



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



**Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do
ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**

MARIA DO CARMO FARIA PAES

Bióloga

**Jaboticabal - SP
2008**

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

**Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval
do ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**

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

Maria do Carmo Faria Paes

Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

**Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2008**

Paes, Maria do Carmo Faria
P126i Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do
ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)/Maria do
Carmo Faria Paes. -- Jaboticabal, 2008
vii, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Centro de Aqüicultura da Universidade
Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Laura Satiko Okada Nakaghi

Banca examinadora: Hugo Pereira Godinho, Alexandre Ninhaus-
Silveira

Bibliografia

1. Acará-açu-reprodução. 2. Acará-açu-embriogênese. 3.
Astronotus ocellatus. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura da
Universidade Estadual Paulista.

CDU 639.3.03

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

*“ É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar ainda em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro, em dias tristes, na chuva caminhar, que em casa me esconder.
Eu prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ”.*
(Martin Luther King)

*À Deus
por cada passo dado,
por estar sempre ao meu lado e ter me dado força para vencer.*

*Aos meus pais,
Luzia e José, por ter me dado a vida e
por terem lutado muito para que hoje eu estivesse aqui.*

*Aos meus queridos irmãos,
Letícia, João Bosco e Domingos
pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.*

*Aos meus velhos amigos dos
quais nunca me esquecerei e que
mesmo longe estiveram comigo.
Aos novos amigos aqui
conquistados que levarei para
sempre no coração.*

Ofereço e Dedico

*"O valor das coisas não está no
tempo em que elas duram, mas na
intensidade em que elas
acontecem... Por isso existem
momentos inesquecíveis, coisas
inexplicáveis e pessoas
incomparáveis..."
(Fernando Pessoa)*

À

Profa. Laura Satiko Okada Nakaghi,

Pela confiança em mim depositada desde o primeiro dia em que pisei no laboratório de histologia, no primeiro ano de graduação. Lá entrei e nunca mais saí... encontrei uma orientadora disposta a ensinar com paciência e dedicação, que me apresentou a pesquisa, caminho pelo qual me apaixonei. Que me mostrou ser muito mais que uma orientadora, ser amiga, ser profissional, querer sempre crescer e seguir em frente... Muito obrigada por estar sempre ao meu lado, nos momentos mais difíceis da minha vida, mas também nos mais alegres... Levarei-te sempre em meus pensamentos e no meu coração.

Minha eterna gratidão!

“Amizade é um amor que nunca morre”

(Mário Quintana)

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

Minha Homenagem

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi pelos ensinamentos, amizade, carinho, paciência e compreensão.

À família Okada Nakaghi, Laura, Edson, Eduardo, Leonardo e Ricardo. Pelos bons momentos e carinho.

A todos os colegas de laboratório, Camila, Francine, Fernanda, Lílian, Verônica, Érika, Daniella, Leila, Bel, Érico, Angélica, Sérgio e Lú. Muito mais que uma equipe de trabalho, uma grande família!

Ao amigo e braço direito Leonardo Avendaño pela ajuda preciosa, risadas e amizade. “Muchas gracias!”

Ao Márcio R. Reche (“Perereca”), técnico do Setor de Ranicultura, pela disponibilidade, paciência e por estar sempre pronto a ajudar! Muito obrigada!

Aos amigos Lílian e Márcio pela ajuda sempre que precisei e por serem pessoas amigas e maravilhosas!

Ao amigo Camilo P. Mojica pela ajuda e, principalmente, pela amizade!

As irmãs de república: Camila, Fernanda, Francine, Joyce, Louise, Michelle, Andréa, Vilaine e Nani: pelo tempo de convívio, por todos os momentos tristes e felizes, por toda amizade, companhia, conselhos, brigadeiros, tapiocas, esfirras, filmes... Jamais me esquecerei de vocês!

Aos queridos amigos de Guaira que moram no meu coração!

A todos que cruzaram meu caminho e que de alguma forma contribuíram para meu sucesso.

O meu muito obrigada!

Agradecimentos

 *À minha orientadora Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, por me orientar na execução deste trabalho, pelos ensinamentos e pelo apoio.*

 *Ao Sr. Dr. Antônio Francisco da Silva por fornecer a sementinha que germinaria neste trabalho.*

 *À Profa. Dra. Isabel C. Boleli e Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pelas preciosas sugestões na ocasião da qualificação.*

 *Aos Profs. Drs. Hugo Pereira Godinho e Alexandre Ninhaus Silveira pelas preciosas sugestões dadas na ocasião da defesa.*

 *Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pelo fornecimento dos peixes e disposição dos laboratórios de Reprodução e de Peixes Ornamentais.*

 *Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros pela preciosa ajuda nas análises estatísticas.*

 *À Profa. Dra. Márcia Rita F. Machado por gentilmente emprestar o equipamento de captura de imagens do Laboratório de Anatomia.*

 *Ao histotécnico Sr. Orandi Mateus, pelo auxílio no processamento das lâminas e também pela amizade e bons momentos.*

 *À técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Cláudia Aparecida Rodrigues, pela ajuda e paciência.*

 *À técnica do Laboratório Central do CAUNESP Sílvia Regina Ligeiro de Laurentiz pela ajuda nas análises de água.*

 *Ao Márcio R. Reche, técnico do Setor de Ranicultura pela ajuda, e à Profa. Dra. Marta Verardino D'Stefani, pelo espaço concedido.*

 *Ao Sr. Mauro, funcionário do Caunesp, pela disposição e ajuda sempre que precisei.*

 *Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento pelo apoio financeiro.*

 *À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida (processo núm. 06/54048-3).*

 *Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, por permitir a realização deste trabalho.*

 *À todos os amigos, professores e funcionários do CAUNESP. Competentes e maravilhosos!*

 *Ao pessoal do Laboratório de peixes ornamentais pela amizade, ajuda e convivência.*

 *A todos os amigos, professores e funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Espécie em estudo	02
1.2. Reprodução induzida	03
1.3. Desenvolvimento embrionário	05
1.4. Ontogênese larval	06
2. OBJETIVOS	08
3. MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1. Local	09
3.2. Animais	09
3.3. Metodologia aplicada	09
3.3.1. Qualidade da água	09
3.3.2. Preparação e indução à reprodução	10
3.3.3. Coletas de desovas naturais	11
3.4. Estereomicroscopia	11
3.5. Microscopia de luz	11
3.5.1. Inclusão em historesina	11
3.5.2. Inclusão em paraplást	12
3.6. Microscopia eletrônica de varredura	12
3.7. Morfometria de ovos e larvas	13

3.8. Análise Estatística	13
4. RESULTADOS	14
4.1 Reprodução induzida	14
4.2. Qualidade da água.....	18
4.3. Comportamento reprodutivo	18
4.4. Morfometria de ovos e larvas.....	18
4.5. Desenvolvimento embrionário e larval de desovas naturais	20
4.5.1. Desenvolvimento embrionário e larval sob estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura	20
4.5.1.1. Formação do embrião	20
4.5.1.2. Eclosão	21
4.3.1.3. Fase larval vitelínica	21
4.5.2. Desenvolvimento histológico de embriões e larvas.....	29
4.5.2.1. Formação do embrião e eclosão	29
4.5.2.2. Fase larval vitelínica	29
4.5.2.2.1. Sistema digestivo	29
4.5.2.2.2. Sistema locomotor e outros	30
4.5.2.2.3. Sistema sensorial	31
4.5.2.2.4. Sistema circulatório e respiratório	32
4.5.2.2.5. Sistema excretor	32
4.5.2.2.6. Sistema nervoso	33
5. DISCUSSÃO	38
5.1. Reprodução induzida	38
5.2. Qualidade da água	40
5.3. Morfometria de ovos e larvas	40
5.5. Desenvolvimento de embriões e larvas	42

5.5.1. Formação do embrião	42
5.5.2. Eclosão	42
5.5.3. Fase larval vitelínica	43
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resposta da indução hormonal em fêmeas.....	15
TABELA 2 – Resposta da indução hormonal em machos.....	16
TABELA 3 – Parâmetros físico-químicos da água.....	18
TABELA 4 - Valores médios de diâmetro máximo e mínimo dos ovos de <i>A. ocellatus</i>	19

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Pesagem, indução e extrusão de reprodutores de <i>Astronotus ocellatus</i>	10
FIGURA 2 – Fotomicrografia de ovo e larva de <i>Astronotus ocellatus</i> - medidas de comprimento e largura	12
FIGURA 3 – Fotomicrografias e eletronicmicrografia de ovócitos de <i>Astronotus ocellatus</i>	16
FIGURA 4 – Valores médios de comprimento padrão e altura do vitelo das larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> a partir da eclosão	19
FIGURA 5 – Fotomicrografias e Eletronicmicrografia de ovos e larva de <i>Astronotus ocellatus</i> em diferentes estágios de desenvolvimento	23
FIGURA 6 – Eletronicmicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> - crescimento e absorção do vitelo	24
FIGURA 7 – Eletronicmicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> – detalhes da cabeça e nadadeira peitoral	25
FIGURA 8 – Fotomicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> - pigmentação da cabeça e vascularização do vitelo; nadadeiras peitorais; excreção de bile; raios da nadadeira caudal; vitelo absorvido	26
FIGURA 9 – Eletronicmicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> - Glândulas adesivas; neuromastos; aparelho branquial	27
FIGURA 10 – Eletronicmicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> - boca e o orifício nasal;	

células produtoras de muco; botões gustativos	28
FIGURA 11 – Fotomicrografia de ovos de <i>Astronotus ocellatus</i> – córion; gástrula; formação da cabeça; glândulas adesivas	34
FIGURA 12 - Fotomicrografia de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> – bexiga natatória; fígado; notocorda, pronéfron	35
FIGURA 13 – Fotomicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> – Coração; cabeça; brânquias; olho	36
FIGURA 14 – Fotomicrografias de larvas de <i>Astronotus ocellatus</i> – glândulas da faringe, esôfago, estômago, intestino e bexiga urinária	37

RESUMO

O *Astronotus ocellatus* é originário da Bacia Amazônica, climatizado e disseminado, desde 1938, em açudes e rios do Nordeste brasileiro, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. Trata-se de um peixe de grande potencial, devido a características adequadas para pesca esportiva, cultivado como ornamental e com uma carne saborosa e apreciada pela população do Norte e Nordeste do Brasil. Existem na literatura atual poucos estudos a respeito da biologia reprodutiva dessa espécie. Embora seja de desova parcelada e se reproduza bem em cativeiro, estudos de reprodução artificial têm suma importância para diversas pesquisas de biologia e desenvolvimento embrionário, cujos eventos devem ser acompanhados numa faixa de tempo conhecida e assim contribuir para uma melhor compreensão do cultivo, manejo e controle da espécie. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta do *Astronotus ocellatus* a aplicação de dois hormônios estimuladores de reprodução (gonadotropina coriônica humana - HCG e extrato de hipófise de carpa - EHC) e estudar a estrutura, ultraestrutura e morfometria de seus ovos e larvas. Foram utilizados 16 casais de reprodutores pertencentes ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (SP) e quatro desovas ocorridas naturalmente nos viveiros. Observou-se que cinco das dezesseis fêmeas responderam ao estímulo hormonal, sendo três com HCG e duas com EHC. Dos machos, apenas um respondeu positivamente ao HCG. O acará-açu possui ovos demersais, adesivos, pouco resistentes ao tato, de formato ovóide pouco acentuado. “In vivo” apresentaram coloração amarelada, quando fertilizados, e branca opaca, quando não fertilizados, com grande esfera vitelina e pequeno espaço perivitelino. As desovas apresentaram ovos com valores médios variando de $1,75 \pm 0,056$ a $1,98 \pm 0,038$ e $1,65 \pm 0,057$ a $1,75 \pm 0,037$ mm para diâmetro maior e menor, respectivamente. As larvas da quarta desova eclodiram com $3,25 \pm 0,24$ mm de comprimento e $1,55 \pm 0,03$ mm de altura do vitelo. Com $7,86 \pm 0,11$ mm de comprimento total, o vitelo já estava completamente absorvido. A eclosão das larvas ocorreu entre 46 e 58 horas após a coleta inicial, o desenvolvimento destas até a absorção do vitelo levou 185 horas, a uma temperatura média de $27,45 \pm 2,13$ °C. Foi observada a gastrulação e a organogênese, com o desenvolvimento de glândulas adesivas na cabeça, vesícula óptica e ótica, eclosão com boca e ânus fechados, formação do coração, fígado, bexiga gasosa, brânquias, olhos, pronéfrons, cérebro, nadadeiras e trato digestório.

Palavras-Chave: Reprodução, morfologia, embriões, larvas, ontogenia, *Astronotus ocellatus*.

SUMMARY

Astronotus ocellatus is a fish from the Amazon Basin, adapted and widely reared since 1938 in ponds and rivers of Brazilian northeast region by the Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. This fish has a great potential due to appropriate characteristics for sporting fishing, reared as ornamental and owning a very tasty meat being appreciate by the people in north and northeast regions of Brazil. Despite having all these adjectives for aquaculture there are a few studies about reproductive biology of this species. Although spawning does not occur at once and reproduction in captivity is well successful, studies about artificial reproduction are extremely important for several researches in biology and early embryonic development of which events must be followed in a known lack of time and like this to contribute for a better understanding of rear conditions, management and control of the species. Therefore, this present research aimed to assess the *Astronotus ocellatus* responses to administration of two kinds of reproductive hormones (Human Chorionic Gonadotropin - HCG and carp hypophysis extract – CHE) and studying the structure, ultrastructure and morphometry of its eggs and larvae. Sixteen couples from Centro de Aquicultura of Universidade Estadual Paulista, *Campus* of Jaboticabal (SP) and four spawnings occurred naturally in ponds were also caught. Five of sixteen females responded to hormonal stimuli, three of them with HCG and two with CHE. In relation to males, only one responded favorably to HCG. Acará-açu females have demersal and adhesive eggs, somewhat resistant to the touch, discreet egg shape-like, yellowish colour “*in vivo*” and when fertilized and white opalescent without fertilization, with a large vitelline sphere and a small space between yolk and chorion. The spawnings presented eggs with average values of $1,75\pm 0,056$ - $1,98\pm 0,038$ and $1,65\pm 0,057$ - $1,75\pm 0,037$ mm for length and width, respectively. The hatching occurred with larvae measuring 3.25 ± 0.24 mm in length and 1.55 ± 0.03 mm in yolk height. At 7.86 ± 0.11 mm of larval total length, yolk was completely absorbed. The larvae hatching occurred between 46 and 58 hours after the first collection, and its development until the yolk absorption took about 185 hours in average temperature of 27.45 ± 2.13 °C. The gastrulation and organogenesis events were observed with development of adhesive glands on the head, optic and otic vesicles and formation of heart, liver, swimbladder, gills, eyes, kidney, brain, fins and digestive tract. The mouth and anus at moment of hatching were closed.

Keywords: Reproduction, morphology, embryos, larvae, ontogeny, *Astronotus ocellatus*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil já dispõe de razoável tecnologia de criação das espécies nativas, ainda sim, há a necessidade de se conhecer melhor a biologia de algumas que apresentam grande potencial para a piscicultura (CASTAGNOLLI, 1992). A criação de novas espécies de peixes em cativeiro será uma opção importante, pois permitirá um aumento sobre os estoques pesqueiros. Isto nos indica a necessidade e prioridade de resguardar o setor, requerendo o conhecimento científico da biologia e ecologia de peixes de água doce. É cada vez mais urgente que órgãos públicos e universidades, estudem e selecionem novas espécies que possam contribuir para o desenvolvimento de uma piscicultura sustentável (VAL e HONCZARIK, 1995 e VAL et al., 2000).

Apesar da importância do *A. ocellatus* para a piscicultura esta ainda é uma espécie pouco estudada. Não foi encontrado na literatura atual trabalhos de desenvolvimento de embriões e larvas nem de indução hormonal desta espécie. Estudos sobre desenvolvimento embrionário e larval são muito importantes, pois podem ser utilizados em uma ampla variedade de pesquisas. A descrição das fases embrionárias pode auxiliar na identificação dos ovos viáveis em estudos de produtividade e sobrevivência, uma vez que estes variam em tamanho, forma, cor, número e densidade específica de acordo com a espécie (LAGLER, 1959). Além disso, podem dar suporte para diversos estudos de ontogenia e serem utilizados como objeto de experimentação na avaliação da qualidade do ambiente e do efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática (FLORES et al., 2002).

O conhecimento dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de peixes é de extrema importância para pesquisas com espécies nativas (RIBEIRO et al., 1995) e para a piscicultura de modo geral. Assim, o estudo da biologia reprodutiva do acará-açu é justificável por todos os atributos já citados, por sua importância na perpetuação e preservação da espécie e, sobretudo pela falta de informações existentes. Apesar do grande consumo pela população da região Norte do país, é um peixe pouco cultivado na piscicultura e requer maiores estudos para que haja a reprodução e produção em escala comercial (DA SILVA et al., 2004).

1.1. Espécie em estudo

O *A. ocellatus* é um ciclídeo originário da Bacia Amazônica, climatizado e disseminado desde 1938 em açudes e rios do Nordeste brasileiro pelo do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), encontrado em quase todo o país (FONTENELE, 1982).

Nos Estados Unidos, no sul do Estado da Flórida, há referência de que a espécie é encontrada em grande concentração, cultivada em aquários para pesca esportiva (FURY, 1994).

O acará-açu apresenta corpo de conformação robusta, achatado lateralmente, com regular altura em relação ao comprimento; região dorsal espessa e sem espinhas intramusculares; cor parda escura ou castanha, com manchas verticais vermelho-claras; nadadeira dorsal e anal com espinhos, nadadeira caudal arredondada; cabeça pequena em relação ao corpo; olhos grandes e linha lateral interrompida. O que caracteriza a espécie é um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira de mesmo nome (FONTENELE e NEPOMUCENO, 1983).

Quanto ao habitat da espécie, Braga (1962) afirma que é preferencialmente gregária: alevinos e juvenis nadam em cardumes compactos. Adultos vivem menos conjuntamente. Prefere locais sombreados, calmos e águas rasas, claras. Não é tolerante a grandes variações de temperatura. Reduz sua atividade em águas abaixo de 15°C e morre quando a temperatura se torna inferior a 10°C. Santos (1977) enfatiza que o *Astronotus ocellatus* tolera bem o verão paulista, e as gerações nascidas e criadas no estado São Paulo se apresentam resistentes ao frio no inverno, quando a água esfria até 14°C.

Em exemplares sexualmente maduros, as cores se acentuam, principalmente o carmesim na base do opérculo e nas faixas verticais. As tonalidades marrons mudam para negra, notadamente no dorso e parte superior da cabeça (FONTENELE, 1982). Indivíduos da espécie chegam a medir 330 mm e pesar até 1,5 Kg (MACHADO, 1983).

Na natureza, acasalam-se logo que atingem a primeira maturação gonadal, entre 10 e 12 meses de idade, e fazem sua postura em superfícies duras e limpas, tais como pedras, galhos e troncos submersos, seus ovos são adesivos, entre 1500 e 2000 por desova (BRAGA, 1962). Apresenta desova parcelada, liberando seus gametas em um espaço bastante reduzido, tem cuidado parental e podem desovar de 3 a 4 vezes por ano (SILVA et al., 1993). Fontenele (1951) observou que o acará-açu apresenta mais de um ciclo reprodutivo por ano, nas condições climáticas do Nordeste brasileiro, concentrando suas desovas entre outubro e abril,

período de maior fotoperíodo, temperatura elevada e de chuvas. Santos (1977) salienta que, nas condições climáticas de São Paulo, a espécie desova até três vezes por ano.

Magalhães (1931) salienta que a espécie é muito valiosa na Amazônia. Fontenele e Nepomuceno (1983) enfatizam que é um peixe bastante apreciado no Norte e Nordeste do Brasil, por apresentar carne saborosa, firme e sem espinhas intramusculares. Azevedo e Vieira (1940), Menezes (1951), Braga (1982) e Fontenele (1982) referem que a disseminação dessa espécie é facilitada por sua rápida aclimação e reprodução em novos ambientes.

Gurgel e Freitas (1973) afirmam que o aproveitamento do acará-açu com peso médio de 283,8 g é, em média, de 85,5%, entre o peixe íntegro e eviscerado, variando de 81,0 a 90,6%. As fêmeas apresentam maior rendimento em carne do que os machos e se trata de uma espécie de grande potencial para o mercado consumidor do Nordeste brasileiro.

Nos anos de 1978 a 1988, a produção de acará-açu, em 100 açudes administrados pelo DNOCS, foi de 5.574,34 t, em média 506,76 t/ano, o que coloca a espécie entre as seis mais produtivas ainda, a produção de alevinos é promissora e viável, com mão de obra, relativamente baixa sem comprometer os rendimentos (BEZERRA e SILVA et al., 1993). Alcântara Filho e Araújo Filho (1983) dizem que a criação intensiva desta espécie não é recomendável, devido ao tempo necessário para a espécie alcançar o tamanho comercial, porém, recomendam-na para a extensiva, considerando suas características biológicas e aceitação, principalmente pelas comunidades rurais. Ainda, pode ser considerada uma espécie onívora de valor comercial, que é capaz de reproduzir-se em ambientes reduzidos sem oferecer perigo às demais espécies, principalmente nativas (BEZERRA e SILVA, 1993).

É muito conhecido em todo o mundo como peixe de aquário (MACHADO, 1983). Além da beleza é apreciado por ser um peixe muito inteligente, agressivo e capaz de reconhecer seu dono (Observação pessoal).

1.2. Reprodução induzida

A reprodução é o processo biológico mais importante dos organismos, já que dela depende a sobrevivência e perpetuação das espécies, por isso, a possibilidade de controlar o ciclo reprodutivo dos organismos submetidos a condições de confinamento é um dos fatores de maior importância para assegurar o êxito da piscicultura (ROMAGOSA, 2003).

A piscicultura, no Brasil, teve possibilidade de se expandir a partir do momento em que as técnicas de reprodução em cativeiro, que vinham se desenvolvendo desde a década de

30, com a criação do processo de desova artificial de peixes, se consolidaram (WOYNAROVICH e HÓRVATH, 1983).

A reprodução induzida tornou-se um processo muito importante, especialmente para espécies reofílicas devido ao perigo de extinção de algumas destas espécies nobres, em virtude do desaparecimento das matas ciliares, das lagoas marginais e da construção de grandes barragens hidrelétricas que alteram seu habitat e dificultam sua reprodução natural (CASTAGNOLLI, 1992). Além disso, essas espécies necessitam migrar para reproduzir o que não é possível em condições de confinamento, portanto precisam ser induzidas à reprodução através de aplicação de hormônios estimulantes (NARAHARA et al., 1994).

Vários pesquisadores brasileiros têm mostrado interesse pela reprodução induzida (NARAHARA et al., 2002), e embora haja muitos trabalhos sendo desenvolvidos, algumas espécies ainda necessitam de estudos para o aprimoramento das técnicas de indução da reprodução (ANDRADE-TALMELLI et al., 2002).

A indução à desova deve ser realizada na época certa que coincide com o período de reprodução. Por isso, há a necessidade de se conhecer a biologia reprodutiva e comportamental da espécie com que se pretende trabalhar (CASTAGNOLLI, 1992).

O processo de reprodução inicia-se a partir do hipotálamo, que é a glândula que influenciada por fatores externos, inicia a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este hormônio decapeptídeo controla a liberação das gonadotrofinas em peixes, GtH I e GtH II, que à semelhança do hormônio luteinizante de mamífero (LH) irá estimular as gônadas a produzir os esteróides que desempenham importante papel na maturação final e reprodução (CASTAGNOLLI, 1992; RANG et al., 2005).

As formas de indução hormonal à reprodução se dá através da aplicação de substâncias que irão desencadear estímulos na hipófise desses animais ou em nível gonadal (ANDRADE e YASUI, 2003). A utilização do extrato bruto da hipófise de peixes adultos continua sendo a técnica mais utilizada para a indução hormonal da maturação final, apesar de algumas desvantagens, tais como a variabilidade na quantidade de gonadotropina presente em hipófises distintas, o que dificulta a padronização da dosagem indicada, e também os elevados preços no mercado nacional e internacional (HARVEY e CAROSFELD, 1993).

Uma alternativa, também empregada é o HCG, que atua diretamente nas gônadas, induzindo a maturação e, apesar possa desencadear reação imune, e não ter uma metodologia definida em muitas espécies possui um custo menor que o extrato de hipófise, permite uma padronização qualitativa, fácil aquisição e pode ser estocado por longos períodos (ANDRADE e YASUI, 2003).

As induções químicas podem ainda ser utilizadas para aumentar a produção seminal, antecipar o período reprodutivo, restringí-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote de matrizes, o que permite obtenção de maior número de alevinos em períodos que a lucratividade é maior (VENTURIERI e BERNARDINO, 1999).

A reprodução de peixes de desova parcelada apresenta baixo custo para a obtenção de alevinos, pois ao contrário dos peixes reofílicos, dispensa o uso de hormônios, instalações e mão-de-obra especializada. Por outro lado, com a reprodução natural o produtor tem pouco controle do processo reprodutivo dos animais, devido à dificuldade em implantar um programa de acompanhamento do desenvolvimento dos gametas, e da qualidade dos reprodutores (ANDRADE e YASUI, 2003).

Embora a maioria das espécies lênticas se reproduza bem em cativeiro, estudos de indução hormonal têm suma importância para pesquisas de reprodução, pois muitas das técnicas reprodutivas ainda não estão bem compreendidas para as espécies nativas, e os principais estudos que estão sendo desenvolvidos nessa área, estão voltados para espécies exóticas (ANDRADE e YASUI, 2003).

1.3. Desenvolvimento embrionário

Estudos sobre ovos de peixes são de grande interesse por fornecerem subsídios para a compreensão da fisiologia dessa célula germinativa, tendo em vista a preservação de gametas, a conservação da ictiofauna e o aprimoramento de técnicas de cultivo (GODINHO et al., 2003).

No Brasil, pesquisas relacionadas à biologia reprodutiva e ao desenvolvimento embrionário e larval de peixes em cativeiro têm sido baseadas principalmente em espécies reofílicas como: *Brycon cephalus* (ROMAGOSA et al. 2001), *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al. 2001), *Brycon orbignyanus* (GANECO, 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (MARQUES, 2005), *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (SAMPAIO, 2006), *Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma fasciatum* (FAUSTINO et al. 2007), *Brycon amazonicus* (NEUMANN, 2008).

Pouco se conhece sobre o desenvolvimento inicial de espécies nativas de desova parcelada. O conhecimento de embriões e larvas de uma espécie é de grande importância, pois constitui ferramenta útil na localização de áreas de desova e no estudo do crescimento da espécie em ambiente natural (REYNALTE-TATAJE et al., 2001). Com relação ao grande

número de espécies de peixes nativos da Bacia Amazônica, muito pouco se conhece acerca de seus estádios embrionários e potencial reprodutivo (ANJOS e ANJOS, 2006).

O desenvolvimento embrionário é um processo que se inicia com a fertilização do ovócito e vai até a eclosão das larvas (KIMMEL et al., 1995). Após a fertilização, o ovo absorve água e ocorre a formação do espaço perivitelino, com a separação entre o córion e a membrana vitelina. Os ovos dos peixes são telolécitos, com um elevado suprimento de vitelo, do qual o embrião irá se nutrir durante a embriogênese, assim como as larvas durante algum tempo após a eclosão (NAKATANI et al., 2001).

De acordo com Woynarovich e Horvath (1983) e Nakatani et al. (2001), o desenvolvimento embrionário pode ser dividido nas seguintes fases: ovo recém-fertilizado, segmentação, blastulação, gastrulação, fechamento do blastóporo, vesícula óptica, vesícula auditiva, liberação da cauda e eclosão.

Trata-se de um processo complexo que permite estudar a ontogenia das espécies, podendo ser utilizado como objeto de experimentação em processos biotecnológicos, como bioindicadores da qualidade do ambiente e para avaliar o efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática. Portanto os embriões podem ser utilizados em uma grande variedade de estudos (FLORES et al., 2002; BOTERO et al., 2004; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006).

Os mecanismos básicos do desenvolvimento de teleósteos são semelhantes. Por outro lado, são muito diferentes no que diz respeito ao tempo de desenvolvimento, pois estes eventos são controlados por fatores genéticos e ambientais (FALK-PETERSEN, 2005).

Considerando-se que os peixes representam 50% dos vertebrados e que apresentam grande variedade de estratégias reprodutivas (NELSON, 1994) ainda há muito que ser estudado especialmente sobre as espécies nativas brasileiras.

1.4. Ontogênese larval

O conhecimento da ontogênese de larvas de peixes brasileiros é escasso, sendo seu estudo importante para o conhecimento da história de vida inicial, para taxonomia e larvicultura (GODINHO et al., 2003).

O estágio larval pode durar de alguns dias a meses, dependendo da temperatura e também da espécie. A maioria das larvas de peixes de água doce eclode transparente, com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos com pouca pigmentação e saco vitelino grande (NAKATANI et al., 2001). Antes da abertura da boca, as larvas nutrem-se do vitelo, que é

reabsorvido constantemente através de endocitose via camada sincicial vitelínica (SHAHSAVARANI et al., 2002).

O período de absorção do saco vitelino é vital para a larva, pois, nesse período, o sistema digestório ainda se encontra em diferenciação (GODINHO et al., 2003). Em muitas espécies, a maioria dos órgãos começa a ser funcionais após a primeira alimentação e durante a diferenciação dos estágios larvais e de metamorfose, embora alguns peixes de desenvolvimento direto e longo período de incubação apresentem larvas com morfologia e funcionamento de órgãos imediatamente à eclosão (FALK-PETERSEN, 2005).

O tempo de desenvolvimento de sistemas e órgãos 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).

O tamanho do saco vitelino e tempo de absorção do mesmo também são espécie-específica. Larvas com maior quantidade de reservas endógenas dispõem de um período mais longo para se adaptar a captura de alimentos externos enquanto são sustentadas pelas reservas do saco vitelino (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983; BONISLAWSKA et al., 2000; GISBERT et al., 2000).

Da mesma forma que em outros animais, o sistema digestório dos peixes é responsável pela ingestão e armazenamento de alimentos, quebra mecânica e hidrólise enzimática (CHAVES e VAZZOLER, 1984). A formação do sistema digestório está entre as alterações morfológicas que mais influenciam na sobrevivência e crescimento dos peixes durante o início do ciclo de vida (NEUMANN, 2008).

A maioria dos estudos com larvas de peixes é voltada à sistemática e filogenia, sem dar atenção particular ao desenvolvimento morfológico em relação à função. Estudos sobre larvas de peixes são necessários na compreensão do papel biológico dos caracteres larvais para a sobrevivência, principalmente de mecanismos funcionais relacionados a requerimentos vitais, como locomoção, alimentação e respiração (OSSE, 1990).

2. OBJETIVOS

Diante da importância biológica e econômica do *Astronotus ocellatus* para a piscicultura brasileira o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois protocolos de reprodução artificial em matrizes e estudar o desenvolvimento embrionário e larval por análise morfométrica, observações em estereomicroscópio, microscopia de luz e eletrônica de varredura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O experimento foi realizado utilizando-se matrizes de *Astronotus ocellatus* pertencentes ao Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Campus de Jaboticabal. A reprodução artificial foi realizada no Laboratório de Reprodução de Peixes e os ovos foram incubados no Laboratório de Peixes Ornamentais e no Setor de Ranicultura, também do CAUNESP. As análises histológicas foram processadas no Laboratório de Histologia de Peixes do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e as amostras de microscopia eletrônica no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal.

3.2. Animais

Dezesseis casais de reprodutores de um a dois anos de idade e peso médio de 460g foram selecionados quando apresentaram as seguintes características secundárias de reprodução: abdome abaulado, coloração da papila urogenital, coloração das escamas (aparecem faixas verticais vermelhas no corpo na época de reprodução - FONTENELE, 1982) e formação de casal dentro do viveiro.

Cada casal foi acondicionado em caixas de fibrocimento com 1000L de capacidade e 500 L de volume de água, com aerador e temperatura controlada por aquecedores.

3.3. Metodologia aplicada

3.3.1. Qualidade da água

Os seguintes parâmetros da qualidade de água foram monitorados, tanto nas incubadoras quanto nos viveiros: temperatura e oxigênio dissolvido em oxímetro digital YSI 550 A, pH e condutividade em condutivímetro digital multiparâmetro YSI 63 (medidos pela manhã, uma vez ao dia), alcalinidade e amônia pelos métodos de Goltermann et al. (1978) (pela manhã, uma vez por semana).

Nas caixas onde permaneceram os reprodutores para reprodução artificial, foi monitorada somente a temperatura, diariamente.

3.3.2. Preparação e Indução à reprodução

Os trinta e dois peixes foram pesados em balança digital e induzidos à reprodução com injeções de hormônios sexuais utilizando-se de seringas plásticas de 3 mL sem a retirada dos animais de dentro d'água, para evitar ao máximo o estresse desses (Figura 1 A e B). Houve enorme preocupação em dar as melhores condições possíveis de bem estar aos reprodutores durante o experimento de indução à reprodução, evitando o excessivo manuseio destes, e aclimatando-os no momento da transferência destes dos viveiros para as caixas.

Utilizou-se de dois protocolos de indução hormonal, adaptados dos protocolos utilizados por Andrade e Yasui (2003) e Carrillo e Romagosa (2004), respectivamente:

1) Os peixes receberam injeções intramusculares de extrato bruto de hipófise de carpa (EHC), secas em acetona, que foi triturada em gral com pistilo, adicionando-se solução fisiológica de NaCl a 0,6%. As fêmeas receberam uma dose preparatória de 0,5 mg/Kg (miligramas de hipófise seca por quilo de peso vivo de peixe), e após 18 horas, a segunda dose de 5 mg/Kg. Os machos receberam 1,5 mg/Kg em dose única, junto com a segunda dose das fêmeas.

2) As fêmeas receberam injeções intramusculares, com gonadotrofina coriônica humana, hormônio HCG – Vetecor 5000 UI, utilizado na dose total de 5,0 UI por grama de peso de peixe, dividido em duas injeções, a primeira correspondendo a 10% na hora zero e a segunda de 90% aplicada 18 horas após a primeira dose. Os machos receberam metade das doses aplicadas nas fêmeas em dose única, junto com a segunda dose das fêmeas.

Após 24 horas da última injeção, machos e fêmeas foram retirados dos tanques e envoltos em um pano para secá-los. Após a secagem foram realizadas leves massagens abdominais no sentido crânio-caudal, para extrusão dos gametas (Figura 1 C). Foram observados então liberação e quantidade de sêmen, liberação, quantidade, coloração e forma dos ovócitos.

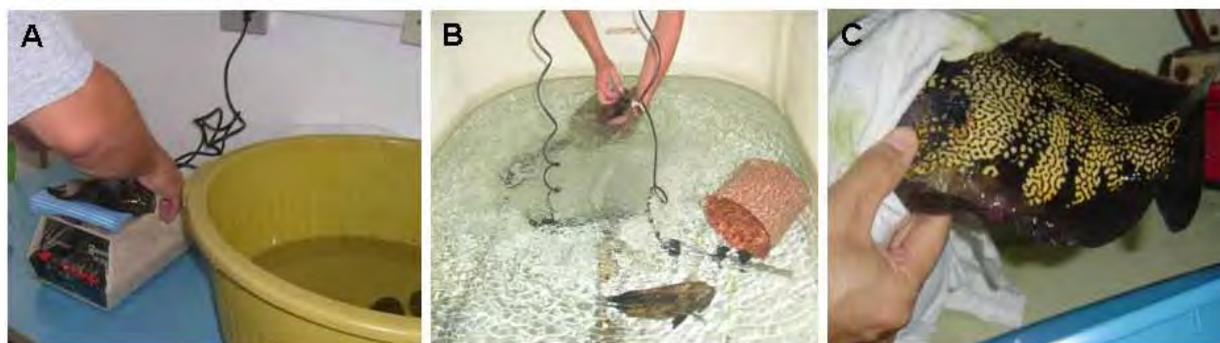


Figura 1: A – Pesagem dos animais; B - Indução hormonal e C – Extrusão.

3.3.3. Coletas de desovas naturais

Foram utilizados dois lotes de 150 peixes, aproximadamente, de *A. ocellatus* entre um e dois anos de idade, mantidos em dois viveiros de alvenaria de 50 m³ e alimentados com ração comercial extrusada contendo 40% de proteína bruta, duas vezes ao dia. Foram colocados cilindros de plástico e tijolos de cerâmica (0,20 m X 0,20 m X 0,10 m), em toda extensão dos taludes internos dos viveiros para abrigo e substrato para desova. Foram, então, observadas desovas naturais ocorridas durante o período de outubro de 2006 a abril de 2007 e de outubro de 2007 a fevereiro de 2008.

Assim que percebidas as desovas no viveiro, estas foram retiradas e transportadas para incubadoras do tipo bandeja plástica com 0,40 m de largura X 0,60 m de comprimento X 0,15 m de altura e fluxo de água contínuo. Iniciaram-se as coletas das amostras seguindo o protocolo: coleta inicial, assim que vista a desova no viveiro, de seis em seis horas até a abertura da boca da larva, depois de 12 em 12 horas até 161 horas (pós-eclosão) e de 24 em 24 horas.

3.4. Estereomicroscopia

As amostras foram fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24 horas, lavadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e conservadas em geladeira em álcool 70%. Observadas e capturadas as imagens em estereomicroscópio LEICA MZ8, acoplado ao equipamento automático de fotomicrografia LEICA DC 180.

3.5. Microscopia de luz

3.5.1. Inclusão em historesina

As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24h, lavadas em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4. Desidratadas por 24 horas em solução de álcool 80%. Lavadas duas vezes durante 30 minutos em álcool 90% e absoluto. Em seguida foram incluídas em historesina segundo instruções do Kit Leica Historesin. Ficaram 4 horas na solução de pré-infiltração glicolmetacrilato (GMA) com etanol (1:1), 16 horas na etapa de infiltração (GMA) e então foram incluídas em histomoldes. As amostras permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas para polimerização.

Os cortes foram feitos com 3µm de espessura, corados com Hematoxilina-Floxina (HF) (TOLOSA et al., 2003) e montados em lâmina histológica e lamínula com entelan. Posteriormente observados e fotomicrografados em microscópio Leica DM 2500.

3.5.2. Inclusão em paraplast

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24h, lavadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Após a lavagem, os ovos e larvas permaneceram por 5 minutos em cada uma das soluções para desidratação (álcool a 80, 90 e 95%, álcool absoluto I, II e III) e para diafanização (xilol I, II e III) e, 20 minutos para as etapas de infiltração do paraplast (Merck), seguida de inclusão do material. Considerando a natureza do material biológico em questão, a técnica de microtomia foi adaptada para que os cortes obtidos tivessem melhor qualidade para observação. Desta forma, os blocos a serem cortados foram desbastados e o lado do corte foi imerso em solução de glicerina e água destilada (1:1) por 24h. Os cortes foram feitos com 5 µm de espessura e a coloração dos cortes realizada com Hematoxilina-Eosina (TOLOSA et al., 2003). Posteriormente observados e fotomicrografados em microscópio Leica DM 2500.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras (ovos e larvas) foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24 horas, lavadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, lavadas novamente no mesmo tampão. Desidratadas em série crescente de etanol, iniciando-se por álcool 30%, passando para álcool 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e três banhos em álcool 100% (absoluto), sendo 15 minutos em cada etanol.

As amostras foram, então, secas em secadora de ponto crítico com CO₂ líquido, em aparelho BAL-TEC, montadas em suporte de cobre, metalizadas com ouro paládio em aparelho DENTON VACUM DESK II, e observadas e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL – JSM 5410).

3.7. Morfometria de ovos e larvas

Foram medidos 10 ovos e 5 larvas de cada um dos tempos de coleta. O diâmetro máximo e mínimo dos ovos, comprimento total e altura do vitelo das larvas, foram realizados no mesmo estereomicroscópico acoplado ao Programa IM 50-LEICA (Figura 2 A e B).

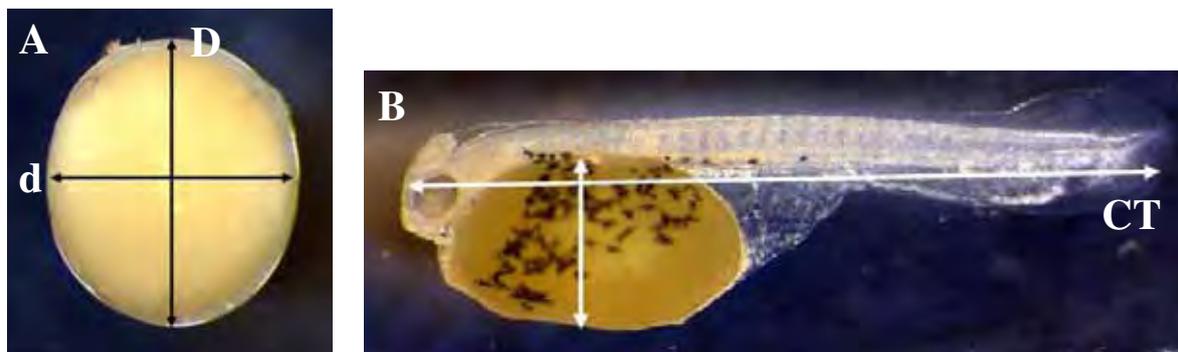


Figura 2: A - Fotomicrografia de ovo de *A. ocellatus* com setas evidenciando como foram realizadas as medidas de diâmetro maior (D) e menor (d) em milímetros (mm) (32X); B - fotomicrografia de larva de *A. ocellatus* mostrando como foram realizadas as medidas de comprimento total (CT) e altura do vitelo (AV) em milímetros (mm) (20X).

3.8. Análise estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado. Os valores medidos de ovos e larvas foram avaliados estatisticamente pelo programa SAS 9.1 com $P < 0,05$, pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. Reprodução induzida

Considerou-se resposta positiva ao estímulo hormonal quando houve liberação de gametas por extrusão, tanto em fêmeas quanto em machos. Assim, observou-se que cinco das 16 fêmeas liberaram ovócitos depois de transcorrido o tempo de ação hormonal, sendo três com HCG e duas com EHC, conforme se observa na Tabela 1.

As fêmeas 1 e 2 desovaram aproximadamente 1.400 ovócitos, de coloração amarelo-claro, formato ovóide, tamanhos uniformes e resistentes ao tato (Figuras 3 A e B). As fêmeas 3 e 10 extrusaram aproximadamente 800 e 1.100 ovócitos, respectivamente. Os ovócitos formavam “grumos”, apresentaram coloração variando de amarelo-claro a amarelo-pardo e formato irregular (Figuras 3 C e D). Já a fêmea 12 extrusou aproximadamente 500 ovos de coloração amarelo-claros e diversos tamanhos (Figura 3 E). Em microscopia eletrônica de varredura observaram-se amostras de todas as cinco desovas. Verificou-se a presença de uma camada gelatinosa envolvendo os ovócitos (Figura 3 E). Esta foi removida manualmente com a utilização de pinças, porém não foi vista a presença de micrópila em nenhuma das amostras observadas.

Quanto aos machos, apenas um respondeu positivamente ao HCG conforme se observa na Tabela 2, tendo espermiado menos de 1 mL de sêmen.

Devido ao comportamento inesperado dos machos em relação à indução, dois animais já induzidos, um com HCG e outro com EHC, foram anestesiados em benzocaína e sacrificados para observação de seus testículos. Observou-se que estes se apresentaram na forma de filetes, de coloração rósea, ocupando uma pequena porção da cavidade celomática e com pouquíssima produção de sêmen.

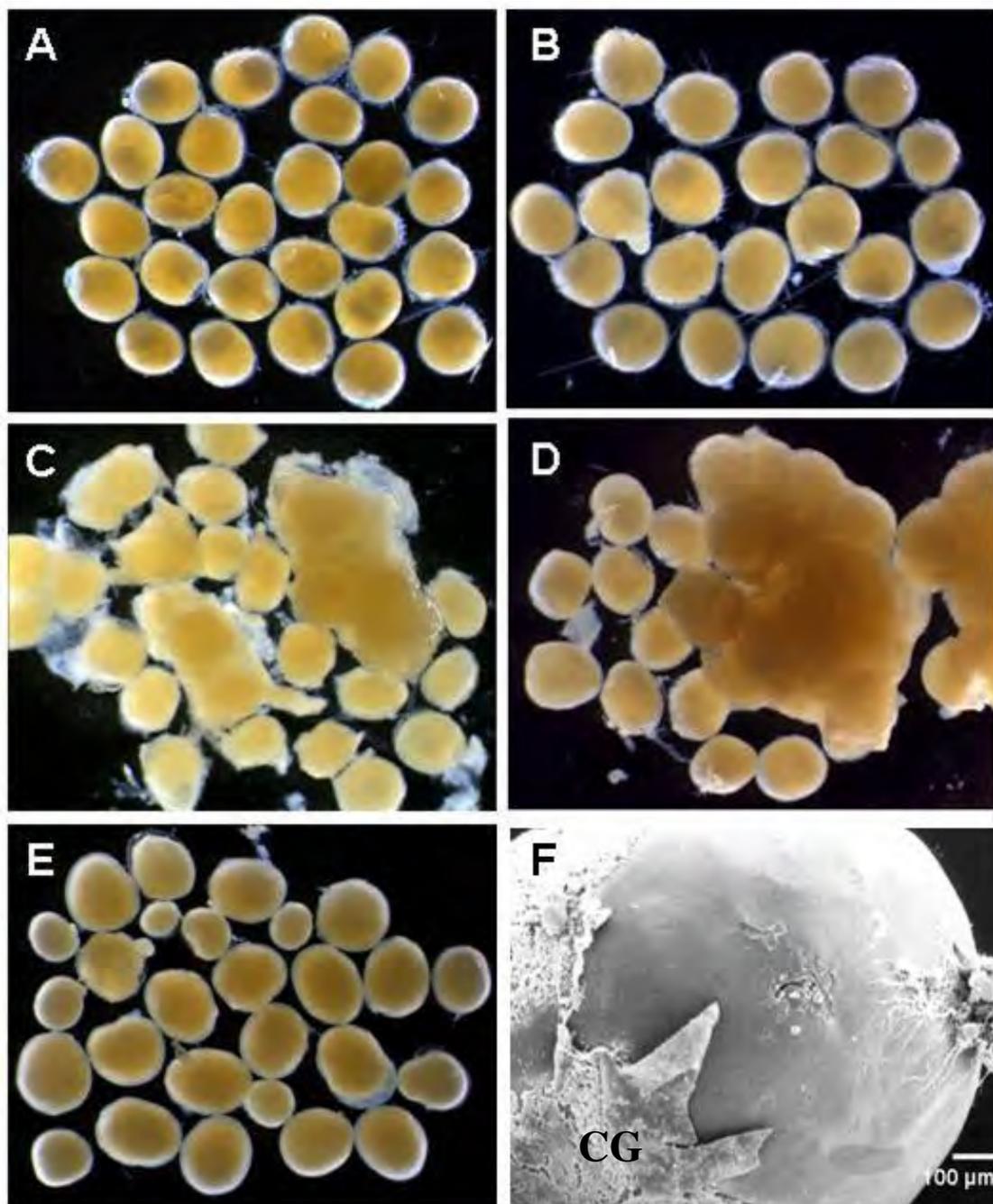
Tabela 1: Resposta das fêmeas à reprodução induzida relacionando o peso corporal e o hormônio empregado.

Nº	Peso corporal (g)	Hormônio	Resposta
1	595 g	HCG	Sim
2	500 g	HCG	Sim
3	525 g	HCG	Sim
4	525 g	HCG	Não
5	600 g	HCG	Não
6	500 g	HCG	Não
7	480 g	HCG	Não
8	414 g	HCG	Não
9	470 g	EHC	Não
10	610 g	EHC	Sim
11	655 g	EHC	Não
12	485 g	EHC	Sim
13	525 g	EHC	Não
14	514 g	EHC	Não
15	299 g	EHC	Não
16	293 g	EHC	Não

Tabela 2: Resposta dos machos à reprodução induzida relacionando o peso corporal e o hormônio empregado.

Nº	Peso corporal (g)	Hormônio	Resposta
1	470 g	HCG	Não
2	500 g	HCG	Sim
3	435 g	HCG	Não
4	665 g	HCG	Não
5	380 g	HCG	Não
6	320 g	HCG	Não
7	380 g	HCG	Não
8	377 g	HCG	Não
9	425 g	EHC	Não
10	305 g	EHC	Não
11	250 g	EHC	Não
12	950 g	EHC	Não
13	605 g	EHC	Não
14	320 g	EHC	Não
15	290 g	EHC	Não
16	320 g	EHC	Não

Figura 3: A, B, C, D, E - Fotomicrografias de ovócitos da fêmea 1, 2, 3, 10 e 12 (10X); F – Electronmicrografia de ovócito visto em MEV (CG – camada gelatinosa).



4.2. Qualidade da água

A temperatura média das caixas onde os reprodutores permaneceram durante a reprodução induzida variou de 28° a 30°C.

Os valores médios de variáveis físico-químicas da água das incubadoras e dos viveiros durante o período de coletas, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios de variáveis físico-químicas da água das incubadoras e viveiros durante o período estudado.

Variáveis	O ₂ (mg/L)	pH	Alcalinidade (mg/L)	Amônia (µg/L)	Condutividade (µS/cm)	Temperatura (°C)
Incubadoras	5,52	4,83	52,0	117,45	35,51	27,45±2,13
Viveiros	4,70	6,18	38,0	82,50	34,30	26,30±1,13

4.3. Comportamento reprodutivo

Os reprodutores de acará-açu apresentavam comportamento reprodutivo muito acentuado que durava em torno de 10 a 15 dias. Formavam casais que juntos limpavam e protegem o substrato escolhido para a desova. Observou-se que os casais formados pouco se alimentavam durante o período de corte, apresentavam agressividade e, depois da desova ocorrida, alternavam o cuidado da prole: enquanto um nadava sobre os ovos para oxigená-los, o outro protegia o local contra outros peixes e predadores.

Como a maioria dos peixes ósseos, o *A. ocellatus* possui fertilização externa. Os ovos apresentavam-se aderidos ao substrato e espalhados em uma única camada. São demersais, isto é, possuem gravidade específica maior do que a da água, são adesivos e um pouco resistentes ao tato. Apresentaram formato ovóide pouco acentuado, com grande esfera vitelina e pequeno espaço perivitelino (espaço entre o vitelo e o córion). “In vivo” apresentaram coloração amarelada, quando fertilizados, e branca opaca, quando não fertilizados.

4.4. Morfometria

Foram medidos ovos das quatro desovas coletadas que estão representados na Tabela 4. Para morfometria de larvas, foi analisada somente a desova quatro, pois esta apresentou

maior número de amostras e foi a única que permitiu o estudo até a absorção do vitelo. As larvas recém eclodidas desta desova mediam $3,25 \pm 0,24$ mm de comprimento total e $1,55 \pm 0,03$ mm de altura do vitelo. Com $7,86 \pm 0,11$ mm já haviam absorvido o vitelo (Figura 4).

Tabela 4: Valores médios de diâmetro máximo e mínimo dos ovos das quatro desovas analisadas (em milímetros).

Desova	Diâmetro máximo	Diâmetro mínimo
1	$1,88 \pm 0,022$	$1,70 \pm 0,033$
2	$1,98 \pm 0,038$	$1,73 \pm 0,045$
3	$1,94 \pm 0,025$	$1,75 \pm 0,037$
4	$1,75 \pm 0,056$	$1,65 \pm 0,057$

O comprimento total das larvas aumentava continuamente à medida que o vitelo ia sendo absorvido. Com 125 horas foi introduzida a alimentação exógena e com 185 horas o vitelo foi totalmente consumido.

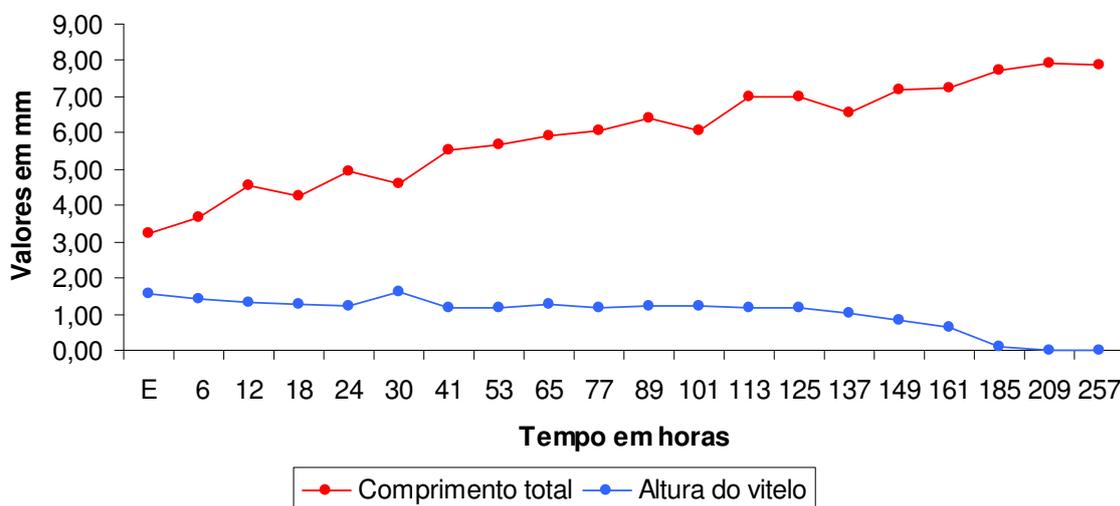


Figura 4: Valores médios de comprimento total e altura do vitelo (mm) das larvas de *Astronotus ocellatus* da desova 4 a partir da eclosão até a absorção do vitelo.

4.5. Desenvolvimento embrionário e larval

Diversas fases importantes do desenvolvimento do *A. ocellatus* foram observadas no presente experimento. Todas as quatro desovas foram analisadas em estereomicroscópio, porém, utilizou-se para processamento microscópico apenas a quarta desova, pois esta apresentou maior número de amostras e foi a única que permitiu o estudo até a absorção do vitelo. A eclosão das larvas ocorreu no terceiro dia após transferência da desova para incubadora, o desenvolvimento destas até a absorção do vitelo levou 185 horas, a uma temperatura média de $27,45 \pm 2,13^\circ\text{C}$. A figura 6 mostra uma seqüência do desenvolvimento larval vitelínico desde a eclosão até 209 horas após esta.

4.5.1. Desenvolvimento embrionário e larval sob estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura

4.5.1.1. Formação do embrião

Assim que retirada a desova natural do viveiro fez-se a primeira coleta dos ovos (coleta inicial - CI). Esta apresentou a maioria dos ovos na fase de gástrula inicial, com cerca de 30% de epibolia (Figura 5 A) e uma camada gelatinosa que conferia aderência a estes. Após 6 horas foram encontrados ovos com 50% de epibolia e, com doze horas após a CI já havia iniciado a formação do embrião.

O início da organogênese embrionária foi caracterizada pela formação do eixo embrionário, com o surgimento de somitos, seguido da diferenciação da cauda e da cabeça (Figura 5 B). Nessa fase, o espaço perivitelino permitiu observar, além do córion, a presença de uma membrana muito próxima da cabeça do embrião (Figura 5 C), possivelmente para maior proteção do mesmo contra injúrias do meio. Foi percebido também o alongamento da cauda, o início da pigmentação do saco vitelínico (melanóforos), a formação de glândulas adesivas na cabeça (Figura 5 D), a vesícula ótica e óptica com o início da pigmentação da retina. Momentos antes da eclosão, a pré-larva (Figura 5 E) apresenta movimentos fortes e contínuos da cauda para rompimento do córion.

4.5.1.2. Eclosão

A eclosão ocorreu entre 46 a 58 horas após a coleta inicial. A larva recém-eclodida (Figura 5 F) apresenta-se transparente, com pigmentação do saco de vitelo e da porção posterior da larva na altura do intestino. A membrana embrionária (“finfold”) presente é bastante ampla (Figura 6 B), a boca estava fechada, glândulas adesivas muito desenvolvidas e em número de dois pares na região superior e um par na região frontal da cabeça (Figura 7 A).

4.5.1.3. Fase larval vitelínica

➤ **6 horas pós-eclosão (hPE):** Um primórdio do coração pulsava na parte anterior do embrião. Observou-se em microscopia eletrônica de varredura o sulco cefálico, as glândulas adesivas bem destacadas e os orifícios nasal e da vesícula ótica (Figura 7 A e 9 A). Devido à ausência de nadadeiras e bexiga natatória e, à presença do vitelo abundante, as larvas mantinham-se no fundo da incubadora, aglomeradas e se locomoviam deslizando com rápidas movimentações da cauda.

➤ **12 - 30 hPE:** A pigmentação do corpo da larva aumentou, houve o surgimento do botão da nadadeira peitoral, a cabeça já se destacava do vitelo, e com 30 hPE o coração já transportava sangue por toda extensão da larva, o vitelo estava bem vascularizado e os olhos bem pigmentados. Nessa fase as larvas tentavam fugir da sucção da pipeta e mostravam-se fotossensíveis quando expostas à luz do estereomicroscópio.

➤ **41 - 77 hPE:** Houve um aprofundamento do epitélio que reveste a entrada da boca e o início da formação dos arcos branquiais (Figura 7 B). Com 53 hPE a boca abriu e ocupava a região anterior da cabeça, abaixo da linha dos olhos. Em seguida iniciou-se a pigmentação da cabeça, a nadadeira peitoral já se destacava, notou-se a formação de lamelas branquiais e o opérculo começava a recobri-las (Figura 7 C). Com 77 hPE as larvas encontravam-se com a nadadeira peitoral livre, a nadadeira embrionária havia diminuído de tamanho, o opérculo recobria quase totalmente as brânquias já bem desenvolvidas e o maxilar inferior estava completamente formado (Figura 7 D), movimentando-se continuamente.

➤ **89 - 113 hPE:** A larva apresentava o aparelho branquial formado, vendo-se as lamelas principais dos arcos branquiais e intensa irrigação sangüínea no vitelo e na cabeça (Figuras 8 A e 9 E). As glândulas adesivas já não eram tão evidentes, as nadadeiras peitorais possuíam grande movimento e o opérculo já estava completamente formado com 101 hPE (Figura 7 F e 8 B). Com 113 hPE a boca já se encontrava na posição terminal, começou a parecer os

primeiros neuromastos ao redor dos olhos (Figuras 9 C e D) e percebeu-se a excreção de bile através ânus (Figura 8 C).

➤ **125 hPE:** Iniciou-se a alimentação exógena. Foram notados botões gustativos somente na superfície dos lábios (Figuras 10 E e F). O epitélio olfativo apresentava muitos cílios (Figuras 10 A e B), a larva já apresentava natação vertical e perseguia os náuplios de artêmia.

➤ **137 – 383 hPE:** Surgiram os primeiros raios da nadadeira caudal (Figura 8 D), existia apenas um par de glândulas adesivas e o coração já se encontrava alojado sob o opérculo. Iniciou-se a formação das nadadeiras dorsal e anal com 149 hPE e surgiram também raios na nadadeira peitoral. Com 185 hPE o vitelo já estava absorvido. A partir de 383 hPE notou-se seis arcos branquiais com células secretoras de muco (Figuras 9 E e F) semelhantes às encontradas presentes na pele (Figuras 10 C e D). A nadadeira peitoral estava completamente formada, nadadeiras dorsal e anal começando a se desenvolver, as glândulas adesivas regredidas, olhos completamente formados, vendo-se a retina já com sua coloração definida e com intensa pigmentação (Figura 8 E).

Figura 5: Fotomicrografias e Eletronmicrografia de ovos e larva de *Astronotus ocellatus*: A - Estágio de gástrula; B - Diferenciação da cabeça e da cauda; C - Presença da membrana próxima da cabeça do embrião; D - Formação da glândula cefálica; E - Pré-larva momentos antes da eclosão; F - Larva recém eclodida.

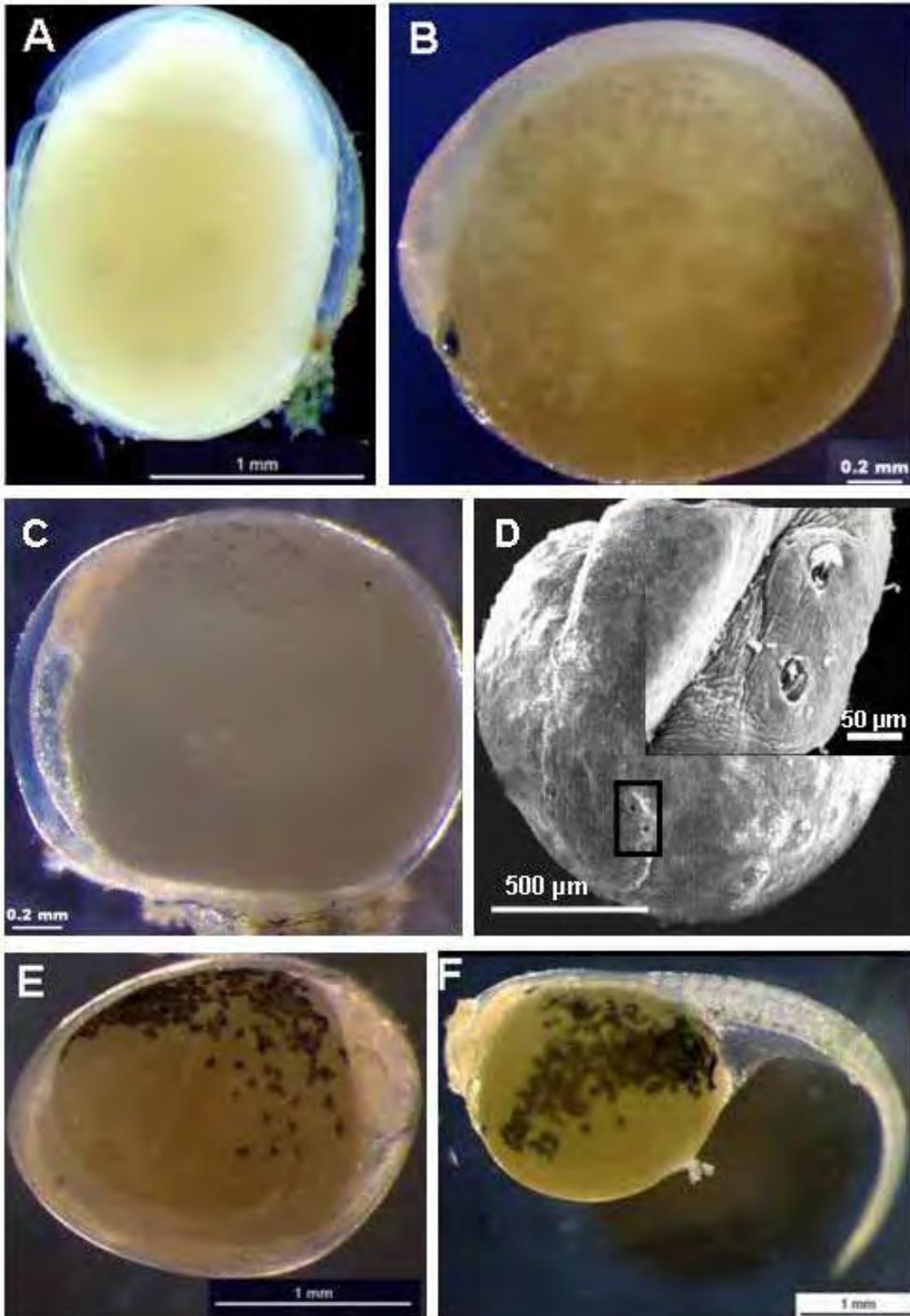


Figura 6: Eletronmicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus* mostrando o desenvolvimento destas. A – Larva recém-eclodida; B – 30 hPE Membrana vitelínica (seta); C – 65 hPE; D – 77 hPE; E – 101 hPE; F – 149 hPE; G – 186 hPE; H – 209 hPE (hPE: horas pós-eclosão).

V: Vitelo; MV: Membrana vitelínica; Quadrado: nadadeira peitoral; Asterisco branco: nadadeira caudal; Asterisco preto: nadadeira dorsal; Ponta de seta branca: nadadeira anal; Círculo: desenvolvimento dos olhos; Seta branca: desenvolvimento da boca.

Figura 7: Eletronmicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus* mostrando o desenvolvimento de estruturas da cabeça. A – 6 hPE; B – 41 hPE; C – 65 hPE; D – 77 hPE; E – 101 hPE; F – 149 hPE .

Ponta de seta branca: orifício nasal; Asteriscos pretos: glândulas adesivas; Ponta de seta preta: orifício da vesícula ótica; Seta preta: nadadeira peitoral; Círculo preto: formação das brânquias; Seta branca: boca; Seta pontilhada preta: sulco cefálico.

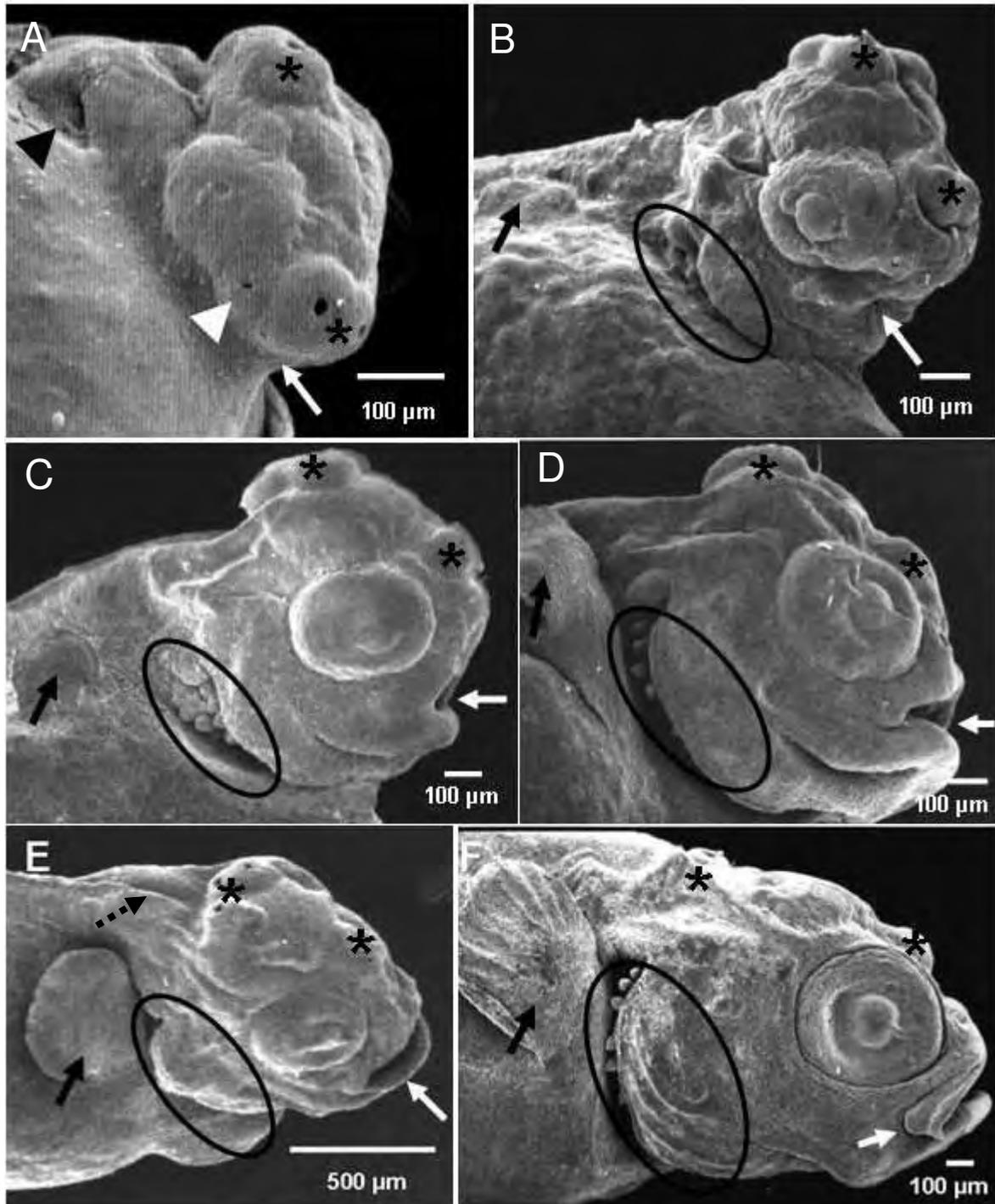


Figura 8: Fotomicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus*: A – 89 hPE larva com início da pigmentação da cabeça, saco de vitelo ricamente vascularizado, formação e irrigação do aparelho branquial; B – 101 hPE larva com nadadeiras peitorais livres; C – 113 hPE Excreção de bile pelo ânus; D – 137 hPE Formação dos raios da nadadeira caudal; E – 383 hPE Larva com vitelo completamente absorvido, olhos bem formados, coração alojado sob o opérculo, pigmentação corporal, trato digestório formado, bexiga natatória inflada e início do aparecimento de raios das nadadeiras dorsal e anal.

Asteriscos pretos: nadadeira peitoral; Seta branca: bile; Círculo branco: coração; Seta preta: bexiga natatória; Asteriscos brancos: nadadeiras dorsal e anal.

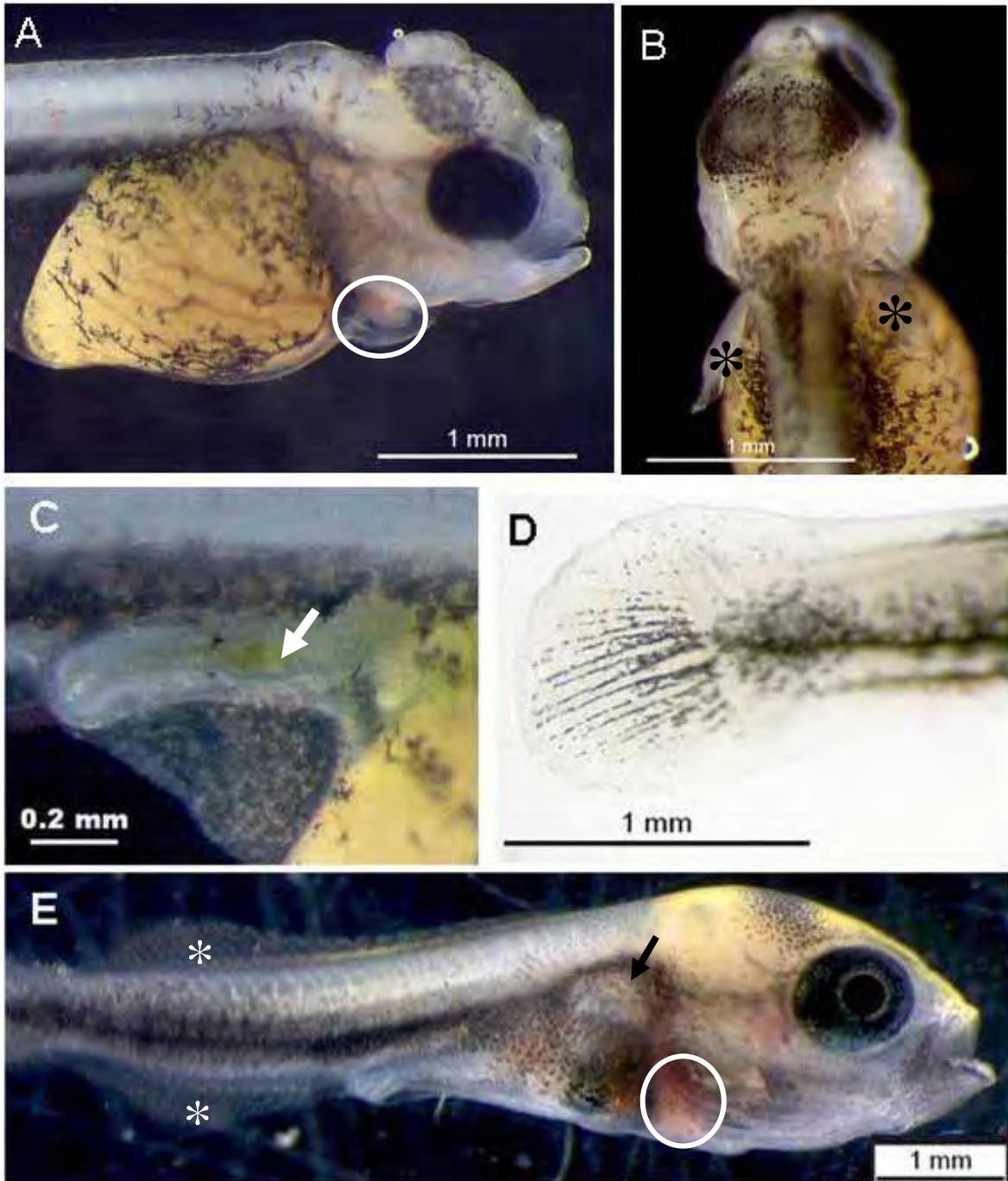


Figura 9: Eletronmicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus*: A – 24 hPE Glândulas adesivas presentes na cabeça; B – Detalhe da figura anterior mostrando o orifício da glândula; C – 185 hPE Neuromasto ao redor dos olhos; D – Detalhe da figura anterior mostrando um neuromasto imaturo presente ao redor do olho; E – 383 hPE Filamentos branquiais; F – Aumento da figura anterior mostrando as lamelas principais e secundárias que compõem as brânquias.

Seta branca: cápsula do neuromasto; Círculo preto: abertura central do neuromasto; Canto direito superior - Setas pretas: células secretoras de muco presentes nas brânquias.

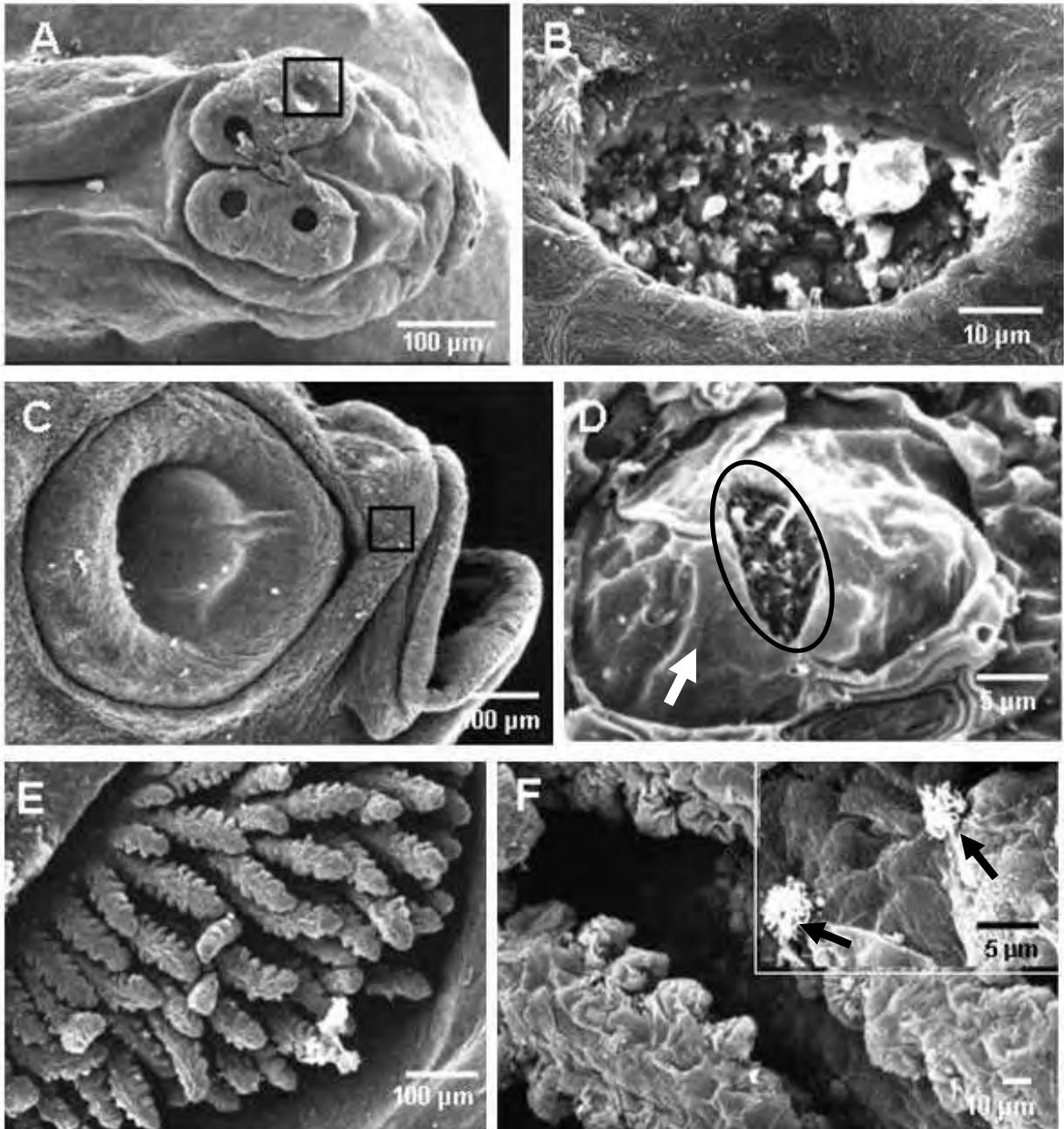
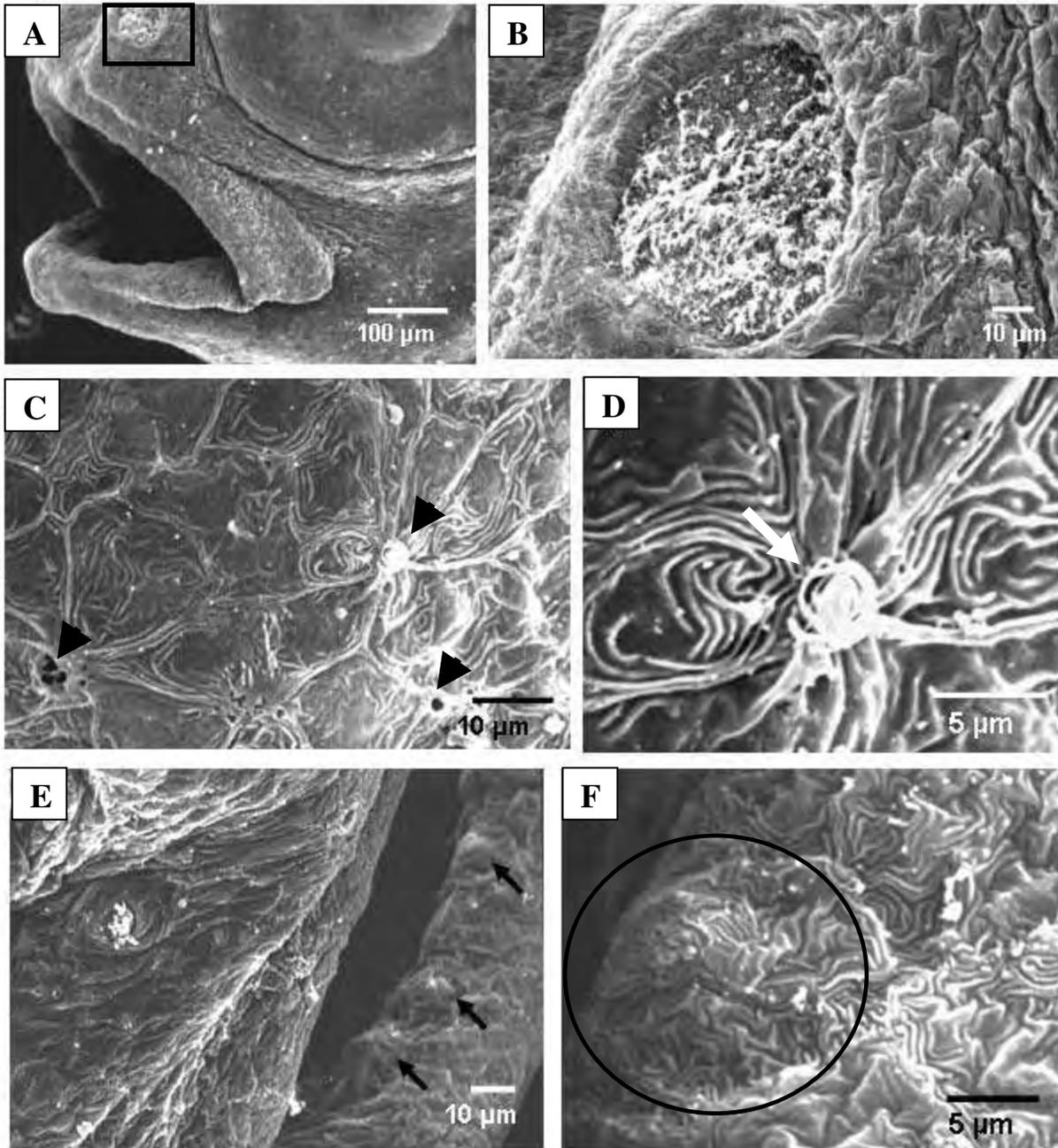


Figura 10: Eletronmicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus*: A – 113 hPE cabeça mostrando o orifício nasal, a boca e o olho; B – Orifício nasal com epitélio contendo cílios; C – 113 hPE superfície epitelial do corpo do peixe; D – Muco; E – 125 hPE Presença de botões gustativos na boca (setas); F – Botão gustativo.

Quadrado: orifício nasal; Pontas de setas pretas: células produtoras de muco presentes na pele; Seta branca: muco; Setas pretas: botões gustativos na boca; Círculo: detalhe de um botão gustativo.



4.5.2. Desenvolvimento histológico de embriões e larvas

4.5.2.1. Formação do embrião e eclosão

Os ovos de *Astronotus ocellatus* apresentaram-se com córion espesso e vitelo formado por grânulos. A gástrula foi caracterizada pelos movimentos de migração formando duas camadas: a superior ou epiblasto e a inferior ou hipoblasto (Figuras 11 A e B). Esta fase é marcada pela migração celular e formação dos folhetos germinativos.

Em seguida percebeu-se a formação do cálice óptico, do prosencéfalo (Figura 11 C), da vesícula ótica, das divisões cefálicas em rombomêros e um primórdio do cerebelo (Figura 11 D).

Percebeu-se que a formação de glândulas adesivas ocorreu antes mesmo da eclosão, mostrando-se como uma estrutura em forma de cálice composta por células secretoras (Figuras 11 E e F). A larva recém eclodida apresentou olhos despigmentados e boca fechada.

4.5.2.2. Fase larval vitelínica

4.5.2.2.1. Sistema Digestivo

➤ Caverna bucal e faríngea:

Observou-se que em larvas a partir de 77 hPE que a caverna bucal e faríngea estavam separadas pelo primeiro arco branquial, o qual era suportado por cartilagem. Na parte posterior da maxila e mandíbula foi identificado a valva oral e musculatura estriada esquelética que sustenta a mandíbula inferior. Histologicamente não foram observados os botões gustativos e nem a formação de dentes. A caverna bucofaríngea é revestida por epitélio estratificado.

➤ Tubo digestório:

Assim que eclodiu, a larva apresentou as cavernas oral e anal fechadas e formação do trato digestório como um tubo simples, retilíneo, composto por um epitélio simples localizado logo acima do saco de vitelo. Com 24 hPE, o tubo digestório já se encontrava aberto, porém a boca ainda estava fechada (Figura 14 A). Após a abertura da boca, o sistema digestório

começou a se diferenciar em esôfago, estômago e intestinos. A partir de 125 hPE, observou-se a presença de inúmeras células globosas, que se coraram de roxo intenso na historresina, na região da faringe e esôfago, as quais deixam de ser visualizadas na região onde inicia-se o primórdio do estômago (Figura 14 C). A partir de 161 hPE, foram verificadas, na região da faringe e esôfago, células secretoras grandes, arredondadas e vistas isoladas ou numerosas próximas umas das outras. Estas células aumentavam em número conforme aumentava a idade das larvas e seu citoplasma era volumoso, claro, com aspecto vesiculoso e o núcleo muitas vezes encontrava-se em posição basal (Figura 14 B). Ainda nesse tempo, notou-se o estômago diferenciado, com parede delgada e invaginações, epitélio estratificado composto por células de núcleo muito grande e nucléolo muito evidente e o intestino, com borda luminal proeminente e espessa, a qual é chamada de borda ou cutícula estriada (Figura 14 D e F). Observou-se, enterócitos com núcleo grande e nucléolo bem evidente, e entre estes, a presença de células secretoras. Com o início da alimentação exógena (125 hPE) as larvas já apresentavam o trato digestório um pouco mais desenvolvido, porém não foi notada, até o último tempo analisado, a presença de glândulas digestivas no estômago.

➤ **Fígado (glândula anexa):**

O fígado está associado à absorção do saco vitelínico. É um órgão que se apresentou muito grande com relação ao tamanho corporal da larva na eclosão. Os hepatócitos apareceram, em sua maioria, com um único núcleo e com citoplasma vacuolar, provavelmente por conter em seu interior alta concentração lipídica e de glicogênio. Foi verificada também a presença de vasos capilares contendo eritrócitos (Figuras 12 C). Não houve mudanças histológicas significativas no fígado ao longo do crescimento das larvas, apenas no tamanho deste, em relação ao tamanho corporal da larva, que diminuiu.

4.5.2.2.2. Sistema locomotor e outros

➤ **Tecido muscular estriado esquelético, liso e cartilaginoso:**

O tecido muscular estriado esquelético foi visualizado na larva a partir de 6 hPE. As fibras musculares encontradas ao longo do corpo da larva são compostas por miofibrilas e são multinucleadas com núcleos periféricos. Já o tecido muscular liso foi encontrado, principalmente, associado ao trato digestório.

Até o final da fase larval vitelínica não foram encontrados ossos, sendo a sustentação corpórea formada apenas por cartilagem hialina com condrócitos em lacunas envoltos por matriz extracelular que surge desde 12 hPE.

➤ **Bexiga natatória:**

A bexiga natatória do *Astronotus ocellatus* quando vista lateralmente, localizava-se abaixo da notocorda e acima do trato digestório. Com 101 hPE apresentou-se ainda não inflada, com uma camada de células pavimentosas e uma de células colunares com núcleo e nucléolo bem evidentes (Figura 12 A) e, com, 137 hPE, mostrou-se funcional, inflada e composta por uma única camada de células cúbicas com núcleo e nucléolo evidentes e citoplasma basófilo (Figura 12 B).

➤ **Glândulas adesivas:**

As glândulas adesivas foram caracterizadas logo que o embrião desenvolveu a região cefálica e permaneceu na larva, regredindo gradativamente, até desaparecer com 149 hPE. Essas glândulas foram vistas na cabeça em número de dois pares na região superior e um par na região frontal. São formadas por células secretoras (Figura 11 F) cuja finalidade é de adesão ao substrato para prevenir a dispersão das larvas pelas correntes d'água e facilitar o cuidado parental.

4.5.2.2.3. Sistema sensorial

➤ **Olhos:**

Os olhos se desenvolveram rápido, sendo verificado o início de sua formação em embriões antes da eclosão e com 41 hPE, são vistos bem desenvolvidos e pigmentados, localizados lateralmente à cavidade bucal e ao cérebro. A retina era envolvida por uma camada pigmentada composta por células cúbicas contendo muitos grânulos de melanina e prolongamentos apicais. Posteriormente tínhamos a camada de células fotorreceptoras (cones e bastonetes), a camada nuclear externa, é a região onde ocorre sinapses entre cones/bastonetes e neurônios bipolares, a camada nuclear interna, onde há células bipolares e células ganglionares. Observou-se também a coróide com células revestidas por tecido

conjuntivo frouxo, a lente composta pelo cristalino e pelo corpo vítreo, e a córnea recoberta por epitélio estratificado (Figuras 13 E e F).

4.5.2.2.4. Sistema circulatório e respiratório

➤ **Coração:**

É o primeiro órgão funcional na larva. Estava completamente formado e situado na cavidade pericardial anterior à cavidade abdominal de larvas a partir de 113 hPE. Foi identificado o seio venoso, a válvula sinoatrial, o átrio, a válvula átrio-ventricular, o ventrículo, com musculatura estriada cardíaca bastante desenvolvida, a válvula ventrículo-bulbar e a artéria branquial (Figura 13 A).

➤ **Brânquias:**

Encontraram-se quatro arcos branquiais com lamelas principais e secundárias sustentadas por cartilagem em larvas a partir de 77 hPE (Figura 13 D). Revestindo os arcos e as lamelas branquiais encontrou-se o epitélio branquial composto por células pavimentosas, poucas células secretoras de muco, células de cloreto, que se mostraram com núcleo grande e distribuídas na base das lamelas secundárias e, células de suporte. Já o epitélio respiratório, que recobre as lamelas, apresentou uma única camada de células pavimentosas. As pseudobrânquias foram vistas situadas dos dois lados do teto da faringe, na parte interna do opérculo ventral, posterior ao olho e anterior ao primeiro arco branquial (Figura 13 C). Este nome deve-se ao fato da pseudobrânquia parecer uma brânquia e apresenta uma pequena função respiratória.

4.5.2.2.5. Sistema Excretor

➤ **Prónefro (Rim primitivo):**

O prónefro foi observado localizado em larvas de 113 hPE na parte dorsal da cavidade corporal e acima da bexiga natatória. Desenvolveram-se como estruturas enoveladas que se uniam e desembocavam na papila urogenital. Pode-se perceber os glomérulos, vasos sanguíneos próximos destes e túbulos renais (Figura 12 E). Os glomérulos são formados por

células de núcleo grande e muito basófilo. O túbulo proximal apresenta-se com luz ampla e células de citoplasma acidófilo com núcleo e nucléolo evidente. O túbulo distal apresenta células menores e de citoplasma menos acidófilo.

Com 113 hPE, foi notada a formação da bexiga urinária próxima da abertura anal (Figura 14 E) composta por tecido estratificado com células pavimentosas e cúbicas.

4.4.2.2.6. Sistema nervoso

➤ **Notocorda:**

A notocorda é um tecido intermediário entre a cartilagem e o tecido conjuntivo e é encontrado por toda extensão corporal da larva. Foi observada nos embriões mesmo antes da eclosão, tornando-se mais evidente em larvas a partir de 24 hPE. As células se apresentavam grandes, com citoplasma bastante vacuolar e núcleo periférico, fornecendo ao tecido a característica de sustentação da medula espinhal (Figuras 12 D).

➤ **Encéfalo:**

Apesar de não estar completamente desenvolvido na larva, pôde-se ter uma idéia geral da localização da maior parte do cérebro em larvas com 89 hPE. Na parte anterior avistou-se o lobo olfatório delimitado por células pavimentosas e no interior por células cúbicas. Na parte dorsal do cérebro, posterior ao lobo, observou-se o órgão pineal central com células cúbicas de núcleo basófilo, seguindo, o tectum óptico cercado de vasos sanguíneos, uma camada de células pavimentosas e células colunares e cúbicas. Posteriormente tinha-se o cerebelo e a medula oblongada formada por duas camadas granulosas, uma com células bem próximas, outra com células mais espaçadas e uma última camada molecular. Acima da cavidade bucofaríngea, verificou-se o hipotálamo (Figura 13 B).

Figura 11: Fotomicrografias de ovos de *Astronotus ocellatus*: A e B – Ovos evidenciando o córion e a fase de gástrula (Historesina – HF); C – Formação da cabeça (Paraplast – HE); D – Vesícula óptica, vesícula ótica, formação do cerebelo, rombômeros e notocorda (Paraplast – HE); E – Pré-larva mostrando as glândulas adesivas da cabeça (Historesina – HF) e F – Detalhe da glândula adesiva (Paraplast – HE).

C: córion; EP: espaço perivitelino; G: gástrula; V: vitelo; E: epiblasto; H: hipoblasto; P: prosencéfalo; CO: cálice óptico; Op: vesícula óptica; Ot: vesícula ótica; Ce: cerebelo; R: rombômeros; No: notocorda; GA: glândulas adesivas; CM: células secretoras de muco.

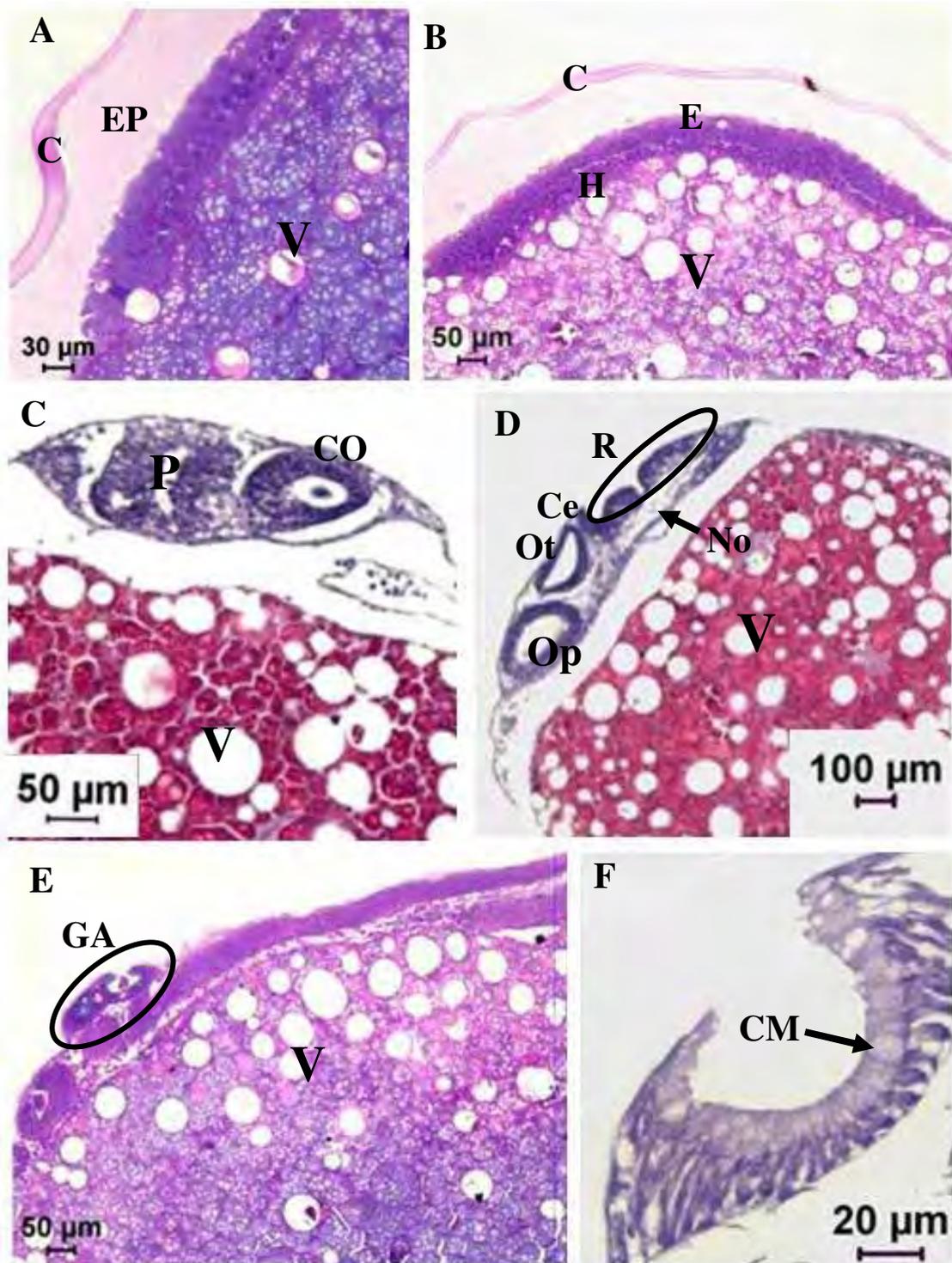


Figura 12: Fotomicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus*: A – 113 hPE Bexiga natatória não inflada (Histoiresina – HF); B – 383 hPE Bexiga natatória inflada e detalhe do epitélio (Histoiresina – HF); C – 257 hPE Fígado (Paraplast – HE); D – 113 hPE Notocorda (Paraplast – HE); E- 113 hPE Pronéfron (Paraplast – HE).

BNI: Bexiga natatória não inflada; Ep: epitélio; L: luz; Seta branca: hepatócitos; Seta preta: eritrócitos; No: notocorda; GL: glomérulo; VS: vaso sangüíneo; TP: túbulo proximal; TD: túbulo distal.

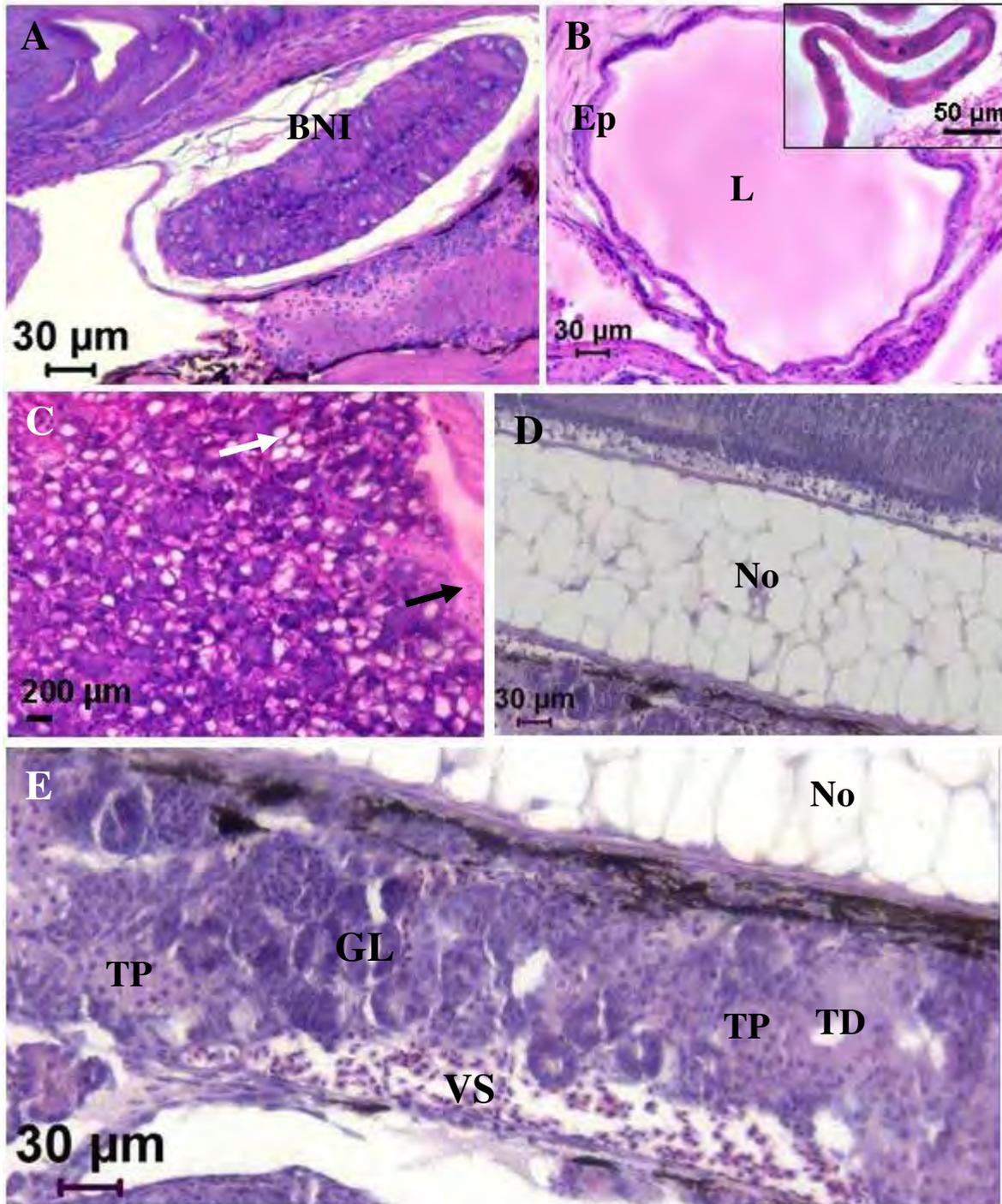


Figura 13: Fotomicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus*: A – 161 hPE Coração (Paraplast – HE); B – 101 hPE Cabeça mostrando estruturas cefálicas (Histoiresina – HF); C – 101 hPE Arcos branquiais (Histoiresina – HF); D – 101 hPE Detalhe de uma brânquia; E – 137 hPE Olho (Histoiresina – HF); F – 137 hPE Detalhe das camadas que compõem o olho (Histoiresina – HF) .

SV: seio venoso; VSA: válvulas sinoatriais; VE: ventrículo; A: átrio; VAV: válvula atrioventricular; VVB: válvula ventriculobulbar; AB: artéria branquial; V: vitelo; CA: cavidade abdominal; GA: glândulas adesivas; CB: cavidade bucal; H: hipotálamo; Asterisco: cerebelo; MO: medula oblongada; TO: tetum óptico; P: pineal; LO: lobo olfatório; Quatro asteriscos pretos: arcos branquiais; Seta preta menor: pseudobrânquia; Seta preta maior: lamela principal; Oito asteriscos pretos: lamelas secundárias; L: lente; C=EE: córnea e epitélio estratificado da epiderme; R: retina; CP: camada pigmentada; TC: tapete da coróide; CF: células fotorreceptoras; CIN: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CIP: camada interna plexiforme.

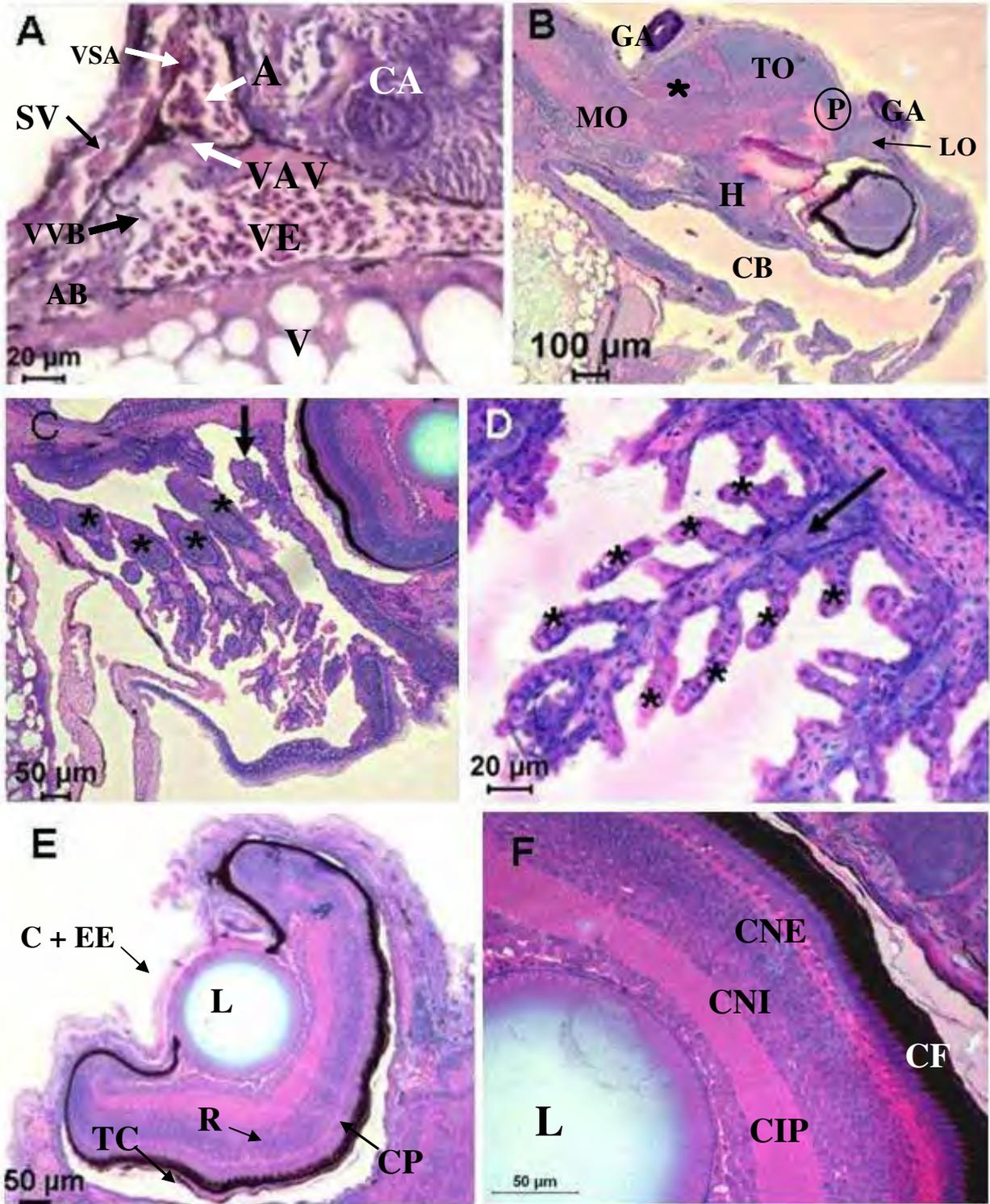
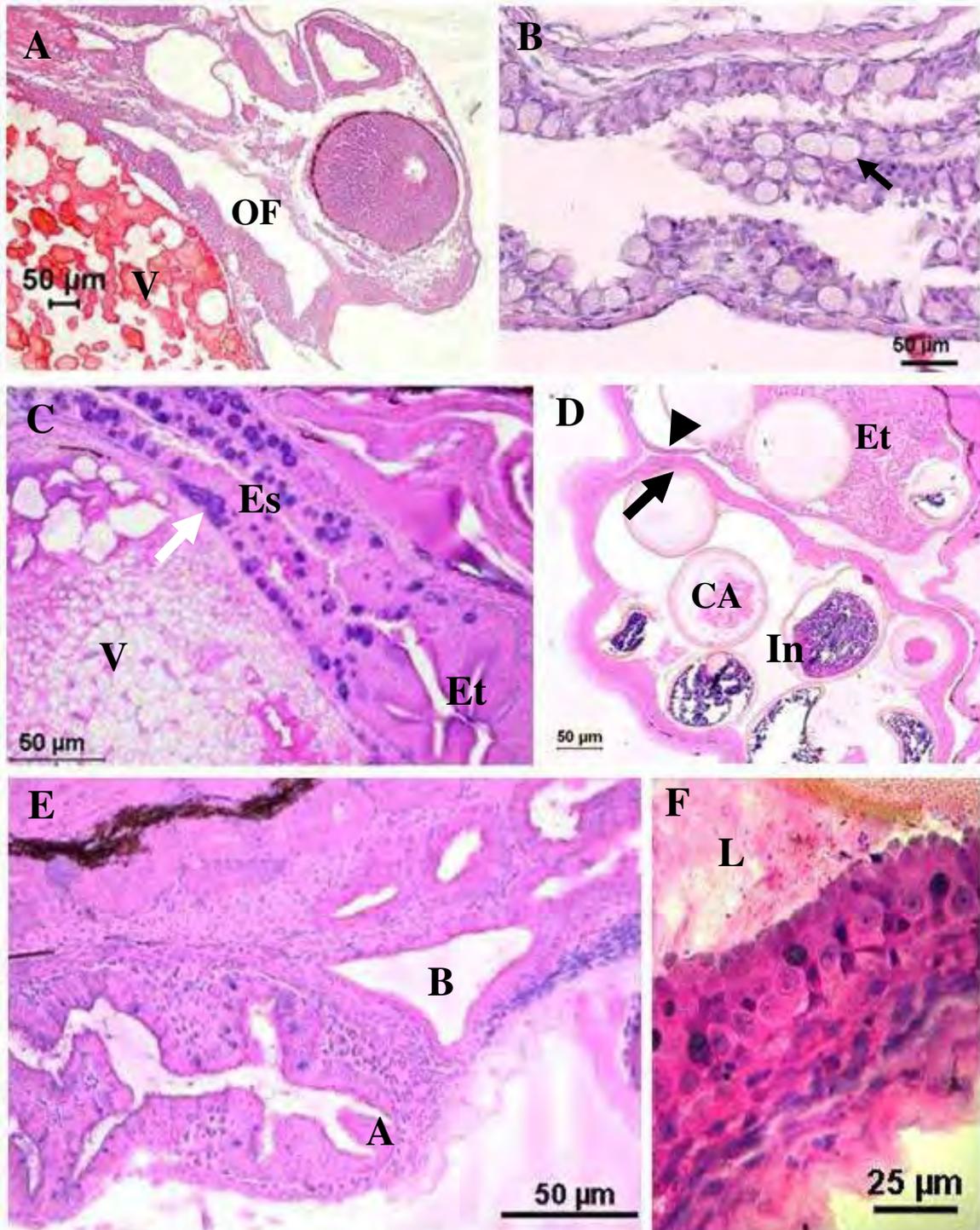


Figura 14: Fotomicrografias de larvas de *Astronotus ocellatus*: A – 24 hPE Cavidade orofaríngea aberta, porém a boca ainda permanece fechada (Paraplast – HE); B – 161 hPE Células secretoras presentes na faringe (Paraplast - HE); C - 137 hPE Transição entre esôfago e estômago (Historresina – HF); D – 185 hPE Estômago e intestino chamando a atenção para a diferença de epitélio entre o estômago, delgado e intestino mais espesso (Historesina – HF); E – 137 hPE Ânus e bexiga urinária (Historesina – HF) F – 185 hPE Detalhe de epitélio intestinal (Historesina – HF).

OF: cavidade orofaríngea; V: vitelo; Seta preta menor: célula secretora da faringe; Seta branca: células globosas presentes no esôfago; Es: esôfago; Et: estômago; Ponta de seta: epitélio do estômago; Seta preta maior: epitélio do intestino; CA: cisto de artêmia; B: bexiga urinária; A: ânus; L: luz.



5. DISCUSSÃO

5.1. Reprodução induzida

A capacidade de seleção de peixes maduros é vital para o sucesso do processo de indução da maturação final e desova, sendo considerada a etapa mais importante para o sucesso da reprodução artificial (CAROSFELD, 1989). Alguns autores recomendam o método de canulação de ovócitos como uma forma eficiente de avaliar se a fêmea está apta para a indução hormonal (FENERICH-VERANI et al. 1984). Porém este método pode ser considerado inviável quando se visa à produção de peixes em larga escala (ANDRADE-TALMELLI et al., 1999) e aumenta o estresse dos animais já que necessita um maior manuseio destes. Diante disso, optou-se por avaliar os peixes através de características externas que é uma técnica mais simples, porém, menos eficiente.

Harvey e Carosfeld (1993) relatam que no momento da captura, a luta dos peixes para tentar escapar, gera um estresse que pode acarretar profundos efeitos na química do organismo, aumentando os níveis de gonadotrofinas, andrógenos e cortisol no sangue. Ainda dizem que, o excessivo manuseio dos peixes pode reduzir a alimentação, causar infecções, mortalidade, e há fortes indícios de que o grau de estresse em fêmeas afeta a qualidade dos ovos produzidos na reprodução artificial. Diante disso, houve enorme preocupação em dar as melhores condições possíveis de bem estar aos reprodutores durante o experimento para minimizar os efeitos do estresse nos resultados da indução à reprodução. Evitou-se ao máximo o manuseio dos animais; aclimataram-se os peixes no momento da transferência destes dos viveiros para as caixas; tomou-se o cuidado de cobrir os olhos dos animais com um pano úmido no momento da pesagem e, também, a aplicação dos hormônios foi realizada sem a retirada dos animais da água.

Nas condições do presente experimento, a indução hormonal, foi mais efetiva em fêmeas do que em machos embora, nos dois casos, foi considerada insatisfatória. Os métodos de indução hormonal atualmente utilizados, apesar de bem sucedidos para muitas espécies, ainda apresentam empecilhos, pois, há uma enorme dificuldade em se padronizar as doses que serão aplicadas, porque não há metodologias definidas para muitas outras (ANDRADE e YASUI, 2003) especialmente para as de desovas parceladas. Assim, devem-se testar os diversos tipos de hormônios e protocolos de indução existentes para se identificar aquela adequada à espécie. Neste experimento optou-se pelos métodos de indução com hipófise de carpa por ser a técnica atualmente mais utilizada por produtores (ANDRADE e YASUI,

2003), e o HCG por já ter sido um hormônio utilizado com sucesso em muitas espécies (CARRILLO e ROMAGOSA, 2004; CERQUEIRA et al., 2005; ANDRADE-TALMELLI et al., 2002).

Alguns autores recomendam o uso de três doses de hormônio, sendo uma dose prévia antes de iniciar o tratamento hormonal com hipófise de carpa ou com análogos de GnRH (ZANIBONI-FILHO e BARBOSA, 1996), porém Reynalte-Tataje et al. (2001) utilizando-se desta mesma técnica obtiveram menor sobrevivência dos reprodutores. Andrade-Talmelli et al. (2002) utilizaram para piabanha (*Brycon insignis*) uma combinação de EHC com HCG. Esta combinação mostrou ser mais eficiente do que a utilização de EHC puro e menos eficiente que o HCG puro. Assim, recomenda-se que outros protocolos de indução à reprodução devem ser testados no acará-açu para se obter melhores resultados.

Outros fatores além do hormônio empregado e dose utilizada também devem ser investigados, pois também podem influenciar no processo de reprodução induzida como: maturação sexual dos animais, estresse, idade dos reprodutores, alimentação, entre outros.

As condições experimentais de cada trabalho também podem influenciar nos resultados. Carrillo e Romagosa (2004) que utilizaram o HCG para indução em tilápias constataram que o método foi efetivo para obtenção de ovócitos aptos à fertilização, porém, esses resultados contrastaram com os apresentados por Rana (1988), Bhujel (2000) e Shelton (1998; 2000; 2002) que mencionam que as tilápias não respondem positivamente à indução hormonal.

No caso de machos, em algumas espécies, não há necessidade de indução, pois se consegue facilmente a liberação dos gametas com a extrusão. Muitas vezes a função básica da indução hormonal é apenas o aumento do volume, que está mais associado a uma maior fluidez do sêmen produzido do que com o aumento do número de células espermáticas (ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004).

Em um experimento piloto tentou-se a extrusão de esperma por meio de massagem abdominal, sem a aplicação de hormônios, mas os animais não espermiaram. Optou-se então pelo estímulo hormonal na tentativa de verificar se os hormônios estimulariam uma maior produção de sêmen. Como apenas um dos dezesseis machos induzidos respondeu ao estímulo, dois dos animais já induzidos, sendo um com HCG e um com EHC, foram anestesiados em benzocaína e sacrificados para observação de seus testículos, que apresentaram pouca produção de sêmen (menos de 1 mL). Da Silva (2005) estudando a biologia reprodutiva do acará-açu, verificou que machos em fase de primeira maturação gonadal, apresentam uma seqüência mensal de evolução do desenvolvimento testicular acompanhando o

desenvolvimento ovariano das fêmeas. O que nos levou a crer que, embora estivessem no período reprodutivo, os machos neste experimento ou não estavam aptos a espermição ou já haviam espermiado há pouco tempo ou ainda, podem ter entrado em estágio de reabsorção, pois como já dito, a seleção de peixes através de características externas é uma técnica simples e pouco eficiente.

De acordo com Godinho (2007), o volume de sêmen produzido pelos peixes é muito variável, dependendo do tamanho do indivíduo, época e metodologia empregada. Relata que peixes de couro produzem maiores quantidades de sêmen do que peixes de escama. E que o tempo entre a aplicação hormonal e extrusão também influencia na qualidade e quantidade espermática. Kavamoto et al. (1999) mostraram que em curimbatá (*Prochilodus scrofa*) anormalidades morfológicas de espermatozóides ocorrem quanto maior o número de horas de ação hormonal. Kavamoto et al. (1997) avaliou a produção espermática do curimbatá (*Prochilodus scrofa*) e verificou que a quantidade de sêmen diminui quando os machos são submetidos a extrusões sucessivas em um curto período de tempo.

O emprego de EHC e HCG tem mostrado eficiência no controle e manipulação da reprodução em muitas espécies de peixes porém, o desenvolvimento de outros protocolos de indução à reprodução, outros tipos de hormônios, assim como, outras condições experimentais deve ser objeto de estudos futuros.

5.2. Qualidade da água

A temperatura das caixas de reprodutores e os parâmetros físico-químicos da água de incubadoras e viveiros (temperatura, oxigênio dissolvido, alcalinidade, condutividade e amônia) ficaram próximos a valores considerados bons para o desenvolvimento do acará-açu (GURGEL, 1970). Os valores médios de pH nas incubadoras foram considerados baixos.

5.3. Morfometria de ovos e larvas

Os ovos de peixe são classificados como telolécitos, devido à grande quantidade e distribuição do vitelo (RIBEIRO et al., 1995; LEME DOS SANTOS e AZOUBEL, 1996) e os ovos do *Astronotus ocellatus* encaixam-se nessa classificação.

O aspecto dos ovos de acará-açu encontrados está de acordo com os descritos por Fontenele (1951). A superfície de ovos adesivos é coberta por glicoconjugados que são normalmente secretadas por células presentes nos ovócitos durante a maturação folicular

(GURAYA, 1996). Os ovócitos se tornam pegajosos na presença de água o que permite a adesão destes ao substrato (RIZZO e GODINHO, 2003). As características dos ovos de acará-açu condizem com o descrito por Sato (1999) que diz que espécies não migradoras ou sedentárias, geralmente, apresentam algum grau de adesividade, possuem tamanhos variáveis, de pequeno a grande (1,0-3,0 mm de diâmetro), espaço perivitelino geralmente menor (0,2-0,7 mm de largura), são menos numerosos, a duração da embriogênese varia de acordo com o grau de adesividade (de 16-29 h nos ovos fracamente adesivos a 41- 46 h nos fortemente adesivos a 23-24 °C) e podem estar sujeitos a cuidado parental.

Notou-se que o tempo de desenvolvimento do *A. ocellatus* foi considerado lento quando comparados ao de espécies reofílicas. Leme dos Santos (1995) afirma que em peixes quanto maior a quantidade de vitelo mais lento é o desenvolvimento embrionário. Ovos com um diâmetro menor apresentam curto período de incubação. Já aqueles que possuem um diâmetro maior, possuem um período de incubação mais longo (SARGENT et al., 1987), como é o caso do *Astronotus ocellatus*.

Neste trabalho encontraram-se ovos de acará-açu com tamanhos médios próximos aos valores médios encontrados por Nakatani et al. (2001) (1,91 mm para diâmetro maior), por Fontenele (1951) (2,2 mm X 1,9 mm) e por Chacon (1982) (2,00 X 1,00) mm. Suzuki (1992) mostrou que em espécies que apresentam estratégias reprodutivas do tipo cuidado parental possuem ovócitos com mais de 1,50 mm de diâmetro, como é o caso do acará-açu.

Já as larvas, no momento da eclosão, apresentaram valores médios um pouco menores que aos valores encontrados por Da Silva (2005) (4,75±0,45 mm para comprimento total) e Chacon (1982) (4,6 mm de comprimento total e 1,8 mm de altura do vitelo) para o acará-açu. A qualidade dos ovos em peixes pode determinar a qualidade de larvas produzidas. Em uma mesma espécie, o tamanho dos ovos, quando significa maior volume de reservas energéticas, é um parâmetro de qualidade (KJORSVIK et al., 1990; BROOKS et al., 1997; BONISLAWSKA et al., 2001). Ovos grandes produzem larvas grandes (WOOTTON, 1994), com saco vitelino maior (GISBERT et al., 2000) e com maiores taxas de sobrevivência em relação a larvas provenientes de ovos pequenos (RANA, 1985; SARGENT et al., 1987; ZHUKINSKIY e GOSH, 1988; DUARTE e ALCARAZ, 1989; KJORSVIK et al., 1990; CHAMBERS e LEGGETT, 1996; BROOKS et al., 1997; BONISLAWSKA et al., 2000). Porém Coleman e Galvani (1998) afirmam que o tamanho dos ovos nem sempre está relacionado à quantidade de nutrientes em seu interior, pois ovos maiores podem conter apenas mais água, que é perdida no momento da eclosão.

5.4. Desenvolvimento de embriões e larvas

5.4.1. Formação do embrião

A primeira fase encontrada nas desovas analisadas foi a de gástrula. Chacon (1982) acompanhou o desenvolvimento dos ovos de acará-açu e constatou que a fase de gástrula surge aproximadamente 5 horas após a primeira clivagem, porém deve-se levar em consideração as condições ambientais de cada experimento já que muitos fatores influenciam no tempo de desenvolvimento, principalmente a temperatura (OSMAN et al., 2008).

A somitogênese, em *A. ocellatus*, ocorreu antes do término da epibolia, semelhante ao descrito por Morrison et al. (2001) para tilápia nilótica. Isso pode ter ocorrido devido ao grande tamanho dos ovos, característica de espécies cuidam da prole (SUZUKI, 1992).

Além do córion, havia também uma membrana muito próxima do embrião, cuja finalidade deve estar associada a maior proteção contra injúrias do meio. Esta estrutura também foi encontrada por Chacon (1982) em acará-açu e Marques (2005) para pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

5.4.2. Eclosão

Neste estudo as larvas eclodiram com boca e ânus fechados, mostraram-se transparentes, com grande saco vitelino e ausência de pigmentação nos olhos, semelhante a maioria das larvas de peixes de água doce (NAKATANI et al., 2001). A larva recém-eclodida apresenta glândulas adesivas muito desenvolvidas e em número de dois pares na região superior e um par na região frontal da cabeça, estando de acordo com o descrito por Nakatani et al. (2001) para o acará-açu.

As glândulas adesivas em peixes são formadas por um grupo de células produtoras de muco. Araújo-Lima e Bittencourt (2002) observaram glândulas adesivas em larvas de *Hoplias malabaricus*, sugerindo que essa glândula serviria para evitar que as larvas se dispersassem do ninho, o que reduziria a eficiência da proteção parental. Em *Paracheirodon axelrodi* (ANJOS e ANJOS, 2006) a glândula pode ser uma adaptação para a fixação das larvas ao substrato, diminuindo, assim, o risco de predação e de dispersão pela correnteza já que, nesta espécie não há evidências de cuidado parental com a prole. Ainda, Godinho et al. (2003) dizem que em espécies migradoras, tais como o dourado (*Salminus brasiliensis*), as glândulas adesivas

tem papel importante na dispersão larval por aderir à superfície da água, podendo, assim, a larva ser conduzida pela correnteza.

A presença da membrana embrionária também é marcante em larvas recém-eclodidas. Notou-se que esta foi sendo lentamente reabsorvida com o surgimento das nadadeiras e o desenvolvimento do aparelho branquial. Segundo Van Snik et al. (1997) a função desta membrana estaria relacionada ao modo de locomoção nos momentos iniciais, mas principalmente, à respiração, aumentando a superfície para respiração cutânea nos primeiros dias de vida.

5.4.3. Fase larval vitelínica

O tempo observado para absorção do saco de vitelo foi de aproximadamente de 185 horas desde a eclosão das larvas. Verificou-se que após o início da alimentação exógena a absorção das reservas endógenas foi mais lenta. O desenvolvimento de estruturas utilizadas na captura de alimento como a pigmentação dos olhos, nadadeira peitoral, posição da boca e desenvolvimento do aparelho branquial ocorreu a partir da eclosão até 113 hPE, sendo estas características desenvolvidas antes do término da absorção vitelínica. Este fato também foi observado para outros teleósteos como *Oreochromis niloticus* (PAES e NAKAGHI, 2005; MORRISON et al., 2001), *Auchenipterus osteomystax* (BIALEZTKI et al., 2001), *Leporinus macrocephalus* (REYNALDE-TATAJE et al., 2001), *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (SAMPAIO, 2006).

Os olhos do acará-açu se desenvolvem muito rápido, antes mesmo da abertura da boca, sendo o primeiro órgão do sentido a ser efetivamente funcional. As larvas de *A. ocellatus* com olhos já formados e pigmentados fugiam facilmente da sucção da pipeta nos momentos de coleta (observação pessoal). Esses dados nos mostram características típicas de espécies cuja alimentação e fuga dos predadores depende principalmente da visão (OSMAN et al., 2008). Em algumas espécies como *Salminus brasiliensis*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus argenteus*, a abertura da boca se dá antes da pigmentação da retina (GODINHO et al., 2003).

Antes da abertura da boca as larvas se nutrem do vitelo, que é absorvido através de endocitose via camada sincicial do vitelo (SHAHSAVARANI, et al., 2002). Segundo Nakatani (2001) espécies com saco vitelino maior estão melhor preparadas para sobreviverem mais tempo sem depender de alimentação exógena. Segundo Tengjaroenkul et al. (2002), para

evitar mortalidade das larvas e desperdício de ração, a alimentação exógena deve se iniciar com o vitelo completamente absorvido.

O acará-açu não tem trato digestório diferenciado quando eclode, sendo encontrado apenas um tubo retilíneo composto por epitélio simples pavimentoso, como o encontrado por Maciel (2006) em pirancanjuba (*Brycon orbygnianus*) e por Neumann (2008) em jatuarana (*Brycon amazonicus*). O trato digestório é originado do endoderma durante a embriogênese, havendo também a formação do fígado e do pâncreas a partir de células do endoderma (OBER et al., 2003). Em ciclídeos as larvas apresentam estômago funcional antes da mudança da alimentação endógena para exógena (GORDON e HECHT, 2002). Notou-se que no estômago das larvas ainda não havia presença de glândulas gástricas. Segundo Cericato (2005), a presença de glândulas digestivas é um evento muito importante no desenvolvimento do trato digestório, pois, sugere o início da digestão ácida, cuja importância está na adequação do manejo alimentar das larvas. Dessa forma, larvas de *Astronotus ocellatus* até 16 dias após a eclosão ainda não estão preparadas para receberem dietas artificiais.

A partir de 89 hPE, as larvas já apresentavam intestino com muitas pregas na mucosa, o que, segundo Neumann (2008), retardam a passagem do alimento, possibilitando maior período digestivo, melhor aproveitamento do alimento e maior capacidade de absorção.

Foi notada a presença de muitas células secretoras de muco principalmente na faringe e esôfago com formato arredondado, sendo encontradas isoladas ou em grupos. Estas células também foram vistas por Mangetti (2006) em *Pseudoplatystoma corruscans* e por Maciel (2006) em *Brycon orbygnianus*. AL-HUSSAINI (1949) diz que, em teleósteos, as células secretoras de muco atingem o seu máximo desenvolvimento na faringe com a finalidade de lubrificar e facilitar a passagem dos alimentos, independentemente da natureza deste. E Mangetti (2006) diz que o número de células secretoras aumenta com a idade da larva, concentrando-se em direção caudal do esôfago, próximo ao estômago diferenciado, o que também foi verificado no presente trabalho.

Segundo Prejs (1981), os hábitos alimentares de uma mesma espécie podem se modificar de acordo com o habitat, natureza do alimento, estação do ano, fase do desenvolvimento e sexo. Augusto et al. (1979), Jeffrey (1972) e Machado (1983) salientam que o acará-açu é uma espécie onívora, com tendência à piscívora/insetívora à medida que se torna adulto. Segundo Prejs (1981), a morfologia do aparelho digestório é marcada pelas mudanças dos hábitos alimentares, produzidas à medida que o peixe se desenvolve.

As valvas orais maxilar e mandibular foram verificadas em larvas com 161 hPE. Segundo Cericato (2005) essas valvas auxiliam na função mecânica da respiração, impedindo

o refluxo da água da cavidade bucal para o meio ambiente, durante o esforço respiratório. Não foi verificada a formação de dentes nas larvas de acará-açu do presente experimento. Rodrigues et al. (2006) dizem que espécies de hábitos onívoros e herbívoros, ao contrário dos carnívoros, não possuem dentição bem desenvolvida, o que está correlacionada com a natureza da dieta.

O fígado além de armazenar gordura e glicogênio (FALK-PETERSEN e HANSEN, 2001) é um importante órgão no processo de absorção do vitelo (MORRISON et al., 2001). Foi observado que o fígado é muito grande em relação ao tamanho corporal das larvas de *A. ocellatus* com hepatócitos vacuolares e eritrócitos. Foi também verificada a excreção de bile através do ânus com 113 hPE, fato também descrito por Chacon (1982). Kunz (2004) sugere que essa secreção é provavelmente análoga ao mecônio de bebês recém-nascidos.

Os botões gustativos também são estruturas importantes para a alimentação. Segundo Matsuoka (2001) os órgãos olfatórios e botões gustativos operam como quimiorreceptores, com função de captar o cheiro e o gosto de substâncias saturadas na água. A quantidade de botões gustativos também estaria envolvida na habilidade do peixe em localizar efetivamente uma fonte de alimento (CAPRIO, 1988). No caso do acará-açu, este não possui botões gustativos em grande quantidade e nem foi localizado botões extra-orais, provavelmente por possuírem olhos bem desenvolvidos para localizar fontes de alimento.

Em peixes, os principais receptores de estímulos externos vibratórios e gravitacionais são os neuromastos, a unidade básica da linha lateral (CESTAROLLI, 2005). Os neuromastos são constituídos por mecanorreceptores responsáveis por perceber movimentos na água, estando localizados superficialmente na epiderme, constituindo os neuromastos livres, e/ou em sulcos e canais, formando o sistema de linha lateral (MATSUOKA, 2001). De acordo com Ghysen e Dambly-Chaudère (2000) a distribuição dos neuromastos é espécie-específica e acompanha a filogenia. No presente estudo, foi observado apenas neuromastos livres localizados na cabeça. Provavelmente a linha lateral se forma posteriormente à fase larval vitelínica.

O desenvolvimento do sistema circulatório tem início com o surgimento do coração no período da somitogênese do embrião, continuando durante o desenvolvimento da larva (HU et al., 2000). Neste período, as células sanguíneas são bombeadas através de sinusóides presentes no saco vitelínico e nas membranas das nadadeiras (HELFMAN et al., 2000). O coração é uma estrutura que se desenvolve rapidamente, sendo o primeiro órgão que apresenta funcionalidade nas larvas. Osman et al. (2008) dizem que em *Clarias gariepinus*, a rápida

formação do coração indica uma adaptação de espécies nativas de águas quentes, ao aumento da taxa metabólica resultante da demanda de oxigênio e nutrientes sob temperaturas elevadas.

Foram observados arcos branquiais em números de quatro pares e um par de pseudo-brânquias, de cada lado da cabeça. As brânquias são importantes para a respiração, osmoregulação e excreção do metabólitos nitrogenados. Em tilápias a pseudo-brânquia é coberta por um tecido conectivo, mas em alguns teleósteos grandes, pode ser identificado como uma brânquia normal (MORRISSON et al., 2006). Os arcos branquiais apresentam expansões, os rastros, direcionadas à cavidade faríngea, variando em forma, tamanho, quantidade e distribuição, para cada espécie. Servem para proteção dos filamentos branquiais e, ainda, podem estar vinculados aos hábitos alimentares da espécie (EIRAS-STOFELLA, 1994). Prein e Kunzmann (1987), estudando duas espécies de peixes da mesma família e que vivem no mesmo habitat encontraram diferenças na morfologia branquial. A espécie mais ativa apresentou maior número de filamentos por arco branquial, além de mais lamelas por filamento. Em acará-açu foi encontrado células mucosas e de cloreto nas brânquias formadas em larvas com 383 hPE. Adoff (1986) encontrou precursores de células de cloreto presentes no estágio de mórula no bacalhau (*Gadus morhua*). E ao final da epibolia estão aparentemente funcionais. Já as células secretoras de muco são geralmente encontradas nos filamentos, mas o muco pode ser encontrado sobre o epitélio respiratório em peixes expostos a condições de estresse, sugerindo que a camada de muco proteja as superfícies lamelares contra agentes infecciosos, tóxicos e partículas em suspensão (MALLATT, 1985; POWELL et al., 1992).

Em peixes, a maior parte dos metabólitos nitrogenados é excretada pelas brânquias, e a principal função dos rins é o balanço de sal da água (MORRISON et al., 2006). Os pronéfrons, ou rins primitivos encontrados nas larvas de *A ocellatus* apresentaram-se como estruturas enoveladas, localizadas na parte dorsal da cavidade corporal, acima da bexiga natatória. A bexiga urinária foi observada próxima a abertura anal.

Já a bexiga natatória apresentou uma camada de células colunares quando não inflada, e composta por uma camada de células cúbicas após inflar. Este fato também foi visto por e Morrison et al. (2001), em larvas de tilápias nilóticas. Em várias espécies, a bexiga natatória é um órgão hidrostático que auxilia no ajuste de gravidade dos peixes em diferentes profundidades. Pode ainda contribuir no processo respiratório, servir como órgão de sentido, ou mesmo na produção de sons (MACHADO, 1999).

O desenvolvimento de *Astronotus ocellatus* foi considerado lento, como o da maioria das espécies lênticas. A ocorrência de estruturas morfológicas que permitem a captura de alimentos antes mesmo da exaustão das reservas energéticas endógenas, asseguram o aumento

das chances de sobrevivência durante a fase larval. A diferenciação simultânea de estruturas natatórias como nadadeira peitoral, bexiga gasosa e brânquias foram marcantes, assim como a rápida formação dos olhos evidencia se tratar de uma espécie caracterizada como predadora visual.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que:

- Nas condições do presente experimento, a indução hormonal em *Astronotus ocellatus* não foi considerada satisfatória em nenhum dos dois métodos empregados, embora tenha sido mais efetiva em fêmeas do que em machos.
- Através das observações realizadas podemos classificar o *Astronotus ocellatus* como uma espécie sedentária, que possui cuidado parental, ovos demersais, adesivos e telolécitos.
- Seu desenvolvimento embrionário é lento quando comparado ao de espécies reofílicas, com ovos apresentando córion espesso e pequeno espaço perivitelino.
- A fase larval vitelínica durou 185 horas a uma temperatura de $27,45 \pm 2,13^\circ\text{C}$, apresentando larvas transparentes, com glândulas adesivas, boca e ânus fechados na eclosão.
- A organogênese larval inicia-se com o surgimento de somitos, vesícula óptica e ótica, o desenvolvimento do sistema nervoso central, do coração, olhos, nadadeira peitoral e brânquias. As larvas, ao absorverem todo o vitelo, apresentam trato digestório já diferenciado, mas com ausência de glândulas enzimáticas no estômago.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOFF, G. R. Anatomical studies of developing eggs and larvae of the cod (*Gadus morhua* L.) In: Fyhn HJ, editor. **Fish larval physiology and anatomy**. University of Bergen; p. 51-116, 1986.

AL-HUSSAINI, A. H. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: anatomy and histology. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, London, v. 3-90, n.10, p.109-139, 1949.

ALCÂNTARA FILHO, P., ARAÚJO FILHO, J. B. Análise quantitativa em um ensaio de piscicultura com o apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* (Cuvier) (Pisces, Perciformes, Cichlidae), na estação de piscicultura “Valdemar Carneiro de França” (Ceará-Brasil). **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 14, n.1/2, p. 15-35. 1983.

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

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Fator de condição relativo (Kn): um critério para selecionar fêmeas de piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) (Pisces: Bryconidae), para indução reprodutiva. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, n. 25, p. 95 – 99. 1999.

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). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 21-27. 2001.

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 803-811. 2002.

ANJOS, H. D. B.; ANJOS, C. R. Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, Schultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em laboratório. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, n.2, p. 151-166. 2006.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. e BITTENCOURT, M.M. A reprodução e o início da vida de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae; Characiformes) na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 32, n.2, p. 693-697. 2002.

AUGUSTO, J. A. M.; NEPOMUCENO, F. H.; CARVALHO, J. N. Nota prévia sobre o cultivo de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1829), utilizando-se três diferentes dietas, na Estação de Piscicultura “Valdemar C. de França” (Maranguape, Ceará, Brasil). **Boletim Técnico DNOCS**. Fortaleza, n. 37, p. 153-158, 1979.

AZEVEDO, P.; VIEIRA, B. B. Realizações da Comissão técnica de Piscicultura do Nordeste. **Boletim de Inspeção de Obras Contra as Secas**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 113-124, 1940.

BEZERRA e SILVA, J. W., REGIS, R. C., BEZERRA, A. T. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, n.1/2, p. 22-26. 1993.

BHUJEL, R.C. A review of strategies for the management of tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 181, p. 37-59, 2000.

BIALEZTKI, A.; BAUMGARTNER, G.; SANCHES, P. V. et al. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Auchenipterus osteomystax* (Osteichthyes, Auchenipteridae) da bacia do rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 377-382, 2001.

BONISLAWSKA, M.; FORMICKI, K.; WINNICKI A. Size of eggs and duration of embryogenesis in fishes. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, Szczecin, Polônia, v. 30, n. 1, p.61-71. 2000.

BONISLAWSKA, M.; FORMICKI, K.; WINNICKI, A.; Fish egg size variability: biological significance. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 4, n. 2, p. 61-71. 2001.

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

BRAGA, R. A. **Apaiari ou acará-açu, *Astronotus ocellatus ocellatus* Spix**. Fortaleza: DNOCS, 1962, 2p.

BRAGA, R. A. Frequência de desova de reprodutores de apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* Spix (Pisces, Cichlidae), mantidos em cativeiro. Fortaleza: **DNOCS**, p. 351-357, 1982. (Coletânea dos Trabalhos Técnicos do DNOCS).

BROOKS, S.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in Fish and Fisheries**, Vancouver, v. 7, p. 387-416. 1997.

CAPRIO, J. Peripheral filters and chemoreceptor cells in fishes. In: ATEMA, J.; FAY, R. R.; POPPER, A. N.; TAVOLGA, W. N. (Ed.) **Sensory Biology of Aquatic Animals**. New York : Springer-Verlag, 1988. p. 313–338.

CAROSFELD, J. Reproductive physiology e induced breeding of fish as related to culture of Collossomas. P. 37-73. In: Armando Hernandez, editor. **Cultivo de *Colossoma* (SUDEPE – Colciências - CIID)**, Canadá, 1989.

CARRILLO, M.; ROMAGOSA, E. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): tempo pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.31, n.1, 55-64. 2004.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.

CERICATO, L. **Larvicultura de piau, *Leporinus macrocephalus*: Estudo da substituição do alimento vivo pelo artificial e da morfologia do sistema digestório.** 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2005.

CERQUEIRA, V. R.; MIOSO, R.; CANARIN, M. Indução de desova com fertilização natural e artificial e incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus*). **Atlântica**, Rio Grande, n. 27, v. 1, 31-38, 2005.

CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais.** 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2005.

CHACON, J. O. Evolução de ovo, larva e alevino de apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* (Técnicos do DNOCS).

CHAMBERS, R. C.; LEGGETT, W. C. Maternal influences on variation in eggs size in temperature marine fishes. **American Zoologist**, Oxford, v. 36, p. 180-196. 1996.

CHAVES, P. T. C.; VAZZOLER, G. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. III Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Semprochilodus insignis* (Chariciformes: Prochilodontidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 14, p. 343-353, 1984.

COLEMAN, R. M.; GALVANI, A. P. **Eggs size determines offspring size in neotropical cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae).** *Copeia*, v. 1, p. 209-213, 1998.

DA SILVA, A. F.; ROMAGOSA, E.; SOUSA, A. P. Incubação artificial na produção de alevinos de acará-açu, *Astronotus ocellatus*. In.: *Aqua Ciência* 2004, 1., 2004, Vitória, ES. **Resumos...** Vitória: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (Aquabio), 2004. p. 226.

DA SILVA, A. F. **Desenvolvimento inicial do acará-açu, *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1832) (Pisces, Cichlidae), e observações preliminares acerca das simulações de chuvas da**

espécie mantida em confinamento, 2005. 88 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2005.

DUARTE, C. M.; ALCARAZ, M. To produce many small or few large eggs: a size independent reproductive tactic of fish. **Oecologia**, Heidelberg, v. 80, p. 401-404. 1989.

EIRAS-STOFELLA, D. R. **Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (Teleostei), estudada através da microscopia eletrônica de varredura**. Curitiba, 1994. 125p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Zoologia) – Universidade Federal do Paraná.

FALK-PETERSEN, I. B.; HANSEN, T. K. Organ differentiation in newly hatched common wolfish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 59, p. 1465-1482, 2001.

FALK-PETERSEN, I. B. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. **Fish and Shellfish Immunology**, Scotland, v. 19, p. 307-412. 2005.

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 corruscans* X cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 29, p. 49-55. 2007.

FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. M.; NARAHARA, M. Y. The size composition of the eggs of curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 42, p. 37-41, 1984.

FLORES, J.C.B., ARAIZA, M.A.F., VALLE, M.R.G. **Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon indellus* (Carpa herbívora)**. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), p.792-797, 2002.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484. 1951.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, p. 467-484. 1982.

FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F. H. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 85-99. 1983.

FURY, J. R.; MORELLO, F. A. The contribution of an exotic fish, the oscar, to the sport fishery of the Everglades water conservation areas. In.: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOUTHEASTERN ASSOCIATION OF FISH AND WILDLIFE AGENCIES, 48., 1994, Biloxi. **Proceedings...** p. 474-481.

GANECO. L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** 2003. 66 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2003.

GHYSEN, A.; DAMBLY-CHAUDIÉRE, C. A genetic programme for neuronal connectivity. **Trends in Genetics**, New York, v. 16, p.221-226, 2000.

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**, Amsterdam, v. 183, p. 83-94. 2000.

GODINHO, H. P.; SANTOS, J. E.; SATO, Y. Ontogênese larval de cinco espécies do São Francisco, p. 133-148. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003, 468 p.

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

GOLTERMANN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for Physical and Chemical Analysis of Freshwaters**. London: Blackweel Science Publication, IBP Handbook number 8, 1978. 214 p.

GORDON, A. K.; HECHT, T. Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 18, p. 113-117. 2002.

GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: DATTA MUNSHI, J. S.; DUTTA, H. M. (eds) **Fish Morphology**. Horizon of new research. Brookfield: A. A. Balkema Publishers, p. 111-145, 1996.

GURGEL, J. J. S. Aspectos limnológicos do açude Amanari, Maranguape, Ceará, Brasil. Estudos físico-químicos. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 28, n. 1, p. 31-47, 1970.

GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 31, n. 1, p. 37-44, 1973.

HARVEY, B.; CAROSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC. 1993. 145p.

HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E. **The diversity of fishes**. Massachussetts: Blackwell Acience, USA, 2000, CAP. 9, P. 117-134.

HU, N.; SEDMERA, D.; YOST, H. J.; CLARK, E. B. Structure and function of the developing zebrafish heart. **The Anatomical Record**, Wiley Liss, v. 260, p. 148-157, 2000.

JEFREY, N. B. **Progress report on fisheries development in northeastern Brazil**. Alabama: Auburn University, 1972. 10 p.

KAVAMOTO, E. T.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; CAMPOS, B. E. S. Produção espermática do curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, n. 24, p.73 – 78. 1997.

KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, n. 25, p. 61- 66. 1999.

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

KJORSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I.; Egg quality in fishes. **Advances in Marine Biology**, v. 26, p. 71-113, 1990.

KUNZ, Y. W. **Developmental Biology of Teleost Fishes**. The Netherlands: Springer, 2004. 637 p.

LAGLER, K.F. **Freshwater Fishery Biology**. Second Edition. 421p. Dubuque: WM.C. **Brown Company**, 1959.

LEME DOS SANTOS, H. S. Anatomia microscópica dos ovos de teleósteos nas diferentes etapas do desenvolvimento embrionário. In: II Semana sobre Histologia de Peixes da FCAVJ-UNESP. **Anais**, 153p. 1995.

LEME DOS SANTOS, H. S.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. Jaboticabal: FUNEP. 1996, 189p.

MACIEL, C. M. R. R. Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Charciformes, Characidae, Bryconinae). 2006. 229 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 2006.

MACHADO, C. E. M. Criação de apaiari. In:____. **Criação prática de peixes**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1983. p. 71-78.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixe como indicadores de qualidade das águas. **Ciência, Biologia e Saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63 – 76. 1999.

MAGALHÃES, A. C. **Monografia brasileira de peixes fluviais**. São Paulo: Romiti, Lanzarra e Zanin, 1931. 262 p.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Toronto, v. 42, p. 630-648, 1985.

MANGETTI, A., J. **Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829**. 2006. 94p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP: São Paulo. 2006.

MARQUES, C. **Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. 2005. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MATSUOKA, M. Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 67, p. 1036-1045. 2001

MENEZES, R. S. **O apaiari nos açudes do Nordeste do Brasil**. Chácaras e Quintais, São Paulo, v. 84, n. 3, p. 305-307, 1951.

MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT JR, J. R. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 247, p. 172-195. 2001.

MORRISON, C. M.; FITZSIMMONS, K., WRIGHT JR., J. R. **Atlas of tilapia histology**. World Aquaculture Society, Louisiana, 2006, 96p.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; CAVICCHIOLI, M. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM/Nupélia, 2001, 359p.

NARAHARA, M. Y.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. et al. Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon*, no Instituto de Pesca. In: Seminário sobre a criação de espécies do gênero *Brycon*, 1., 1994, Pirassununga, SP. **Anais...** Pirassununga: 1994. p.5-6.

NARAHARA, M. Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; GODINHO, H. M. Reprodução induzida da pirapitinga do sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1070-1075, 2002.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**, 3. ed., New York: John Wiley & Sons, 1994, 523 p.

NEUMANN, E. **Características do desenvolvimento de duas linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus* e uma linhagem híbrida de *Oreochromis* sp.** 2004. 65 p. 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 Aqüicultura). 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) (Characiformes; Prochilodontidae). **Zygote**, Napoli, v. 14, p. 217-229, 2006.

OBBER, E. A.; FIELD, H. A.; STAINIER, D. Y. R. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. **Mechanisms of Development**, Kobe, Japan, v. 120, p. 5-18, 2003.

OSMAN, G. M.; WUERTZ, S.; MEKKAWY, I. A.; VERRETH, J. E KIRSCHBAUM, F. Early development of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), focusing on the ontogeny of selected organs. **Journal Applied Ichthyology**, Berlin, n. 24, p. 187-195, 2008.

OSSE, J. W. M. Form changes in fish larvae in relation to changing demands of function. **Journal of Zoology**, Netherlands, v. 40, n. 1-2, p. 362-385. 1990.

PAES, M. C. F.; NAKAGHI, L. S. O. Estudo do desenvolvimento de embriões e larvas de *Oreochromis niloticus* sob estereomicroscópio. In: XIII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005, Ribeirão Preto. **Resumos...** 2005.

PREIN, M.; KUNZMANN, A. Structural organization of the gills in pipefish (Teleostei, Syngnathidae). **Zoomorphology**, Berlin, v. 107 p. 161-168, 1987.

PREJS, A. **Metodos para el estudio de los alimentos y las relaciones troficas de los peces**. Caracas, Universidad central de Venezuela y Universidad de Varsovia. 129 p. 1981.

POWELL, M. D.; SPEARE, D. J.; BURKA, J. F. Fixation of mucus on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gills for light and electron microscopy. **Journal of Fish Biology**, London, v. 41, p. 813-824, 1992.

RANA, K. J.; Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. **Aquaculture**, Amsterdam v. 46, n. 2, p. 119-131, 1985.

RANA, K. **Reproductive biology and hatchery rearing of tilapia eggs and fry**. In: MUIR, J.F. e ROBERTS, R.J. (Ed.). v. 3: Recent Advances in Aquaculture. Colorado: Westview Press. p.343-406, 1988.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia** 5th ed. Rio de Janeiro, ed Elsevier, 2005.

REYNALTE-TATAJE, D.R.; ZANIBONI-FILHO, E.; MUELBERT, B. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello e Britski, 1988). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.4, p. 823-827. 2001.

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). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.55, n. 1, p.65-78. 1995.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes, p. 112 - 130. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003, 468 p.

RODRIGUES, S. S.; NAVARRO, R. D.; MENIN, E. Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringeana de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Pisces, Characiformes, Anostomidae) em relação ao hábito alimentar. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 1, p. 51-58. 2006.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Stages of embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 29-32. 2001.

ROMAGOSA, E. Reprodução induzida em peixes tropicais. In.: Congresso de Integração em Biologia da Reprodução. **Resumos abstracts**. p.59, 2003.

SAMPAIO, K. H. **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, 2006.

SANTOS, E. **Pesca e piscicultura**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1977. 212 p.

SARGENT, R. C.; TAYLOR, P. D.; GROSS, M. R. Parental care and evolution of egg size in fishes. **The American Naturalist**, Chicago, v. 121, n. 1, p. 32-46. 1987.

SAS INSTITUTE., 1991. **SAS/STAT user's guide**: statistics, version 5. Cary, 1028p.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 198 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal São Carlos, São Carlos, 1999.

SHAHSAVARANI, I. A.; THOMAZ, Z. C.; BALLANTYNE, J. S.; WRIGHT, P. A. A novel technique for the separation of yolk from the developing embryonic tissue in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Namur, Bélgica, v. 24, p. 321 – 326, 2002.

SHELTON, W.L. **Artificial propagation tilápia for chromosome manipulation**. In: BURKE, D.; BAKER, J.; GOETZE, B.; CLAIR, D.; EGNA, H. (Ed.). Oregon: Fifteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture. p.25-29, 1998.

SHELTON, W.L. **Methods for androgenesis techniques applicable to tilapia**. In: McELWEE, K.; BURQUE, D.; NILES, M.; EGNA, H. (Ed.). Oregon: Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture. p.51-55, 2000.

SHELTON, W.L. **Monosex tilapia production through androgenesis**. In: McELWEE, K.; LEWIS, K.; NIDIFFER, M.; BUITRAGO, P. (Ed.). Oregon: Nineteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture. p.1-9, 2002.

SILVA, J. W. B.; REGIS, R. C.; BEZERRA, A. T. Produção de alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus ocellatus* (Cuvier, 1829) Swainson, 1839, em viveiros. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, n. ½, p. 22 – 26. 1993.

SOLIGO, T. A. **Primeiras experiências com a reprodução, larvicultura e desmame do robalo-flecha *Centropomus undecimalis* no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 40 p. 2007.

SUZUKI, H. I. **Variações na morfologia ovariana e no desenvolvimento do folículo de peixes teleósteos da bacia do rio Paraná no trecho entre a foz do rio Paranapanema e a do rio Iguaçu.** Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1992. 190p.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; SMITH, S. A.; CHATREEWOGSIN, U. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, p. 241-251, 2002.

TOLOSA, E.M.C.; BEHMER, O.A.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** Barueri – SP: Manole, 2003. 331p.

VAL, L. A.; HONCZARIK, A. A criação de peixes na Amazônia: um futuro promissor. In.: _____. **Criando peixe na Amazônia.** Manaus, INPA, 1995, p. 1-5.

VAL, L. A.; ROLIN, P. R.; RABELO, H. Situação atual na aqüicultura na região norte. In.: VALENTE, W. C.; POLI, C. R.; BORGHETT, J. R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.** Brasília: CNPq, 2000. cap. 13, p. 246-265.

VAN SNIK, G. M. J.; VAN DEN BOOGAART, J. G. M.; OSSE, J. W. M.. Larval growth patterns in *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus* with attention to the finfold. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, p. 1339-1352. 1997.

VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. Hormônios na reprodução artificial de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 55, p. 39 – 48, 1999.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 56, n. 4, p. 655 – 659. 1996.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In.: **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** P. 45-73, São Paulo: TecArt, 2004.

ZHUKINSKIY, V. N.; GOSH, R. I. Criteria of biological quality of eggs of commercial fishes and a method for rapid assessment. **Journal of Ichthyology**, Moscow, v. 28, n. 6, p. 106-114. 1988.

WOOTTON, R. J. Life histories as sampling devices: optimum egg size in pelagic fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 1067-1077. 1994.

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