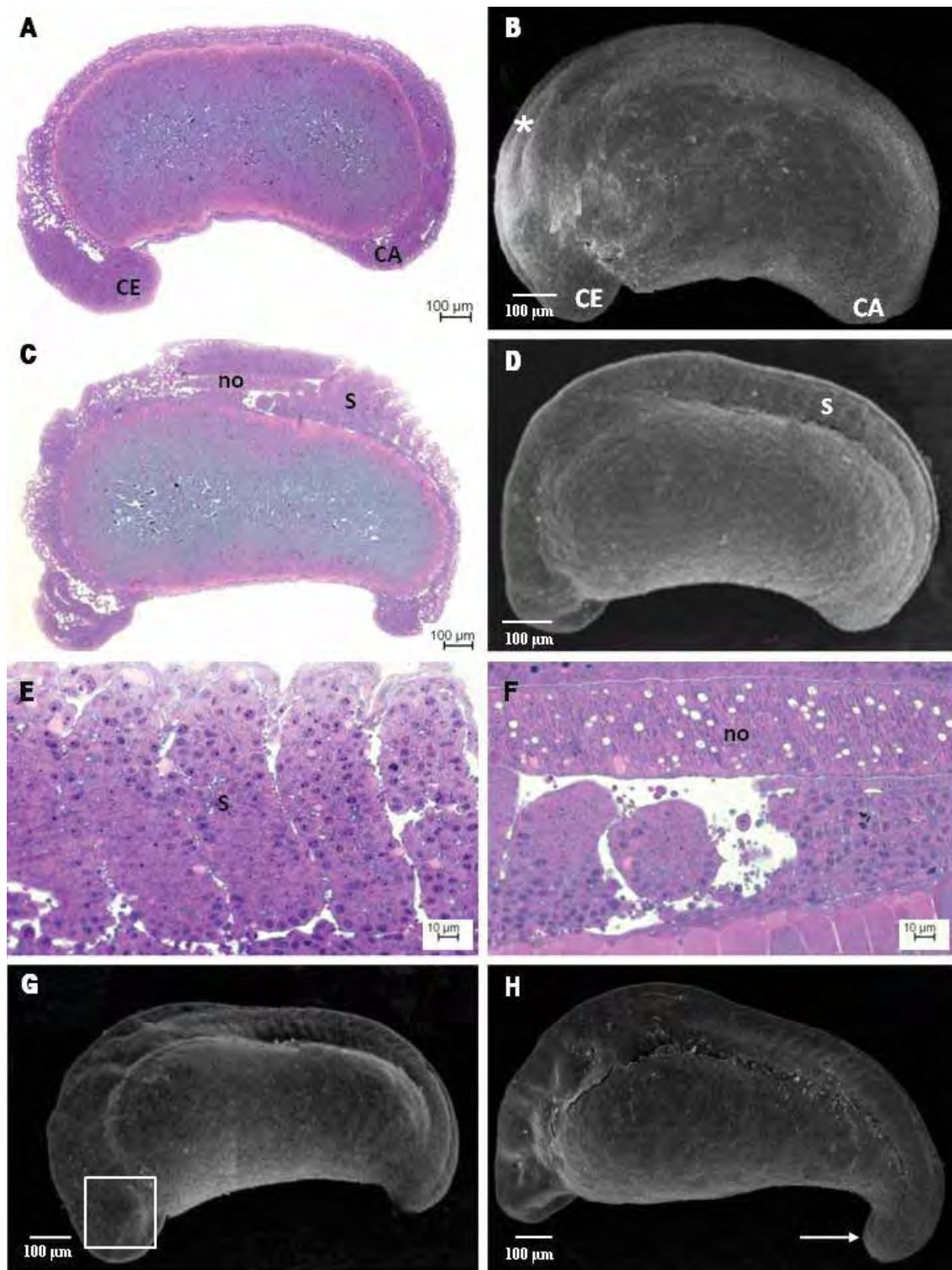


Fig. 4. Eletronmicrografias de varredura (B, D, G e H) e fotomicrografias (A, C, E, F) de embriões de *B. gouldingi*. 8 hpf: A e B: formação do eixo embrionário com diferenciação das regiões cefálica (CE) e caudal (CA) e presença do sulco neural (*); 9 hpf: C e D: observação dos primeiros somitos (S) e da notocorda (no); E: detalhe dos somitos; F: detalhe da notocorda; 10 hpf: G: vesícula óptica (destaque); H: destacamento da região caudal (seta).

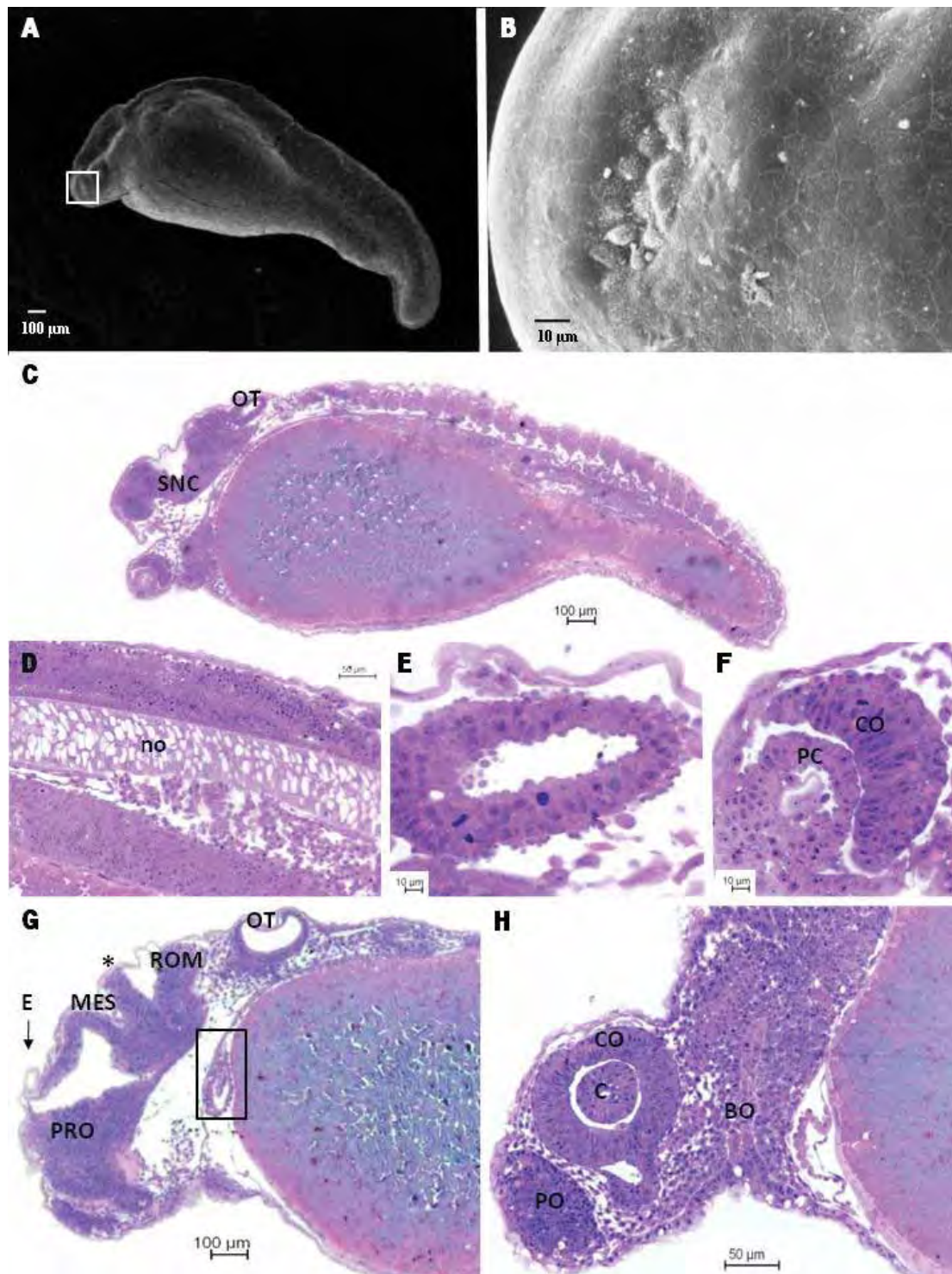


Fig. 5. Eletronmicrografias de varredura (A e B) e fotomicrografias (C - H) de embriões de *B. gouldingi*. 12 hpf (A - F) e 13 hpf (G e H): **A:** alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal e desenvolvimento das placas olfatórias (seta); **B:** placa olfatória; **C:** sistema nervoso central (SNC) e vesícula ótica (OT). **D:** notocorda; **E:** vesícula ótica; **F:** cálice óptico (CO) e primórdio do cristalino (PC); **G:** região céfálica da larva: vesícula ótica (OT), coração (destaque); sistema nervoso central com divisão em prosencéfalo (PRO), mesencéfalo (MES) e rombencéfalo (ROM), epífise (E) e primórdio do cerebelo (*); **H:** região céfálica da larva: cálice óptico (CO), cristalino (C), primórdio da boca (BO), placa olfatória (PO).

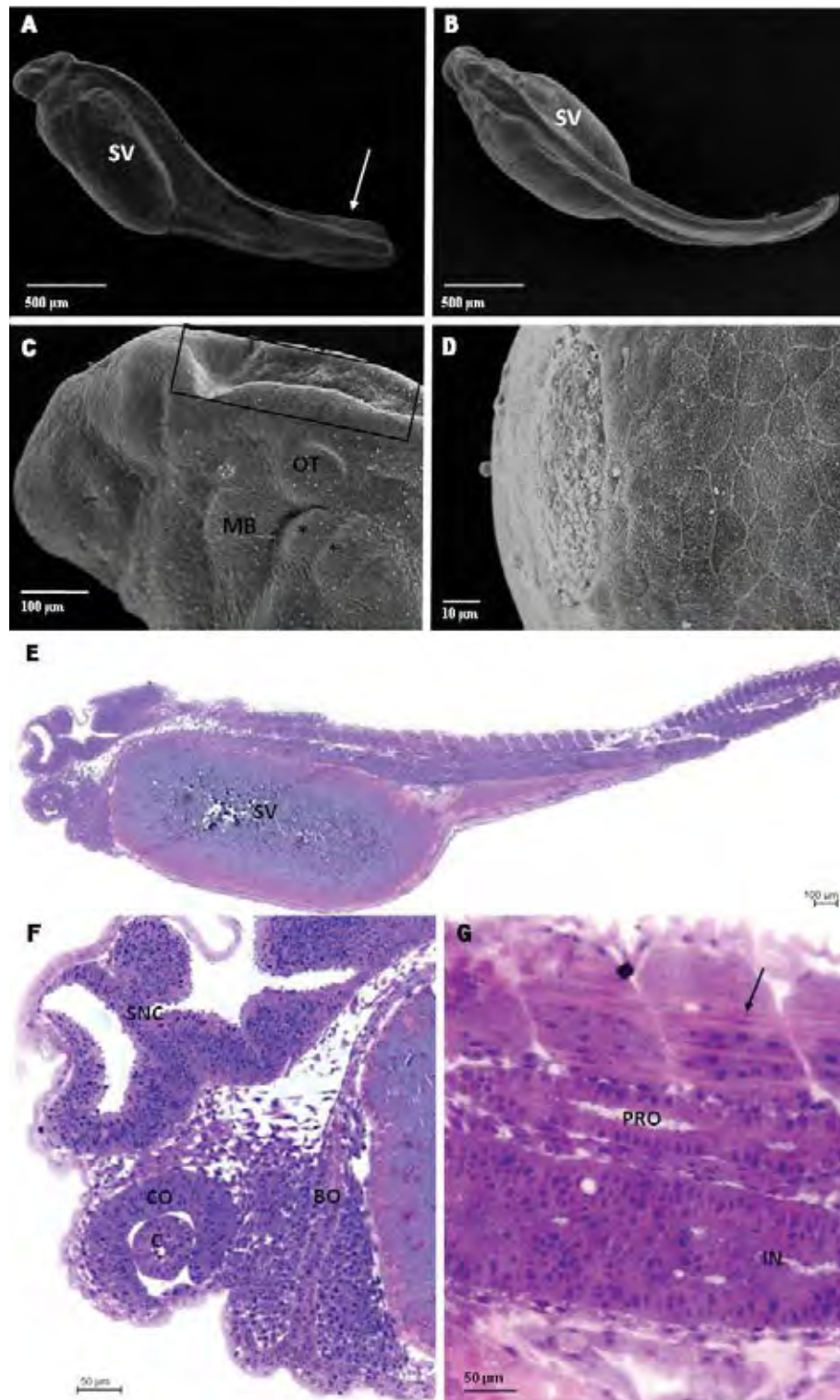


Fig. 6. Eletronmicrografias de varredura (A - D) e fotomicrografias (E - G) de larvas de *B. gouldingi*. 14 hpf: Eclosão larval. **A:** postura distendida, saco vitelínico (SV) e nadadeira embrionária (→); **B:** vista dorsal da larva eclodida com saco vitelínico (SV); **C:** região cefálica da larva eclodida com esboço dos arcos branquiais (*), vesícula ótica (OT), membrana branquiostegial (MB) e sistema nervoso central (destaque); **D:** placa olfatória preenchida por células ciliadas; **E:** postura distendida, saco vitelínico (SV); **F:** região cefálica da larva com primórdio da boca (BO), cálice óptico (CO), cristalino (C), sistema nervoso central (SNC); **G:** diferenciação dos miômeros (→), pronefro (PRO) e intestino (IN).

DISCUSSÃO

A constatação da micrópila com vestíbulo em forma de funil e a presença de sulcos em disposição retilínea, visualizada nos ovócitos de *B. gouldingi*, é uma característica reprodutiva apresentada entre as espécies do gênero *Brycon*, também constatada por Ganeco & Nakaghi (2003) e Ganeco *et al.* (2008) em *B. orbignyanus*, por Sampaio (2006) em *B. orthotaenia* e por Neumann (2008) em *B. amazonius*. A micrópila caracteriza-se como uma pequena abertura localizada no pólo animal da célula (Laale, 1980), através da qual o espermatozóide penetra no ovócito (Riehl, 1993). Segundo Rizzo & Bazzoli (1993), micrópila com forma afunilada é observada na maioria dos teleósteos e permitem a passagem de apenas um espermatozóide pela abertura interna.

Riehl (1993) e Li *et al.* (2000) afirmam que a microestrutura da micrópila é um dos critérios necessários para caracterização e identificação dos ovos de peixes. Chen *et al.* (1999) também sugerem que a micrópila é importante ferramenta na identificação de ovos e estudos filogenéticos em peixes, podendo haver diferenças entre micrópilas de espécies do mesmo gênero ou família, como um dos mecanismos para prevenir a hibridização inter-específica. Porém, estudos relatam semelhanças entre o aparelho micropilar em diferentes espécies, mostrando possíveis relações entre grupos sistemáticos (Rizzo *et al.*, 2002).

A sequência de eventos observada na embriogênese da espécie deste trabalho é similar à descrita para outras espécies do gênero, como *B. insignis* (Andrade -Talmelli *et al.*, 2001), *B. cephalus* (Lopes *et al.*, 1995; Romagosa *et al.*, 2001), *B. orbignyanus* (Landinez *et al.*, 2004; Reynalte-Tataje *et al.*, 2004) e também em híbridos de *P. corruscans* com *P. fasciatum* (Faustino *et al.*, 2007), *P. lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006) e *P. corruscans* (Marques *et al.*, 2008), diferenciando-se apenas na cronologia dos eventos.

A observação de vários espermatozoides no vestíbulo da micrópila, desde o momento da homogeneização de sêmen com os ovócitos até 1 minuto pós-fertilização (mpf) sugere que a fertilização tenha ocorrido neste intervalo. Kudo (1980) relata que o tempo entre a fusão dos gametas e a formação subsequente do cone de fertilização ocorre de forma muito rápida. O autor

afirma que este cone é composto de um material granular com poucas organelas celulares. Iwamatsu (2000) relatou que o cone de fertilização é formado por fluido perivitelínico expelido através do canal micropilar, formando uma bolha. O início da formação deste cone ocorre simultaneamente à exocitose dos alvéolos corticais (Iwamatsu & Ohta, 1981).

Logo após a fertilização, os ovos de *B. gouldingi* tornaram-se achatados. Esta característica também foi verificada por Neumann (2008) em *B. amazonicus*. A autora também relaciona este “achatoamento” à movimentação celular para formação do pólo animal. As clivagens nos ovos de *B. gouldingi* ocorreram somente no pólo animal, enquanto o pólo vegetativo era constituído por vitelo. Este tipo de divisão é típico dos ovos de peixes, conhecida como meroblástica ou parcial, por ocorrer apenas no pólo animal (Balinsky, 1970; Leme dos Santos & Azoubel, 1996).

As divisões mitóticas da clivagem ocorrem para que a relação existente entre o núcleo e citoplasma no pólo animal atinja um novo equilíbrio, ou seja, o enorme volume do citoplasma zigótico é dividido cada vez mais em células menores, enquanto o volume citoplasmático não aumenta (Gilbert, 2003). Tal fato foi visualizado em *B. gouldingi*: o número de blastômeros aumentava enquanto seu tamanho diminuía corroborando os relatos de Wourms & Evans (1974) e Castellani *et al.* (1994), sendo possível observar ocorrências destas divisões mitóticas, assim como relatado por Marques (2008).

Segundo Kimmel *et al.* (1995), o termo mais apropriado para descrever a fase de blástula seria estereoblástula, pois a blastocela não está presente havendo apenas pequenos espaços extracelulares irregulares existentes entre as células, como em *B. gouldingi*. Nesta fase, foi possível observar a diferenciação das regiões da blastoderme (células embrionárias) e do periblasto. A camada de “periblasto” (também chamada camada sincicial vitelínica) é importante, pois antes de iniciar a alimentação exógena, embrião/larva nutre-se do vitelo, que é reabsorvido constantemente via camada sincicial vitelínica (Balinsky, 1970). De acordo com Kimmel *et al.* (1995) esta camada é encontrada apenas em teleósteos, posicionando-se de forma extra-embrionária não contribuindo, portanto, para a formação do embrião.

O surgimento do periblasto também foi relatado na fase de blástula por Cardoso *et al.*

(1995) em *Pseudoplatystoma corruscans*, Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) em *Prochilodus lineatus* e González-Doncel *et al.* (2005) em *Oryzias latipes*. Porém, é importante salientar que o aparecimento desta camada foi observado na fase de mórula por Long e Ballard (1976) em *Catostomus commersoni*, por Matkovic *et al.* (1985) em *Rhamdia sapo* e por Marques (2008) em *Zungaro jahu*.

O início da movimentação celular caracterizou a epibolia (Warga & Kimmel, 1990, Leme dos Santos, 1996). Durante a gastrulação, ocorre o deslocamento das células do blastodisco, levando à diferenciação dos folhetos germinativos com separação do epiblasto e hipoblasto e também início da formação da notocorda (Stickney *et al.*, 2000). Na epibolia, o epiblasto e a camada sincicial vitelínica (periblasto) expandem-se sobre o vitelo até ocorrer o fechamento do blastóporo (Kimmel *et al.*, 1995), conforme observado em *B. gouldingi* e também em *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001), *Leporinus piau* (Borçato *et al.*, 2004), *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006).

Durante a fase de histogênese e organogênese, também conhecida como fase de somitogênese, ocorre o surgimento dos somitos, imprescindível na organização do padrão segmentar dos embriões de vertebrados, pois são estruturas que se desenvolvem em blocos de células, transitórias e precursoras musculares (Gilbert, 2003).

A observação da notocorda em *B. gouldingi* ocorreu nesta fase e segundo Gilbert (2003) é um órgão transitório cuja principal função inclui a indução da formação do tubo neural (futuro sistema nervoso central) e estabelece o eixo corporal ântero-posterior. A maior parte da notocorda degenera, mas a porção existente entre as vértebras forma o tecido dos discos intervertebrais. Segundo Falk-Petersen (2005), a notocorda é formada por células vacuoladas separadas por finas membranas celulares.

No *B. gouldingi*, a região anterior do tubo neural se expandiu formando as regiões do prosencéfalo (cérebro anterior), mesencéfalo (cérebro médio) e rombencéfalo (cérebro posterior) conforme descrito em *Danio rerio* por Kimmel *et al.* (1995), em *Gadus morhua* por Hall *et al.* (2004), em *Prochilodus lineatus* por Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) e por Marques *et al.* (2008) em *Pseudoplatystoma corruscans*. De acordo com Gilbert (2003), o cérebro anterior

subdivide-se em telencéfalo (mais anterior) e diencéfalo (mais posterior), o cérebro médio não apresenta divisão e o cérebro posterior subdivide-se em metencéfalo (mais anterior) que formará o cerebelo e mielencéfalo (mais posterior) que dará origem à medula espinhal.

Neste estudo, foi possível verificar a epífise, derivada do diencéfalo, primórdio da pineal (Kimmel *et al.*, 1995) que aparece na região do teto do diencéfalo (Hall *et al.*, 2004). O primórdio do cerebelo também foi identificado em *B. gouldingi* e, de acordo com Kimmel *et al.* (1995) e Hall *et al.* (2004), é originado do metencéfalo, porção mais anterior do rombencéfalo.

Na fase de somitogênese do embrião, surge o coração iniciando-se, assim, a formação do sistema circulatório (Langeland & Kimmel, 1997; 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 primórdio do coração visualizado na região anterior do vitelo em *B. gouldingi*, também foi constatado por Morrison *et al.* (2001); Hall *et al.* (2004), os quais relatam que o coração aparece inicialmente como um tubo simples com uma parede de cama multicelular.

Após a fase de organogênese/histogênese segue a eclosão larval. A maioria das larvas de peixes de água doce eclode com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados e saco vitelínico grande (Nakatani *et al.*, 2001), como as larvas de *B. gouldingi*. Ademais, as larvas desta espécie, ao eclodirem, apresentavam ausência de esboços das nadadeiras (uma nadadeira embrionária circundava a cauda em toda a sua extensão) e tubo digestório rudimentar sem aberturas oral e anal. Segundo Önal *et al.* (2009), larvas que eclodem com grande saco de vitelo e trato digestório indiferenciado, como *B. gouldingi*, podem ser classificadas como larvas altriciais.

As informações obtidas neste trabalho são inéditas, pois descrevem características biológicas de uma nova espécie de *Brycon* endêmica da bacia brasileira Tocantins-Araguaia, que vem despertando interesse de piscicultores para criação em cativeiro e como fonte de alimento para muitos ribeirinhos, mas cuja sobrevivência está em risco devido impacto provocado pela construção de hidrelétricas nesta bacia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Piscicultura Buriti – Nova Mutum/MT, na pessoa do Sr. José Mário Ribeiro Mendes e funcionários, pelo fornecimento do material biológico. Ao Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Laboratório de Histologia e Embriologia, e à Srta. Cláudia Aparecida Rodrigues, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica (ambos da FCAV/UNESP). À FAPESP pela Bolsa Mestrado (2007/57826-7) e ao CNPq (473712-2007-5).

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, M.O., Bezerra e Silva, J.W. & Kóvacs, G. (1994). Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. *B.Téc. DNOCS* **47/52**, 79-100.
- 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* **27**, 21-27.
- Balinsky, B. I. (1970). *An introduction to embryology*. Philadelphia: W. B. Saunders. 353p.
- Borçato, F.L., Bazzoli, N. & Sato, Y. (2004). Embryogenesis and larval ontogeny of the “piaugordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. *Rev. Bras. Zool.* **21**, 117-122.
- Britski, H.A., Silimon, K.S.S. & Lopes, B. S. (1999). Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Brasília: EMBRAPA – SPI.
- 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.* **8**, 343-346.
- Castagnolli, N. (1992). Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: FUNEP. 189p.
- Castellani, L.R., Tse, H.G., Santos, H.S., Faria, R.H.S. & Santos, M.L.S. (1994). Desenvolvimento embrionário do curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). *Rev. Bras. Ciênc. Morfol.* **11**, 99-105.
- Ceccarelli, P.S., Senhorini, J.A. & Volpato, G.L. (2000). *Dicas em piscicultura: perguntas e resposta*. Botucatu: Santana Gráfica Editora. 247p.
- Chen, K.C., Shao, K.T. & Yang, J.S. (1999). Using micropilar ultrastructure for species identification and phylogenetic inference among four species of Sparidae. *J. Fish Biol.* **55**, 288-300.

- Depêche, J. & Billard, R. (1994). Embryology in fish: a review. Paris: Société Française d'Ichtyologie. 123 p.
- Falk-Petersen, I.B. (2005). Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish & Shellfish Immunology* **19**, 397-412.
- Faustino, F., Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Makino, L. & 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 Sci.* **29**, 49-55.
- Faustino, F., Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Ganeco, L.N. & Makino, L.C. (2010). Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids. *Int J Dev Biol* **54**: 723-730.
- Ganeco L.N., Franceschini-Vicentini I.B. & Nakaghi L. S. O. (2008). Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*, *Zygote* **17**, 93-99.
- Gilbert, S.F. (2003). *Biologia do Desenvolvimento*. Quinta edição. Ribeirão Preto: FUNPEC, 962p.
- 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.* **38**, 151-156.
- 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.* **21**, 39-52.
- Hall, T.E., Smith, P. & Johnston, I.A. (2004). Stages of embryonic development in the Atlantic cod *Gadus morhua*, *J. Morphol.* **259**, 255-270.
- Howes, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bulletin of the British Museum Natural History (Zoology)* **43**, 1-47.
- Hu, N., Sedmera, D., Post, H.J. & Clark, E.B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record* **260**, 148-157.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Listas de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/list_extincao.pdf. Acesso em: 22 jul. 2009.
- Iwamatsu, T. (2000). Fertilization in fishes. In: TARIN, J. J. e CANO A. (Ed.) Fertilization in Protozoa and Metazoa Animals. (Tarín, J. J. & Cano, A. Ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 89-145.
- Iwamatsu, T. & Ohta, T. (1981). Scanning electron microscopic observation on sperm penetration in teleostean fish. *J. Exp. Biol.* **218**, 261-277.
- Junk, W.J. & Nunes de Mello, J.A.S. (1990). Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. *Estudos avançados* **4**, 126-143.

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R. & Ullmann, B. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253-310.
- Kudo, S. (1980). Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Development Growth & Differentiation* **22**, 403-414.
- Laale, W.H. (1980). The perivitelline space and egg envelopes of Bony fishes: A review. *Copeia*, **2**, 210-226.
- Landinez, M.A., Senhorini, J.A., Sanabria, A.I., Baldan, A.P. & Urbinati, E.C. (2004). Desenvolvimento embrionário e larval de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Bol. Tec. CEPTA*, **17**, 1-12.
- Langeland, J.A. & Kimmel, C.B. (1997). *Fishes*. In Embryology. Constructing the organism (Gilbert, S.F. & Raunio, A.M., eds), Sunderland, MA: Sinauer Associates, 383-407.
- Leme dos Santos, H.S. & Azoubel, R. (1996). *Embriologia comparada*. Jaboticabal: FUNEP. 189p.
- Li, Y.H., Wu, C.C.E. & Yang, J.S. (2000). Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera in Perciformes. *J. Fish Biol.* **56**, 615-621.
- Lima, F.C.T. (2004). *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **15**, 279-287.
- Long, W.L. & Ballard, W.W. (1976). Normal embryonic stages of the white suckers, *Catostomus commersoni*. *Copeia* **2**, 342-351.
- Lopes, R.N.M., Senhorini, J.A. & Soares, M.C.F. (1995). Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869, (Pisces, Characidae). *Bol. Tec. CEPTA* **8**, 25-39.
- 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* **27**, 49- 55.
- Maciel, C.M.R.R. (2006). Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignianus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa.
- Marques, C. (2008). Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de jaú (*Zungaro jahu*) Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal.
- 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* **16**, 333-342.
- Matkovic, M., Cussac, V.E., Cukier, M., Guerrero, G.A. & Maggese, M.C. (1985). Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae). I. Segmentación, morfogénesis y organogénesis temprana. *Rev. Bras. Biol.* **45**, 149-160.

- Morrison, C.M., Miyake, T. & Wright Jr., J. R. (2001). Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus*. *J. Morphol.* **247**, 172-195.
- Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Faustino, F. & Senhorini, J.A. (2006). Desenvolvimento embrionário do dourado (*Salminus brasiliensis*) por meio de microscopia eletrônica de varredura. *Bol. Tec. CEPTA* **19**, 9-19.
- 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: EDUEM/Nupélia, 359p.
- Neumann, E. (2008). Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae), Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F. & Azevedo, A. (2006). Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote* **14**, 217-229.
- Önal, U., Çelik, I. & Cirik, S. (2009). Histological development of digestive tract in discus, *Symphysodon* spp. Larvae. *Aquacult Int* (in press).
- Reynalte-Tataje, D., Zaniboni-Filho, E. & Esquivel, J.R. (2004). Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Sci.* **26**, 67-71.
- Ribeiro, C.R., Leme dos Santos, H.S. & Bolsan, A.A. (1995). Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu). *Rev. Bras. Biol.* **55**, 65-78.
- Riehl, R. (1993). Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. *Eur. Microsc. Anal.* **5**, 29-31,
- Rizzo, E. & Bazzoli, N. (1993). Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces Characiformes). *Eur. Arch. Biol.* **104**, 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.* **61**, 615-632.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y., Fenerich-Verani, N. (2001). Stages of embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca* **27**, 29-32.
- Sampaio, K.H. (2006). Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte.
- Stickney, H.L., Barresi, M.J.F. & Devoto, S.H. (2000). Somite Development in Zebrafish. *Dev. Dyn.* **219**, 287-303.
- Tolosa, E.M.G., Behmer, O.A. & Freitas Neto, A.G. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, Edusp, 240p.

- Warga, R.M. & Kimmel, C.B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* **108**, 569-580.
- Wourms, J.P. & Evans, D. (1974). The embryonic development of the black prickleback, *Xiphister atropurpureus*, a Pacific Coast blennioid fish. *Can. J. Zool.* **2**, 879-887.
- Woynarovich, E. & Horváth, L. (1983). A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 225p.
- Yelon, D. & Stainier, D.Y.R. (1999). Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **10**, 93-98.

ARTIGO III

Ultraestrutura das larvas de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): uma abordagem voltada à aquicultura**F. Faustino, L. S. O. Nakaghi, S. F. Zaiden and E. Neumann**Submissão do artigo: *The International Journal of Developmental Biology*
(Impact Factor 3,271)**RESUMO**

Brycon gouldingi, espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, foi recentemente descrita e, apesar de estar iniciando sua produção com matrizes mantidas em cativeiro e ser um peixe consumido por comunidades ribeirinhas, não foram encontradas na literatura pesquisas com esta espécie. Com o objetivo de proporcionar conhecimentos acerca da cronologia do desenvolvimento larval de *Brycon gouldingi*, foi realizado o acompanhamento acerca do período larval sob microscopia eletrônica de varredura. Após captura dos exemplares provenientes do Rio das Mortes, adaptação em cultivo e reprodução induzida na Piscicultura Buriti, Nova Mutum, Mato Grosso, Brasil, nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008, foram realizadas coletas de amostragens em momentos pré-definidos após a eclosão das larvas que ocorreu, em média, com $13,9 \pm 0,06$ horas pós-fertilização (hpf), quando apresentavam comprimento total de $3,40 \pm 0,07$ mm. Foi registrado o aparecimento de órgãos adesivos na região dorsal cefálica das larvas. O sulco neural, presente nas larvas recém-eclodidas, foi preenchido pelo desenvolvimento do sistema nervoso central. A abertura da boca foi constatada às 9 hpe e os dentes começaram a perfurar o epitélio com 23 hpe. Neuromastos foram visualizados na região cefálica da larva, especialmente ao redor das orbitais dos olhos, na porção anterior da linha lateral e por toda a extensão da linha inferior até a nadadeira caudal. As nadadeiras peitoral e caudal foram as primeiras a se desenvolver, enquanto as nadadeiras dorsal e anal apenas se delimitaram. A absorção do saco de vitelo ocorreu com 54 horas pós-eclosão (hpe), momento em que as larvas possuíam, em média, $6,68 \pm 0,65$ mm de comprimento total. Este estudo traz informações para a larvicultura desta nova espécie de *Brycon*, podendo contribuir para um melhor desempenho e produção em cativeiro.

Running title: Ultraestrutura das larvas de *B. gouldingi***Key-words:** *Brycon*, microscopia eletrônica de varredura, larvas.

INTRODUÇÃO

A espécie *Brycon gouldingi* foi recentemente descrita por Lima (2004) como endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia e ainda não há relatos sobre este peixe, que pertence à Família Characidae, maior e mais complexa dentre os Characiformes (Howes, 1982), e à Subfamília Bryconinae, que engloba espécies de porte mediano a grande, com ampla distribuição pela América do Sul e em parte da América Central (Britski *et al.* 1999).

B. gouldingi possui alimentação baseada em frutos e insetos, vive em ambiente bentopelágico de água doce, de clima tropical, e é caracterizada por possuir o quinto osso infra-orbital mais alto que largo, várias listras estreitas longitudinais e sinuosas (não-retas) ao longo do corpo, nadadeiras peitorais e pélvicas escurecidas, distinta mancha em forma de V no pedúnculo caudal e nadadeira caudal, e cerca de 66-82 escamas na linha lateral (Lima, 2004).

As espécies do gênero *Brycon* apresentam grande potencial para a aquicultura por apresentarem ótimo desempenho em cativeiro e alta qualidade e sabor da carne (Zaniboni-Filho *et al.* 2006). Ademais, têm-se intensificado estudos visando a viabilização dos peixes deste gênero não somente com vistas à piscicultura, mas também para o repovoamento em regiões onde estejam ameaçados de extinção, devido ao desmatamento ciliar, construção de barragens e poluição dos rios (Oliveira *et al.* 2004).

Durante o desenvolvimento inicial, as larvas apresentam-se como organismos distintos dos adultos, ocorrendo um processo de metamorfose com diferenciação progressiva de caracteres morfológicos até o período juvenil, quando passam a possuir características idênticas às dos adultos (Nakatani *et al.* 2001). O padrão de desenvolvimento em teleósteos reflete sua necessidade de adaptação ao ambiente (Vandewalle *et al.* 2005).

O acompanhamento descritivo da morfogênese de larvas obtidas por técnicas de reprodução artificial permite o monitoramento das diferenciações morfológicas ocorridas, fornecendo informações sobre as exigências ambientais e alimentares dos peixes durante as fases iniciais da vida. Ainda, segundo Sanches *et al.* (2001), estudos sobre a ecologia de peixes

não podem ser considerados adequados sem o conhecimento prévio do desenvolvimento inicial das espécies.

Kawamura *et al.* (2003) sugerem que o desenvolvimento de órgãos sensoriais acompanham mudanças comportamentais com importantes implicações para a ecologia e criação das espécies de peixes, pois altas taxas de mortalidade de larvas podem estar relacionadas ao estresse causado por forte agitação na água, aeração e fluxo exagerados, entre outros parâmetros da qualidade da água que atuam sobre a sensibilidade química e mecânica nas diferentes fases do ciclo de vida.

Com o intuito de propiciar informações sobre o desenvolvimento das larvas de *B. gouldingi*, especialmente sobre o conhecimento de estruturas sensoriais e relacionadas à captura de alimentos, este trabalho teve por objetivo descrever o desenvolvimento larval desta espécie, do momento da eclosão das larvas até a absorção total do vitelo, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que fornece imagens tridimensionais permitindo, assim, o acompanhar o desenvolvimento de estruturas externas das larvas.

MATERIAL E MÉTODOS

Reprodutores de *Brycon gouldingi* provenientes do Rio das Mortes – MT, Brasil, foram adaptados em cultivo por cerca de sete meses na Piscicultura Buriti, Nova Mutum - Mato Grosso, Brasil e selecionados para reprodução induzida nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008. Dez fêmeas da espécie tiveram seus descendentes (geração F1) analisados, considerando-se cada desova uma repetição.

Para a indução hormonal, seguiram-se as técnicas de Woynarovich e Horváth (1983). Nas fêmeas, a primeira dose de hipófise aplicada foi de 0,5 mg.kg⁻¹ e a segunda dose, após um intervalo de 10 horas, de 5,0 mg.kg⁻¹. A dose única dos machos foi de 1,0 mg.kg⁻¹, no momento da segunda dose das fêmeas. A base da nadadeira peitoral foi o local de aplicação do hormônio.

Após a extrusão, os ovócitos foram acondicionados em bacias e, em seguida, receberam o sêmen, que foi homogeneizado suavemente (Woynarovich e Horváth, 1983). Após

alguns segundos, foi adicionada água à mistura para a hidratação dos ovos, sendo posteriormente lavados com água para a retirada do excesso de sêmen. Os ovos foram transportados para incubadoras cônicas de fibra de vidro, com capacidade de 200 litros e renovação de água de 6 L.s^{-1} .

Coletaram-se amostragens a partir da eclosão da larva (tempo zero), a cada hora até nove horas pós-eclosão (hpe), a cada 2 horas até completar 33 hpe e, depois disso, a cada 3 horas até a absorção do vitelo pela larva. As amostras foram fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5%) durante 24 horas para análise em microscopia. Após este período foram lavadas e transferidas para tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4 e armazenadas sob baixas temperaturas. O material fixado foi transportado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, no Campus de Jaboticabal - SP, para ser processado no Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Tais amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas e lavadas novamente no mesmo tampão. A desidratação ocorreu em série crescente de álcool, iniciando-se por álcool 30%, passando para álcool 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e três banhos a 100% por 7 minutos em cada concentração. Em seguida, foram processadas em Secadora de Ponto Crítico com CO_2 líquido (aparelho BAL-TEC), montadas em suporte de cobre, metalizadas com ouro (aparelho DENTON VACUM DESK II) e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

RESULTADOS

1º dia de vida das larvas (0 a 24 hpe)

A eclosão em *B. gouldingi* ocorreu com 15 horas de desenvolvimento, quando as larvas possuíam, em média, $3,40 \pm 0,07 \text{ mm}$ de comprimento total. A cabeça estava aderida à região anterior do saco vitelínico, corpo em postura distendida e ausência total de nadadeiras, com presença apenas da nadadeira embrionária (**Fig. 1A**). As placas olfatórias, na região frontal lateral da cabeça, possuíam uma depressão rasa e forma circular, preenchidas por células

olfativas contendo pequenos cílios rudimentares (**Fig. 1B e 1C**), e as vesículas ópticas estavam totalmente indiferenciadas sendo caracterizadas apenas por protuberâncias esféricas (**Fig. 1B**).

O esboço dos arcos branquiais foi visualizado neste momento, enquanto a membrana branquiostegial despontava e um neuromasto primordial era observado acima desta e anteriormente à vesícula ótica (**Fig. 1B**). Na região dorsal da cabeça, estava presente um sulco neural longitudinal, sinalizando que o sistema nervoso central encontrava-se em contínuo desenvolvimento (**Fig. 1D**).

Pôde-se observar que o limite entre o saco vitelínico e o corpo das larvas estava mais pronunciado com 5 hpe (**Fig. 1E**). Os arcos branquiais encontravam-se mais delimitados e a membrana branquiostegial mais desenvolvida, enquanto na boca, os lábios começam a se separar por meio de fissuras (**Fig. 1F**). O neuromasto primordial desenvolvia-se (**Fig. 1G**) e a placa olfatória era composta por cílios mais alongados (**Fig. 1H**).

A delimitação entre a cabeça e o saco vitelínico era mais evidente às 9 hpe, observando-se também a abertura da boca, após separação dos lábios (**Fig. 2A e 2B**). Na região dorsal da cabeça das larvas surgiram órgãos adesivos e o sulco neural ainda persistia, porém já parcialmente preenchido pelo desenvolvimento do sistema nervoso central (**Fig. 2C e 2D**).

Às 15 hpe, a cabeça deslocava-se para atingir sua posição terminal, encontrando-se desprendida do saco vitelínico (**Fig. 2E**). Um estreitamento da nadadeira embrionária na região posterior indicou o início da delimitação da nadadeira caudal (**Fig. 2E**). A membrana branquiostegial começava a cobrir os arcos branquiais (**Fig. 2F**). As placas olfatórias possuíam cílios mais desenvolvidos, porém ainda se encontravam em depressão rasa (**Fig. 2F e 2G**). As vesículas ópticas encontravam-se mais protuberantes e o botão da nadadeira peitoral pôde ser visualizado (**Fig. 2F**). A boca estava bem delimitada e ornamentada com protuberâncias enfileiradas que sinalizavam o local onde os dentes despontariam futuramente (**Fig. 2H**).

Às 21 hpe, os órgãos adesivos, na região dorsal da cabeça das larvas, encontravam-se com seu desenvolvimento máximo (**Fig. 3A e 3B**), passando a regredir a partir deste momento. O cálice óptico envolvia o cristalino e a membrana branquiostegial cobria quase que totalmente os arcos braquiais enquanto a nadadeira peitoral desenvolvia-se (**Fig. 3A**).

No assoalho da placa olfatória visualizou-se o início da formação de uma depressão mais profunda revestida por cílios sensoriais (**Fig. 3C**). Neste momento, além do neuromasto primordial, visualizado inicialmente próximo à região da vesícula ótica, outros neuromastos também eram visíveis, principalmente próximos à orbital da vesícula ótica (**Fig. 3A**) e na região médio-lateral do corpo da larva (linha inferior do corpo) (**Fig. 3D, 3E e 3F**).

Às 23 hpe, a cabeça encontrava-se em posição retilínea com boca em posição terminal (**Fig. 3G**). A maioria dos dentes ainda encontrava-se recoberta por epitélio, com algumas cúspides apontando fora deste (**Fig. 3H**).

2º dia de vida (25 a 48 hpe)

Com 29 hpe, observou-se o volume do saco vitelínico bem reduzido e as nadadeiras dorsal e anal começavam a se delimitar enquanto a nadadeira caudal encontrava-se bem delimitada (**Fig. 4A**). O botão da nadadeira peitoral encontrava-se próxima ao limite posterior da membrana branquiostegial, a qual cobria os arcos branquiais, deixando apenas parte destes expostos (**Fig. 4B**).

Neste momento, os neuromastos também encontravam-se distribuídos na região da linha lateral, anteriormente ao corpo das larvas (**Fig. 4B e 4C**). As protuberâncias dentais estavam na mesma disposição descrita anteriormente, porém mais afiladas nos ápices, sendo verificados dentes perfurando o epitélio e a presença de botão gustativo na pré-maxila (lábio superior) da larva (**Fig. 4D**).

Com 33 hpe, o sulco neural, observado inicialmente, estava completamente preenchido sugerindo o desenvolvimento do sistema nervoso central (**Fig. 4E**), e no lugar da placa olfatória, encontrava-se uma cavidade olfativa completamente revestida por cílios em seu interior e em suas bordas, passando de forma circular para alongada na direção ântero-posterior (**Fig. 4F**). Os órgãos adesivos, na região dorsal da cabeça das larvas, ainda estavam presentes, porém em menor número e com aspecto de regressão (**Fig. 4F**). Às 45 hpe, os neuromastos estavam presentes em maior quantidade na região da linha lateral e também na região ventral da cabeça das larvas (**Fig. 4G e 4H**).

3º dia de vida (49 a 72 hpe)

Com 54 hpe, o saco de vitelo havia sido absorvido pelas larvas, que possuíam, em média, $6,68 \pm 0,65$ mm de comprimento total. Na boca, foi possível observar a formação da língua (**Fig. 5A**) e os dentes encontravam voltados para dentro da cavidade bucal, demonstrando a capacidade de preensão da presa. As glândulas adesivas, presentes inicialmente na parte dorsal da cabeça, ainda se encontravam em regressão (**Fig. 5B e 5C**). Os neuromastos estavam presentes nas regiões dorsal e ventral da cabeça (**Fig. 5A, 5D e 5E**), na porção anterior da linha lateral (**Fig. 5G**), como descrito anteriormente, e também estendendo-se por toda a região médio-lateral do corpo até a nadadeira caudal (**Fig. 5H**). A cavidade olfativa encontrava-se mais profunda e completamente revestida por cílios longos (**Fig. 5F**).

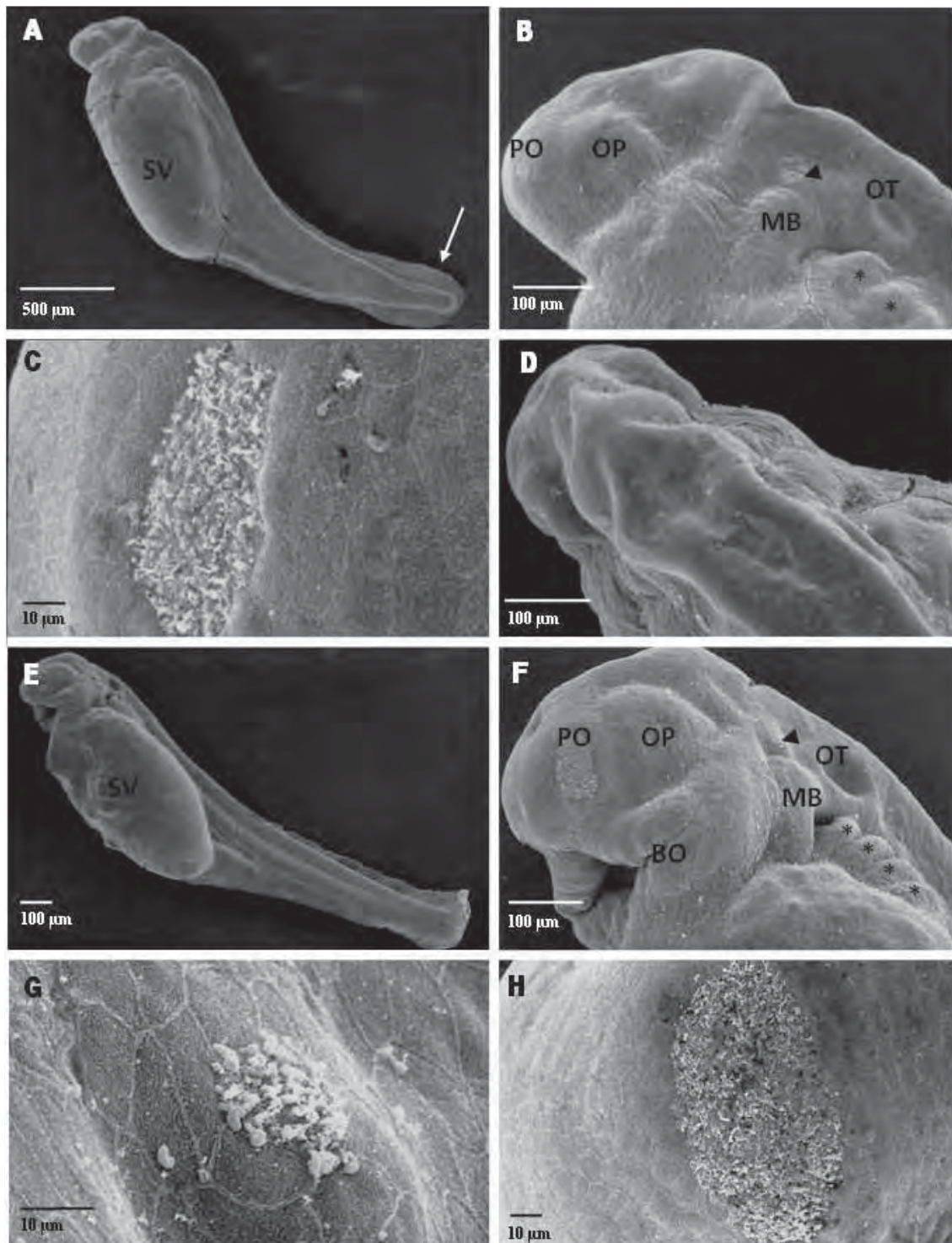


Fig. 1. Eletromicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. Eclosão: **A:** vista lateral completa; **B:** região cefálica; **C:** placa olfatória; **D:** região cefálica dorsal com sulco neural. 5 hpe: **E:** vista lateral completa; **F:** região cefálica; **G:** neuromasto primordial; **H:** placa olfatória. Arcos branquiais (*). Vesícula óptica (OP). Vesícula ótica (OT). Membrana branquiostegial (MB). Neuromasto (►). Placa olfatória (PO). Saco vitelínico (SV). Nadadeira embrionária (→). Boca (BO).

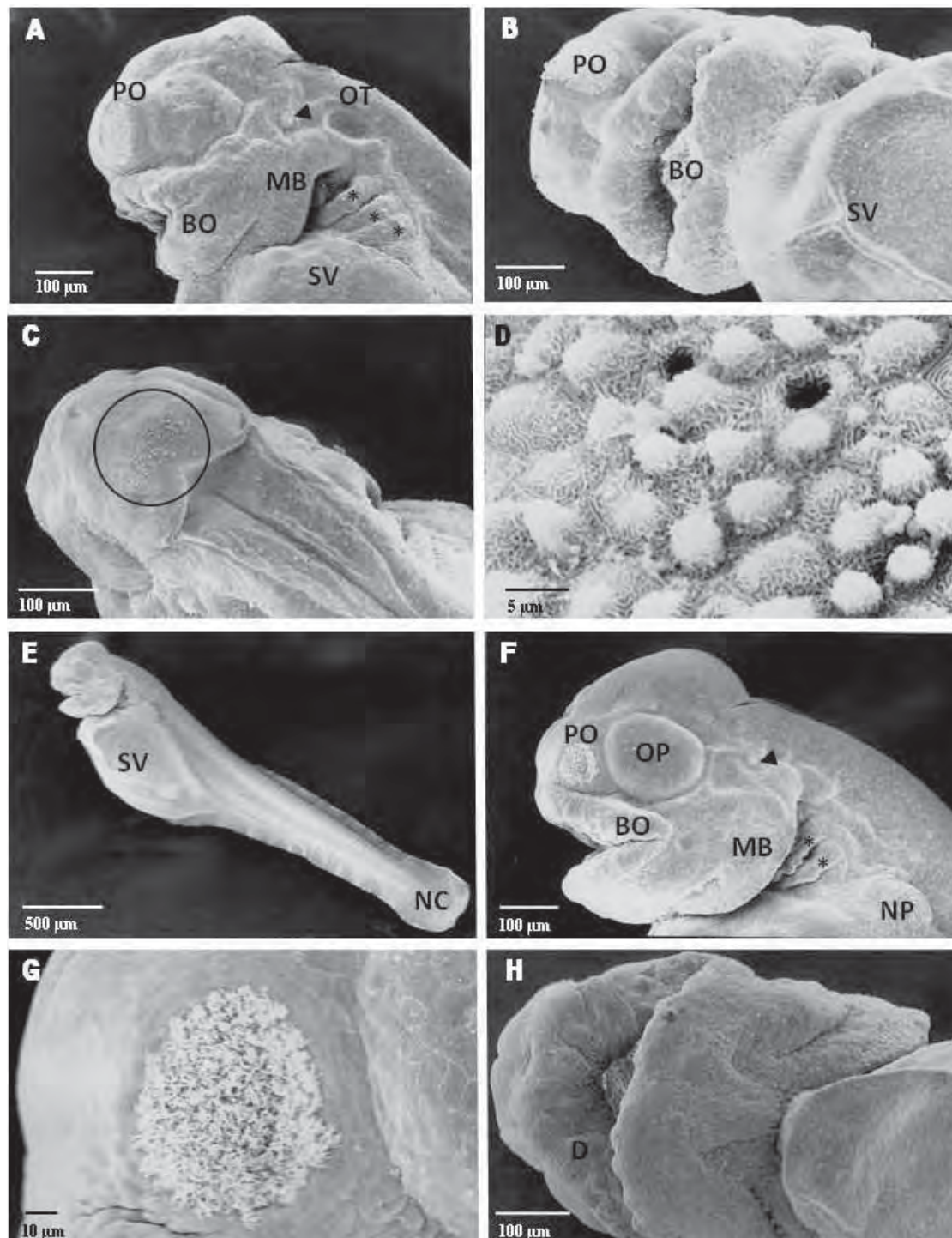


Fig. 2. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 9 hpe: **A:** região cefálica lateral; **B:** região cefálica ventral; **C:** região cefálica dorsal com órgãos adesivos (círculo); **D:** detalhe dos órgãos adesivos. **15 hpe:** **E:** vista lateral completa; **F:** região cefálica lateral; **G:** detalhe da placa olfatória; **H:** região cefálica ventral.

Arcos branquiais (*). Vesícula óptica (OP). Vesícula ótica (OT). Membrana branquiostegial (MB). Neuromasto (►). Placa olfatória (PO). Saco vitelínico (SV). Boca (BO). Nadadeira caudal (NC). Nadadeira peitoral (NP). Primórdio do dente (D).

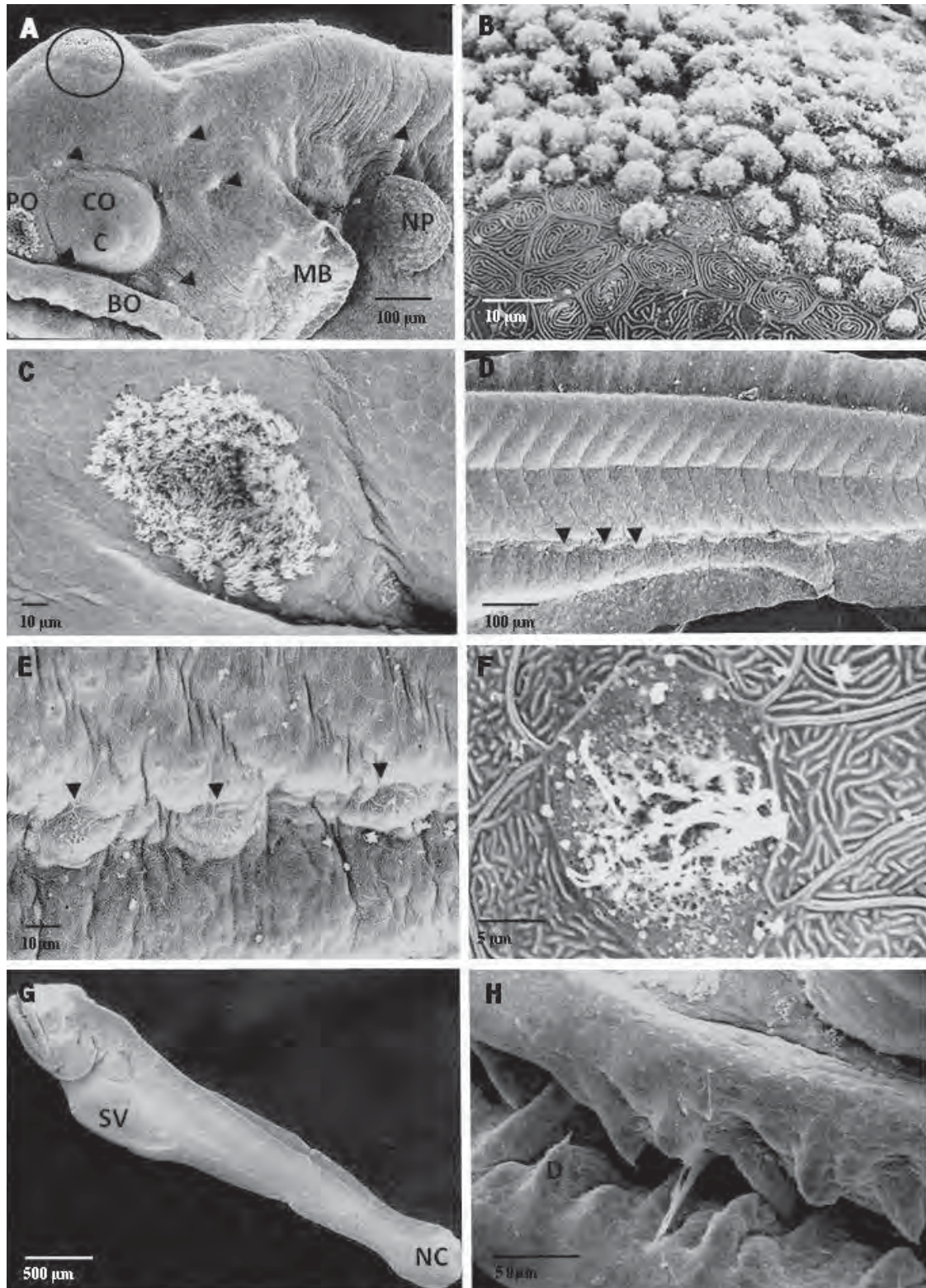


Fig. 3. Eletromicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 21 hpe: A: região cefálica lateral com órgãos adesivos (círculo); B: detalhe dos órgãos adesivos; C: placa olfatória; D: corpo das larvas com neuromastos; E: detalhe dos neuromastos; F: detalhe de um neuromasto. 23 hpe: G: vista lateral completa; H: detalhe da boca.

Arcos branquiais (*). Cálice óptico (CO). Cristalino (C). Membrana branquiostegial (MB). Neuromasto (►). Placa olfatória (PO). Saco vitelínico (SV). Boca (BO). Nadadeira caudal (NC). Nadadeira peitoral (NP). Dente (D).

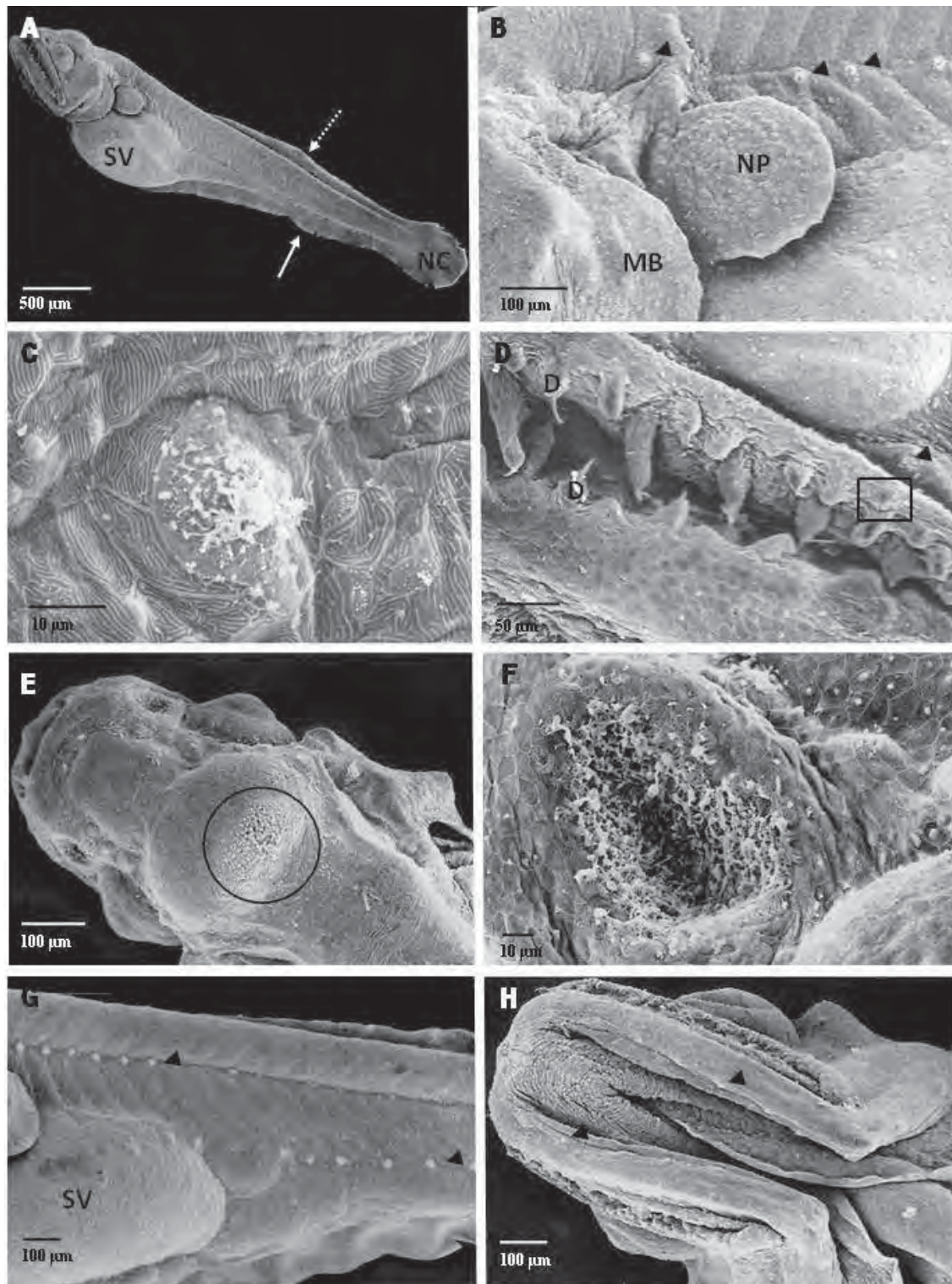


Fig. 4. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 29 hpe: **A:** vista lateral completa; **B:** porção anterior do corpo; **C:** detalhe de um neuromasto da linha lateral; **D:** detalhe da boca com botão gustativo (destaque). **33 hpe:** **E:** região cefálica dorsal com órgãos adesivos em regressão (círculo); **F:** detalhe da placa olfatória. **45 hpe:** **G:** lateral do corpo; **H:** região cefálica ventral.

Membrana branquiostegial (MB). Neuromasto (►). Saco vitelínico (SV). Nadadeira peitoral (NP). Nadadeira dorsal (seta pontilhada). Nadadeira anal (→). Dente (D).

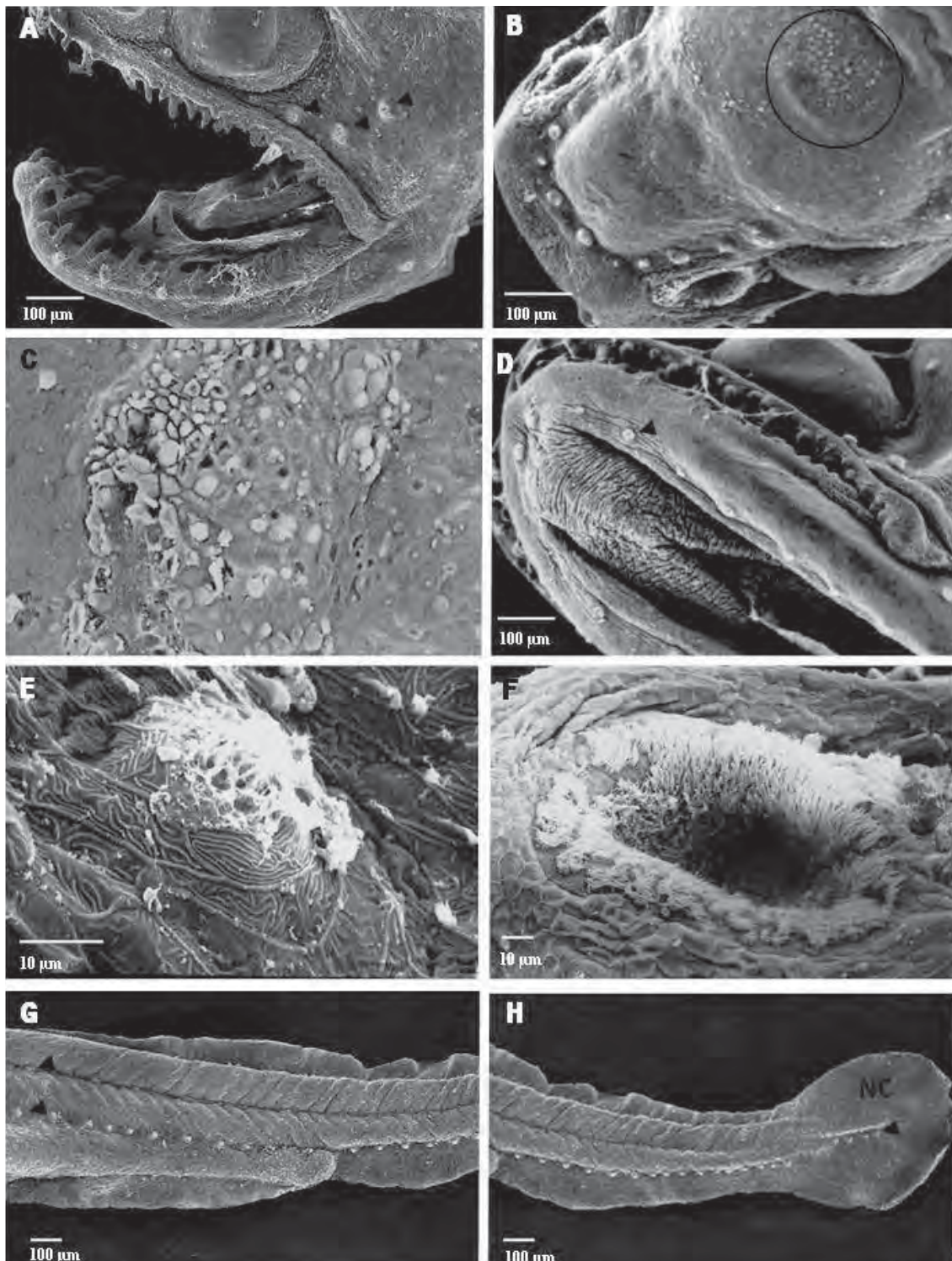


Fig. 5. Eletronmicrografias de varredura de larvas de *B. gouldingi*. 54 hpe: A: região cefálica lateral; B: região cefálica dorsal com órgãos adesivos em regressão (círculo); C: detalhe dos órgãos adesivos em regressão; D: região ventral cefálica; E: detalhe de um neuromasto da região cefálica; F: detalhe da placa olfatória; G: porção mediana do corpo; H: porção final do corpo.

Língua (L). Neuromasto (►). Nadadeira caudal (NC).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento das estruturas corporais das larvas de peixes, juntamente com o início da alimentação exógena, são eventos que garantem sua sobrevivência (Balon, 1986). O conhecimento das estruturas sensoriais e a compreensão do comportamento larval, particularmente o alimentar mediado por essas estruturas, são essenciais para o estabelecimento de uma dieta apropriada e seu uso efetivo, uma vez que sem a adequada interação, qualquer dieta, se não for suficientemente ingerida, torna-se insatisfatória (Appelbaum e Riehl, 1997).

Rodrigues *et al.* (2006) afirmaram que a boca, a cavidade oral e a faringe estão associadas com a captura, orientação e preparação pré-digestiva do alimento. Os mesmos autores relatam que lábios espessos contribuem na preensão do alimento, assim como os dentes orais, que nas espécies onívoras servem para preparação pré-digestiva do material alimentar de origem vegetal, e para captura e preensão do alimento de origem animal. O fornecimento de larvas forrageiras (como fonte de alimento externo) para *B. gouldingi* foi realizado por volta de 24 hpe, momento em que as larvas encontravam-se aptas para captura das presas, uma vez que já se apresentavam com boca aberta (constatada às 9 hpe), lábios bem delimitados e espessos às 21 hpe, e dentes orais perfurando o epitélio com 23 hpe.

O desenvolvimento dos dentes orais com postura voltada para trás, observado na espécie deste estudo, assim como a observação de ingestão de presas inteiras (larvas forrageiras) sugerem que tais dentes têm a função de preensão da presa para que possa ser ingerida, como afirmou Zavala-Camin (1996). Este fato também foi constatado por Neumann (2008) em *B. amazonicus*. A função de preensão do alimento também foi atribuída aos dentes orais para fases iniciais de *Brycon moorei* (Vandewalle *et al.* 2005) e em adultos de *Rita rita* (Yashpal *et al.* 2006).

O surgimento de botões gustativos permite às larvas escolher o alimento preferido entre os itens alimentares oferecidos, sendo responsável pela não aceitação de dietas artificiais por larvas de algumas espécies de peixes (Matsuoka, 2001; Kawamura *et al.* 2003; Cestarolli, 2005). Em peixes, o padrão de distribuição destes botões gustativos varia entre as espécies,

podendo ser encontrados no epitélio dos lábios, cavidade orofaríngea, barbilhões, cabeça e pelo corpo (Hansen *et al.* 2002).

Em *B. gouldingi*, estes botões foram observados com 29 hpe na região dos lábios e, de acordo com relatos de Matsuoka (2001), Kawamura *et al.* (2003) e Cestarolli (2005), a presença destas estruturas na cavidade bucofaríngea responde pela percepção da palatabilidade do alimento apreendido antes da ingestão, permitindo aos peixes escolher o alimento preferido entre os itens alimentares oferecidos.

Ademais, Matsuoka (2001) afirma que os órgãos olfatórios atuam também como quimiorreceptores, com finalidade de captar o cheiro das substâncias saturadas na água e, conseqüentemente, do alimento fornecido. Neste estudo, *B. gouldingi* possuía uma cavidade olfatória revestida por cílios longos às 21 hpe, sugerindo a capacidade olfativa da larva. Na medida em que avançava o desenvolvimento ontogenético, a depressão olfativa tornou-se mais larga e profunda, como também relatado por Cestarolli (2005), passando de forma circular para alongada na direção antero-posterior, assim como constatado por Neumann (2008) para *B. amazonicus*.

Nos teleósteos, o olfato parece atuar como mediador geral dos sinais químicos envolvidos no comportamento de seleção de habitats, migração, cuidados parentais e prevenção a predadores (Hara, 1971), enquanto o paladar parece estar envolvido nas fases do comportamento alimentar de busca e ingestão do alimento (Noakes e Godin, 1988).

Outra estrutura sensitiva, os neuromastos, a unidade básica da linha lateral, constituem os principais receptores de estímulos externos vibratórios e gravitacionais em peixes (Cestarolli, 2005). Estas estruturas são constituídas por mecanorreceptores 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).

Os neuromastos superficiais são capazes de detectar movimentos suaves na água na ausência de ruídos, contribuindo também para a localização da presa, além de permitir que as larvas sejam capazes de escolher entre a presa viva, congelada e partículas de alimento, selecionando o adequado. (Diaz *et al.* 2003).

Segundo Nakatani *et al.* (2001), todas as larvas recém-eclodidas de peixes possuem neuromastos na cabeça e no corpo. Em geral, o primórdio do primeiro neuromasto (neuromasto primordial) surge ainda no embrião, sob a epiderme, entre as vesículas óptica eótica, desenvolvendo-se e emergindo na superfície antes da eclosão (Maciel, 2006).

Nas larvas de *B. gouldingi*, o neuromasto primordial estava presente na região cefálica, entre as vesículas óptica eótica, no momento da eclosão. Com o decorrer do desenvolvimento, os neuromastos alojam-se também na região cefálica da larva, especialmente ao redor das orbitais dos olhos, na porção anterior da linha lateral e por toda a extensão da linha inferior até a nadadeira caudal. Em *B. amazonicus*, os neuromastos estiveram presentes a partir de 25 hpe, distribuídos principalmente às bordas da vesícula óptica, externamente à pré-maxila e na região externa ventral da boca (Neumann, 2008).

A linha lateral, com base em critérios anatômicos, eletrofisiológicos e comportamentais, é considerada como funcional na detecção de movimentos locais de água, de ondas superficiais nas proximidades do corpo do animal e de ondas sonoras de baixa frequência e, além de estar envolvida na alimentação e no comportamento de formação de cardumes, atua também na mediação do comportamento de prevenção a predadores e de comunicação social em peixes teleósteos (Bleckmann, 1993).

Assim, pode-se inferir que, desde 21 hpe, quando os neuromastos estavam presentes na região cefálica e médio-lateral do corpo das larvas (linha inferior do corpo), *B. gouldingi* possuía a capacidade de percepção do ambiente bem desenvolvida, aumentando com o decorrer do processo de desenvolvimento.

Com 9 hpe, as larvas de *B. gouldingi* apresentavam órgãos adesivos na região cefálica dorsal. A presença de órgão adesivo em larvas de peixes varia entre as espécies, dependendo da estratégia reprodutiva adotada (Britz *et al.* 2000). Em espécies sedentárias, como *Cichlasoma dimerus*, o órgão adesivo ajuda a prevenir a dispersão do cardume pelas correntes, facilitando o cuidado parental (Meijide e Guerrero, 2000).

Porém, segundo Britz *et al.* (2000), os órgãos adesivos podem evitar que as larvas sejam lançadas para habitats menos favoráveis, tais como locais com menor concentração de

oxigênio, e mantê-las aderidas a locais seguros contra predadores. Ainda, de acordo com Godinho *et al.* (2003), o órgão adesivo das larvas de espécies migradoras, como é o caso de *B. gouldingi*, teria um papel importante na dispersão larval, aderindo-as à superfície da água, permitindo que sejam conduzidas pela correnteza. Com isso, o órgão adesivo também poderia manter as larvas aderidas a substratos encontrados em remansos e lagoas marginais durante a fase inicial do desenvolvimento, período em que, provavelmente, estão mais susceptíveis à predação.

Em *B. gouldingi* após 33 hpe (segundo dia de vida das larvas), a regressão destes órgãos foi observada. Em estudos realizados por Sampaio (2006), em *S. brasiliensis* e *B. orthotaenia*, os órgãos adesivos estavam presentes na cabeça das larvas a partir da eclosão, com seu desenvolvimento máximo no primeiro e segundo dias, regredindo totalmente após o terceiro dia.

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 (Matsuoka, 2001). De acordo com Neumann (2008), a formação das nadadeiras peitorais, da cavidade olfatória, alvéolos dentários, sistema nervoso central, presença de neuromastos livres logo após a eclosão, fatos observados em *B. gouldingi* neste estudo, além do desenvolvimento de arcos branquiais e início da pigmentação do olho nos primeiros dias de vida livre, constituem um conjunto de características morfológicas favorável à predação, também relatado por Maciel (2006) em *B. orbignyanus* e por Sampaio (2006) em *B. orthotaenia*.

O padrão de desenvolvimento de *B. gouldingi* foi rápido, comum entre as espécies de teleósteos de água doce, priorizando as estruturas alimentares que permitem a expressão da piscivoria no início do desenvolvimento, antes da exaustão das reservas energéticas endógenas, que ocorreu com 54 hpe. As larvas encontravam-se aptas a reconhecer estímulos químicos e sensoriais, reconhecendo as características do ambiente, aumentando as taxas de sobrevivência durante a fase larval.

Esta pesquisa forneceu dados principalmente relacionados ao desenvolvimento do sistema sensorial (neuromastos e cavidade olfatória), nadadeiras, boca e órgãos adesivos em *B. gouldingi*, espécie que vem despontando com grande potencial para a aquicultura. Tais informações são importantes para a larvicultura, fase em que a obtenção de larvas/juvenis é um dos principais obstáculos ao desenvolvimento de cultivos comerciais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Piscicultura Buriti– Nova Mutum/MT, na pessoa do Sr. José Mário Ribeiro Mendes e funcionários, pelo fornecimento do material biológico, à Srta. Cláudia Aparecida Rodrigues do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP pela colaboração no processamento do material. À FAPESP, pela Bolsa Mestrado (2007/57826-7) e ao CNPq (473712-2007-5).

REFERÊNCIAS

- APPELBAUM, S. and RIEHL, R. (1997). Scanning electron microscopic observations of the chemo- and mechanoreceptors of carp larvae (*Cyprinus carpio*) and their relationship to early behaviour. *Aquat Living Resour* 10: 1-12.
- 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.
- BLECKMANN, H. (1993). Role of the lateral line in fish behaviour. In: PITCHER, T.J. (Ed.) *Behaviour of Teleost Fishes*. London: Chapman & Hall, p. 201-246.
- BRITSKI, H.A., SILIMON, K.S.S. and LOPES, B.S. (1999). Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Brasília: EMBRAPA – SPI, 184 p.
- BRITZ, R., KIRSCHBAUM, F. and HEYD, A. (2000). Observations on the structure of larval attachment organs in three species of gymnotiforms (Teleostei: Ostariophysi). *Acta Zool* 81: 57-67.
- CECCARELLI, P.S., SENHORINI, J.A. and VOLPATO, G.L. (2000). *Dicas em piscicultura: perguntas e resposta*. Botucatu: Santana Gráfica Editora, 247p.
- CESTAROLLI, M.A. (2005). Larvicultura de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais. 2005. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- DIAZ, J.P., PRIÉ-GRANIÉ, M., KENTOURI, M., VARSAMOS, S. and CONNES, R. (2003). Development of the lateral line system in the sea bass. *J Fish Biol* 62: 24-40.
- GODINHO, H.P., SANTOS, J.E. and SATO, Y. (2003). Ontogênese larval de cinco espécies de peixes do São Francisco, p. 133-148. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 468 p.
- HANSEN, A., KLAUS REUTTER, K. and ZEISKE, E. (2002) Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Dyn* 223: 483-496.
- HARA, T.J. (1971). Chemoreception. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.) *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 5: 79-120.
- HOWES, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull Brit Mus (Natural History)* 43: 1-47.
- KAWAMURA, G., MASUMA, S., TEZUKA, N., KOISO, M., JINBO, T. and NAMBA, K. (2003). Morphogenesis of sense organs in the bluefin tuna *Thunnus orientalis*. The Big Fish Bang, Proceedings of the 26th Annual Larval Conference, Bergen (Norway), p. 123-135.
- LIMA, F.C.T. (2004). *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthy Explor Freshwaters* 15: 279-287.
- MACIEL, C.M.R.R. Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Charciformes, Characidae, Bryconinae). 2006. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MATSUOKA, M. (2001). Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries Science* 67: 1036-1045.
- MEIJIDE, F.J. and GUERRERO, G.A. (2000). Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *J Zool* 252: 481-493.
- NAKATANI, K., AGOSTINHO, A.A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P.V. and CAVICCHIOLI, M. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM/Nupélia, 359p.
- NEUMANN, E. (2008). Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). 2008. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- NOAKES, D.L.G. and GODIN, J.G.J. (1988). Ontogeny of behaviour and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed) *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 11-B: 345-395.
- OLIVEIRA, A.M.B.M.S., CONTE, L. and CYRINO, J.E.P. (2004). Produção de Characiformes autóctones. In CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce*. São Paulo: TecArt. 533p.

- RODRIGUES, S.S., NAVARRO, R.D. and MENIN, E. (2006). Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringeana de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Pisces, Characiformes, Anostomidae) em relação ao hábito alimentar. *Biotemas*, 19: 51-58.
- SAMPAIO, K. H. (2006). Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SANCHES, P.V., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SUBVIERTO, M.R., GOMES F.D.C., NAKATANI K. and BARBOSA, N.D.C. (2001). Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Sci* 23: 383-389.
- VANDERWALLE, P., GERMEAU, G., BESANCENET, P., PARMENTIER, E. and BARAS, E. (2005). Early development of the head skeleton in *Brycon moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae). *J Fish Biol*, 66: 996-1024.
- WOYNAROVICH, E. and HORVÁTH, L. (1983). A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 225p.
- YASHPAL, M., KUMARI, U., MITTAL, S. and MITTAL, A.J. (2006). Surface architecture of the mouth cavity of carnivorous fish *Rita rita* (Hamilton, 1822) (Siluriformes, Bagridae). *J Zool* 136: 155-162.
- ZANIBONI FILHO, E., REYNALTE-TATAJE, D. and WEINGARTNER, M. (2006). Potencial del género *Brycon* en la piscicultura Brasileña. *Rev Col Cienc Pec* 19: 233-240.
- ZAVALA-CAMIM, L.A. (1996). Introdução ao estudo sobre alimentação natural de peixes. Maringá: EDUEM, 129 p.

ARTIGO IV

Histologia das larvas de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae)**F. Faustino, L. S. O. Nakaghi, L. C. Makino and E. Neumann**

Submissão do artigo: *The International Journal of Developmental Biology*
(Impact Factor 3,271)

RESUMO

Espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, *Brycon gouldingi* foi descrita recentemente e vem despertando interesse tanto de piscicultores, que iniciaram sua criação em confinamento, como de ribeirinhos, que o apreciam como fonte de alimento. Por não constarem na literatura relatos sobre a espécie, este estudo visou fornecer informações acerca do desenvolvimento morfológico inicial deste peixe através da descrição de sistemas orgânicos por meio de análise histológica, a fim de contribuir na compreensão da biologia desta espécie. Foi realizada a captura dos exemplares no Rio das Mortes - MT, adaptação em cultivo e reprodução induzida na Piscicultura Buriti, Nova Mutum, ambos no estado do Mato Grosso, Brasil, nos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008. As coletas de amostragens ocorreram em momentos pré-definidos após a eclosão das larvas que ocorreu, em média, com $13,9 \pm 0,06$ horas pós-fertilização (hpf), quando apresentavam $3,40 \pm 0,07$ mm de comprimento total. Foi possível constatar que, ao eclodirem, as larvas possuíam sistema digestório indiferenciado, apresentando-se como um tubo simples, composto por cordão de células indiferenciadas localizado posteriormente ao saco vitelínico. A cavidade bucofaríngea estava aberta com 9 hpe, a porção posterior do tubo digestivo encontrou-se aberta às 13 hpe e a ligação entre intestino cefálico e anterior deu-se às 29 hpe. A alimentação exógena iniciou-se 24 hpe, e a partir de 32 hpe foram constatadas larvas forrageiras no tubo digestivo das larvas de *B. gouldingi*. Neuromastos foram visualizados na região cefálica da larva, especialmente ao redor das orbitais dos olhos. Foi constatada a presença das glândulas anexas, fígado e pâncreas, que se tornaram funcionais com o decorrer do desenvolvimento. A absorção do saco vitelínico ocorreu com 55 horas pós-eclosão (hpe), momento em que as larvas possuíam, em média, $6,68 \pm 0,65$ mm de comprimento total. As informações fornecidas por este estudo podem ser úteis para subsidiar a criação em cativeiro de *B. gouldingi* durante a fase larval.

Running title: Histologia das larvas de *B. gouldingi***Key-words:** *Brycon*, microscopia de luz, larvas, peixe.

INTRODUÇÃO

A produção de peixes do gênero *Brycon*, com características para a criação experimental e comercial, tem se destacado na piscicultura nacional. Este gênero, pertencente à família Characidae, distribui-se amplamente na América Central e do Sul (Howes, 1982). *Brycon gouldingi* é uma espécie endêmica da Bacia Tocantins – Araguaia e foi recentemente descrita sistematicamente (Lima, 2004).

Apresenta alimentação baseada em frutos e insetos, vive em ambiente bentopelágico de água doce, de clima tropical, e se diferencia dos demais *Brycons* por possuir o quinto osso infra-orbital mais alto que largo, listras estreitas longitudinais e sinuosas (não-retas) ao longo do corpo, nadadeiras peitorais e pélvicas escurecidas, distinta mancha em forma de V no pedúnculo caudal e nadadeira caudal, e cerca de 66-82 escamas na linha lateral (Lima, 2004).

Não foram encontrados na literatura relatos com esta espécie, que vêm despertando a atenção de piscicultores, que iniciaram sua criação em cativeiro, e de comunidades ribeirinhas, que o apreciam como fonte de alimento (comunicação pessoal). Dentre as características apresentadas pelas espécies do gênero *Brycon* pode-se destacar taxas de crescimento elevadas e alta qualidade e sabor da carne quando mantidas em confinamento (Zaniboni-Filho *et al.* 2006).

A fase larval é um fator limitante na criação de *Brycons*, pois aproximadamente 36 horas pós-eclosão, as reservas nutritivas contidas no saco vitelínico esgotam-se e as larvas iniciam a alimentação exógena e a prática do canibalismo (Oliveira *et al.* 2004). Larvas de *Brycon* apresentam canibalismo, ingerindo larvas de tamanho menor ou similar, podendo não conseguir engolir completamente a presa levando-as à morte (Ceccarelli, 1997). O sucesso na criação depende de fatores como qualidade e quantidade de zooplâncton disponível, densidade de estocagem das larvas, qualidade de água e homogeneidade no tamanho das larvas (Ceccarelli e Senhorini, 1996).

O desenvolvimento inicial dos peixes é um período crítico no qual ocorre a diferenciação dos órgãos e sistemas (Brown e Nuñez, 1994). Ademais, nos primeiros dias pós-eclosão a alimentação é endógena, sendo obtida do vitelo e uma vez esgotada esta reserva, a

alimentação passa a ser exógena e, geralmente, neste momento, o tubo digestivo não está completamente desenvolvido, havendo limitações morfológicas, como tamanho de boca que restringe número e tamanho de presas disponíveis, e fisiológicas, como desenvolvimento incompleto de glândulas digestivas ou atividade enzimática incipiente, levando a altas taxas de mortalidade nesta fase (Govoni *et al.* 1986).

Segundo Zavala-Camim (1996), larvas de peixes geralmente apresentam em comum trato digestório rudimentar, em forma de tubo simples, passando por transformações até atingir as características da forma adulta. De acordo com Bértin (1958), o trato digestório assume as seguintes divisões morfológicas: intestino cefálico, que corresponde à cavidade bucal e faringe; intestino anterior, que equivale ao segmento envolvendo esôfago e estômago (quando presente); intestino médio (intestino propriamente dito) e intestino posterior, que corresponde ao segmento do reto (quando presente) e ânus. Esta terminologia é aplicável à morfologia do trato digestório de adultos, pois as larvas de peixes, nas fases iniciais do desenvolvimento, não possuem segmentos definidos no trato digestório.

Estudos relacionados ao desenvolvimento ontogenético de sistemas e órgãos, abordando especialmente o sistema digestório, permitem a identificação de estruturas morfológicas relacionadas com a seleção, captura, digestão e absorção, podendo auxiliar na avaliação dos fatores envolvidos na mortalidade das larvas (Maciel, 2006).

Com o objetivo de fornecer informações a respeito do desenvolvimento morfológico inicial de *B. gouldingi*, este trabalho caracterizou, por microscopia de luz, os sistemas orgânicos, desde o momento da eclosão da larva até a absorção total do vitelo.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras foi realizada na Piscicultura Buriti, Nova Mutum - Mato Grosso, Brasil e o processamento das mesmas ocorreu no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP em Jaboticabal, São Paulo. Reprodutores de *Brycon gouldingi* provenientes do Rio das Mortes – MT, Brasil, foram adaptados em cultivo por cerca

de sete meses e selecionados para reprodução induzida conforme as técnicas de Woynarovich & Hórvath (1983), entre os meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008.

Nas fêmeas, a primeira dose de hipófise aplicada foi de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e a segunda dose, após um intervalo de 10 horas, de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$. A dose única dos machos foi de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, no momento da segunda dose das fêmeas. A base da nadadeira peitoral foi o local de aplicação do hormônio. Dez fêmeas da espécie tiveram seus descendentes (geração F1) analisados, considerando-se cada desova uma repetição.

Após extrusão, os ovócitos foram acondicionados em bacia e, em seguida, receberam o sêmen, que foi homogeneizado suavemente. Após alguns segundos, foi adicionada água aos gametas para a hidratação dos ovos, sendo posteriormente lavados com água para a retirada do excesso de sêmen. Os ovos foram transportados para incubadoras cônicas de fibra de vidro, com capacidade de 200 litros e renovação de água de 6 L.s^{-1} .

Coletaram-se amostragens a partir da eclosão da larva (tempo zero), a cada hora até nove horas pós-eclosão (hpe), a cada 2 horas até completar 33 hpe e, depois disso, a cada 3 horas até a absorção total do vitelo. As amostras foram fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5%) durante 24 horas para análise em microscopia de luz.

Após este período foram lavadas e transferidas para tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4 e armazenadas sob baixas temperaturas, sendo selecionadas e processadas para inclusão em historresina: desidratadas por 24 horas em solução de álcool 80% e realizadas lavagens de 30 minutos cada em álcool 95% e 100%. Permaneceram, posteriormente, 4 horas na solução de pré-infiltração GMA (Glycol Methacrylate) + álcool 100% na proporção 1:1, 16 horas na etapa de infiltração (GMA) e incluídas em histomoldes utilizando a mistura de GMA + endurecedor. As amostras foram levadas para estufa a 50°C , por 24 horas. Os cortes semi-seriados, descartando-se 5 cortes, foram obtidos em micrótomo LEICA RM2255 com $2 \mu\text{m}$ de espessura, utilizando-se navalha de tungstênio. A coloração foi feita com Hematoxilina-Floxina (Tolosa *et al.* 2003). A análise das lâminas e fotodocumentação ocorreram em fotomicroscópio Leica DM 5000 B utilizando o software Leica Application Suite (LAS).

RESULTADOS

As larvas de *B. gouldingi* eclodiram 15 horas após a fertilização, momento em que apresentavam em média $3,40 \pm 0,07$ mm de comprimento total, e a absorção total do saco vitelínico ocorreu com 55 hpe, quando as larvas possuíam comprimento total de $6,68 \pm 0,65$ mm. O acompanhamento do desenvolvimento larval de *B. gouldingi* permitiu constatar características relacionadas aos sistemas digestório, excretor, cardiorrespiratório, nervoso/sensorial e também da vesícula gasosa.

Sistema digestório

No momento da eclosão (tempo zero), o trato digestório encontrava-se indiferenciado, com um epitélio idêntico e contínuo ao tegumento penetrando logo à frente do saco vitelínico, marcando o local da futura cavidade bucofaríngea (**Fig. 1A**). Este epitélio ora era visualizado como uma camada simples de células que se prolongava sobre o saco vitelínico, e ora em várias camadas de células indiferenciadas no local onde mais tarde iria diferenciar-se o intestino (**Fig. 1B**).

O primórdio da cavidade bucofaríngea e a observação de uma incisura oral, que demarcava o local da futura separação dos lábios, foram registrados 1 hpe (**Fig. 1C**). Um pequeno lume surgiu no tubo digestivo, na região do intestino, às 2 hpe (**Fig. 1D**), porém sua porção final encontrava-se fechada, sem presença de luz (**Fig. 1E**).

A cavidade bucofaríngea estava formada com 5 hpe, porém os lábios permaneciam aderidos e a região anterior do tubo digestivo também apresentava-se fechada por uma membrana conjuntiva (**Fig. 1F**).

A separação dos lábios e a abertura da cavidade bucofaríngea ocorreram com 9 hpe, e a porção inicial do tubo digestivo permanecia fechada (**Fig. 2B**), sendo observados os primeiros alvéolos dentais na pré-maxila (lábio superior) e no dentário (lábio inferior) (**Fig. 2C**). Com 11 hpe estes dentes se encontravam mais alongados (**Fig. 2D**).

Às 13 hpe o trato digestório apresentava-se formado por cavidade bucofaríngea, esôfago (apresentando-se neste momento como um tubo curto e estreito) e intestino, porém ainda não era identificada a comunicação entre intestino cefálico e anterior (**Fig. 2E**), sendo visualizada a porção posterior do tubo digestivo aberta (**Fig. 2F**). Foi possível identificar também uma porção do pâncreas (**Fig. 2E**).

Com 23 hpe, notou-se o pregueamento das alças intestinais (**Fig. 3D**). Os dentes na região dos lábios encontravam-se mais protuberantes, recobertos por epitélio simples indefinido (**Fig. 3C**).

A faringe pode ser visualizada com 29 hpe, sendo formada por células epiteliais de muco, enquanto o esôfago apresentava-se revestido por um epitélio simples cilíndrico (**Fig. 3E**). Uma pequena porção de fígado e pâncreas pôde ser observada (**Fig. 3E**). Neste tempo, visualizou-se o tubo digestivo aberto em toda sua extensão. O intestino encontrava-se dilatado, com vilos e revestido por epitélio cilíndrico simples, com grande luz visível (**Fig. 3F**).

A presença de larva forrageira no tubo digestivo das larvas de *B. gouldingi* foi constatada a partir de 32 hpe, ocorrendo praticamente em todos os tempos a partir desse momento, marcando a funcionalidade do tubo digestivo. Às 33 hpe, as células superficiais da faringe apresentaram prolongamentos citoplasmáticos se projetando para o interior e dentes faríngeos foram encontrados (**Fig. 4C**).

O pâncreas apresentava aspecto acinar com núcleo basofílico e citoplasma apical acidófilo com grânulos de zimogênio (**Fig. 4D**), enquanto os hepatócitos do fígado apresentavam-se com citoplasma vacuolar (provavelmente por conter alta concentração lipídica e de glicogênio advindas do vitelo ou de larvas consumidas) (**Fig. 4E**).

O epitélio intestinal apresentava borda em escova, podendo ser notada a presença de material digerido na luz do intestino (**Fig. 4F**). Neste momento, a parede do intestino era composta por um epitélio cilíndrico simples incluindo células caliciformes (**Fig. 4F**).

No teto da faringe, às 36 hpe, também eram visíveis alvéolos dentários que, futuramente, originariam dentes faríngeos (**Fig. 5B**).

A **Fig. 5C**, às 39 hpe, representa o momento em que uma larva forrageira estava sendo ingerida retratando uma alimentação mista, já que a ingestão de larvas ocorreu antes da reserva endógena se esgotar. Muitos alvéolos dentários estiveram presentes e dentes incisivos formavam protuberâncias, indicando que a exteriorização de dentes ocorreria em breve, além de ser notado também botão gustativo (**Fig. 5D**).

Com 48 hpe, foi possível identificar o septo de separação entre o intestino médio (propriamente dito) e o intestino posterior (**Fig. 6A**), sendo verificado material digerido (provavelmente larvas forrageiras consumidas) no intestino médio deixando-o amplamente dilatado (**Fig. 6A**). Neste momento, o vitelo já era quase inexistente.

Com 55 hpe, o saco vitelínico já havia sido totalmente absorvido, sendo observadas larvas de *B. gouldingi* com mais de uma larva forrageira visualizada em seu tubo digestivo (**Fig. 6B**).

Neste instante, o sistema digestório era composto por intestino cefálico (cavidade bucal e faringe), intestino anterior (representado pelo esôfago), intestino médio (intestino propriamente dito) e intestino posterior. Ao longo deste estudo, o esôfago não apresentou modificações consideráveis em sua estrutura. A maioria dos dentes continuava recoberta pelo epitélio, sendo observados muitos alvéolos dentais e alguns dentes exteriorizados.

Não houve, também durante o período estudado, diferenciação/formação do estômago e das glândulas gástricas que, provavelmente, em *B. gouldingi*, ocorre tardiamente. Também não foi constatada a diferenciação da porção retal e do ânus.

Sistema excretor

O pronefro (rim primitivo) pôde ser observado desde o momento da eclosão, logo acima do intestino, acompanhando toda a extensão deste, composto por um epitélio cilíndrico simples (**Fig. 1B**). Um pequeno lume surgiu no pronefro às 2 hpe (**Fig. 1D**) bem como a porção (**Fig. 1E**).

Com o desenvolvimento larval, às 39 hpe, a porção cranial do pronefro, localizada na parte dorsal da cavidade corporal e acima da vesícula gasosa, tornou-se enovelada e seu lúmen mais aparente (**Figura 5E**), enquanto a região caudal permanecia retilínea (**Fig. 5C**).

Sistema cardiorrespiratório

Um coração rudimentar encontrava-se localizado na cavidade pericárdica, anteriormente ao saco vitelínico e à cavidade abdominal no tempo zero (eclosão larval) (**Fig. 1A**). Às 5 hpe eram visualizadas as duas câmaras (átrio e ventrículo) no coração (**Fig. 1F**). A ramificação dos arcos branquiais foi constatada com 17 hpe (**Fig. 3A**).

Sistema nervoso/sensorial

O sistema nervoso central era caracterizado por se apresentar como vesículas primárias, visualizadas à 1 hpe (**Fig. 1C**).

Com 7 hpe, a artéria hialóide e a camada de pigmento surgiram na região periférica do cálice óptico (**Fig. 2A**). Com 9 hpe, o desenvolvimento do sistema nervoso central era bem evidente, observando-se o preenchimento celular das vesículas primitivas (**Fig. 2B**).

A lente do olho encontrava-se bem formada às 17 hpe, e a camada plexiforme começava a despontar (**Fig. 3A**). As larvas apresentavam neuromastos livres no interior do ouvido (**Fig. 3A**) e também na superfície corporal, na região cefálica (**Fig. 3B**).

Próximo às orbitais das vesículas ópticas, às 23 hpe, eram visíveis vários neuromastos (**Fig. 3C**). Às 31 hpe, a camada plexiforme do olho era mais bem visualizada, sendo também distinguida a dupla camada de fotorreceptores, encontrando-se neuromastos superficiais (**Fig. 4A**).

A placa olfatória era composta por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (**Fig. 4B**). O sistema nervoso central foi bem visualizado às 36 hpe, notando-se as três regiões do cérebro (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) desenvolvidas (**Fig. 5A**).

A notocorda, bem visualizada com 39 hpe, (**Fig. 5C e 5E**) sendo encontrada por toda extensão corporal da larva. As células apresentavam-se com citoplasma vacuolar, fornecendo ao tecido a característica de sustentação da medula espinhal.

O olho estava bem desenvolvido às 55 hpe, composto por uma lente bem delimitada, camadas de pigmento (externa) e plexiforme bem proeminentes, além de dupla camada de fotorreceptores (**Fig. 6C**). Vários neuromastos era vistos ao redor da orbital dos olhos (**Fig. 6D**).

Vesícula gasosa

Com 21 hpe, iniciou-se a formação da vesícula gasosa, ligada ao esôfago por um ducto conector (**Fig. 3B**). Esta vesícula encontrava-se formada e revestida por um epitélio estratificado pavimentoso (**Fig. 4D**), localizada abaixo da notocorda e acima do tubo digestivo, com 33 hpe e com 39 hpe, apresentou-se parcialmente inflada (**Fig. 5E**).

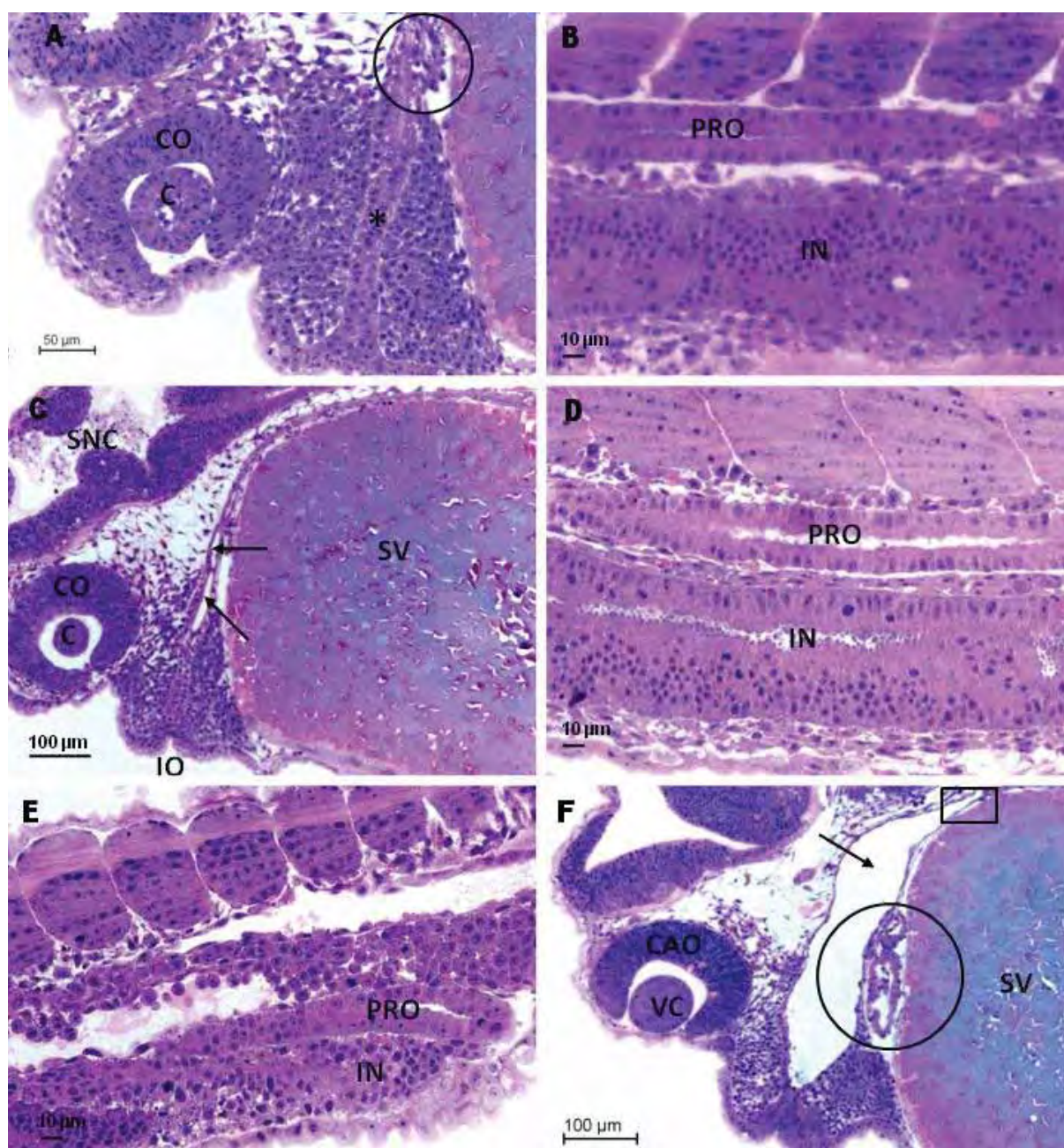


Fig. 1. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. Eclôsa: **A**: epitélio do tegumento penetrando e demarcando o local da cavidade bucofaríngea, coração; **B**: pronefro e intestino sendo delimitados. 1 hpe: **C**: primórdio da cavidade bucofaríngea e incisura oral demarcando o local da separação dos lábios. 2 hpe: **D**: pronefro e intestino com pequena luz visível; **E**: porção final do pronefro e intestino. 5 hpe: **F**: cavidade bucofaríngea formada, lábios aderidos, região anterior do tubo digestivo fechada (destaque), coração com duas câmaras. Epitélio da cavidade bucofaríngea (*). Cálice óptico (CO). Cristalino (C). Coração (círculo). Pronefro (PRO). Intestino (IN). Incisura oral (IO). Abertura da cavidade bucofaríngea (→). Saco vitelínico (SV).

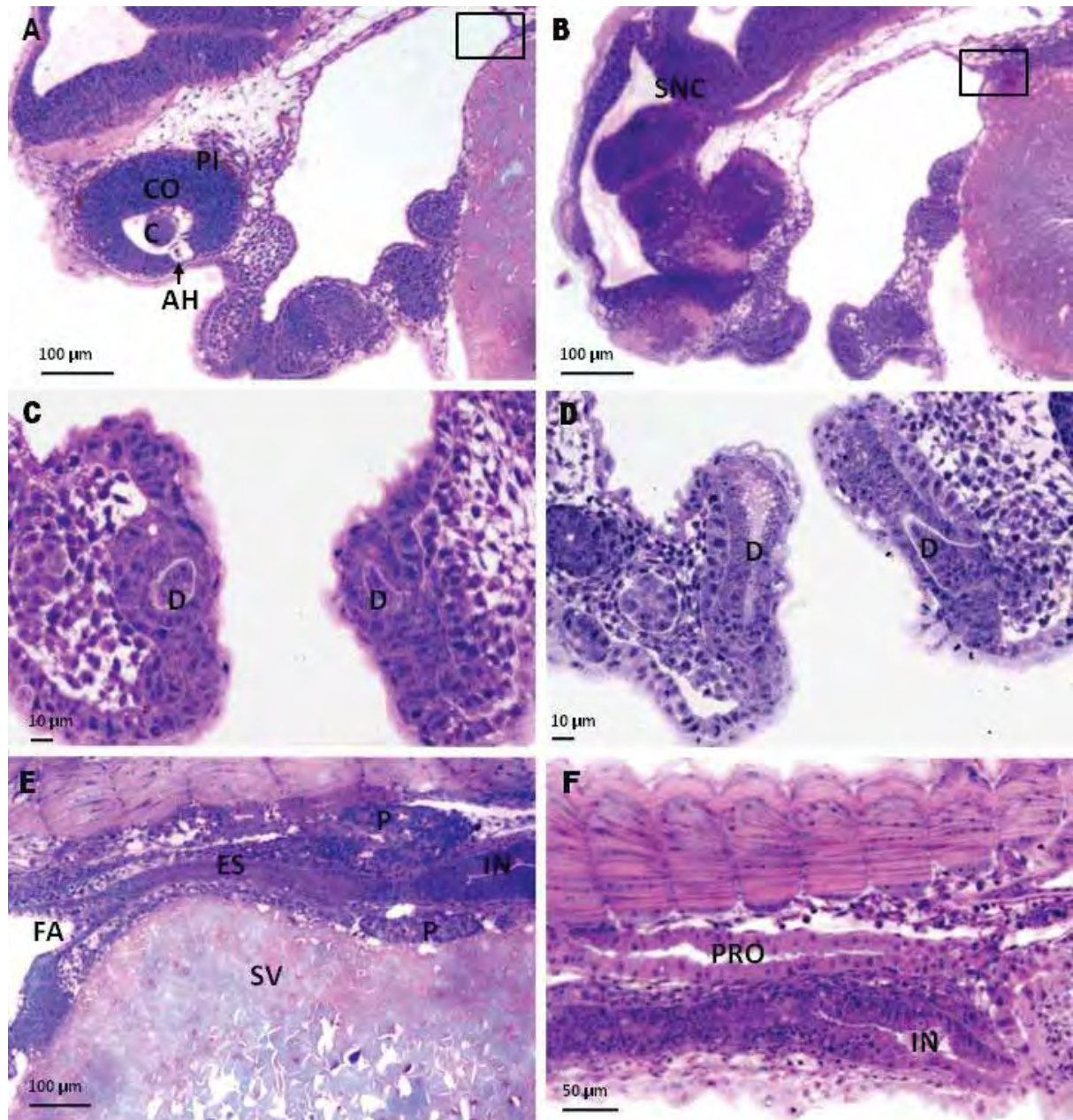


Fig. 2. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 7 hpe: A: região anterior do tubo digestivo fechada (destaque), visualização da artéria hialóide, cristalino, camada plexiforme e cálice óptico. 9 hpe: **B:** lábios separados e região anterior do tubo digestivo fechada (destaque); **C:** surgimentos dos primeiros alvéolos dentais. 11 hpe: **D:** primórdio dos dentes. 13 hpe: **E:** farínge, esôfago, intestino e pâncreas; **F:** porção final do tubo digestivo aberta.

Cálice óptico (CO). Cristalino (C). Camada de pigmento (PI). Artéria hialóide (AH). Pronefro (PRO). Intestino (IN). Primórdio dos dentes (D). Esôfago (ES). Saco vitelínico (SV). Faringe (FA). Pâncreas (P).

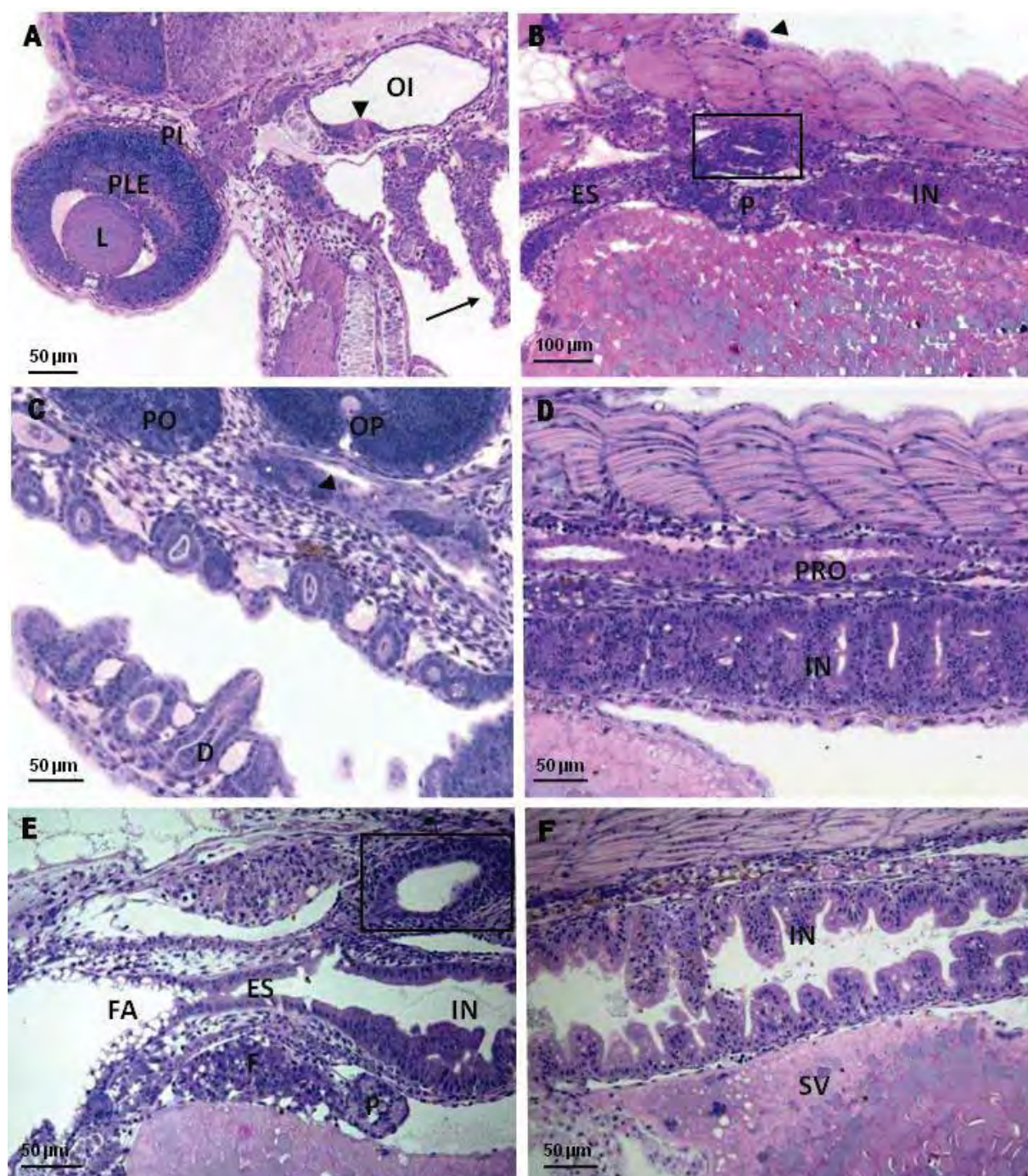


Fig. 3. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 17 hpe: A: arcos branquiais se ramificando, ouvido interno com neuromasto, lente do olho bem formada, camada de pigmento desenvolvendo e camada plexiforme despontando. **B:** 21 hpe: esôfago, intestino, pâncreas, neuromasto superficial e vesícula gasosa (destaque). 23 hpe: **C:** desenvolvimento dos dentes e neuromasto próximo à vesícula óptica; **D:** pronefro e circunvoluções do intestino. 29 hpe: **E:** faringe, esôfago, intestino, fígado, pâncreas e vesícula gasosa; **F:** porção mediana do intestino dilatada.

Lente do olho (L). Camada de pigmento (PI). Camada plexiforme (PLE). Arcos branquiais (→). Primórdio dos dentes (D). Pronefro (PRO). Intestino (IN). Esôfago (ES). Ouvido interno (OI). Pâncreas (P). Neuromasto (►). Placa olfatória (PO). Saco vitelínico (SV). Faringe (FA).

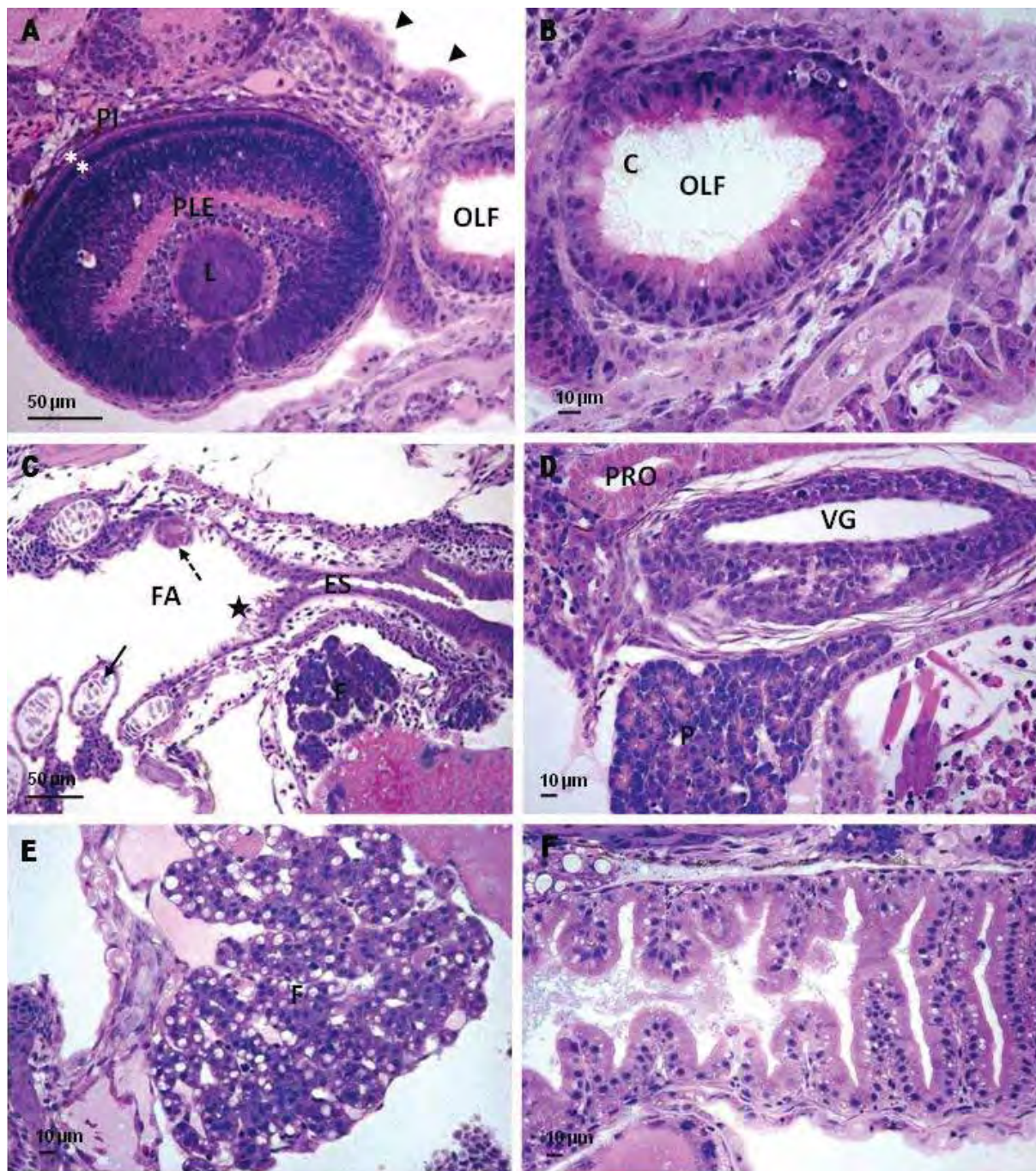


Fig. 4. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 31 hpe: A: olho. B: cavidade olfatória. 33 hpe: C: faringe com prolongamentos citoplasmáticos, esôfago, fígado, arcos branquiais e dente faringeano; D: vesícula gasosa, pâncreas e porção cranial do pronefro tornando-se enovelada; E: fígado; F: material digerido no intestino.

Neuromastos (►). Lente do olho (L). Camada de pigmento (PI). Camada plexiforme (PLE). Camada de fotorreceptores (*). Cavidade olfatória (OLF). Cílios (C). Arcos branquiais (→). Pronefro (PRO). Intestino (IN). Esôfago (ES). Pâncreas (P). Fígado (F). Faringe (FA). Prolongamentos citoplasmáticos da faringe (estrela). Vesícula gasosa (VG). Placa olfatória (PO). Dente faringeano (Seta pontilhada).

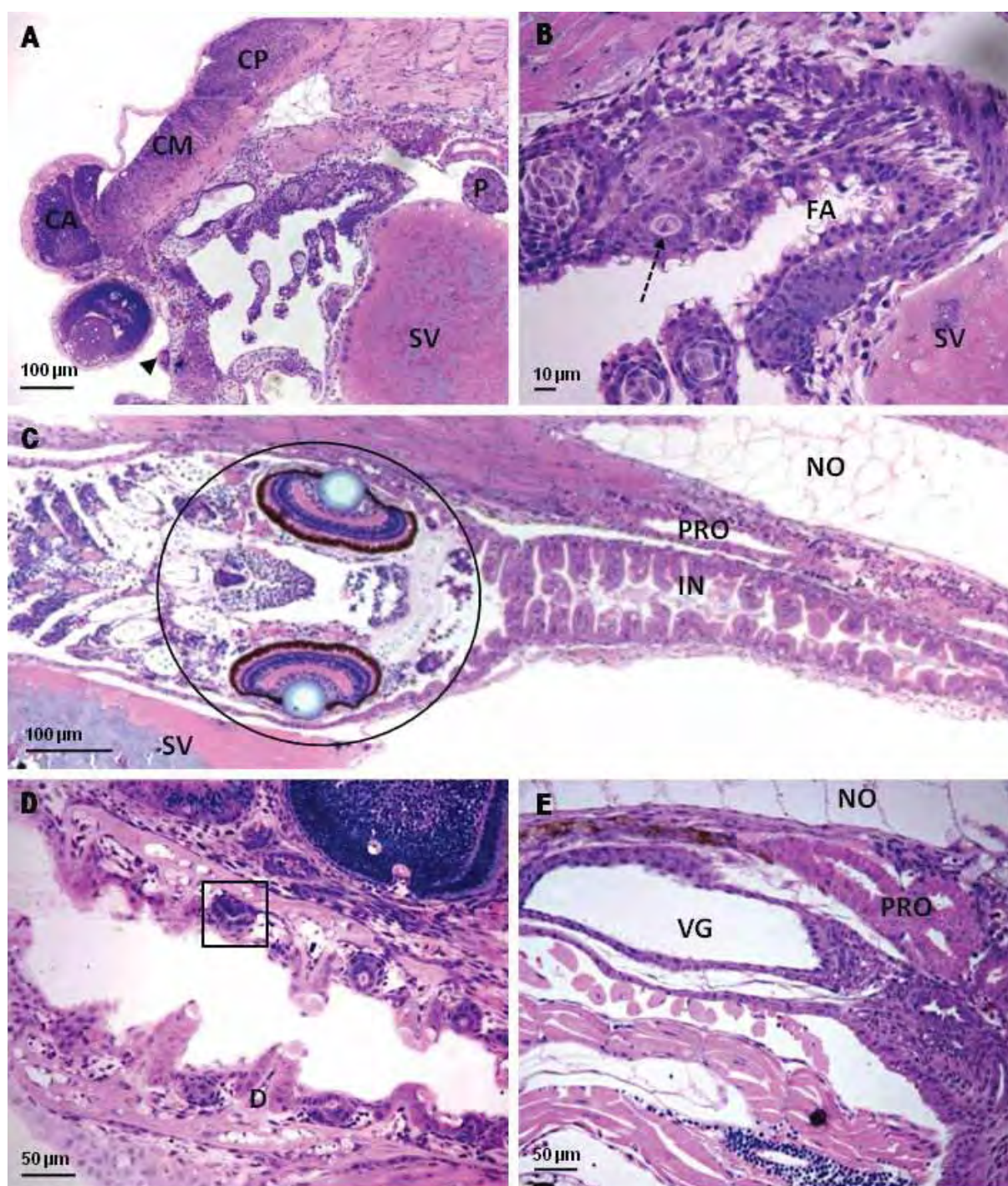


Fig. 5. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 36 hpe: A: três porções do cérebro bem delimitadas; B: presença de alvéolo dentário no teto da faringe. 39 hpe: C: ingestão de larva forrageira; D: dentes e botão gustativo (destaque); E: vesícula gasosa parcialmente inflada, porção cranial do pronefro enovelada.

Cérebro anterior (CA). Cérebro médio (CM). Cérebro posterior (CP). Faringe (FA). Pronefro (PRO). Intestino (IN). Notocorda (NO). Vesícula gasosa (VG). Dente (D). Saco vitelínico (SV). Neuromasto (►). Primórdio do dente faríngeo (seta pontilhada).

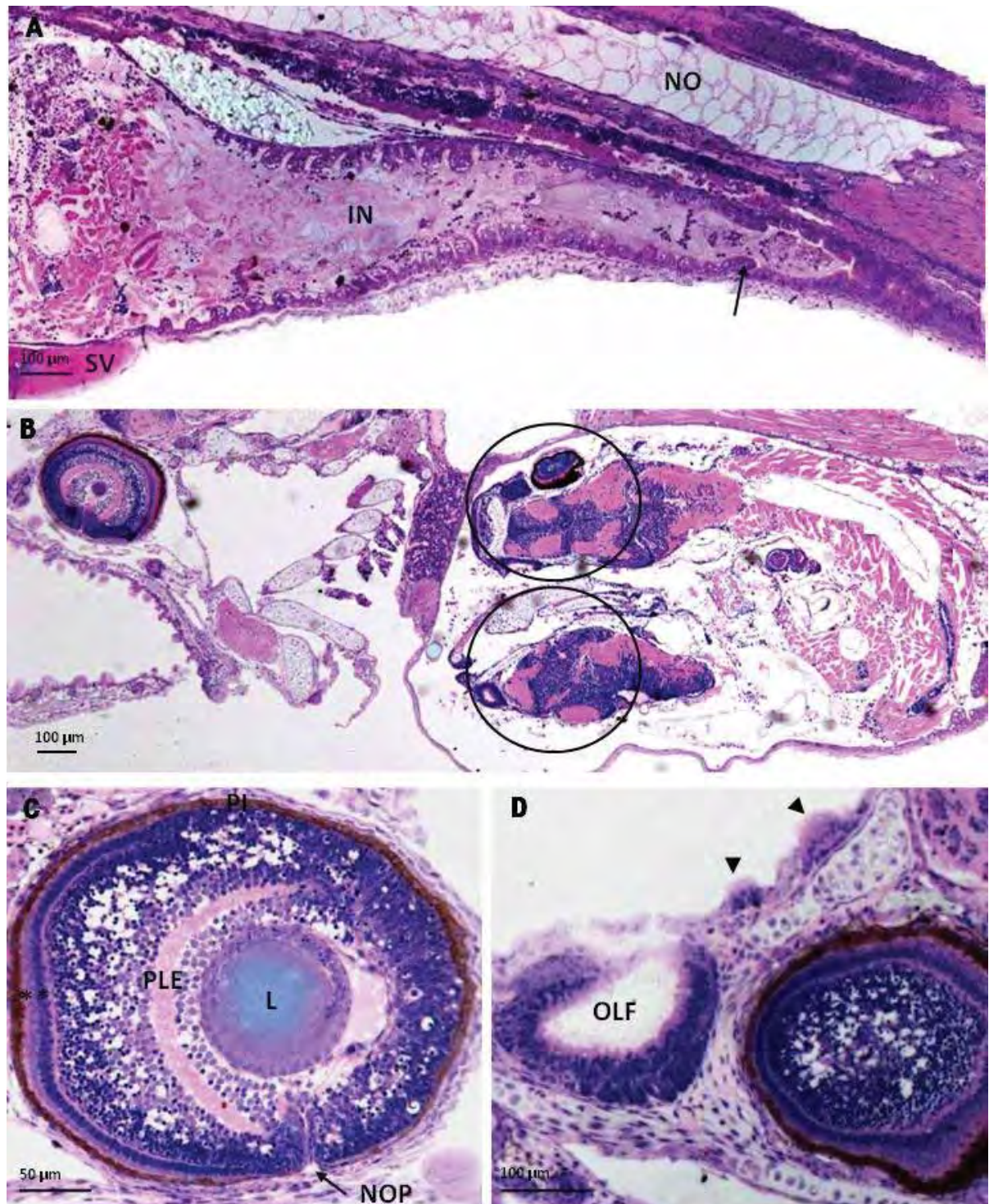


Fig. 6. Fotomicrografias de larvas de *B. gouldingi*. 45 hpe: A: material digerido no intestino. **55 hpe:** vitelo absorvido: **B:** presença de larvas forrageiras no intestino (destaque) e septo entre intestino médio e posterior (→); **C:** olho; **D:** cavidade olfatória e neuromastos ao redor dos olhos. Notocorda (NO). Lente do olho (L). Camada de pigmento (PI). Camada plexiforme (PLE). Camada de fotorreceptores (*). Nervo óptico (NOP). Cavidade olfatória (OLF). Neuromastos (►). Saco vitelínico (SV).

DISCUSSÃO

Na maioria das espécies de peixes, as larvas apresentam trato digestório simples e indiferenciado, desenvolvendo, a seguir, os órgãos digestórios (Govoni *et al.* 1986). De fato, *B. gouldingi* no momento da eclosão apresentava um tubo digestivo rudimentar, enquanto no momento da absorção total do vitelo o trato digestório podia ser dividido em intestinos cefálico, anterior, médio e posterior, mesma classificação adotada por Bértin (1958) e também relatada por Marques (2008) em *Z. jahu* e por Neumann (2008) em *B. amazonicus*.

Rodrigues *et al.* (2006) afirmam que a boca, a cavidade oral e a faringe, que constituem o intestino cefálico, estão associadas com a captura, orientação e preparação pré-digestiva do alimento, sugerindo também que lábios espessos contribuem na preensão do alimento, assim como os dentes orais, que nas espécies onívoras servem para preparação pré-digestiva do material alimentar de origem vegetal, e para captura e preensão do alimento de origem animal. Segundo os autores, dentes faríngeanos, visualizados em *B. gouldingi*, auxiliam na preensão e maceração de organismos de corpo mole. Tais dentes também ocorreram em *Z. jahu* Marques (2008) e em *B. amazonicus* Neumann (2008).

Na faringe, também foram encontradas células de muco no início da alimentação exógena de *B. gouldingi*, sugerindo, segundo Galvão *et al.* (1997) a participação destas células no deslizamento das presas. Foi constatada a presença destas células de muco também no esôfago (González *et al.* 2002; Maciel, 2006; Mangetti, 2006; Marques, 2008; Neumann, 2008) indicando que, conjuntamente com o desenvolvimento das pregas no esôfago, que precedem a diferenciação do estômago, estas células facilitam a rápida transição do alimento para o segmento posterior.

Até o momento da absorção total do vitelo, o esôfago em *B. gouldingi* não apresentou diferenciação significativa. Segundo Zavala-Camim (1996), nos peixes geralmente o esôfago é um órgão tubular que serve de passagem entre a cavidade bucofaríngea e o estômago, com o ducto pneumático da vesícula gasosa se abrindo no esôfago das espécies fisóstomas, assim como ocorreu em *B. gouldingi*.

Até 55 hpe, nas larvas de *B. gouldingi*, 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 é decorrente da presença de pregas e microvilosidades no intestino, sendo que fígado e pâncreas maduros ajudam na digestão do alimento por produzirem secreções digestivas que digerem as proteínas, gorduras e açúcares.

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, como ocorreu em *B. gouldingi* e também verificado em *P. maculofasciatus* (Peña *et al.* 2003), *A. percula* (Gordon & Hecht, 2002), *A. lupus* (Falk-Petersen & Hansen, 2001) e *M. aeglefinus* (Hamlin *et al.* 2000), *Z. jahu* (Marques, 2008), *B. amazonicus* (Neumann, 2008).

Segundo González *et al.* (2002), a presença de pregas no intestino, como observado em *B. gouldingi* com 33 hpe, indica aumento na eficiência da digestão e absorção dos alimentos. Seixas-Filho *et al.* (2000) sugerem que pregas transversais na mucosa retardam a passagem de alimento, possibilitando maior período digestivo e melhor aproveitamento dos nutrientes no intestino médio, não ocorrendo este tipo de arranjo no intestino posterior.

A partir de 33 hpe, foram visualizadas células caliciformes na porção do intestino médio. Segundo George *et al.* (1998), as células caliciformes são secretoras de muco básico, com função de neutralizar a acidez proveniente do estômago e preparar o bolo alimentar para a atuação das enzimas pancreáticas e intestinais, que agem em meio básico.

O pronefro estava presente desde a eclosão das larvas deste estudo e, de acordo com Kimmel *et al.* (1995), desenvolve-se na fase inicial da somitogênese, diferenciando-se em mesonefro somente nos indivíduos juvenis/adultos (Drummond *et al.* 1999).

Segundo Hu *et al.* (2000), o coração é o primeiro órgão definitivo a se desenvolver e tornar-se funcional durante a embriogênese. Em *B. gouldingi*, o coração apresentava-se

rudimentar no momento da eclosão da larva, localizado na cavidade pericardial, anteriormente ao saco vitelínico e à cavidade abdominal, como também registrado em larvas recém-eclodidas de outros estudos (Hu *et al.* 2000; Falk-Petersen, 2005; Marques, 2008).

Segundo Bone *et al.* (1995) a maioria das larvas de Teleostei eclode apresentando trocas gasosas por via cutânea, sendo este tipo de respiração adequada, uma vez que muitas dessas larvas são transparentes e habitam regiões pelágicas onde o oxigênio é abundante e a hemoglobina necessária poderia torná-las visíveis aos predadores. Porém, com o crescimento das larvas, a respiração cutânea torna-se inadequada, passando a ser realizada através das brânquias.

O esboço dos arcos branquiais em *B. gouldingi* foi constatado logo após a eclosão, estando bem desenvolvidos após a absorção total do vitelo. De acordo com Leonardo *et al.* (2001), 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.

Nas larvas de *B. gouldingi*, os olhos, a cavidade olfatória, seguida do ouvido interno e neuromastos, foram as primeiras estruturas sensitivas a serem visualizadas, sendo os botões gustativos os últimos a serem identificados, como relatou Marques (2008) para larvas de *Z. jahu*.

A visão é fundamental para a sobrevivência dos peixes, especialmente após o início da alimentação exógena, pois a maioria é consumidor visual usando também este sentido para evitar predadores (Carvalho *et al.* 2004). O desenvolvimento do olho, em *B. gouldingi*, ocorreu de forma progressiva e, nas larvas com vitelo absorvido, último momento analisado, 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 *O. niloticus* (Morrison *et al.* 2001) e em *Z. jahu* (Marques 2008). A artéria hialóide, constatada neste estudo, provavelmente irrigava o cálice óptico e o cristalino (lente do olho) em desenvolvimento, conforme relatou Maciel (2006) para larvas de *B. orbignyanus*.

A placa olfatória estava presente em *B. gouldingi* desde o momento da eclosão das larvas, corroborando o relato de Hansen e Zeiske (1993), os quais afirmam que a diferenciação

da placa olfatória em embriões e larvas de peixes é rápida, porém o processo até sua completa formação é lento. Segundo Matsuoka (2001), os órgãos olfatórios atuam como quimiorreceptores, com finalidade de captar o cheiro das substâncias saturadas na água e, conseqüentemente, do alimento fornecido.

Em relação aos neuromastos, mecanorreceptores 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), foram observados, neste estudo, próximos às orbitais dos olhos.

O esboço da vesícula gasosa em *B. gouldingi* foi constatado às 21 hpe. De acordo com Hidelbrand (1995), este órgão possui variadas funções como recepção de sons e pressão, ressonador de sons produzidos pelo ranger de dentes faringeanos, atrito de ossos, ação de músculos da própria vesícula e até mesmo sons produzidos por meio do controle da passagem de ar entre a vesícula e o intestino anterior (esôfago), no caso de peixes fisóstomos.

Ademais, a localização da vesícula gasosa, na parte dorsal do corpo, acima do centro de gravidade do peixe, permite a manutenção da postura sem depender de esforço muscular. Segundo Blaxter (1986), muitas larvas de peixes enchem a vesícula momentos após a eclosão devido à ingestão de ar da superfície.

O desenvolvimento de *B. gouldingi* foi rápido, característica comum entre as espécies de teleósteos de água doce, com diferenciação simultânea de estruturas que permitem a captura de alimentos no início do desenvolvimento, antes da exaustão das reservas energéticas endógenas, e também asseguram a fuga de predadores, aumentando as chances de sobrevivência durante a fase larval.

Estas informações são inéditas para a espécie *B. gouldingi* e imprescindíveis para o piscicultor que realiza ou pretende iniciar a larvicultura desta nova espécie de *Brycon*, podendo contribuir para um melhor desempenho e produção em cativeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Piscicultura Buriti – Nova Mutum/MT, na pessoa de José Mário Ribeiro Mendes e funcionários, pelo fornecimento do material biológico, ao Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Laboratório de Histologia e Embriologia pela ajuda no processamento do material, ao CNPq (473712-2007-5) e à FAPESP, pela Bolsa Mestrado (2007/57826-7).

REFERÊNCIAS

- BÉRTIN, L. (1958). Appareil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.). *Traité de zoologie*. Paris: Masson, 13: 1249-1301.
- BLAXTER, J.H.S. (1986). Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Trans Am Fish Soc* 115: 98-114.
- BONE, Q, MARSHALL, N.B. AND BLAXTER, J.H.S. (1995). *Biology of fishes* (2nd edition). Blackie, London, 332p.
- BROWN, C.L.; NUÑES, J.M. (1994). Hormones: Actions and applications in embryogenesis. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, p. 333-339.
- CARVALHO, P.S.M., NOLTIE, D. B and TILLIT, D.E. (2004). Biochemical, histological and behavioural aspects of visual function during early development of rainbow trout. *J Fish Biol* 64: 833-850.
- CECCARELLI, P.S. 1997. Canibalismo em larvas de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo.
- CECCARELLI, P.S. and SENHORINI, J.A. (1996). *Brycon*: viabilização da produção de alevinos. *Panorama da Aqüicultura* 6: 10-11.
- DIAZ, J.P., PRIÉ-GRANIÉ, M., KENTOURI, M., VARSAMOS, S. and CONNES, R. (2003). Development of the lateral line system in the sea bass. *J Fish Biol* 62: 24-40.
- DRUMMOND, I.A., MAJUMDAR, A., HENTSCHEL, H., ELGER, M., SOLNIKA-KREZEL, L., SCHIER, A. F., NEUHAUSS, S.C.F., STEMPEL, D.L., ZWARTKRUIS, F., RANGINI, Z., DRIEVER, W. and FISHMAN, M.C. (1999). Early development of the zebrafish pronefros and analysis of mutations affecting pronefros function. *Development* 125: 4655-4667.
- FALK-PETERSEN, I. B. & HANSEN, T. K. (2001). Organ differentiation in newly hatched common wolfish. *J Fish Biol* 59: 1465-1482.
- FALK-PETERSEN, I.B. (2005). Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunol* 19: 397-412.

- GALVÃO, M.S.N., FENERICH-VERANI, N., YAMANAKA, N. and OLIVEIRA, I.R. (1997). Histologia do sistema digestório da tainha *Mugil platanus* (Günter, 1880) (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Bol Inst Pesca* 24: 91-100.
- GEORGE, L.L., ALVES, C.E.R. and CASTRO, R.R.L. (1998). Histologia comparada, 2 ed, São Paulo: Roca, 286p.
- GONZÁLES, O.R.M., FLORES, J.C.B., DOMÍNGUEZ, B.M.P. and VALLE, M.R.G. (2002). Descripción histológica del sistema digestivo em larvas de *Chirostoma humboldtianum* em la primera alimentación exógena. *I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Civa 2002*. (<http://www.civa2002.org>), p. 313-322.
- GORDON, A.K. and HECHT, T. (2002). Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. *J Appl Ichthyol* 18: 113-117.
- GOVONI, J.J., BOEHLER, G.W. and WATANABE, Y. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environ Biol Fish* 16: 59-77.
- HAMLIN, H.J.; HUNT VON HERBING, I. and KLING, L.J. (2000). Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J Fish Biol* 57: 716-732.
- HANSEN A, and ZEISKE E. (1993). Development of the olfactory organ in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* 333:289-300.
- HIDELBRAND, M. (1995). Análise da estrutura dos vertebrados. São Paulo: Atheneu, 700p.
- HOWES, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull Brit Mus (Natural History)* 43: 1-47.
- HU, N., SEDMERA, D., POST, H.J. & CLARK, E.B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat Record* 260, 148-157.
- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R. and ULLMANN, B. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.
- LEONARDO, J.M.L.O., VARGAS, L., RIBEIRO R.P., MOREIRA, H.L.M., NATALI, M.R. M., VOLSKI, T. and 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 Sci* 23: 863-870.
- LIMA, F. C. T. *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. (2004). *Ichthyol Explor Freshwaters* 15: 279-287.
- MACIEL, C. M. R. R. (2006). Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignianus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MANGETTI, A.J. (2006). Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- MARQUES, C. (2008). Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de jaú (*Zungaro jahu*). 2008. Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MATSUOKA, M. (2001). Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries Science* 67: 1036-1045.
- 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). *J Morphol* 247: 172-195.
- NEUMANN, E. (2008). Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). 2008. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- OLIVEIRA, A.M.B.M.S., CONTE, L. and CYRINO, J.E.P. (2004). Produção de Characiformes autóctones. Cap. 8. In: Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalossi, D. M., Castagnolli, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo. Editora TecArt. 2004.
- PEÑA, R., DUMAS, S., VILLALEJO-FUERTE, M. and ORTÍZ-GALINDO, J.L. (2003). Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- RODRIGUES, S.S., NAVARRO, R.D. and MENIN, E. (2006). Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringeana de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Pisces, Characiformes, Anostomidae) em relação ao hábito alimentar. *Biotemas* 19: 51-58.
- SEIXAS-FILHO, J.T., BRÁS, J. M., GOMIDE, A. T. M., OLIVEIRA, M. G. A., DONZELE, J. L. and MENIN, E. (2000). Anatomia funcional e morfometria dos intestinos e dos cecos pilóricos do Teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). *Rev Bras Zoot* 29: 313-324.
- TOLOSA, E.M.G., BEHMER, O.A. and FREITAS NETO, A.G. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, Edusp, 240p.
- WATANABE, T. and KIRON, V. (1994). Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 24: 223-251.
- WOYNAROVICH, E. and HORVÁTH, L. (1983). A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 225p.
- ZANIBONI FILHO, E., REYNALTE-TATAJE, D. and WEINGARTNER, M. (2006). Potencial del género *Brycon* en la piscicultura Brasileña. *Rev Col Cienc Pec* 19: 233-240.
- ZAVALA-CAMIM, L. A. *Introdução ao estudo sobre alimentação natural de peixes*. Maringá: EDUEM, 1996. 129 p.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos durante as fases iniciais de vida de *B. gouldingi*, foi possível concluir que, nas condições deste estudo:

Os principais eventos envolvidos na fertilização (penetração de espermatozóide no canal micropilar e formação do cone de fertilização) ocorrem até 1 minuto e 30 segundos pós-fertilização.

O desenvolvimento embrionário perfeitou um total de $13,9 \pm 0,06$ horas pós-fertilização sendo dividido em 7 fases com características intrínsecas (zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, histogênese/organogênese e eclosão).

As larvas eclodem com sistemas incompletos.

A espécie apresenta período de sobreposição alimentar (endógena e exógena).

O desenvolvimento de estruturas natatórias e alimentares ocorre simultaneamente fornecendo às larvas um conjunto de caracteres morfológicos favorável à predação.

O desenvolvimento larval perfeitou 54/55 horas pós-eclosão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é pioneiro em *Brycon gouldingi*, espécie recentemente descrita. Os resultados apresentados contribuem para o conhecimento da biologia desta espécie por meio de características morfológicas relacionadas ao desenvolvimento das fases iniciais de vida sob estereomicroscópio, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

Vale ressaltar que, por se tratar de um estudo descritivo, o projeto não testou nenhuma hipótese. Neste tipo de estudo, ocorrem a observação, registro, descrição, análise e relação de fatos ou fenômenos, envolvendo o uso de coleta de dados, questionário e observação sistemática, fornecendo informações essenciais para subsidiar pesquisas posteriores.

Nas condições deste estudo, a espécie apresentou desenvolvimento embrionário e larval rápido, com larvas adquirindo diferenciação acelerada e simultânea de estruturas relacionadas especialmente à habilidade natatória e à captura de alimento, o que, provavelmente, aumentam as chances de sobrevivência. Estes resultados podem contribuir para esclarecer o piscicultor que realiza ou pretende iniciar a larvicultura desta nova espécie de *Brycon*, podendo aumentar a produção quando reprodutores tiverem mantidos em confinamento.

Por ser uma espécie endêmica da Bacia Tocantins-Araguaia, *B. gouldingi* sofre risco de se tornar uma espécie ameaçada de extinção devido a projetos de construção de hidrelétricas na referida bacia, antes mesmo de sua exploração racional e conservação.