



EVER EDREY HERNÁNDEZ CUADRADO

**INDUÇÃO DA ATIVIDADE ESPERMÁTICA E
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E
LARVAL DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

LAVRAS – MG

2013

EVER EDREY HERNÁNDEZ CUADRADO

**INDUÇÃO DA ATIVIDADE ESPERMÁTICA E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO E LARVAL DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Hernández Cuadrado, Ever Edrey

Indução da atividade espermática e desenvolvimento
embrionário e larval de curimba (*Prochilodus lineatus*) / Ever Edrey
Hernández Cuadrado. – Lavras : UFLA, 2013.

182 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixes de água doce. 2. Fotoperíodo. 3. Ativação espermática.
4. Larvas. 5. Embriões. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

A minha querida família, Amparo, Yezid e Douglas, pela força e pela paciência nos meus longos instantes de ausência;

A minha mãe Ana e meu pai Manuel (in memoriam), pelo bom exemplo e por me ensinar a enfrentar a vida sem vacilações.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À vida e ao Brasil, pela oportunidade de me formar na prestigiosa Universidade Federal de Lavras, para ser uma melhor pessoa e um melhor cidadão;

A minha querida família, Amparo, Douglas e Yezid, pelo apoio incondicional;

À família Prasca Vélez; Iván, Arelis, Karen Margarita e Ivan Darío, por serem os guardiões da minha família na minha ausência;

Igual agradecimento às famílias Jaramillo Vélez e Rueda Vélez;

À Universidad del Tolima, pelo apoio durante todo o tempo do Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida no Doutorado;

À COLFUTURO, pelo apoio econômico durante dois dos três anos de estadia no Brasil;

Ao Biotério de Animais da Universidade Federal de Lavras, dependência na qual foi desenvolvida esta pesquisa na sua parte experimental;

Ao professor Dr. Luis David Solís Murgas, pela oportunidade, a amizade e pela orientação acertada durante os meus estudos no Brasil;

À banca avaliadora composta pelas doutoras Mônica Rodrigues Ferreira, Sheila Cristina da Silva Victorio, Cristina Delarete Drummond e Glucia Frasnelli Mian, pelos comentários e sugestões pertinentes que enriqueceram esta pesquisa;

À Doutora Viviane de Oliveira Felizardo, pela sua ajuda e colaboração em muitas oportunidades quando foi consultada durante a realização deste trabalho;

À colega Estefânia Andrade de Souza, pela ajuda e disposição no início desta pesquisa;

Aos estudantes do programa de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras; Jhonatan Solís de León, Gabriela Pimenta Araujo, Ana Roque e Eric Takeshi Senoo, pela grande ajuda na tomada de dados no laboratório e na Piscicultura da Hidrelétrica de Itutinga, CEMIG, MG;

Aos professores; Raimundo Vicente de Souza, Márcio Gilberto Zangerónimo, Luciano José Pererira, Flamarion Tenório de Albuquerque, pelas orientações recebidas durante os cursos desenvolvidos no Doutorado;

Igual agradecimento a José Reinaldo Berin, pela ajuda e disposição no aspecto administrativo durante o tempo do Doutorado;

A William César, pela colaboração no laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Programa de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras;

Aos colegas; JP Chaclán e Jhon Alexander Castañeda, pela tradução ao inglês e na formatação do documento final;

À Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Itutinga, CEMIG, por permitir o acesso às amostras biológicas;

A todos e cada um dos meus colegas do curso de Doutorado em Ciências Veterinárias da UFLA, pelas experiências compartilhadas durante os últimos anos.

RESUMO GERAL

A motilidade espermática é um dos aspectos de maior importância no sucesso da reprodução e produção de peixes em cativeiro. Da mesma forma, o fotoperíodo é um dos fatores físicos que afetam o desenvolvimento embrionário e larval em muitas espécies icticas, particularmente as migradoras. No primeiro experimento objetivou-se avaliar o efeito de seis soluções ativadoras (SA₀, SA₁, SA₂, SA₃, NaCl e água destilada), de diferente osmolaridade e pH, sobre a taxa(%) e a duração da motilidade espermática e as taxas de fertilização (TF) e eclosão(TE) de curimba (*Prochilodus lineatus*). A SA₁ proporcionou maiores tempos de duração da motilidade espermática, TF e TE quando comparadas com NaCl e água destilada. A duração da motilidade obtida com a SA₀ foi a mais baixa e não houve fertilização; com SA₂ e SA₃ o sêmen não ocorreu ativação espermática. É possível concluir que as soluções SA₁, NaCl e água destilada podem ser utilizadas na ativação de gametas durante a fertilização na reprodução induzida de curimba, porém recomenda-se a utilização da SA₁ para obtenção de maior TF e TE. O segundo trabalho visou determinar o efeito de três fotoperíodos sobre o desenvolvimento embrionário de *P. lineatus*. Cerca de 1800 embriões foram repartidos em três tratamentos de luz:escuridão (24:00, 00:24 e 12:12), sendo mantidos em incubadoras dentro de aquários de 15 litros de água com areação artificial e controle da qualidade da água. Houve diferenças a partir do estágio de transição alto-ovóide, atingido às 3,75 horas pós-fertilização(hpf) em 00:24 e 24:00, em 12:12 estavam no estágio ovóide-esfera. Às 4,75 se manteve o padrão de maior avanço em 24:00, seguido por 00:24 e 12:12. Nos estágios de gástrula, segmentação e organogênese foi mantida esta tendência. Os resultados demonstram que existe influência do fotoperíodo no desenvolvimento embrionário da curimba nos estágios mais avançados. No terceiro experimento determinou-se o efeito de três regimes de luz:escuridão sobre o desenvolvimento e o crescimento das larvas de *P. lineatus* desde a eclosão até a reabsorção total do vitelo. Foram usadas 1350 larvas recém eclodidas e submetidas a três regimes de luz:escuridão (24:00, 00:24 e 12:12), repartidas em incubadoras experimentais com areação e iluminação artificiais. Avaliaram-se os principais eventos do desenvolvimento e determinou-se o crescimento relativo ou alométrico em períodos-chaves, nomeados em horas pós-eclosão(hpe). Em 24:00 se acelerou o desenvolvimento e o crescimento das larvas (42,5 hpe) e apresentaram maior atividade locomotora quando comparado com 00:24 e 12:12 (45hpe e 50,2hpe, respectivamente). Os resultados confirmam que os eventos centrais do desenvolvimento das larvas de curimba variam apenas no tempo em atingir cada um desses eventos e no tamanho, apresentando um crescimento alométrico positivo da região cefálica. Deste modo, a extensão da motilidade espermática e o efeito modulador do fotoperíodo do desenvolvimento e crescimento em *P. lineatus* podem contribuir a geração de pacotes tecnológicos de baixo custo para melhorar a produção de embriões e larvas viáveis da espécie.

Palavras – chave: Curimba. Ativação espermática. Fertilização. Eclosão. Fotoperíodo. Embrião. Larva.

GENERAL ABSTRACT

Spermatic motility is one of the most important aspects of the success on the production and reproduction of fish in captivity. Likewise, photoperiod is one of the physical factors which affect embryo and larval development of many fish species, especially the migratory species. The objective of the first experiment was to evaluate the effect of six activating solutions (SA₀, SA₁, SA₂, SA₃, NaCl and distilled water) of different osmolarities and pH over curimba (*Prochilodus lineatus*) spermatic motility rate (%) and duration and fertilizing (FR) and hatching (HR) rates. The SA₁ presented the highest spermatic motility durations, FR and HR when compared to NaCl and distilled water. The motility duration obtained with SA₀ was the lowest and there was no fertilization; with SA₂ and SA₃ there was no spermatic activation. It is possible to conclude that the SA₁, NaCl and distilled water solutions may be used for gamete activation during fertilization in curimba induced reproduction, and we recommend the use of SA₁ in order to obtain higher FR and HR. The second experiment aimed at determining the effect of three photoperiods over *P. lineatus* embryo development. Close to 1800 embryos were divided into three light:darkness treatments (24:00, 00:24 and 12:12), maintained in incubators held inside 15 L water tanks with artificial aeration and water quality control. Differences occurred from the high-ovoid transition stage, reached at 3.75 hours post-fertilization (hpf) in 00:24 and 24:00, while in treatment 12:12 they were at the ovoid-sphere stage. At 4.75 hpf, a higher advance standard was maintained in 24:0, followed by 00:24 and 12:12. During the gastrula, segmentation and organ-genesis stages, this tendency was maintained. The results showed that photoperiod influences curimba embryo development in the more advanced stages. The third experiment determined the effect of three light:darkness regimes over *P. lineatus* larvae development and growth from hatching to total yolk resorption. Thirteen hundred and fifty newly hatched larvae were submitted to three light:darkness regimes (24:00, 12:24 and 12:12), divided into experimental incubators with artificial aeration and illumination. The main development events were evaluated and the relative growth or allometry was determined in key periods, named in hours post-hatching (hph). In treatment 24:0, larvae development and growth were accelerated (42.5 hph) and presented higher locomotive activity when compared to 00:24 and 12:12 (45 hph and 50.2 hph, respectively). The results confirm that the events central to curimba larvae development vary only in the time taken in reaching each of these events and in the size, presenting a positive allometric growth in the cephalic region. Thus, the extension of spermatic motility and the modulator effect of the photoperiod over *P. lineatus* development and growth may contribute in the generation of low cost technological packages in order to improve viable embryo and larvae production of this species.

Keywords: Curimba. Spermatic activation. Fertilization. Hatching. Photoperiod. Embryo. Larvae.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Efeito de diferentes soluções de ativação sobre a duração da motilidade espermática de *P. lineatus* 73
- Figura 2 Efeito de diferentes soluções de ativação sobre as taxas de fertilização em *P. lineatus* 73
- Figura 3 Efeito de diferentes soluções de ativação sobre as taxas de eclosão em *P. lineatus* 75

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Fotoperíodo de zigoto e início da clivagem em *P. lineatus* 92
- Figura 2 Gotas de óleo nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário de *P. lineatus* em tratamento fotoperiódico de 24:00 . 94
- Figura 3 Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento embrionário de *P. lineatus* no período de blástula em 24:00 (a, b), 00:24 (c, d) 95
- Figura 4 Blástula em 4,75 hpf de *P. lineatus* no fotoperíodo de blástula com desenvolvimento assíncrono dos blastômeros após do estágio oblongo – esfera (figura 4a – 4f). 24:00 (a, b); 00:24: blastômeros marginais da EVL (membrana que envolve o blastodisco) (4c, d) e células das camadas profundas marginais (cabeça de seta); 12:12 (e, f) 97
- Figura 5 Gástrula de *P. lineatus* às 5,75 hpf em 24:00 (a, b, d, g), 00:24 (c, h) e 12:12 (e, f) 99
- Figura 6 Gástrula em *P. lineatus* às 7.75 hpf em 24:00 (a), primórdio do escudo embrionário (seta horizontal), blastoderma marginal (cabeça de seta); 00:24 (b), anel germinativo; 12:12 (c, asterisco): duas gotas de óleo; 00:24 (b) e 12:12 (d): escudo embrionário 100

- Figura 7 Segmentação em *P. lineatus* às 9.75 hpf em 24:00 (a): Primórdio cerebral (seta descendente na cabeça embrionária), primórdio da vesícula óptica (seta oblíqua) e da placoda ótica inicial (óvalo), primórdio da vesícula de Kupffer (seta descendente na zona caudal). 12:12 min (b): primórdio da cabeça e da cauda (seta e cabeça de seta, respectivamente). 00 : 24 (c): vesícula óptica (seta) 101
- Figura 8 Segmentação em *P. lineatus* às 11.75 hpf em 24:00 (a): telencéfalo (seta branca), vesícula de Kupffer (seta preta); (b): glândula da eclosão (seta); (c): começo da extensão do vitelo na zona caudal (seta). 00:24 (d): vestígio do cristalino ocular (seta), gotas de óleo (óvalo). 12:12 (e): evidência da fenda de Brachet(?) (cabeça de seta), primórdio do cristalino (seta). (14 – 21); em 00:24 (12 - 18); em 12:12 (10 – 17) 103
- Figura 9 Segmentação em *P. lineatus* às 13 hpf em 12:12: início da extensão da cauda (a). 00:24 depressão no vitelo (b). Desprendimento da cauda (b, c). 24:00 configuração do sistema nervoso central (d): rudimento do cérebro meio (seta inferior), epífise (rudimento do hipotálamo, seta horizontal inferior), mesencéfalo (seta horizontal superior), rombencéfalo (ou cerebelo, seta descendente) com rombómeros ainda não evidentes, e o diencéfalo (seta ascendente), tubo caudal do vitelo (h), nadadeira cartilaginosa e conduto pronéfrico (9e, cabeça de seta), depressão da vesícula ótica sem otólitos (f). Tubo caudal do vitelo (9g, h), avanço do sistema digestivo (h) 105

- Figura 10 Segmentação e organogênese em *P. lineatus* às 14 hpf em 24:00 (a), 00:24 (b, d, e, f) e 12:12 (c). Além da vesícula óptica, o cristalino e a vesícula ótica, em (a) estão: Telencéfalo (seta horizontal esquerda), epífise (seta oblíqua superior), mesencéfalo (seta oblíqua do meio), rombencéfalo (seta horizontal direita) e diencéfalo (seta descendente vertical). Em b: cerebelo (seta horizontal superior), cérebro meio (seta horizontal inferior) e o rombencéfalo (seta descendente), vesícula e início dos otólitos (seta branca). c – f: embriões em 16 hpf. Em c: embrião retrasado em 12:12 quando comparado com os outros dois tratamentos. Otólitos (d, f), início da linha lateral (f, seta branca), lugar onde se formará o ânus (e, seta preta) e o conduto pronéfrico ou rins (e, seta branca) O tratamento 12:12 (c, ou prim-5) apresenta atraso quando comparado com os outros dois tratamentos..... 107
- Figura 11 Larva recém eclodida de *P. lineatus* com aproximadamente 42 somitos..... 109

CAPÍTULO 5

- Figura 1 Larvas de *P. lineatus* em Eclosão 24:00, tempo zero (a), início dos batimentos cardíacos e circulação sanguínea, 1 – 2 hpe (b, seta assinala o coração), início da hematopoiese, 3 – 4 hpe (c, seta indica o coração e presença de circulação sanguínea), início da pigmentação em 7,5 hpe (d, seta branca) e evidencia do sistema digestivo – hepato-pâncreas – em 8 hpe (d, seta preta) e larva pigmentada e em oito horas após de iniciada a hematopoiese (e, óvalo indica a presença de sangue com pigmentos de hemoglobina)..... 147

- Figura 2 Larvas de *P. lineatus* nos eventos de formação do primórdio das brânquias em 8,5 hpe (a, seta) e o início da pigmentação ocular (a, círculo) e do corpo em 11 hpe (b, c, setas), primórdio bucal em 11 – 12 hpe (c,d, e, setas pretas. Em e, a boca cresce para diante), rombómeros em 18 hpe (d, óvalo), primórdio das nadadeiras peitorais em 18 hpe (e, seta branca) e formação do ânus em 12 hpe (f, seta branca)..... 148
- Figura 3 Larvas de *P. lineatus* nos eventos de alongamento da maxila em 20 – 23 hpe (a,b,c, setas pretas), bexiga gasosa e sistema digestório avançado em 28 hpe (d, setas), vestígio dos primórdios dentais em 35 hpe (e), movimentos bucais e olhos laterais em 38,5 hpe (f, óvalo) e alimentação exógena 35 – 38,5 hpe (e,f,g), reabsorção total do vitelo e início da etapa de post – larva em >42 hpe (g,h)..... 149
- Figura 4 Parte posterior do trato digestivo de larvas de *Prochilodus lineatus* após de iniciada a alimentação exógena 150
- Figura 5 Padrão de pigmentação em *P. lineatus* na fase de larva. Pigmentação puntiforme no olho (círculo) e melanóforos dendriformes (seta) extra-oculares (a) e no dorso da cabeça (b, óvalo). Migração dos melanóforos ao vitelo (b, círculo) e à nadadeira embrionária ao longo da parte inferior da notocorda (c,e). Migração para a zona dorsal da notocorda (c,d, sentido das setas). Melanóforos dendriformes da região ventral (g) e mistura de melanóforos dendriformes (seta) e fluorescentes (círculo) na zona cefálica dorsal (h)..... 152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Alguns estudos relacionados com a qualidade e/ou ativação da motilidade espermática em *P. lineatus* e em outras espécies de interesse em piscicultura no Brasil..... 32
- Tabela 2 Alguns estudos relacionados com o desenvolvimento embrionário e larval em *P. lineatus* e outras espécies de interesse em piscicultura no Brasil 42

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Características e componentes das soluções ativadoras usadas na ativação espermática de *P. lineatus*..... 70
- Tabela 2 Parâmetros qualitativos do sêmen de *P. lineatus* (n=10) após ativação com diferentes soluções 74

CAPÍTULO 4

- Tabela 1 Comparação do tempo do desenvolvimento embrionário de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos em relação com estudos prévios. SOG: segmentação e órgão - gênese 110

CAPÍTULO 5

- Tabela 1 Variáveis avaliadas do desenvolvimento larval de *P. lineatus* (temperatura 26°C ±1) sob três fotoperíodos..... 145
- Tabela 2 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas recém eclodidas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos à zero hora pós – eclosão (hpe)..... 154

Tabela 3	Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de <i>P. lineatus</i> sob diferentes fotoperíodos às seis horas pós – eclosão (hpe).....	155
Tabela 4	Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de <i>P. lineatus</i> sob diferentes fotoperíodos às 12 horas pós – eclosão (hpe).....	156
Tabela 5	Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de <i>P. lineatus</i> sob diferentes fotoperíodos às 24 horas pós – eclosão (hpe).....	157
Tabela 6	Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de <i>P. lineatus</i> sob diferentes fotoperíodos às 42,5 horas pós – eclosão (hpe).....	158
Tabela 7	Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de <i>P. lineatus</i> sob diferentes fotoperíodos às 45 horas pós – eclosão (hpe).....	159
Tabela 8	Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de <i>P. lineatus</i> sob diferentes fotoperíodos às 50 horas pós – eclosão (hpe).....	160
Tabela 9	Relações corporais das larvas de <i>P. lineatus</i> durante a fase de larva submetidas a fotoperíodo de luz constante (24:00) em diferentes tempos após da eclosão	161
Tabela 10	Relações corporais das larvas de <i>P. lineatus</i> durante a fase de larva submetidas a fotoperíodo de escuridão constante (00:24) em diferentes tempos após da eclosão.....	162
Tabela 11	Relações corporais das larvas de <i>P. lineatus</i> durante a fase de larva submetidas a fotoperíodo natural (12:12) em diferentes tempos após da eclosão.....	162

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução Geral	17
1 INTRODUÇÃO	17
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2 Ativação espermática e desenvolvimento ontogênico sob ambiente fótico variável da curimba: uma revisão .	21
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Aspectos Relevantes da Motilidade Espermática.....	25
1.2 Soluções de ativação de espermatozóides e integridade espermática	29
1.3 Desenvolvimento e crescimento embrionário e larval de curimba ..	35
1.4 Fotoperíodo, plasticidade fenotípica e alometria nas etapas iniciais da ontogenia dos peixes	39
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 3 Soluções de ativação do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) e seu efeito nas taxas de fertilização e eclosão	63
1 INTRODUÇÃO	65
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Determinação das Taxas de Fertilização e Eclosão.....	70
2.2 Análise dos Dados	71
3 RESULTADOS	72
4 DISCUSSÃO	76
REFERÊNCIAS	80
CAPÍTULO 4 Efeito de diferentes fotoperíodos no desenvolvimento embrionário de <i>Prochilodus lineatus</i>	84
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 Monitoramento e análise dos dados	89
3 RESULTADOS	91
3.1 Achados gerais do desenvolvimento embrionário.....	91
3.2 Períodos de Zigoto e Clivagem	91
3.3 Blástula	92
3.4 Gástrula	98
3.5 Segmentação, organogênese e eclosão	100

3.6	Taxas de fertilização	108
3.7	Taxas de eclosão	108
4	DISCUSSÃO	111
4.1	Período de zigoto	111
4.2	Blástula	112
4.3	Gástrula	115
4.4	Taxas de fertilização, Segmentação, Organogênese e a Eclosão	117
4.5	Eclosão	124
	REFERÊNCIAS	129
	CAPÍTULO 5 Ontogenia larval de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) sob diferentes fotoperíodos	133
1	INTRODUÇÃO	135
2	MATERIAL E MÉTODOS	138
2.1	Obtenção das amostras	138
2.2	Parâmetros físico-químicos da água dos aquários	138
2.3	Coleta de amostras para observação e análise	139
2.4	Eventos do desenvolvimento larval analisados	139
2.5	Medição do Crescimento: Características Morfométricas de Interesse	140
2.6	Relações alométricas das larvas	142
3	RESULTADOS	144
3.1	Desenvolvimento larval de curimba sob três fotoperíodos	144
3.2	Padrão de pigmentação	150
3.3	Crescimento	153
3.4	Relações entre as variáveis morfométricas	161
4	DISCUSSÃO	164
4.1	Desenvolvimento e padrões de pigmentação larval da curimba	164
4.2	Crescimento larval em <i>P. lineatus</i>	171
4.3	Relações alométricas do crescimento de <i>P. lineatus</i>	174
	REFERÊNCIAS	177

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

As espécies nativas de peixes de piracema apresentam uma alta mortalidade nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário e larval (MACIEL, 2006), o que torna importante estudar a ontogenia inicial das espécies ícticas de interesse comercial e científico. Uma destas espécies nativas de muita importância econômica e ecológica do Brasil é a curimba (*Prochilodus lineatus*). Trata-se de uma espécie migradora cujas populações estão ameaçadas em função do deterioro de seu habitat, a construção de barragens e o extrativismo sem controle (PESOA; SCHULZ, 2010). Além disso, por precisar do estímulo dos fatores do ambiente migratório, a sua reprodução em cativeiro é problemática e deve ser induzida artificialmente.

Entre os fatores de maior importância nos processos de migração e reprodutivos encontra-se o fotoperíodo e a qualidade dos gametas. Neste último tópico, a motilidade espermática apresenta-se como um dos aspectos fundamentais a estudar visando melhorar a fertilização e a produção de embriões e larvas de qualidade.

Neste sentido, tem sido realizado alguns estudos das primeiras fases da ontogenia de curimba sob condições de fotoperíodo natural (BOTTA et al., 2010), da capacidade fertilizante do sêmen e a morfologia do espermatozóide (CRUZ, 2001; FELIZARDO et al., 2010; MILLIORINI et al., 2011; ORFÃO et al., 2010) e de alguns aspectos ecológicos (PESOA; SCHULZ, 2010). A fase larvária tem recebido menor atenção e são desconhecidos quais são os efeitos das mudanças do fotoperíodo sobre o seu desenvolvimento e crescimento.

Por outro lado, como indicado por Liem (1980), quando se realizam estudos morfológicos funcionais de determinadas estruturas corporais procura-se

demonstrar uma adaptação específica. No caso particular deste estudo se pretende conhecer qual é o efeito de diferentes soluções ativadoras esperáticas sobre as taxas de fertilização e eclosão em *P. lineatus*, assim como a resposta fenotípica dos embriões e das larvas da espécie frente a mudanças do fotoperíodo. Isto pode gerar dados úteis na piscicultura comercial, criação de pacotes tecnológicos de baixo custo, no repovoamento e para futuras pesquisas básicas e aplicadas. Isto também está sustentado no fato de que os estudos da morfologia funcional e a biologia do desenvolvimento podem aportar muito nesta finalidade (HERNÁNDEZ et al., 2002).

Nesta pesquisa se determinou o efeito de seis soluções ativadoras do sêmen de curimba e seus efeitos sobre a duração da motilidade esperática e as taxas de fertilização e eclosão. Também se determinaram os efeitos de diferentes regimes fóticos sobre a ontogenia de *P. lineatus* durante a fase de alimentação endógena e o início da alimentação exógena.

REFERÊNCIAS

BOTTA, P. et al. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 42, n. 2, p. 109-114, 2010.

CRUZ, V. L. **Criopreservação de sêmen de curimbatá *Prochilodus lineatus* = *scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 259-263, Dec. 2010.

HERNÁNDEZ, L. P. et al. Functional morphology and developmental biology of zebrafish: reciprocal illumination from an unlikely couple. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 222-231, Apr. 2002.

LIEM, K. F. Adaptive significance of intra and interspecific differences in the feeding repertoires of Cichlid Fishes. **American Zoologist**, Seattle, v. 20, p. 295-314, 1980.

MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia das larvas de piracanjuba *Brycon orbygnianus*, Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. 2006. 244 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, Feb. 2011.

ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 679-687, Sept. 2010.

PESOA, N. A.; SCHULZ, U. H. Diel and seasonal movements of grumatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1169-1177, July/Aug. 2010.

CAPÍTULO 2 Ativação espermática e desenvolvimento ontogênico sob ambiente fótico variável da curimba: uma revisão

RESUMO

Entender a ecologia reprodutiva dos peixes migradores é de grande importância na piscicultura, especialmente quando se trata de espécies nativas. Dentre de estes aspectos ressaltam a produção de gametas e os padrões de crescimento e desenvolvimento destas espécies. Com o presente trabalho objetivou-se conhecer o estado do conhecimento no manejo do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), enfatizando na ativação e extensão da motilidade espermática desta espécie nativa como pré-requisito de uma boa fertilização. Também se faz uma revisão destes dados em outras espécies já exploradas comercialmente ou com potencialidades produtivas. Igualmente, é feita uma compilação dos trabalhos publicados sobre a ontogenia da curimba nas fases de embrião e larva, sob ambientes fóticos variáveis e na perspectiva da capacidade adaptativa do fenótipo nesses estágios iniciais de sua história de vida. Os dados compilados indicam que há um crescente interesse pelo estudo dos gametas em espécies nativas de piracema no Brasil e na América do Sul, particularmente nas metodologias de resfriamento, congelamento e avaliação da qualidade espermática. No caso da curimba essas iniciativas surgiram nos anos noventa principalmente, com um aumento progressivo na última década. Os reportes da duração da motilidade espermática nesta espécie têm sido similares aos assinalados para a maioria dos teleosteos, sendo de alguns segundos até três minutos aproximadamente. Uma prolongação da motilidade espermática em curimba ou qualquer outra espécie ajudaria no estudo da fisiologia espermática e pode contribuir na criação de pacotes tecnológicos de baixo custo na produção de embriões, larvas e alevinos de qualidade. Da mesma maneira, a utilização das mudanças nos regimes de luz:escuridão têm suscitado grande expectativa, pois tem sido provado que pode acelerar ou atrasar a reprodução e as taxas de crescimento e desenvolvimento embrionário e larval em muitas espécies de peixes. Mas há um vazio de informação sobre estes aspectos em muitas espécies brasileiras de piracema, entre ela *P. lineatus*. Deste modo, por meio da compilação pode se ressaltar a necessidade realizar pesquisas nas quais sejam manipulados alguns fatores ambientais como as soluções de ativação espermática e o fotoperíodo visando melhorar a produção de curimba nas fases iniciais do seu ciclo de vida. Pela natureza dessas pesquisas, os trabalhos deverão ser abordados desde a perspectiva da adaptação fenotípica ou plasticidade fenotípica do modelo biológico estudado.

Palavras-chave: *Prochilodus lineatus*. Espermatozoides. Motilidade. Fotoperíodo. Espécies nativas. Ontogenia.

CHAPTER 2 Activation sperm and ontogenic development under variable photic environment of curimba and other migratory species:
a review

ABSTRACT

Understanding the reproductive ecology of migratory fish is very importance in aquaculture, especially when it comes to native species. Among these aspects, it is important to emphasize the production of gametes and the patterns of growth and development of these species. The present study is aimed to review the state of knowledge in handling semen curimba (*Prochilodus lineatus*), emphasizing the activation and sperm motility extension of this native species as a prerequisite for a good fertilization. At the same a data review is done with other species which are already been exploited or with productive potential. Likewise, this study is a papers compilation on the ontogeny of curimba in embryo and larva stages under variables photic environments from the perspective of phenotype's adaptive capacity in these early stages of its life history. The compiled data indicate that there is a growing interest in the study of gametes at spawning of native species in Brazil and in South America, particularly in methods of cooling, freezing and sperm quality assessment. In the case of curimba this effort began mainly in the nineties, with a progressive increase in the last decade. Sperm motility in this species have been reported from a few seconds to three minutes approximately, these results are similar to those reported for most teleosts. A prolongation of sperm motility in curimba or any other species may help in the study of sperm physiology and it can contribute to the creation of low cost technological packages for the production of qualified embryos, larvae and fingerling. Likewise, the use of changes in light:darkness regimes have aroused great expectations, it has been proved that in many species of fish the reproductive cycle and the rates of growth and development can be accelerated or stopped. There are many studies in Brazilian about migratory species (or piracema), and *P. lineatus* is one those. Thus, this compilation emphasized the need in advance research in which environmental factors are handled such as activation solutions and photoperiod to improve curimba sperm production in its life cycle early stages. By their nature, these studies should be addressed from the perspective of phenotypic adaptation or phenotypic plasticity in *P. lineatus*.

Keywords: *Prochilodus lineatus*. Spermatozoa. Motility. Photoperiod. Native species. Ontogeny.

1 INTRODUÇÃO

As estratégias ou padrões reprodutivos em teleósteos são muito diversos (GODINHO, 2007), sendo menos evidente em outros vertebrados (COWARD et al., 2002). Assim, na maioria dos casos os ovos e os espermatozoides nos peixes são desenvolvidos separadamente por fêmeas e machos em diferentes modos e condições de reprodução.

Neste sentido, os peixes migradores, também chamados de piracema, precisam do estímulo da dinâmica fluvial e outros fatores ambientais para o desenvolvimento de seu sistema reprodutor e gametas. Daí que em ambientes com características distintas, sua reprodução não é possível (GODOY, 1975) ou apresente dificuldades. Estes peixes algumas vezes percorrem até centos de quilômetros para estimular seus órgãos reprodutivos (HALL, 1972).

Além do conhecimento dos aspectos ecológicos dos peixes migradores, também é importante o entendimento da forma como o ambiente determina alguns processos inerentes destes animais, tais como o crescimento e o desenvolvimento. Entende-se por crescimento o incremento em tamanho e peso de um organismo no tempo desde a fase embrionária até a vida adulta (JØRGENSEN, 1992; RUGH, 1962), entanto que o desenvolvimento faz referencia às mudanças na estrutura ou na forma do organismo em etapas sucessivas até o estágio juvenil (CAPITAL REGION SCIENCE EDUCATION PARTNERSHIP - CRSEP, 2012; DUELLMAN; TRUEB, 1986). Deste modo, o desenvolvimento chega até que o novo organismo atinge a configuração definitiva e típica do peixe adulto e o crescimento pode ser contínuo no tempo. Trata-se de dois processos diferentes, mas relacionados, pois um animal sempre terá um padrão para construir estruturas de crescimento, os quais podem ser moldados pelo ambiente.

Entre os aspectos ambientais que afetam a reprodução, o crescimento e o desenvolvimento dos peixes em geral, encontram-se as características do lugar da desova e o fotoperíodo (CAROLSFELD; HARVEY, 1998; MUSTAPHA et al., 2012). Mas estas duas condições podem ser manipuladas em condições de cativeiro mediante a modificação das soluções de ativação e do ambiente fótico. Com isso é possível melhorar a reprodução e a produção através da otimização da fertilização e aceleração do crescimento e desenvolvimento, ao serem métodos de baixo custo (MURGAS et al., 2012; MUSTAPHA et al., 2012). Mas muitos dos experimentos com algumas espécies de peixes nesta área têm sido feitos sob condições ambientais estáveis tanto do ambiente de ativação dos gametas quanto das condições de luz que devem suportar os embriões e as larvas (FAUSTINO; NAKAGHI; NEUMANN, 2010; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006; VALBUENA et al., 2012). Isto é desconhecido sob condições variáveis em muitas outras espécies, particularmente do neotrópico, sendo este o caso de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836).

A espécie *P. lineatus* também conhecido como grumatã, curimbatã, curimbá ou curimba, é um dos peixes migradores do Brasil. Esta espécie se distribui na bacia dos rios Paraná – Paraguay, Paraíba e São Francisco, é de grande importância econômica e ecológica entre as espécies nativas de mediano e grande porte (BERTOLETTI, 1985; BOTTA et al., 2010; COSTA FILHO; GAYA, 2012; REVALDAVES; RENESTO; MACHADO, 1997), sendo uma das mais produzidas (CASTAGNOLLI, 1992). Sua reprodução ocorre apenas uma vez por ano, entre outubro e março (BERTOLETTI, 1985), e pode percorrer entre 400 e 600 quilômetros na sua rota migratória (BARRADAS; SILVA; FOUNTOURA, 2009; GODOY, 1975) em padrões migratórios altamente complexos (GODINHO; POMPEU, 2003).

Os estoques naturais da curimba têm diminuído devido às atividades comerciais, à sobre – exploração e à degradação do ecossistema onde habita e se

desenvolve (CAROLSFELD; HARVEY, 1998; MACHADO; FORESTI, 2012). Daí que a sua reprodução *in vitro* seja de muita importância do ponto de vista ecológico e nos programas de piscicultura a escala comercial.

Em termos gerais, a reprodução de curimba apresenta as características típicas dos peixes com potencial na piscicultura (DOMÁNICO et al., 2008; GODINHO, 2007; LOPES et al., 2008). Dentre destes aspectos destacam-se que é uma espécie de ovos livres e pequenos, de fertilização externa, sem cuidado parental, tem suporte nutricional do vitelo na fase de embrião, ao sair do corion a larva ainda não está totalmente desenvolvida, e o período larval é completado quando atinge a post-larva. Além disso, tem um desenvolvimento ontogênico inicial curto (BOTTA et al., 2010). Mas são desconhecidos outros tópicos de sua biologia e história de vida e em vários destes se têm um conhecimento incipiente, o qual requer de estudos pontuais para aprofundar ou para gerar novos dados.

Neste trabalho são discutidos os aspectos mais relevantes do conhecimento atual do espermatozoide de curimba e sua ativação, assim como o desenvolvimento embrionário e larval da espécie, tratada sob a perspectiva da adaptação fenotípica em ambientes variáveis. Estes ambientes fazem referência às características das soluções de ativação espermática e sua incidência na duração da motilidade e ao fotoperíodo como modulador das primeiras fases da ontogenia.

1.1 Aspectos Relevantes da Motilidade Espermática

Morfologicamente os espermatozoides de peixes apresentam cabeça, peça intermediária e cauda. Geralmente não há presença de acrossoma, o que está relacionado com uma estrutura para a fertilização, a micrópila, na membrana coriônica no ovócito (COSSON et al., 1999). Além disso, os

espermatozoides dos peixes são imóveis no plasma seminal e em condições isosmóticas de manejo (ALAVI; COSSON, 2006; BASTAMI; IMANPOUR; HOSEINIFAR, 2010). Isto faz que a sua abordagem seja diferente se comparado com a manipulação do sêmen de outros vertebrados.

Para aperfeiçoar a fertilização é preciso determinar a qualidade do sêmen e sua manipulação, mediante uma adequada seleção dos reprodutores, dos ativadores espermáticos e das condições ambientais de desenvolvimento, entres outros aspectos (BILLARD et al., 2004). A forma mais comum para quantificar a qualidade do sêmen é por meio da motilidade espermática, por ser um requerimento chave no sucesso da fertilização (BOZKURT; SEÇER, 2006; RURANGWA et al., 2004).

Em peixes a forma, o comprimento e a largura do núcleo espermático apresentam variação entre as espécies e são frequentemente associadas ao tipo de fecundação (OLIVEIRA, 2007). Esta autora encontrou que os espermatozoides de espécies de fertilização externa mostram ter estruturas conservativas enquanto que os espermatozoides de espécies inseminadoras apresentam mudanças estruturais, principalmente no núcleo espermático. O núcleo arredondado, presente na maioria de espécies de fecundação externa, é chamado de aquasperma (JAMIESON, 1991).

As espécies de fertilização externa, como *P. lineatus*, geralmente apresentam uma peça intermediária pequena, enquanto que nas espécies inseminadoras esta estrutura é normalmente mais alongada (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991). Isto último favorece a presença de um número maior de mitocôndrias na peça intermediária, gerando maior quantidade de energia da célula e favorecendo a viabilidade e a motilidade das células espermáticas (FAWCETT, 1970; PECIO; RAFIŃSKI, 1994).

Existem algumas pesquisas em truta arco-íris, onde a determinação subjetiva da motilidade espermática está em relação com a proporção dos

espermatozoides vivos e mortos (BOITANO; OMOTO, 1992; COSSON et al., 1997; KAVAMOTO et al., 1985). Daí que seja muito importante a determinação da motilidade espermática, já que está relacionada com a fertilidade em muitas espécies de peixes (AYDIN et al., 2012; FAUVEL et al., 1999).

Também é importante ter em conta que a motilidade espermática dos peixes está sob a influência de fatores ambientais como a temperatura, pH, osmolaridade e outras substâncias usadas na reprodução induzida (ALAVI; COSSON, 2006; FELIZARDO et al., 2010a; STREIT JÚNIOR et al., 2004; VALDEBENITO et al., 2009). Deste modo, para garantir o sucesso nos programas de reprodução *in vitro* das espécies ícticas é de muita relevância o controle das condições do meio externo da ativação espermática e das características do sêmen e dos espermatozoides.

Tradicionalmente tem se usado diferentes meios e substâncias ativadoras dos espermatozoides de peixes como soluções salinas, água destilada, e outras preparações tanto iônicas quanto não iônicas (COSSON, 2010; MILIORINI et al., 2011; RAVINDER et al., 1997). Os resultados destas pesquisas têm levado à ativação do espermatozoide durante alguns segundos ou minutos e, em casos isolados, de até dez a quinze minutos (BASTAMI; IMANPOUR; HOSEINIFAR, 2010; JING et al., 2009). Recentemente alguns autores também prolongaram o tempo de ativação espermática do esturjão russo até por 28 minutos em diferentes temperaturas, mas sendo viável para fertilização só até os oito minutos (AYDIN et al., 2012). Daí que deve se não somente prolongar a motilidade, mas também deve se conservar a sua capacidade fecundante. Isto último é fundamental, pois a motilidade dos espermatozoides é de grande interesse na criação e produção comercial de peixes pelas implicações no processo de fertilização (AYDIN et al., 2012; RURANGWA et al., 2004).

Além, a extensão da motilidade espermática pode ajudar no estudo da fisiologia do espermatozoide dos peixes, pois permitiria um maior tempo de

observação dos mecanismos bioquímicos e ultra-estruturais implicados na ativação. Neste sentido, Cosson (2004) também assinala que o estudo do ambiente de ativação do espermatozóide dos peixes pode aportar muito ao entendimento do processo.

Por outra parte, alguns autores indicam que a concentração espermática (CE) é um dos melhores parâmetros para avaliar a qualidade do sêmen de peixes (BILLARD et al., 1995). Mas em determinados casos a CE não está diretamente relacionada com a taxa de fertilização (MARIA, 2005), pois pode mudar intraespecificamente, segundo a idade do indivíduo e a metodologia de obtenção do sêmen. O anterior evidência a necessidade de aprofundar nestes e outros aspectos da reprodução artificial de peixes, especialmente em espécies nativas como a curimba.

Também a CE pode mudar com o método de coleta (GODINHO, 2007; STREIT JÚNIOR et al., 2004), pois com o tratamento hormonal este parâmetro pode diminuir devido à hidratação dos testículos (BILLARD; COSSON; CHRISTEN, 1987; GODINHO, 2007) com o conseqüente aumento do volume. Isto último tem sido observado no sêmen de *P. lineatus* obtido de machos induzidos com diferentes hormônios ou estratos de hormônios.

Assim, machos reprodutores tratados com estrato de hipófise de carpa (EHC), de frango (EHF) e de coelho (EHC_o) apresentaram diferenças no volume e na CE da curimba (STREIT JÚNIOR et al., 2004), sendo maior com EHC_o e EHF que com EHC. Estes autores acharam uma CE em *P. lineatus* de $1,4 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^7$ espermatozoides.ml⁻¹, sendo igual à reportada na indução do pacu, *Piaractus mesopotamicus* com EHC (SILVEIRA et al., 1990) e diferente se comparada com *Anguilla anguilla* (PÉREZ et al., 2000) que foi de 1,0 a $14,0 \times 10^9$ espermatozoides.ml⁻¹ usando gonadotropina coriônica humana (HCG). Nesta última espécie em alguns casos foi obtida uma CE similar à calculada para *P.*

lineatus no presente estudo (capítulo 3) que foi de $13,26 \pm 1,17$ espermatozoides $\times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$.

A menor CE encontrada por Streit Júnior et al. (2004) em *P. lineatus* usando EHC foi atribuída a uma provável menor quantidade de hormônios gonadotrópicos nesse estrato ou possivelmente a um número menor de receptores nas gônadas para os hormônios presentes neste indutor em particular.

1.2 Soluções de ativação de espermatozoides e integridade espermática

Uns dos fatores implicados na motilidade espermática em peixes são os diluentes usados no processo de ativação (GALO, 2009), assim como a quantidade da energia necessária para a motilidade (BILLARD, 1990; COSSON et al., 1999). A análise estandardizada do sêmen, que consiste da contagem de espermatozoides, a avaliação da porcentagem de motilidade espermática e as abnormalidades morfológicas, são consideradas a principal prova de laboratório para testar a fertilidade do macho (TARTAGNI et al., 2004).

Assim, Jeyendran et al. (1984) e Jeyendran, Vem e Zaneveld (1992) reportaram que as mudanças que sofre o espermatozoide em um ambiente com baixa osmolaridade pode ser utilizado para prever a qualidade espermática. Numa solução hiposmótica os fluídos são transportados ao interior da célula a por meio da membrana plasmática do espermatozoide. Como a membrana incha, as fibras da cauda ficam dobradas e enroladas. Estas mudanças são facilmente reconhecidas sob microscopia de contraste de fase como enrolamento de cauda. O espermatozoide é referido como "inchado" ou HOS positivo (+ HOS) e é interpretada como tendo uma membrana plasmática funcionalmente intacta, pois espermatozoides com danos na membrana não incham, isto é, não têm motilidade.

Deste modo, os espermatozoides que não apresentam estas mudanças geram pior qualidade da amostra (NIE; WENZEL, 2001). Segundo isto, a integridade funcional da membrana plasmática é essencial para o metabolismo e função normal dos espermatozoides. Mas uma célula espermática sem movimentação não indica que está morta, essencialmente o teste HOS é uma prova especializada para determinar a vitalidade espermática que pode ser usada para avaliar a qualidade espermática em peixes, quando em uma amostra há células sem motilidade e é preciso conhecer se elas estão vivas o mortas (CENTRUM VOOR REPRODUCTIEVE GENEESKUNDE - CRG, 2011); no caso que estiveram todas sem movimentação, pode se usar microscopia eletrônica para observar em nível ultra-estrutural.

Portanto, pode se afirmar que entre mais sejam os espermatozoides identificados com estas características de inchaço, melhor é a qualidade da amostra de sêmen. Este método poderia captar a maioria dos espermatozoides na amostra com essas características.

Além dos métodos mencionados anteriormente, pode se identificar a porcentagem de espermatozoides ativados de maneira subjetiva, pois tem se provado que em *P. lineatus* esta metodologia é confiável, ainda comparada com a análise espermática assistida por computador (CASA) (VIVEIROS et al., 2010).

Entretanto, alguns dados indicam que a membrana espermática intacta não garante que os espermatozoides tenham todo o seu potencial de fertilização, pois em muitos casos os fatores relativos à fêmea também podem interferir (MÁTYÁS et al., 2000). Além disso, recentes estudos demonstraram que o macho contribui com a perda de fertilização devido aos fatores genéticos, abnormalidades dos espermatozoides e outros aspectos como a idade (MILIORINI et al., 2011; PUSCHECK; JEYENDRAN, 2007), envelhecimento

do espermatozoide, sazonalidade e os métodos subjetivos de coleta e avaliação (RANA, 1995).

Alguns destes tópicos, e outros relacionados com a reprodução, têm sido abordados por vários autores tanto em curimba quanto em outras espécies brasileiras relacionadas e com grande potencial na piscicultura (tabela 1).

Tabela 1 Alguns estudos relacionados com a qualidade e/ou ativação da motilidade espermática em *P. lineatus* e em outras espécies de interesse em piscicultura no Brasil

Espécie (s)	Nome comum	Estudo	Referência
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Criopreservação e motilidade espermática	Felizardo et al. (2010b)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Ativação espermática e criopreservação do sêmen	Felizardo et al. (2011)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Criopreservação e danos morfológicos do espermatozoide	Miliorini et al. (2011)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Criopreservação do sêmen, diluidores, ativadores e crioprotetores.	Murgas et al. (2007)
<i>P. lineatus</i> , <i>P. argenteus</i> , <i>P. costatus</i> , <i>B. cephalus</i> , e outros.	Curimbatá, Curimatã-pacu, Curimatã-pioa, Matrinxã,	Eficiência reprodutiva de espécies nativas de peixes de água doce.	Murgas et al. (2009)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Vitamina E e glutathion reduzido na criopreservação do sêmen	Paula et al. (2012)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Fertilidade do sêmen	Orfão et al. (2010)
<i>P. lineatus</i> = <i>scrofa</i>	Curimbatá, Curimba	Criopreservação de sêmen	Cruz (2001)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Anormalidades morfológicas dos espermatozoides	Kavamoto et al. (1999)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Qualidade do sêmen e taxa de fertilidade após resfriamento	Franciscatto et al. (2002)
<i>P. marggravii</i>	Curimbatá	Influência da presença da fêmea sobre a produção seminal	Shimoda et al. (1997)
<i>P. Lineatus</i>	Curimba	Criopreservação do sêmen técnicas para o descongelamento	Paulino (2009)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Motilidade e fertilidade do sêmen criopreservado	Viveiros et al. (2010).
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Método simples de congelamento de sêmen	Viveiros et al. (2008)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Efeito do hCG na produção de sêmen	Kavamoto et al. (1996)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Características seminais	Kavamoto, Fogli da Silveira e Godinho (1986)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Ação hormonal sobre as características seminais	Kavamoto (1993)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Efeito do hCG na produção de sêmen	Kavamoto et al. (1996)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Produção espermática	Kavamoto et al. (1997)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Fertilização com sêmen criopreservado	Kavamoto et al. (1989)

“Tabela 1, continuação”

Espécie (s)	Nome comum	Estudo	Referência
<i>P. lineatus</i>	Curimbá	Comparação do sêmen após indução com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa	Streit Júnior et al. (2004)
<i>P. magdalenae</i>	Bocachico	Influência Criopreservação do sêmen e seu efeito na fertilização e eclosão.	Martínez et al. (2012)
<i>P. marggravii</i>	Curimbatá-pacu	Capacidade de fertilização do sêmen congelado sob forma de ‘pellets’.	Coser et al. (1992)
<i>B. orbignyanus</i> , <i>P. lineatus</i> , <i>P. mesopotamicus</i> , <i>S. maxillosus</i> , <i>L. Elongatus</i>	Piracanjuba, Curimba, Pacu, Dourado, Piapara	Criopreservação do sêmen	Carolsfield et al. (2003)
<i>S. brasiliensis</i> , <i>P. lineatus</i> <i>R. quelen</i> , <i>Rhinelepis áspera</i> , <i>Oreochromis niloticus</i>	Dourado, Curimba Jundiá, Cascudo-preto, Tilápia	Estimativa da concentração espermática	Sanches et al. (2011)
<i>Leporinus macrocephalus</i> , <i>P. lineatus</i> , <i>C. carpio</i>	Piaçu, Curimbatá, Carpa comum	Efeito de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades espermáticas	Moraes et al. (2004)
<i>B. insignis</i>	Piabanha	Relação espermatozoides/ovócitos	Shimoda et al. (2007)
<i>Brycon cefálios</i>	Matrinxã	Caracterização espermática e criopreservação	Silveira (2000)
<i>B. orbignyanus</i> , <i>Rhamdia quelen</i> e <i>B. hilarii</i>		Ultraestrutura e avaliação do sêmen	Prieto (2004)
<i>L. macrocephalus</i>	Piaçu	Reprodução induzida	Reynalte-Tataje, Esquivel e Esquivel (2002)
<i>R. quelen</i>	Jundiá cinza	Dose inseminante na fertilização artificial de ovócitos	Bombardelli et al. (2006)
<i>B. orbignyanus</i>		Ultraestrutura e fertilização	Ganeco et al. (2008)
<i>P. mesopotamicus</i>	Pacu	Avaliação dos parâmetros seminais, taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas.	Galo (2009)
<i>B. orbignyanus</i>	Piracanjuba	Dose inseminante do ovócito	Felizardo et al. (2010a)
<i>L. obtusidens</i>	Piapara	Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen	Murgas et al. (1999)
<i>B. orbignyanus</i>	Piracanjuba	Qualidade seminal pós descongelamento	Murgas et al. (2001)
<i>L. obtusidens</i>	Piapara	Viabilidade seminal, diluentes, e resfriamento do sêmen	Murgas et al. (2002)

“Tabela 1, conclusão”

Espécie (s)	Nome comum	Estudo	Referência
<i>B. orbignyana</i>	Piracanjuba	Avaliação Espermática pós-descongelamento	Murgas, Franciscatto e Santo (2003)
<i>P. mesopotamicus</i>	Pacu	Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen	Maria et al. (2004)
<i>B. orbignyana</i>	Piracanjuba	Influência efeito do resfriamento e congelamento sobre a motilidade espermática	Maria et al. (2006)
<i>B. orbignyana</i>	Piracanjuba	Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen	Maria (2005)
<i>B. insignis</i>	Piabanha	Características seminais após estimulação hormonal	Andrade-Talmelli et al. (2001)

1.3 Desenvolvimento e crescimento embrionário e larval de curimba

Estudar a morfologia dos organismos através do tempo permite que as espécies sejam classificadas segundo seus rasgos ontogênicos e reprodutivos (SATO, 1999). No caso dos peixes, o desenvolvimento é um processo complexo que permite estudar a ontogenia das espécies e pode se utilizar em processos biotecnológicos, como bioindicador e em experimentos toxicológicos (BOTERO et al., 2004). No entanto, os dados sobre os ovos e as larvas de peixes de água doce no Brasil são deficientes, se comparado com o conhecimento na fase adulta, mas já existe um crescente interesse por seu estudo nos últimos anos (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; BOTTA et al., 2010; NEUMANN et al., 2004; VALBUENA et al., 2012).

A utilidade de estudar o desenvolvimento embrionário em peixes permite a identificação temporal da morfologia no processo de formação de um novo organismo, o qual ajuda no manejo da incubação e da produção de larvas (VALBUENA et al., 2012). A fase de embrião em peixes é considerada como o período entre a fertilização e a eclosão, sendo seguida pela de larva, post – larva e alevino (GODINHO, 2007).

Mas, algumas definições dos estágios do desenvolvimento em peixes muitas vezes geram confusão. Por isso, alguns autores têm proposto o uso de uma nomenclatura definida e mais ou menos estandardizada. Por exemplo, Zaniboni-Filho et al. (2002) sugerem que seja tomada a fase de ovo como o período compreendido entre a fertilização e a eclosão; a de larva entre a eclosão, o consumo do vitelo e o início da alimentação externa. O mesmo autor indica que a fase de pós – larva começa com o início da alimentação externa, ainda com algumas reservas de vitelo, e finaliza ao aparecer às nadadeiras peitorais, ventral e anal. Finalmente, na fase de alevino há uma metamorfose completa e o peixe é morfológicamente semelhante aos exemplares adultos.

Outra forma mais detalhada de estudar o desenvolvimento embrionário em peixes foi a indicada por Kimmel et al. (1995), quem nomeiam os diferentes períodos do embrião até chegar ao início do estado de larva, assim: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, faríngula, eclosão e o início da fase de larva.

O zigoto apresenta diferenciação do pólo animal e vegetal, sendo que o ovo dos peixes é do tipo telolécito. A clivagem compreende seis divisões sucessivas do blastodisco até atingir os 64 blastômeros passando pelos estágios de duas, quatro, oito, 16, 32 e 64 células. O tipo de divisão é meroblástico e só acontece no blastodisco sem comprometer o vitelo. Na última clivagem, que é o primeiro horizontal, se produz a membrana envolvente do blastodisco (EVL).

O período de blástula começa a partir de 128 células até o início da gastrulação, é dizer, do oitavo ciclo de divisão até o ciclo 14. Ocorrem fatos importantes como a entrada do embrião em transição da blástula meia (TBM), a formação da capa sincicial da gema (YSL) e o começo da epibolia. A TBM é de grande relevância no desenvolvimento embrionário porque é o indício da transcrição do RNA (BOTTA et al., 2010; KIMMEL et al., 1995). A YSL é uma estrutura particular dos peixes ósseos, conformada por duas partes: a I-YSL, que está embaixo do blastodisco e pode ter função nutritiva; e a E-YSL que é transitória durante os movimentos da epibolia. Durante este período, o blastodisco que no início tem forma de montículo alto, torna-se mais plano. A porcentagem de epibolia é definida como a porcentagem da gema que a blastoderma cobre.

Na gastrulação ocorrem os movimentos de involução, convergência e extensão que darão origem às camadas germinativas primárias e ao eixo embrionário. A involução assinala o início da gastrulação quando o embrião atinge o 50% de epibolia e aparece o anel germinativo no bordo do blastoderma. Na convergência se dá uma acumulação de células ao longo do anel

germinativo. Já o movimento morfo-genético de extensão faz referência ao alongamento do eixo embrionário primário.

Na segmentação acentuam-se os movimentos morfogenéticos, os primeiros somitos e o rudimento dos órgãos aparecem, assim como o alongamento e os primeiros movimentos musculares do embrião.

A farínghula é atingida quando morfologicamente pode ser comparado o embrião dos peixes com o embrião de outros vertebrados. Após deste período acontece a eclosão e o início da fase de larva

No presente trabalho serão conjugadas parcialmente as duas terminologias dos autores anteriores.

Em peixes de reprodução sazonal muitos fatores dos ambientes externo e interno atuam no início de uma série complexa de alterações neuroendócrinas que exercem o controle geral dos processos de maturação gonadal e desova, desenvolvimento e crescimento (MUSTAPHA et al., 2012; WHITEHEAD et al., 1978). Muitos destes fatores estão relacionados à qualidade dos ovos, como à ração utilizada na dieta e sua formulação, métodos de desova, acasalamento, manipulações, indução da desova, ambiente, seleção e condições de cultura. Assim mesmo, a qualidade dos ovos compreende as características que determinam sua capacidade de sobreviver (BROMAGE; PORTER; RANDALL, 2001).

Têm-se assinalado alguns eventos chaves no desenvolvimento das larvas de peixes para a produção de larvas (GODINHO, 2007; SANTOS; GODINHO, 1994, 2012). Estes autores destacam o tamanho ao eclodir, tempo da reabsorção do vitelo, pigmentação da retina e do corpo, abertura da boca e do sistema digestivo (lúmen intestinal), flexão da notocorda, desenvolvimento das nadadeiras, enchimento da bexiga gasosa, entre outras. Por isso, a abordagem de alguns destes aspectos é crucial no estudo da ontogenia de espécies como a curimba e outros peixes, sejam estes migradores ou não. Além disso, o

fechamento do blastóporo é considerado um dos eventos mais importantes da embriogênese em aquíicultura, pois indica o momento adequado para se estimar taxas de fertilização.

Devido a sua capacidade adaptativa a diferentes ambientes de água doce, precocidade, elevada prolificidade, possibilidade de fertilização artificial, baixo custo de sua alimentação e aceitação ao consumo, as espécies do gênero *Prochilodus* são de muita importância comercial em várias as regiões do Brasil (MACHADO; FORESTI, 2012; REVALDAVES; RENESTO; MACHADO, 1997; ZANOBONI-FILHO et al., 2008).

Por sua parte, as áreas de reprodução e larvicultura foram destacadas como prioritárias para pesquisa e desenvolvimento no Brasil (GODINHO, 2007), devido ao fato de que as espécies de peixes tropicais brasileiras têm sido pouco estudadas, particularmente no referente às técnicas de estudos de gametas (MARIA, 2005). Deste modo, o conhecimento da fisiologia reprodutiva de peixes de água doce ainda é limitado (GUERRERO et al., 2009), o qual é aplicável às circunstâncias de muitos países neotropicais.

Assim, no ano 2005 a aquíicultura do Brasil representou acima de 25% da produção total de pescado, tendo como principais produtores as regiões Sul, Nordeste e Sudeste do país (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2007), sendo uma das espécies do gênero *Prochilodus* (curimatã) uma das três espécies com maiores índices de produção extrativistas no país.

Na tabela 2 se sumarizam alguns estudos feitos no desenvolvimento embrionário e larval de curimba e outras espécies de importância ou com potencial na piscicultura brasileira.

1.4 Fotoperíodo, plasticidade fenotípica e alometria nas etapas iniciais da ontogenia dos peixes

Um dos fatores que mais efeito tem sobre muitas funções fisiológicas nos animais é o fotoperíodo (ASCHOFF, 1981). Isto é relevante na reprodução, no crescimento e no desenvolvimento dos teleósteos por ser o sinal mais importante da sazonalidade (MARTÍNEZ-PALACIOS et al., 2007; MUSTAPHA et al., 2012), especialmente em espécies nativas.

As exigências dos períodos de luz:escuridão (L:E) são espécie – específicas e dependem da etapa de desenvolvimento do peixe (ADEWOLU; ADENIJI; ADEJOBI, 2008). Deste modo, alguns autores encontraram em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em *Pagrus major* um crescimento maior nas primeiras fases de sua ontogenia (BEZERRA et al., 2008; RAD et al., 2006) quando submetidas a fotoperíodos longos, especialmente 24:00.

Os resultados encontrados por outros autores são contraditórios, pois em alguns casos tem sido reportado um aumento do crescimento e desenvolvimento com luz ou escuridão constante (BRITZ; PIENAAR, 1992; MUSTAPHA et al., 2012; VERAS, 2011), e em outros casos permanecem iguais (ALMAZAN-RUEDA et al., 2005). Por isso é importante a realização de pesquisas pontuais para cada espécie, pois estas apresentam características particulares que deveram ser abordadas e interpretadas de maneiras diferentes.

A variação do fenótipo pelo efeito direto do ambiente é encontrada em muitas espécies (LOMAN, 2003). Assim, esta plasticidade fenotípica é considerada um fenômeno geral onde os indivíduos modificam seus fenótipos em resposta a sinais ambientais, geralmente para se adaptar aos ambientes variáveis (SADEH et al., 2011).

Segundo a União Internacional de Ciências Fisiológicas (INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES - IUPS,

2003), a plasticidade fenotípica faz referência às mudanças adaptativas que ocorrem em um organismo como resposta a mudanças induzidas experimentalmente, particularmente fatores climáticos, tais como a temperatura ambiental e a intensidade lumínica em um meio controlado. Assim, trata-se de mudanças que reduzem a tensão fisiológica produzida por componentes estressantes do ambiente total e que ocorrem dentro do período de vida de um organismo.

Dentre dos fatores que podem afetar a resposta adaptativa de um organismo ao ambiente encontra-se as mudanças do fotoperíodo. O termo faz referência às mudanças ou flutuações anuais na duração do dia solar, as quais têm grande incidência na reprodução dos peixes de zonas temperadas e tropicais (MAITRA; SETH; CHATTORAJ, 2006). O fotoperíodo pode afetar a incubação, o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência das larvas de peixes (BAUMGARTNER et al., 2008), sendo sugerido que na natureza cada espécie seleciona os fatores abióticos adequados para a sua reprodução.

Como se observa, o fenômeno da plasticidade fenotípica é aplicável inteiramente ao efeito que possa ter a variação do fotoperíodo sobre o crescimento e desenvolvimento de embriões e larvas de *P. lineatus*.

Além disso, deve-se estudar a pigmentação (melanóforos, iridóforos) e os seus padrões de aparecimento nos primeiros estágios ontogênicos, pois em peixes é indicativo do tipo de ambiente no que habita a espécie (BOLKER; HILL, 2000). Algumas espécies eclodem sem pigmentação (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; MACIEL, 2006), umas tem em menor grau (NAKATANI et al., 2001) e outras a apresentam bem definida, inclusive desde antes de eclodir (KIMMEL et al., 1995; MONTOYA; ARIAS; OLIVERA-ANGEL, 2010; ROMAGOSA; NARAHARA; FENERICH-VERANI, 2001).

Em *P. lineatus* existe um vazio de dados sobre os padrões de pigmentação, mas em espécies próximas tem se reportado alguns estudos (CORREIA et al., 2010; GODINHO; POMPEU, 2003; MACIEL JÚNIOR, 1996; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004). Isto permite indicar que as pesquisas que abordem este tópico aportarão dados úteis para a compreensão da ecologia e o manejo da curimba em confinamento.

Por outra parte, no estudo da morfologia dos animais é preciso saber o comportamento do crescimento relativo das estruturas corporais, o qual é conhecido como alometria. Assim, esta pode ser positiva, quando a taxa de crescimento da estrutura de interesse é maior que a parte corporal tomada como referência; é negativa, quando essa taxa de crescimento é menor; chama-se de isometria se as taxas das partes que se comparam são iguais. No caso das larvas de peixes é importante o estudo alométrico dos componentes anteriores do corpo (cabeça), pois é nessa região onde se encontram os principais órgãos relacionados com a coordenação dos movimentos e a percepção do ambiente (CORREIA et al., 2010; MACIEL, 2006). Em curimba estes aspectos são desconhecidos ou têm sido tratados tangencialmente em outros estudos.

Finalmente, tendo em vista os aspectos expostos anteriormente, é necessária a realização de pesquisas que visem determinar o efeito de soluções ativadoras com diferentes características sobre a fertilização e o desenvolvimento ontogênico inicial de *P. lineatus*. Igualmente, é importante estudar os padrões do desenvolvimento e crescimento da espécie sob diferentes condições ambientais, particularmente do fotoperíodo. Os resultados que possam ser atingidos nessas futuras pesquisas podem ser de muita ajuda na otimização de pacotes tecnológicos que visem melhorar os processos de fertilização e o manejo de embriões e larvas de curimba em cativeiro.

Tabela 2 Alguns estudos relacionados com o desenvolvimento embrionário e larval em *P. lineatus* e outras espécies de interesse em piscicultura no Brasil

Espécie (s)	Nome comum	Estudo	Referência
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Ultraestrutura do embrião	Ninhaus-Silveira, Foresti e Azevedo (2006)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Desenvolvimento embrionário	Botta et al. (2010)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Movimentos de migração (piracema)	Pesoa e Schulz (2010)
<i>P. lineatus</i>	Curimbatá	Caracterização genética com fins de repovoamento.	Lopes et al. (2008)
<i>P. lineatus</i>	Sábalo	Avaliação do Recurso en el Paraná.	Dománico et al. (2008)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Anéis diários em escamas no início do desenvolvimento	Domingues e Hayashi (1998)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Características morfométricas de estoques migratórios e residentes	Machado e Foresti (2012)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Variabilidade genética no alto Paraná	Revaldaves, Renesto e Machado (1997)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Supervivência de alevinos em pH variáveis	Zaniboni-Filho et al. (2002)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Supervivência de larvas em pH variáveis	Zaniboni-Filho et al. (2008)
<i>P. lineatus</i>	Curimba	Gonadotropina coriônica equina e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução	Pereira (2006)
<i>P. lineatus, Piaractus mesopotamicus, B. orbignyanus</i>	Curimba, Pacu, Piracajuba	Características reprodutivas.	Silva (2007)
<i>P. scrofa</i>	Curimbatá	Desova induzida	Castagnolli e Cyrino (1980)
<i>P. magdalenae</i>	Bocachico	Desenvolvimento larval	Arias-Gallo, Jiménez-Segura e Dorado (2010)
<i>P. marggravii</i>	Curimatá-Pacu	Desenvolvimento de larvas em diferentes temperaturas	Maciel Júnior (1996)

“Tabela 2, continuação”

Espécie (s)	Nome comum	Estudo	Referência
<i>P. marggravii</i>	Curimatá-Pacu	Armazenamento e fertilização de ovócitos	Rizzo, Godinho e Sato (2003)
<i>Piaractus brachypomus Colossoma macropomum</i>	“Cachama Blanca”, “Cachama Negra”	Desenvolvimento embrionário de híbridos	Botero et al. (2004)
<i>Hoplias aff. malabaricus, P. lineatus, B. orbignyanus, L. obtusidens, S. brasiliensis, R. quelen, e outros.</i> <i>P. lineatus</i>	Traira, curimba, piracanjuba, dorado, Grumatã	Larvas de peixes do alto rio Paraná, fatores abióticos e densidade larval Distribuição presumida na Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai.	Baumgartner et al. (2008)
<i>Piaractus mesopotamicus), Brycon orbignyanus, Hoplias lacerdae Pseudoplatystoma spp.</i>	Pacu, Piracanjuba, Trairão	Ontogenia da pigmentação das larvas em incubatório Ultraestrutura dos embriões de híbridos	Barradas, Silva e Fountoura (2009) Correia et al. (2010) Faustino, Nakaghi e Neumann (2010)
<i>Clarias gariepinus</i>	Catfish africano	Efeito do fotoperíodo no crescimento, comportamento e estresse.	Almazan-Rueda et al. (2005)
<i>Clarias gariepinus</i>	Catfish africano	Efeito de três fotoperíodos no crescimento e coloração	Mustapha et al. (2012)
<i>Brycon cephalus</i>	Matrinxã	Análise do desenvolvimento embrionário	Alexandre et al. (2009)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Piracanjuba	Crescimento e Supervivência de pós – larvas	Silva et al. (2009)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Piracanjuba	Desenvolvimento e comportamento larval	Maciel et al. (2009)
<i>Brycon Gouldingi</i>		Desenvolvimento embrionário e potencial uso em aquicultura	Faustino, Nakaghi e Neumann (2010)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Piracanjuba	Ontogenia das larvas.	Maciel (2006)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Piracanjuba	Desenvolvimento embrionário e larval	Reynalte-Tataje, Zaniboni-Filho e Esquivel (2004)
<i>Brycon insignis</i>	Piabanha	Desenvolvimento embrionário e larval	Andrade-Talmelli et al. (2001)

“Tabela 2, conclusão”

Espécie (s)	Nome comum	Estudo	Referência
<i>Brycon siebenthalae</i>	Yamú	Influência da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem	Atencio-García et al. (2003)
<i>Brycon cephalus</i>	Matrinxã	Estágios do desenvolvimento embrionário	Romagosa, Narahara e Fenerich-Verani (2001)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Piracanjuba	Caracterização genética em sistema seminatural.	Lopera-Barrero et al. (2010)
<i>Brycon moorei</i>		Desenvolvimento inicial do esqueleto cefálico	Vandewalle et al. (2005)
<i>Hoplias lacerdae</i>	Trairão	Desenvolvimento larval e captura do alimento exógeno.	Maciel et al. (2009)
<i>Roeboides paranensis</i>		Morfometria das larvas e juvenis no rio Paraná	Neumann et al. (2004)
<i>Salminus brasiliensis</i>	Dourado	Ontogenia e comportamento natatório da larva	Santos e Godinho (2002)
<i>Leporinus elongates</i>	Leporin	Ontogenia e comportamento do nado da larva	Santos e Godinho (1994)
<i>Pimelodus grosskopfii</i>	Capaz	Desenvolvimento embrionário	Valbuena et al. (2012)
<i>B. orbignyanus</i>	Piracanjuba	Análise estrutural da fertilização	Ganeco et al. (2008)
<i>Galaxias maculatus, Basilichthys australis, Percilia gillissi, Percichthys trucha, otros</i>	–	Primeiros estágios do ciclo de vida (larvas e juvenis)	Montoya, Arias e Olivera-Angel (2012)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Influência do fotoperíodo e do ritmo de alimentação na fase de larva	Dugué et al. (2005)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pacu	Parâmetros seminais, fertilização, eclosão e larvas.	Galo (2009)
<i>Salminus brasiliensis</i>	Dourado	Crescimento e sobrevivência pós – larva em diferentes tipos de alimento e fotoperíodos	Schütz e Nuñez (2007)
<i>Salminus maxillosus</i>	Dourado	Reprodução induzida.	Dumont-Neto et al. (1997)
<i>Zungaro jahu</i>	Jaú	Reprodução induzida e características seminais e ovocitárias	Drumond (2008)
<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida	Muniz, Catanho e Santos (2008)

REFERÊNCIAS

ADEWOLU, M. A.; ADENIJI, C. A.; ADEJOB, A. B. Feed utilization, growth and survival of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fingerlings cultured under different photoperiods. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 283, n. 1/4, p. 64-67, Oct. 2008.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I., effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2006.

ALEXANDRE, J. S. et al. **Structural analysis of the embryonic development in Brycon cephalus (Günther, 1869)**. Zygote: Cambridge University, 2009. 11 p.

ALMAZAN-RUEDA, P. et al. Photoperiod affects growth, behavior and stress variables in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 67, n. 4, p. 1029-1039, Oct. 2005.

ANDRADE-TALMELLI, E. et al. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 149-154, 2001.

ARIAS-GALLO, M.; JIMÉNEZ-SEGURA, L. F.; DORADO, M. P. Desarrollo larval de *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, 1879) (Pisces: Prochilodontidae), Río Magdalena, Colombia. **Actual Biology**, Charlottesville, v. 32, n. 93, p. 199-208, 2010.

ATENCIO-GARCÍA, V. et al. Influência da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem de yamú *Brycon siebenthalae* (Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 61-72, 2003.

AYDIN, Ý. et al. Temperature response to sperm motility of Russian sturgeon semen during the post-activation period. **Yunus Araþtýrma Bülteni**, Yomra, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2012.

BARRADAS, J. R. S.; SILVA, L. G. da; FOUNTOURA, N. F. Distribuição Presumida do Grumatã (*Prochilodus lineatus*) na Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: PUCRS, 2009. p. 213-215.

BASTAMI, K. D.; IMANPOUR, M. R.; HOSEINIFAR, S. H. Sperm of feral carp *Cyprinus carpio*: optimization of activation solution. **Aquaculture International**, New York, v. 18, n. 5, p. 771-776, Aug. 2010.

BAUMGARTNER, G. et al. Fish larvae from the upper Paraná River: do abiotic factors affect larval density? **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 6, n. 4, p. 551-558, 2008.

BERTOLETTI, J. Aspectos biológicos da ictiofauna do rio Uruguai. **Veritas**, Porto Alegre, v. 30, p. 93-129, 1985.

BEZERRA, K. S. et al. Crescimento e sobrevivência da tilápia chitralada submetida a diferentes fotoperíodos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 737-743, jun. 2008.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4th ed. Endinburgh: Churchill Livingstone, 1990. p. 870-887.

BILLARD, R.; COSSON, M. P.; CHRISTEN, R. Some recent data on the biology on trout spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 3., 1987, Saint John's. **Proceedings...** Saint John's: Newfoundland, 1987. p. 187-190.

BILLARD, R. et al. Broodstock management and seed quality general considerations. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 1-24.

_____. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1/4, p. 1-9, June 2004.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{2+} . **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 21, n. 1, p. 74-82, 1992.

BOLKER, J. A.; HILL, C. R. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 56, n. 5, p. 1029-1052, May 2000.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, jul./ago. 2006.

BOTERO, M. et al. Descripción del desarrollo embrionario de cigotos 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, n. 1, p. 38-45, 2004.

BOTTA, P. et al. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 42, n. 2, p. 109-114, 2010.

BOZKURT, Y. V.; SEÇER, S. Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında üreme mevsimi boyunca spermatolojik özelliklerin belirlenmesi. **Journal of Fisheries & Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 23, n. 1/2, p. 195-198, 2006.

BRITZ, P. J.; PIENAAR, A. G. Laboratory experiments on the effect of light and cover on the behavior and growth of African catfish *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). **Journal of Zoology**, London, v. 227, n. 1, p. 43-62, May 1992.

BROMAGE, N. R.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/2, p. 63-98, 2001.

CAPITAL REGION SCIENCE EDUCATION PARTNERSHIP. **Organisms' life processes and basic needs**: material is based upon work supported by the National Science Foundation under Grant N° 9911868. Disponível em: <<http://www.crsep.org/ConceptMaps/organisms.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática**. Vitória: World Fisheries Trust, 1998. 47 p.

CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: _____. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 71-96.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. Desova induzida do curimatã *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 32, p. 1245-1253, 1980.

CENTRUM VOOR REPRODUCTIEVE GENEESKUNDE. **Sperm analysis**. Disponível em: <<http://crg-v2.nettools.be/sperm-analysis#7>>. Acesso em: 3 jan. 2011.

CORREIA, M. A. et al. Ontogenia da pigmentação das larvas de três espécies de characiformes, criadas em incubatório. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-14, 2010.

COSER, A. M. L. et al. Capacidade de fertilização do sêmen de *Prochilodus marggravii* (curimatã-pacu) congelado sob forma de “pellets”. In: ANNUAL AQUACULTURE MEETING, 10., 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: AAM, 1992. p. 56-59.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, Jan. 2010.

_____. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, London, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in. In: _____. **The male gamete**. Montreux: Cache River, 1999. p. 161-186.

_____. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. **Polish Archives of Hydrobiology**, Cincinnati, v. 44, n. 2, p. 103-113, 1997.

_____. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 460-486, 2008.

COSSON, M. P.; COSSON, J.; BILLARD, R. Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence of movement parameters whatever the incubation medium. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 20, n. 1, p. 55-68, 1991.

COSTA FILHO, J.; GAYA, L. G. Abordagens recentes do melhoramento genético de peixes. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, n. 1, p. 195-210, jan./abr. 2012.

COWARD, K. N. R. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 12, n. 1, p. 33-58, Mar. 2002.

CRUZ, V. L. **Criopreservação de sêmen de curimbatá *Prochilodus lineatus* = *scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

DOMÁNICO, A. et al. **Proyecto evaluación del recurso sábalo (*Prochilodus lineatus*) en el Paraná: informe de los resultados de la segunda etapa 2006-2007**. Buenos Aires: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos Subsecretaría de Pesca y Acuicultural, 2008. 25 p.

DOMINGUES, W. M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 609-617, 1998.

DRUMOND, M. M. **Reprodução induzida de jaú, Zungaro jahu: análise das características seminais e ovocitárias**. 2008. 102 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

DUELLEMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill Book, 1986. 670 p.

DUGUÉ, R. et al. Influencia del fotoperiodo y del ritmo de alimentación sobre la sobrevivencia larval del surubí (*Pseudoplatystoma fasciatum*). In: COMUNICACIONES DEL PRIMER COLOQUIO INTERNACIONAL DE LA RED DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA ICTIOFAUNA AMAZÓNICA, 1., 2005, Iquitos. **Anales...** Paris: IIAP, 2005. p. 199-204.

DUMONT-NETO, R. et al. Reprodução induzida do dourado (*Salminus maxillosus*, VALENCIENNES, 1849) na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta-Grande CEMIG/EPDA/V.G. **Revista UNIMAR**, Marília, v. 19, n. 2, p. 439-445, 1997.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; NEUMANN, E. *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential. **Zygote**, Cambridge, v. 19, p. 351-363, Nov. 2010.

FAUVEL, C. et al. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, London, v. 54, n. 2, p. 356-369, Feb. 1999.

FAWCETT, D. W. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction - Supplement**, Champaign, v. 2, p. 90-127, 1970.

FELIZARDO, V. O. et al. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 5, p. 648-652, 2010a.

_____. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 259-263, Dec. 2010b.

_____. Osmolaridade dos ativadores e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus Lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, n. 232, p. 1255-1262, 2011.

FRANCISCATTO, R. T. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4° C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

GALO, J. M. **Avaliação dos parâmetros seminais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

GANECO, L. N. et al. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. **Zygote**, Cambridge, v. 17, p. 93-99, May 2008.

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

GODINHO, H. L.; POMPEU, P. S. A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco de Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC-Minas, 2003. p. 361-372.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: Subordem Characoidei**. São Paulo: Franciscana, 1975. 6 v.

GUERRERO, H. Y. E. et al. Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 189-196, Mar. 2009.

HALL, C. S. Migration and metabolism in temperate stream ecosystem. **Ecology**, Durham, v. 53, p. 585-604, 1972.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Estatística da pesca grandes regiões e unidades da federação**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES. Glossary of terms for thermal biology. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 75-106, 2003.

JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics**: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University, 1991. 319 p.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 70, p. 219-228, 1984.

JEYENDRAN, R. S.; VEM, H. H. van der; ZANEVELD, L. J. D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Archives of Andrology**, New York, v. 29, n. 2, p. 105-116, 1992.

JING, R. et al. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 290, n. 1/2, p. 165-171, May 2009.

JØRGENSEN, C. B. Growth and reproduction. In: FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. (Ed.). **Environmental physiology of the amphibians**. Chicago: The University of Chicago, 1992. p. 439-466.

KAVAMOTO, E. T. **Efeito da ação hormonal sobre as características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881**. 1993. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999. Número especial.

_____. Avaliação macro e microscópica do sêmen de truta arco-iris *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 73-81, 1985.

_____. Efeito do hCG na produção de sêmen do curimatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 43, n. 245, p. 76-85, 1996.

_____. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 29-36, 1989.

_____. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p. 73-78, 1997. Volume único.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 45-50, 1986.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LOMAN, J. Growth and development of larval *Rana temporaria*: local variation and counter. **Journal of Herpetology**, Athens, v. 37, n. 3, p. 595-602, Sept. 2003.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 184-191, 2010.

LOPES, T. S. et al. Caracterização genética de estoques de curimatá (*Prochilodus lineatus*) utilizados em programas de repovoamento. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 86-93, Oct./Dec. 2008.

MACHADO, M. R. F.; FORESTI, F. Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847), of the migratory and resident stocks of the river Mogí-Guaçu, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 341-346, Oct./Dec. 2012.

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

MACIEL, C. M. R. et al. Desenvolvimento morfológico das larvas de *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (Characiformes, Erythrinidae), da eclosão até a metamorfose, relacionado com a capacidade de capturar alimento exógeno. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 103-111, set. 2009.

MACIEL JÚNIOR, A. **Desenvolvimento inicial de larvas de Curimatá-Pacu (*Prochilodus marggravii* Walbaum, 1792) (Characiformes, Prochilodontidae) submetidas a diferentes temperaturas de incubação**. 1996. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

MAITRA, S. K.; SETH, M.; CHATTORAJ, A. Photoperiod, pineal photoreceptors and melatonin as the signal of photoperiod in the regulation of reproduction in fish. **Journal of Endocrinology and Reproduction**, Dublin, v. 10, n. 2, p. 73-87, 2006.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARIA, N. A. et al. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 55-60, jan./mar. 2006.

_____. Influência da adicção de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-194, jan./fev. 2004.

MARTÍNEZ, J. G. et al. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 19-26, Jan./Mar. 2012.

MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A. et al. The effect of photoperiod on the reproduction of *Chirostoma estor estor* Jordan 1879 from Lago de Paátzcuaro, Mexico. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 23, n. 5, p. 621-623, Oct. 2007.

MATTEI, X. Espermatozoa ultrastructure and taxonomy in fishes. In: BACCELETI, B. (Ed.). **Comparative spermatozoology**. Raven: Serono, 1991. p. 985-990.

MÁTYÁS, S. et al. **Experiences with hypoosmotic swelling test**. Budapest: Kaali Institute, 2000. 83 p.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, Jan. 2011.

MONTOYA, A.; ARIAS, M.; OLIVERA-ANGEL, M. Embryonic Development of *Bryconamericus caucanus* (Characidae: Tetragonpterinae) under laboratory conditions. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 28, n. 3, p. 869-872, 2010.

MORAES, G. V. et al. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-116, 2004.

MUNIZ, J. A. S. M.; CATANHO, M. T. J. A.; SANTOS, A. J. G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 205-211, 2008.

MURGAS, L. D. S. et al. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 246-248, jul./set. 1999.

_____. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Veterinaria Murcia**, Murcia, v. 17, n. 2, p. 3-10, 2001.

_____. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, maio/jun. 2007.

_____. Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 22, n. 1, p. 197-206, 2012. Edição especial.

_____. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 6, p. 70-76, 2009. Suplemento.

_____. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, dez. 2002.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTO, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003. Suplemento.

MUSTAPHA, M. K. et al. Effects of three different photoperiods on the growth and body coloration of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). **Archives of Polish Fisheries**, Warsaw, v. 20, n. 1, p. 55-59, Apr. 2012.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce**: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NEUMANN, E. et al. Morphometry of larvae and juveniles of *Roeboides paranensis* (osteichthyes) of the paraná river, Brazil. In: DON MACKINLAY INTERNATIONAL CONGRESS ON THE BIOLOGY OF FISH, 1., 2004, Manaus. **Proceedings...** Manaus: UFAM, 2004. p. 107-117.

NIE, G. J.; WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, Los Angelis, v. 55, n. 4, p. 1005-1018, Mar. 2001.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 217-229, Aug. 2006.

OLIVEIRA, C. L. C. de. **Análise comparada da ultraestrutura dos espermatozoides e morfologia da glândula branquial em espécies de cheirodontinae (Characiformes: Characidae)**. 2007. 113 p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 679-687, Sept. 2010.

PAULA, D. A. J. et al. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 10, n. 3, p. 661-665, 2012.

PAULINO, M. S. **Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus Lineatus*): técnicas para o descongelamento**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PECIO, A.; RAFIŃSKI, J. Structure of the testis, spermatozoa and spermatozeugmata of *Mimagoniates barberi* Regan, 1907 (Teleostei: Characidae), an internally fertilizing, oviparous fish. **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 75, n. 3, p. 179-185, Apr. 1994.

PEREIRA, G. J. M. **Utilização de gonadotropina coriônica equina e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PÉREZ, L. et al. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. **Journal of Fish Biology**, London, v. 57, n. 6, p. 1488-1504, Dec. 2000.

PESOA, N. A.; SCHULZ, U. H. Diel and seasonal movements of grumatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1169-1177, 2010.

PRIETO, C. A. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, Brycon orbignyianus, Rhamdia quelen e Brycon hilarii (Pisces, Teleostei)**. 2004. 63 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticaba, 2004.

PUSCHECK, E. E.; JEYENDRAN, R. S. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss fertility. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, London, v. 19, n. 3, p. 222-228, 2007.

RAD, F. et al. Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, n. 1/4, p. 292-300, May 2006.

RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p. 53-76.

RAVINDER, K. et al. Computerized analysis of motility patterns and parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, 1997.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 381-388, 1997.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; ESQUIVEL, B. M.; ESQUIVEL, J. R. Reproducción inducida del piaçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2002.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 67-71, 2004.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. **Theriogenology**, Los Angelis, v. 60, n. 6, p. 1059-1070, Oct. 2003.

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.

RUGH, R. (Ed.). Experimental embryology. In: _____. **Mechanical separation of growth and differentiation**. Minesota: Burgess, 1962. p. 158-164.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

SADEH, A. et al. Compensatory development and costs of plasticity: larval responses to desiccated conspecifics. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 1, 2011. Disponível em:
<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015602>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

SANCHES, E. A. et al. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 6, p. 1163-1167, nov./dez. 2011.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. Larval ontogeny and swimming behaviour of the leporin fish *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1874) under experimental conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 1, p. 109-116, 1994. Suplemento.

_____. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 19, n. 1, p. 163-171, jan./fev. 2002.

SATO, Y. **Reproduction of São Francisco river basin fishes: induction and characterization of patterns**. 1999. 90 f. Thesis (Ph.D. in Ecology) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. O. Growth and survival of Dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 435-444, May 2007.

SHIMODA, E. et al. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

_____. Influência da presença da fêmea sobre a produção seminal no curimatá (*Prochilodus marginatus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 4, n. 1, p. 39-42, 1997.

SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Piracajuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, M. O. et al. Crecimiento y supervivencia de postlarvas de piracajuba (*brycon orbignyanus*). **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 58, n. 222, p. 285-288, 2009.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã (*Brycon cefálios*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

SILVEIRA, W. F. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 1-13, 1990.

STREIT JÚNIOR, D. P. et al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 147-153, May/June 2004.

TARTAGNI, M. et al. Males with subnormal hypo-osmotic swelling test scores have lower pregnancy rates than those with normal scores when ovulation induction and timed intercourse is used as a treatment for mild problems with sperm count, motility, or morphology. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 5, p. 781-783, 2004.

VALBUENA, V. R. D. et al. Desarrollo embrionario del capaz *Pimelodus grosskopfii* (Steindachner, 1879). **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 30, n. 1, p. 150-156, 2012.

VALDEBENITO, I. et al. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados: una revisión. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Santiago del Chile, v. 41, n. 2, p. 97-106, 2009.

VANDEWALLE, P. et al. Early development of the head skeleton in *Brycon moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae). **Journal of Fish Biology**, London, v. 66, n. 4, p. 996-1024, 2005.

VERAS, G. C. **Fotoperíodos no comportamento locomotor e desenvolvimento de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 97 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

VIVEIROS, A. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Los Angelis, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010.

_____. Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, June 2008.

WHITEHEAD, C. et al. The effects of alterations in photoperiod on ovarian development and spawning time in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, Paris, v. 18, n. 4, p. 1035-1043, 1978.

ZANIBONI-FILHO, E. et al. Survival of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) fingerlings exposed to acute pH changes. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 917-920, 2002.

_____. Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 151-155, Mar. 2008.

CAPÍTULO 3 Soluções de ativação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e seu efeito nas taxas de fertilização e eclosão

RESUMO

O objetivo com este trabalho foi avaliar o efeito de seis soluções ativadoras sobre a taxa (%) e a duração da motilidade espermática (minutos) e as taxas de fertilização (TF) e eclosão (TE) de *Prochilodus lineatus*. Os experimentos foram realizados na piscicultura da usina hidrelétrica de Itutinga, entre os meses de novembro/2010 e março/2011. Para esta finalidade, dez casais de curimba foram induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para obtenção dos gametas. As soluções ativadoras utilizadas foram: SA₀ (199 mOsm.Kg⁻¹, pH 8,5), SA₁ (138 mOsm.Kg⁻¹, pH 7,5), SA₂ (256 mOsm.Kg⁻¹, pH 7,5), SA₃ (131 mOsm.Kg⁻¹, pH 10), NaCl (54 mOsm.Kg⁻¹, pH 7,5) e água destilada (32 mOsm.Kg⁻¹, pH 7,5). A SA₁ proporcionou os maiores tempos de duração da motilidade espermática, TF e TE, em relação às outras soluções ativadoras testadas como NaCl e água destilada. A duração da motilidade obtida com a SA₀ foi a mais baixa e não houve fertilização, enquanto que com SA₂ e SA₃ o sêmen não foi ativado. É possível concluir que as soluções SA₁, NaCl e água destilada podem ser utilizadas na ativação de gametas durante a fertilização na reprodução induzida de curimba, porém recomenda-se a utilização da SA₁ para obtenção de maior taxa de fertilização e eclosão. Deste modo, foi verificado que a osmolaridade e o pH das soluções ativadoras, independente da substância utilizada, são os principais fatores atuando sobre a qualidade seminal de *P. lineatus* após ativação.

Palavras-chave: Ativador Espermático. Osmolaridade. Motilidade. Embriões. Larvas.

CHAPTER 3 Curimba (*Prochilodus lineatus*) semen activation solutions and their effect on fertilization and hatching

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of six activating solutions on *Prochilodus lineatus* sperm motility rate (%) and duration (minutes) and fertilization (FR) and hatching (HR) rates. The experiments were performed on the fish culture facility of the hydroelectric power plant in Itutinga, between the months of November/2010 and March/2011. Ten curimba pares were induced with crude carp pituitary extract (CCPE) in order to obtain the gametes. The activating solutions (AS) used were: SA₀ (199 mOsm.Kg⁻¹, pH 8.5), SA₁ (138 mOsm.Kg⁻¹, pH 7.5), SA₂ (256 mOsm.Kg⁻¹, pH 7.5), SA₃ (131 mOsm.Kg⁻¹, pH 10), NaCl (54 mOsm.Kg⁻¹, pH 7.5) and distilled water (32 mOsm.Kg⁻¹, pH 7.5). SA₁ presented the highest sperm motility durations, FR and HR, when compared to the other activating solutions. The motility duration obtained with SA₀ was the lowest, and no fertilization occurred, whereas with SA₂ and SA₃, the semen was not activated. It is possible to conclude that solutions SA₁, NaCl and distilled water may be used for the activation of gametes during fertilization in curimba induced reproduction induced. However, we recommend the use of SA₁ in order to achieve higher fertilization and hatching rates. Thus, it was observed that the osmolarity and pH of the activating solutions, regardless of the solute used, were the main factors influencing the quality of *P. lineatus* sperm after activation.

Keywords: Spermatic Activator. Osmolality. Motility. Embryos. Larvae.

1 INTRODUÇÃO

Em teleósteos a capacidade do sêmen de fertilizar com sucesso os ovócitos pode determinar sua qualidade, a qual pode ser quantificada através de algumas características particulares. Entre estas características seminais ressaltam o volume, a densidade e a motilidade espermática (BILLARD et al., 1996; RURANGWA et al., 2004) e a relação entre o número de espermatozoides por ovócito usados na fertilização (FELIZARDO et al., 2010a). No caso da motilidade espermática, esta pode estar diretamente relacionada com a fertilidade em algumas espécies ícticas (FAUVEL et al., 1999).

Deste modo, tem se reportado que uma boa motilidade dos espermatozoides permite aperfeiçoar a fertilização e garante uma alta produção de larvas viáveis (BILLARD et al., 1995). Este fato é importante nos programas de piscicultura e repovoamento de espécies nativas ameaçadas, em particular as migradoras, por ser de difícil reprodução em cativeiro. Por sua vez, dentre das espécies migradoras do Brasil com estas características encontra-se a curimba (*Prochilodus lineatus*).

Os estoques populacionais desta espécie têm sido grandemente afetados devido às atividades comerciais, sobrepesca, alteração do habitat, variação na qualidade da água (CAROLSFELD; HARVEY, 1998), construção de barragens e pesca ilegal (PESOA; SCHULZ, 2010). Daí que sejam prioritários os estudos que visem o melhoramento de seus aspectos reprodutivos em cativeiro.

Por outro lado, os espermatozoides de teleósteos são imóveis dentro dos testículos, do plasma seminal e em soluções isomóticas (peixes de água doce) ou hipertônicas (peixes marinhos), sejam eletrolíticas ou não (BATSAMI; IMANPOUR; HOSEINIFAR, 2010). Além disso, a duração da motilidade espermática em peixes é curta e depende das soluções ativadoras utilizadas no procedimento de ativação (GALO, 2009).

Assim, a ativação espermática e sua duração é afetada pela concentração de íons, a osmolaridade e o pH (ALAVI; COSSON, 2006a; COSSON, 2010) presentes na solução ativadora. Entre as soluções ativadoras da motilidade espermática, merecem destaque a água destilada, soluções salinas de bicarbonato de sódio, NaCl e KCl em diferentes concentrações, dependendo da espécie (RAVINDER et al., 1997).

Miliorini et al. (2011) utilizaram NaCl (30 e 60 mM) e NaHCO₃ (30 e 60 mM) como soluções ativadoras do sêmen de *P. lineatus* resfriado e Lahnsteiner, Patzner e Weismann (1993) acharam que soluções de NaCl reduziram a duração da sua motilidade, em ambos os estudos. Silveira (2000) observou que a solução de NaHCO₃ 1% favoreceu a taxa de motilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon cephalus*), porém, os ovócitos, durante a fertilização, se aglutinaram no fundo do recipiente e a taxa de eclosão foi nula.

Mas uma boa solução ativadora é aquela que, além de ativar a célula espermática, garanta uma adequada fertilização e não interfira no desenvolvimento embrionário.

A motilidade espermática em teleósteos varia entre 30 segundos e três minutos, embora recentemente fosse referida a ativação de espermatozoides entre 10 e 15 minutos em *Danio rerio* e *Cyprinus carpio* (BATSAMI; IMANPOUR; HOSEINIFAR, 2010; JING et al., 2009). Além disso, vários aspectos da qualidade espermática têm sido bem estudados em salmonídeos como truta arco-íris (BOITANO; OMOTO, 1992; COSSON; COSSON; BILLARD, 1991; COSSON et al., 1997; KAVAMOTO et al., 1985). Mas estas características do esperma em outras espécies de peixes são pouco conhecidas (ALAVI; COSSON, 2006b) e nem todos os fatores envolvidos na ativação são bem compreendidos.

Portanto, explorar novas condições do ambiente de ativação espermática pode ajudar a entender melhor este processo (COSSON, 2004). Diante disso, o

objetivo do autor com este trabalho foi avaliar o efeito de seis soluções ativadoras com diferentes osmolaridade, íons e pH sobre a duração da motilidade espermática e as taxas de fertilização e eclosão de *P. lineatus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados entre novembro de 2010 a março de 2011, na Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Itutinga, CEMIG, Minas Gerais, Brasil. Foram selecionados dez casais de curimba, com peso médio de $755,0 \pm 436,2$ e $825,0 \pm 380,24$ g para machos e fêmeas, respectivamente. Os reprodutores apresentavam características sexuais secundárias como: presença de orifício genital avermelhado e cavidade celomática abaulada (fêmeas) e liberação de sêmen sob compressão na parede celomática (machos) (FELIZARDO et al., 2010a).

Os animais selecionados foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo em quatro aquários com troca constante de água. Para a indução de liberação de gametas, aplicou-se injeção intramuscular de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). Nas fêmeas, foi aplicada uma dose prévia de 0,5 mg/kg e, doze horas após a primeira, foi aplicada uma segunda dose de 5 mg/kg. Para os machos, foi ministrada uma dose única de 2 mg/kg de EBHC, na hora em que as fêmeas receberam a segunda dose, conforme protocolo utilizado na piscicultura da CEMIG. A temperatura da água se manteve em 27 ± 1 °C, durante este período.

Aproximadamente 196 horas após a aplicação do hormônio foi realizada a coleta de gametas a seco, mediante massagem abdominal no sentido crânio-caudal. As desovas foram pesadas para obter a média ($178,5 \pm 75,28$ g) e estimar a quantidade de ovócitos/grama ($600 \pm 37,11$). Da desova de cada fêmea foi coletado 0,1 g de ovócitos, para posteriormente determinar o número de espermatozoides/ovócito.

O sêmen foi coletado em tubos de ensaio esterilizados e graduados e a desova em béqueres limpos e secos. As amostras de sêmen de cada macho foram

previamente observadas *in natura* ao microscópio para comprovar a não ativação do sêmen por contaminação com fezes, urina ou água.

Devido ao fato de que a concentração espermática (CE) pode influenciar a taxa de fertilização em peixes (ARAL; ŞAHINÖZ; DOGU, 2007), após a coleta uma alíquota de sêmen *in natura* de cada peixe foi diluída em formol-citrato (FC - 2,9 g de citrato de sódio, 4,0 ml de formaldeído ao 35%, 100 ml água destilada) na proporção 1:10000 (sêmen:FC). A CE foi determinada mediante contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer (Bright line, BOECO, Germany) usando microscópio de luz em 400x.

A ativação seminal foi realizada com seis soluções diferentes (Tabela 1) na proporção 1:3 (sêmen: ativador) e observada ao microscópio óptico com aumento de 4x. A duração da motilidade espermática foi determinada mediante a observação a partir da ativação até que se observasse 10% de motilidade, registrado o tempo com a ajuda de um cronômetro digital. A taxa de motilidade espermática foi realizada de maneira subjetiva tendo em conta 100% de motilidade. Das soluções ativadoras usadas, três foram modificadas da solução (a) proposta por Batsami, Imanpour e Hoseinifar (2010) chamada aqui de SA₀. O pH foi ajustado com HCl e medido usando pHmetro digital. A osmolaridade das soluções ativadoras foi medida com osmômetro (VAPRO 5520, Vescor).

Tabela 1 Características e componentes das soluções ativadoras usadas na ativação espermática de *P. lineatus*

Soluções	Características e componentes				
	NaCl mM	KCl mM	Tris mM	Osmolaridade mOsm.Kg ⁻¹	pH
SA ₀ *	50	30	30	199**	8,5
(SA ₁)	40	20	20	138	7,5
(SA ₂)	60	40	40	256	7,5
(SA ₃)	40	20	20	131	10
(NaCl)	50	-	-	54	7,5
AD	-	-	-	32	7,5

* solução (a) proposta por Batsami, Imanpour e Hoseinifar (2010). **osmolaridade determinada nesta pesquisa. SA_(1,2,3): soluções ativadoras modificadas. AD: água destilada.

2.1 Determinação das Taxas de Fertilização e Eclosão

A fertilização dos gametas foi realizada em becker de vidro de 50 mL. Foram usados 0,5 g da desova + 200 µl de sêmen, onde foram homogeneizados por um minuto e em seguida ativados em 10 mililitros de cada solução testada. Os ovócitos fertilizados foram levados às incubadoras experimentais confeccionadas de PVC (diâmetro: 98 mm, altura: 168 mm, com fundo de malha de 0,6 mm), sendo realizado este procedimento em duplicata. As incubadoras ficaram submergidas em aquários de 500 litros com areação artificial em um sistema de recirculação constante (temperatura da água 25±1 °C, pH 6,9±0,4, OD: 8,2±1,3 mg/L).

A taxa de fertilização (TF) foi determinada oito horas pós-fertilização (hpf) segundo o sugerido por Felizardo et al. (2010b), e a taxa de eclosão (TE) foi realizada em 18 hpf. Em ambos os casos se realizou a contagem aleatória de embriões e larvas (n≥100) em lupa microscópica (KEN-A-VISION, 5615 Raytown Road, Kansas City, Missouri), utilizando as seguintes fórmulas usadas por Felizardo et al. (2010a):

$$TF = [E / (E+I)] \times 100,$$

em que

TF: taxa de fertilização;

E: número de embriões viáveis;

I: número de ovos inviáveis.

$$TE = LA / TF \times 100,$$

em que

TE: taxa de eclosão;

LA: número de larvas;

TF: taxa de fertilização.

2.2 Análise dos Dados

Foi realizada análise descritiva de cada variável e de correlação linear entre o peso corporal e a concentração espermática dos machos com a duração de motilidade, TF e TE. Além disso, foi feita uma análise de correlação entre o peso corporal das fêmeas e peso da desova, TF e TE por cada solução ativadora. As comparações da concentração espermática, duração de motilidade, TF e TE nas diferentes soluções ativadoras foram feitas com ANOVA de medidas repetidas e teste de Tukey quando diferenças foram encontradas. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão com nível de significância de 0,05 usando o pacote computacional STATISTICA 7.1.

3 RESULTADOS

A concentração espermática dos reprodutores foi de $13,26 \pm 1,17 \times 10^9$ espermatozoides.ml⁻¹. O peso da desova obtido das fêmeas foi de $178,5 \pm 75,28$ g. Foi determinada uma proporção de espermatozoides/ovócito de 4.420.333/1.

Quando se utilizaram as soluções SA₂ e SA₃ não foi verificada viabilidade seminal. A SA₀, embora tenha proporcionado ativação da motilidade espermática, demonstrou não ser um bom ativador do sêmen de *P. lineatus*, pois a fertilização foi nula.

O sêmen ativado com SA₁ apresentou maior (P<0,05) tempo de duração da motilidade espermática em relação às outras soluções ativadoras testadas (figura 1, Tabela 2). Por outro lado, a taxa de motilidade do sêmen ativado com a SA₁ não diferiu da taxa apresentada pelo sêmen ativado com NaCl e água destilada, sendo observadas taxas de motilidade espermática acima de 98% com a utilização destas soluções (SA₁, NaCl, água destilada) (Tabela 2).

A utilização de SA₁ produziu uma maior taxa de fertilização (P<0,05) em relação aos demais ativadores avaliados, exceto a solução de NaCl (Tabela 2). E a taxa de eclosão não diferiu (P>0,05) quando se utilizaram a SA₁, NaCl e água destilada na ativação. Mas com a solução de NaCl e a água destilada houve uma maior variação na duração da motilidade e nas taxas de fertilização e eclosão em relação à SA₁ (figuras 2 e 3, tabela 2).

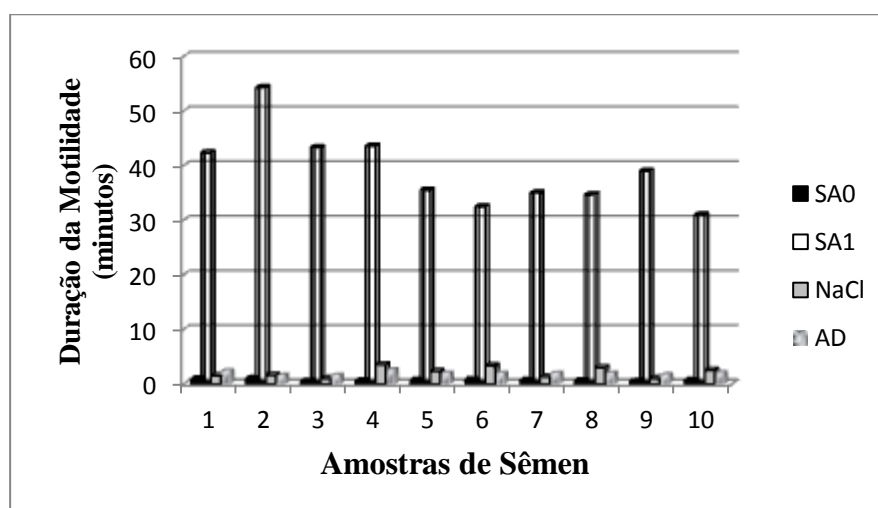


Figura 1 Efeito de diferentes soluções de ativação sobre a duração da motilidade espermática de *P. lineatus*

Nota: SA₁: solução de ativação modificada neste estudo - SA₀: solução proposta por Batsami, Imanpour e Hoseinifar (2010); NaCl: solução salina; AD: água destilada. N=10.

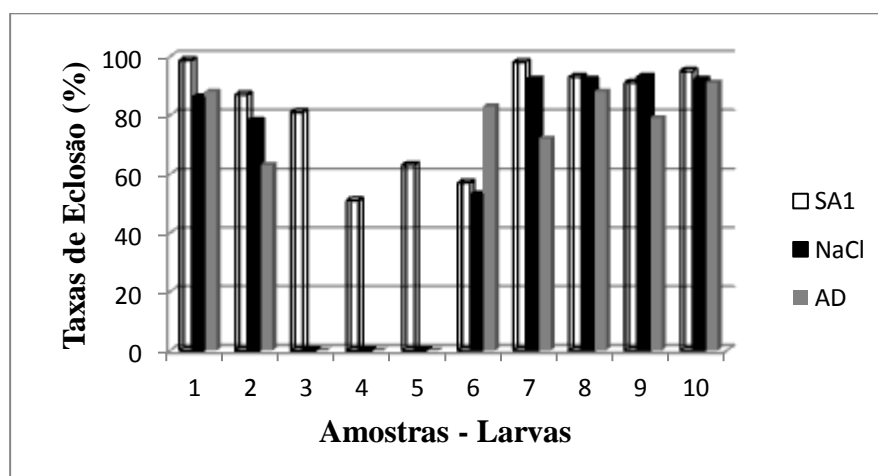


Figura 2 Efeito de diferentes soluções de ativação sobre as taxas de fertilização em *P. lineatus*

Nota: SA₁: solução de ativação modificada neste estudo - de SA₀: solução proposta por Batsami, Imanpour e Hoseinifar (2010); NaCl: solução salina; AD: água destilada. N=10

Tabela 2 Parâmetros qualitativos do sêmen de *P. lineatus* (n=10) após ativação com diferentes soluções

Soluções	Parâmetros avaliados \pm DP*			
	DM (min)	TM (%)	TF (%)	TE (%)
SA ₀	0,7 \pm 0,2 ^b	64,6 \pm 6,4 ^b	0 ^c	0 ^b
SA ₁	39,1 \pm 6,9 ^a	98,7 \pm 2,2 ^a	91,3 \pm 4,4 ^a	81,4 \pm 17,9 ^a
SA ₂	0 ^c	0 ^c	0	0 ^b
SA ₃	0 ^c	0 ^c	0	0 ^b
NaCl	2,1 \pm 0,9 ^b	98,6 \pm 1,9 ^a	76,2 \pm 29,0 ^{ab}	58,6 \pm 42,1 ^a
Água destilada	2,1 \pm 0,4 ^b	98,9 \pm 2,0 ^a	65,1 \pm 29,3 ^b	56,4 \pm 39,7 ^a

*Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. SA. solução ativadora; DM. Duração da motilidade; TM. Taxa de motilidade; TF. Taxa de fertilização; TE. taxa de eclosão.

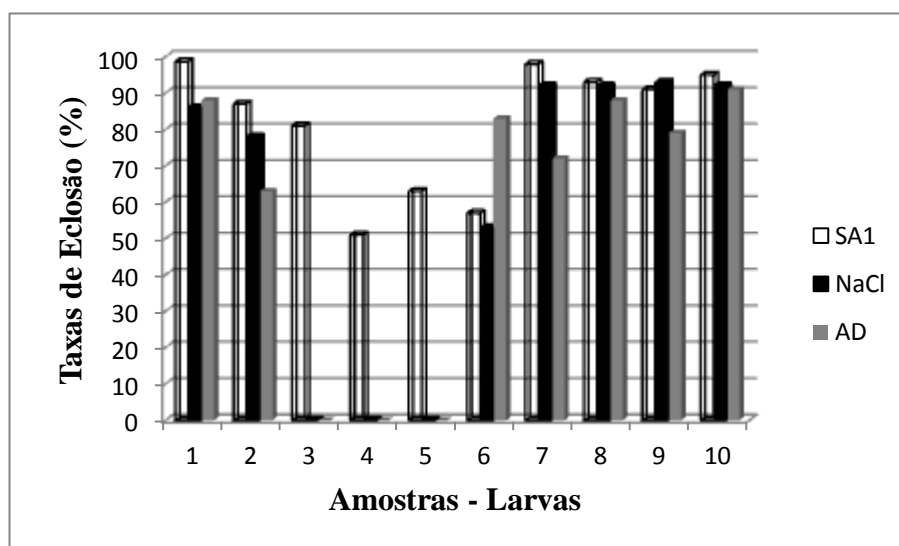


Figura 3 Efeito de diferentes soluções de ativação sobre as taxas de eclosão em *P. lineatus*

Nota: SA₁: solução de ativação modificada neste estudo - SA₀: solução proposta por Batsami, Imanpour e Hoseinifar (2010); NaCl: solução salina; AD: água destilada. N=10

4 DISCUSSÃO

O tempo de duração da motilidade observado no sêmen de *P. lineatus* ativado com a SA₁ (39,1±6,9 minutos) pode ser considerado muito alto em relação ao verificado por outros autores para a mesma espécie. Nesta espécie, Felizardo et al. (2010b) e Murgas et al. (2007) relatam tempos de duração da motilidade inferior a 2 minutos. O resultado aqui reportado é muito importante, tendo em vista que a motilidade espermática e sua duração influenciam diretamente sobre o sucesso da fertilização (ARAL; ŞAHINÖZ; DOGU, 2007; AYDIN et al., 2012; RURANGWA et al., 2004).

Provavelmente, a SA₁ prolongou a duração da motilidade devido aos valores de osmolaridade (138 mOsm) e pH (7,5) registrados nesta solução. Tendo em vista que a SA₃ (131 mOsm e pH 10), mesmo apresentando osmolaridade próxima à verificada na SA₁ e pH mais alto, teve duração e taxa da motilidade nulas. O mesmo aconteceu com a SA₂ (256 mOsm e pH 7,5), cujo pH foi semelhante e sua osmolaridade superior à da SA₁. Isto sugere que a osmolaridade e o pH das soluções ativadoras atuam conjuntamente para proporcionar condições adequadas aos espermatozoides, de forma que possam permanecer mais tempo em atividade. Também vale ressaltar que na SA₁ e SA₃ foram utilizados as mesmas proporções dos componentes empregados (tabela 1), diferindo somente no valor de pH, sugerindo assim, que a substância utilizada na solução ativadora não é tão atuante sobre as características quantitativas do sêmen de curimba quanto à osmolaridade e o pH.

A importância da osmolaridade da solução ativadora do sêmen de peixes já é bem conhecida e relatada para as espécies de água doce (FELIZARDO et al., 2011; SHIMODA et al., 2007). Sabe-se que para conseguir alta duração (e taxa) na motilidade espermática em *P. lineatus*, o ativador não pode ter uma osmolaridade superior a 277 mOsm.kg⁻¹ e o pH deve variar de acordo com o pH

do sêmen, que no caso da curimba é de $7,8 \pm 0,4$ (MILLIORINI et al., 2011; ORFÃO et al., 2010). Este valor é similar ao achado em truta arco-íris por Baynes, Scott e Dawson (1981), que verificaram que ativadores com pH acima de 7,8 inibiam a motilidade espermática em sêmen dessa espécie.

As maiores taxas de motilidade espermática observadas com a utilização das soluções SA₁, NaCl e água destilada, provavelmente também estão relacionadas com a atuação conjunta da osmolaridade e do pH adequados. No entanto, a SA₀ que apresenta uma osmolaridade apropriada (199 mOsm) para a ativação seminal, apresentou taxa de motilidade inferior às apresentadas pela SA₁, NaCl e água destilada, resultado atribuível ao alto pH.

De acordo com Cosson (2004), a diminuição da osmolaridade externa leva ao reajustamento da concentração iônica interna pelo processo osmorregulatório da membrana. A diminuição da concentração iônica atinge valores nos que a atividade da ATPase é ótima e, conseqüentemente, a motilidade se dá em alta velocidade. De acordo com Alavi e Cosson (2006a, 2006b), o pH influencia na concentração de prótons intracelular e na despolarização da membrana celular e, portanto, na motilidade espermática.

A aferição da taxa de fertilização e eclosão mediante a ativação dos gametas com os diferentes ativadores é necessária para confirmar a atuação da solução na fertilização, visto que alguns ativadores podem ser bons para a ativação seminal, porém, podem causar danos aos ovócitos quando utilizado na fertilização, como é relatado por Silveira (2000). Este autor também encontrou que a solução de NaHCO₃ favoreceu satisfatoriamente a taxa de motilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon cephalus*), porém, os ovócitos, durante a fertilização, se aglutinaram no fundo do recipiente e a taxa de eclosão foi nula. De acordo com Morris et al. (1989) e Sayer, Reader e Dalziel (1993), as fases iniciais de vida do peixe, tal como ovos e larvas, não tem o sistema regulatório ácido-base

efetivo como o de peixes adultos, podendo dessa forma, ser afetado quando há alteração do pH no ambiente onde ele se encontram.

No presente trabalho foi observado que a SA₁ proporcionou altas taxas de fertilização e eclosão, provavelmente ocasionadas por estarem os espermatozoides mais tempo ativos, e dessa forma, aumentando a possibilidade de fecundar os ovócitos. Daí que é possível confirmar que a SA₁ pode ser utilizada na fertilização sem que haja prejuízo nos resultados, tendo em vista que a reprodução induzida tem por objetivo obtenção de um maior número de larvas saudáveis.

Este resultado concorda com Godinho (2007) que assinala que uma boa taxa de fertilização é um indicador seguro da qualidade do sêmen, dos ovócitos, do processo de fertilização e da embriogênese.

A utilização da SA₀, apesar de proporcionar motilidade aos espermatozoides, não permitiu a fertilização dos gametas. Provavelmente o pH mais alto desta solução tenha inviabilizado os gametas durante este procedimento. Ferreira, Nuñez e Esquivel (2001) relatam que o pH afeta diretamente a taxa de fertilização de jundiá, *Rhamdia quelen*, onde observaram que ovos mantidos em ambiente com pH 4 não apresentavam fertilização e os submetidos a pH 5, apesar de apresentarem fertilização, não eclodiram. Da mesma forma Kuegel, Hoffmann e Friess (2006) registraram diminuição da eclosão dos ovos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e de truta-marrom (*Salmo trutta f. fario*). Segundo estes autores, esta atuação do pH sobre a eclosão, ocorre por causa da redução da permeabilidade da membrana coriônica, que impede a saída da larva de dentro do ovo, quando submetido a valores baixos de pH.

É possível concluir que as soluções SA₁, NaCl e água destilada podem ser utilizadas na ativação de gametas durante a reprodução induzida de curimba, porém recomenda-se a utilização da SA₁ para obtenção de maiores taxas de

fertilização e eclosão e menor variação nas mesmas. Foi verificado que a osmolaridade e o pH das soluções ativadoras, independente das substâncias dissolvidas nelas, são os principais fatores atuando sobre a qualidade seminal após ativação.

REFERÊNCIAS

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I., effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2006a.

_____. Sperm motility in fishes: II., effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006b.

ARAL, F.; ŞAHİNÖZ, E.; DOĞU, Z. A study on the milt quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Southeastern. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ankara, v. 7, n. 1, p. 41-44, 2007.

AYDIN, Ý. et al. Temperature response to sperm motility of Russian sturgeon semen during the post-activation period. **Yunus Araştırma Bülteni**, Yomra, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2012.

BASTAMI, K. D.; IMANPOUR, M. R.; HOSEINIFAR, S. H. Sperm of feral carp *Cyprinus carpio*: optimization of activation solution. **Aquaculture International**, New York, v. 18, n. 5, p. 771-776, Aug. 2010.

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P.; DAWSON, A. P. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii richardson*, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. **Journal of Fish Biology**, London, v. 19, n. 3, p. 259-267, 1981.

BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality. In: _____. **Broodstock management, egg and larval quality**. Oxford: Blackwell, 1996. p. 25-52.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{2+} . **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 21, n. 1, p. 74-82, 1992.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática**. Vitoria: World Fisheries Trust, 1998. 47 p.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, Jan. 2010.

_____. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, London, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSSON, J. et al. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. **Polish Archives of Hydrobiology**, Cincinnati, v. 44, n. 2, p. 103-113, 1997.

COSSON, M. P.; COSSON, J.; BILLARD, R. Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence of movement parameters whatever the incubation medium. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 20, n. 1, p. 55-68, 1991.

FAUVEL, C. et al. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, London, v. 54, n. 2, p. 356-369, Feb. 1999.

FELIZARDO, V. O. et al. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 5, p. 648-652, 2010a.

_____. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 259-263, Dec. 2010b.

_____. Osmolaridade dos ativadores e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus Lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, n. 232, p. 1255-1262, 2011.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. O.; ESQUIVEL, J. R. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 477-48, 2001.

GALO, J. M. **Avaliação dos parâmetros seminais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas.** 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

GODINHO, H. 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.

JING, R. et al. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 290, n. 1/2, p. 165-171, May 2009.

KAVAMOTO, E. T. et al. Avaliação macro e microscópica do sêmen de truta arco-íris *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 73-81, 1985.

KUEGUEL, B.; HOFFMANN, R. W.; FRIESS, A. Effects of low pH on the chorion of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 37, n. 2, p. 301-310, 2006.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reproduction and Nutritional Development**, Les Ulis, v. 33, n. 4, p. 349-360, 1993.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, Jan. 2011.

MORRIS, R. et al. **Acid toxicity and aquatic animals**. Cambridge: Cambridge University, 1989. 282 p. (Society for Experimental Biology Seminar Series, 34).

MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, maio/jun. 2007.

ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 679-687, Sept. 2010.

PESOA, N. A.; SCHULZ, U. H. Diel and seasonal movements of grumatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1169-1177, 2010.

RAVINDER, K. et al. Computerized analysis of motility patterns and parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, 1997.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

SAYER, M. D. J.; READER, J. P.; DALZIEL, T. R. K. Fresh-water acidification: effects on the early-life stages of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 3, n. 2, p. 298-298, June 1993.

SHIMODA, E. et al. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã (*Brycon cefálios*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

CAPÍTULO 4 Efeito de diferentes fotoperíodos no desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho determinar o efeito de três fotoperíodos sobre o desenvolvimento embrionário de *P. lineatus*. Os gametas foram obtidos de dois casais induzidos com extrato bruto de hipófise de catfish (EBHCt). Após a fertilização foram coletados aleatoriamente cerca de 1800 embriões que foram repartidos em três tratamentos de luz:escuridão (24:00, 00:24 e 12:12), com 600 embriões cada, mantidos em incubadoras dentro de aquários de 15 litros de água com areação artificial. Foi monitorada a qualidade da água: pH ($7,3 \pm 1$), oxigênio dissolvido ($8,7 \pm 1,8 \text{ mg L}^{-1}$) e temperatura ($26,4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Os embriões foram avaliados de 15 em 15 minutos na primeira hora pós – fertilização (hpf) e depois a cada hora até a eclosão. Nos primeiros estágios os embriões se desenvolveram de acordo com os dados da literatura atual para a espécie. A partir do estágio de transição alto-ovoide houve diferenças importantes, pois nos tratamentos 00:24 e 24:00 este estágio foi atingido aproximadamente a 3,75 hpf, etretanto no tratamento 12:12 se observou embriões no estágio ovoide-esfera. As 4,75 hpf os embriões de 00:24 na fase de domo e entrando em ovoide-esfera, em 24:00 iniciando a epibolia e em 12:12 no estágio de domo, onde se observou a capa vitelínica sincicial. No período de gástrula, às 5,75 hpf a epibolia estava em 70% em 24:00, em 60 % em 00:24 e no início deste estágio em 12:12. A gástrula finalizou as 7,75 hpf no tratamento 24: 00, às 8,2 hpf em 00:24 e às 8,75 hpf em 12:12. As taxas de fertilização foram de 94% em 24:00, de 95% em 00:24 e de 93% em 12:12. No início da segmentação e organogênese, os primeiros três somitos e a vesícula ótica apareceram às 9,75 hpf em 24:00, às 10,25 hpf em 00:24 e 10,5 em 12:12. Aproximadamente às 14,75 hpf foram observados os movimentos musculares em 24:00 e 00:24, sendo mais ativos em 24:00, e em 12:12 os embriões ainda estavam atingindo os 30 somitos. A taxa de eclosão foi de 90% e 91% em 24:00 e 00:24, respectivamente, que ocorreu as 16,3 hpf, e às 17,5 hpf em 12:12, com taxa de eclosão de 93%. Os resultados demonstram que existe influência do fotoperíodo sobre o desenvolvimento embrionário da curimba em condições laboratoriais nos estágios mais avançados de desenvolvimento.

Palavras - chave: Peixe nativo. Ambiente fótico. Ontogenia

CHAPTER 4 Effect of different photoperiods on *Prochilodus lineatus* embryonic development

ABSTRACT

This study aimed at determining the effect of three photoperiods on the embryonic development of *P. lineatus*. The gametes were obtained from two pares induced with crude catfish pituitary extract (CCtPE). After fertilization, approximately 1800 embryos were randomly collected. These embryos were divided into three light:darkness treatments (24:0, 00:24 and 12:12) and maintained in incubators within 15 liter water tanks artificially aerated and water quality control of pH (7.3 ± 1), DO (8.7 ± 1.8 mg L⁻¹) and temperature (26.4 ± 1 ° C). The embryos were monitored four times in the first hour post - fertilization (hpf) and every hour until hatching. In the early stages, the embryo developed according to recent literature data for the species. Differences were found in the high-ovoid transition stage. This stage was reached at approximately 3.75 hours post - fertilization (hpf) in treatments 00:24 and 24:00. In treatment 12:12 an ovoid-sphere stage was observed at 3.75 hpf. At 4.75 hpf the 00:24 embryos were at dome stage and entering ovoid-sphere stage. At 24:00, the epibolia stage was beginning the epiboly stage and, at 12:12, they were in dome stage, in which the yolk syncytial layer was observed. In the gastrula period at 5.75 hpf, the epiboly was 70% in 24:00, 60% in 00:24 and at the beginning of this stage in 12:12. The gastrula stage ended at 7.75 hpf in treatment 24:00, at 8.2 hpf in 00:24, and at 8.75 hpf in 12:12. Fertilization rates were 94% at 24:00, 95% at 00:24 and 93% in 12:12. At the beginning of segmentation and organ genesis, the first three somites and optic vesicle appeared at 9.75 hpf in 24:00, at 10.25 hpf in 00:24 and at 10.5 hpf in 12:12. At approximately 14.75 hpf, muscle movements were observed in 00:24 and 24:00. These movements were more active in 00:24, and at 12:12 the embryos were still reaching the 30 somites. The hatching rates were 90% and 91% at 24:00 and 00:24, respectively, and occurred at 16.3 hpf, and at 17.5 hpf in 12:12, with hatching rate of 93%. The results show that photoperiod influences curimba's embryonic development in later stages under laboratory conditions.

Keywords: Native fish. Photic environment. Ontogeny.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário em teleósteos é um processo que inicia na fertilização e finaliza na eclosão, abarcando os períodos de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e organogênese. Trata-se de um fenômeno complexo que permite estudar a ontogenia das espécies e pode se utilizar em processos biotecnológicos, em bioindicação e em experimentos toxicológicos (BOTERO et al., 2004). Além disso, a sobrevivência nestes períodos iniciais é um dos aspectos mais críticos na produção comercial de peixes sob sistemas controlados e nos programas de repovoamento.

O conhecimento e identificação de cada estágio ontogênico são de muita importância, particularmente nos peixes de piracema, pelas mudanças dos fatores ambientais aos que estão expostos na sua rota migratória. Entre estes fatores se encontra o fotoperíodo, ou período de luz ao que o animal está exposto, pois tem grande influência nos aspectos fundamentais como o crescimento, o desenvolvimento, o controle do ritmo endógeno, os padrões de pigmentação corporal e a reprodução (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; MUSTAPHA et al., 2012). Isto pode ser de muita ajuda nos estudos da incidência ambiental sobre a ontogenia das espécies ícticas de interesse comercial e/ou científico, especialmente quando se quer melhorar o aproveitamento das mesmas do ponto de vista ecológico e econômico. Mas o efeito da manipulação do fotoperíodo nos estágios iniciais do desenvolvimento dos peixes tem sido pouco estudado (RAD et al., 2006).

As áreas de reprodução e os estudos nas primeiras fases do desenvolvimento ontogênico são de interesse prioritário para a piscicultura brasileira (GODINHO, 2007). Daí a relevância dos trabalhos que procuram a criação de pacotes tecnológicos alternativos para o melhoramento do potencial

produtivo das espécies promissórias de peixes nativos de mediano e grande porte como a curimba (*Prochilodus lineatus*) (BOTTA et al., 2010).

Os estágios embrionários têm sido estudados em muitas espécies ícticas (GAO et al., 2011; VALBUENA et al., 2012), entre estas algumas do gênero *Prochilodus* como *P. magdalenae* e *P. lineatus* (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; BOTTA et al., 2010; NIHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Em *P. magdalenae* foi descrito sucintamente o desenvolvimento embrionário dando ênfase na fase larval. No caso de *P. lineatus* tem sido descrito o desenvolvimento dos embriões sob condições de luz:escuridão de 12:12 e de duas temperaturas diferentes (NIHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Mas são desconhecidas as conseqüências das variações fotoperiódicas sobre as fases embrionárias. Objetivou-se com eesta pesquisa a determinação do efeito que têm diferentes fotoperíodos sobre o desenvolvimento da curimba na sua fase embrionária visando conhecer o seu grau de sensibilidade às mudanças deste fator.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os gametas foram obtidos de dois casais adultos induzidos artificialmente na estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Itutinga, CEMIG, Minas Gerais, Brasil. As fêmeas apresentavam peso médio de 650 g e os machos de 400 g.

Os reprodutores foram induzidos mediante aplicação de estrato bruto de hipófise de catfish (EBHCf), assim: as fêmeas receberam duas aplicações de EBHCt, uma ao início do experimento de 0,5 mg/kg e outra de 5,0 mg/kg doze horas após da primeira para a obtenção dos ovócitos.

Os machos foram tratados com uma dose única ao mesmo tempo da segunda dose das fêmeas para obter os espermatozoides.

Aproximadamente 196 horas após a aplicação do hormônio foi realizada a coleta de gametas, mediante massagem abdominal no sentido anteroposterior para obtenção do sêmen que foi coletado em tubos esterilizados.

Uma amostra de sêmen (uma gota) de cada macho foi previamente observada *in natura* ao microscópio para verificar a ausência de ativação por contaminação com água ou com fluídos corporais dos peixes (fezes ou urina). Se houve motilidade espermática, o sêmen foi descartado.

Devido que a concentração espermática (CE) pode influenciar a taxa de fertilização em peixes (ARAL; ŞAHINÖZ; DOĞU, 2007), após a coleta uma alíquota de sêmen *in natura* de cada peixe foi diluída em formol-citrato (FC - 2,9g de citrato de sódio, 4,0 ml de formaldeído ao 35%, 100 ml água destilada) na proporção 1:10000 (sêmen:FC). Posteriormente a CE foi determinada mediante contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer (Bright line, BOECO, Germany) usando microscópio de luz em 400x.

As desovas foram pesadas para estimar a quantidade de ovócitos/grama. Da desova de cada fêmea foi coletado 0,1g de ovócitos, para determinar o número de espermatozoides/ovócito.

A fertilização foi feita agregando-se o sêmen coletado sobre os ovócitos. Depois foram coletados aleatoriamente cerca de 1800 embriões e transportados ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras, sendo divididos em três tratamentos de luz:escuridão (24:00, 00:24 e 12:12). Em cada tratamento houve 600 embriões com três repetições de 200 embriões alocados em incubadoras experimentais (confeccionadas em PVC, diâmetro: 98 mm, altura: 168 mm, com fundo de malha de 0,6 mm), dentro de aquários de 15 litros de água com aeração artificial. Os fotoperíodos se obtiveram usando lâmpadas de luz branca de 1100 lúmenes controlados por temporizadores. Foram monitorados durante todo o experimento alguns parâmetros relevantes da qualidade da água como o pH o Oxigênio dissolvido (OD) e a temperatura.

2.1 Monitoramento e análise dos dados

O desenvolvimento embrionário foi monitorado a cada quinze minutos na primeira hora e a cada hora nos períodos seguintes até a eclosão (BOTTA et al., 2010), usando microscópio de contraste de fase com câmera incorporada (MOTIC BA 310, câmera 2.0 MP USB2). Os dados são apresentados por períodos, estágios e horas pós-fertilização (hpf) ressaltando os eventos mais relevantes observados segundo cada tratamento. O momento da eclosão foi considerado quando 90% ou mais dos ovos estavam eclodidos, segundo o proposto por Jhonston, Vera e Abercromby (1995).

Os embriões em período de zigoto e as larvas recém eclodidas em cada tratamento foram medidos usando o campo graduado do microscópio e paquímetro digital (Digimac Caliper, precisão de 0,001 mm).

Foi realizada uma análise descritiva de cada estágio de interesse e ANOVA para comparar o efeito de cada tratamento sobre o desenvolvimento das larvas ao eclodir.

3 RESULTADOS

A média do peso da desova foi de $181,3 \pm 72,9$ g e a relação da quantidade de ovócitos/grama de 611 ± 29 . O valor médio da concentração espermática (CE) dos machos foi de $14,01 \pm 0,95$ espermatozoides $\times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$. Os parâmetros da qualidade da água dos aquários experimentais foram: pH ($7,4 \pm 1$), OD ($8,5 \pm 1,5$ mg L⁻¹) e temperatura ($26,7 \pm 1$ °C).

3.1 Achados gerais do desenvolvimento embrionário

Nas primeiras quatro horas os embriões tiveram um desenvolvimento parecido ao reportado recentemente para *P. lineatus* por Botta et al. (2010). Após a quarta hora pós – fertilização se evidenciam mudanças no avanço do desenvolvimento entre os tratamentos, sendo particularmente mais acelerado no tratamento 24:00 00:24 min. Já no caso do tratamento 12:12 o tempo do desenvolvimento é similar ao reportado em pesquisas prévias.

3.2 Períodos de Zigoto e Clivagem

Em 0,5 hpf o diâmetro do zigoto foi de $1,22 \pm 0,14$ mm (mínimo 0,9 e máximo 1,5), sendo observada a formação do blastodisco e o início do fotoperíodo de clivagem (figura 1). Nesse tempo o espaço perivitelínico foi maior que o embrião mesmo ($1,4 \pm 0,24$ mm, figura 1).

Na 1,5 hpf o embrião estava em clivagem com 32 células para todos os tratamentos, alcançando as 64 células às 1,75 hpf.

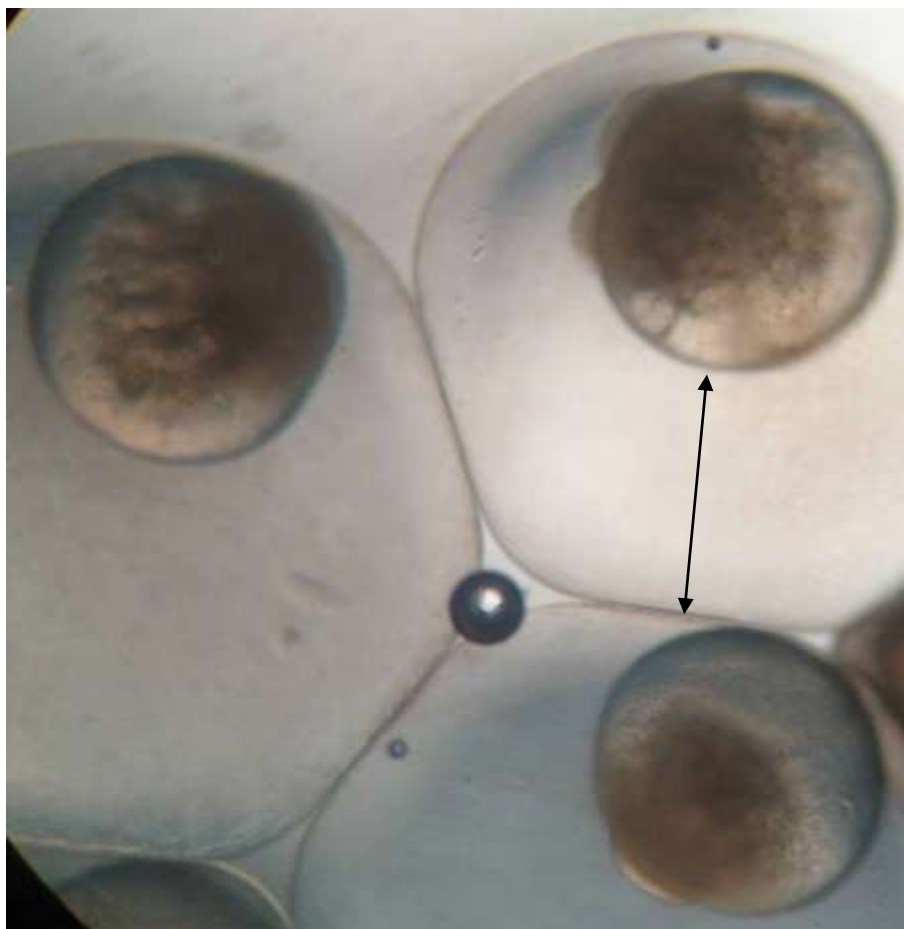


Figura 1 Período de zigoto e início da clivagem em *P. lineatus*

Nota: O espaço perivitelínico em 0,5 hpf é maior em cerca de 10% que o zigoto. (barra: 1 mm).

3.3 Blástula

No período de blástula, o estágio de 128 células foi atingido às 2 hpf e o estágio alto às 3 hpf nos três tratamentos, sendo possível a observação de algumas gotas oleosas de tamanho mediano, particularmente no tratamento de 24:00 (figura 2).

A partir do estágio de transição alto-ovoide houve diferenças importantes, pois nos tratamentos 24:00 e 00: 24 este estágio foi atingido aproximadamente as 3,75 hpf. Nesse mesmo tempo em 12:12 foram observados embriões no estágio oblongo – esfera.

Às 4,75 hpf os embriões de 24:00 estavam no início da epibolia, os de 00:24 na fase de domo e entrando a ovoide-esfera, e em 12:12 no estágio de domo observando-se a capa vitelínica sincicial. Estes aspectos podem se visualizar na figura 3.

Estágio oblongo – esfera: no estágio oblongo se observou uma divisão assíncrona dos blastômeros; no estágio de esfera a interface entre o vitelo e o blastodisco é quase plano ou plano (figura 3b). Ao final desta fase o pólo animal se orienta para acima, dando início ao estágio de domo (figura 3c).

Observaram-se embriões em 1K – cell no estágio alto e a presença de núcleos da capa sincicial do vitelo (figura 3d).

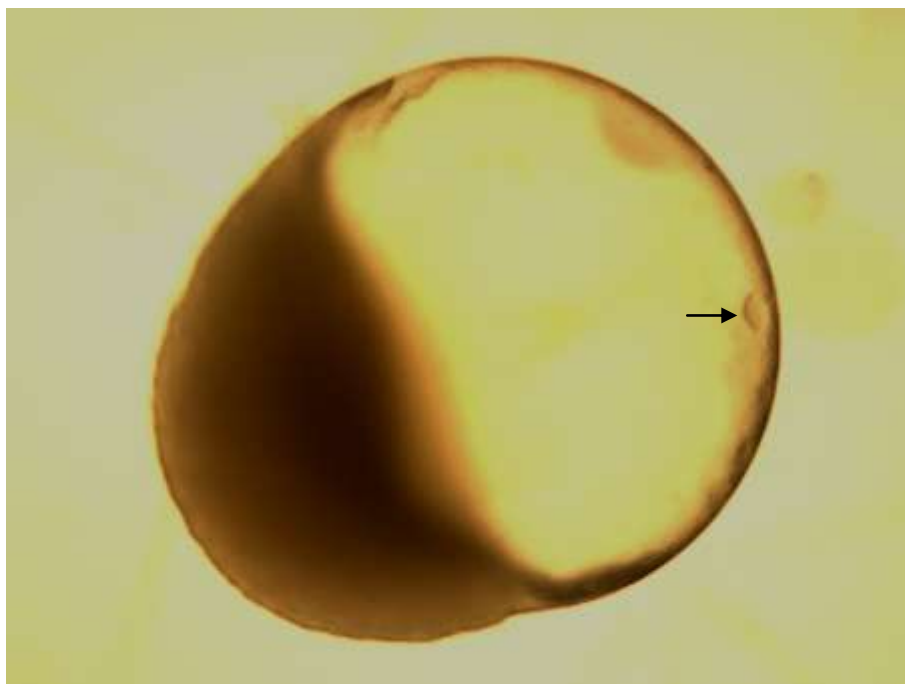


Figura 2 Gotas de óleo nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário de *P. lineatus* em tratamento fotoperiódico de 24:00

Nota: 3 hpf. (barra: 1 mm).

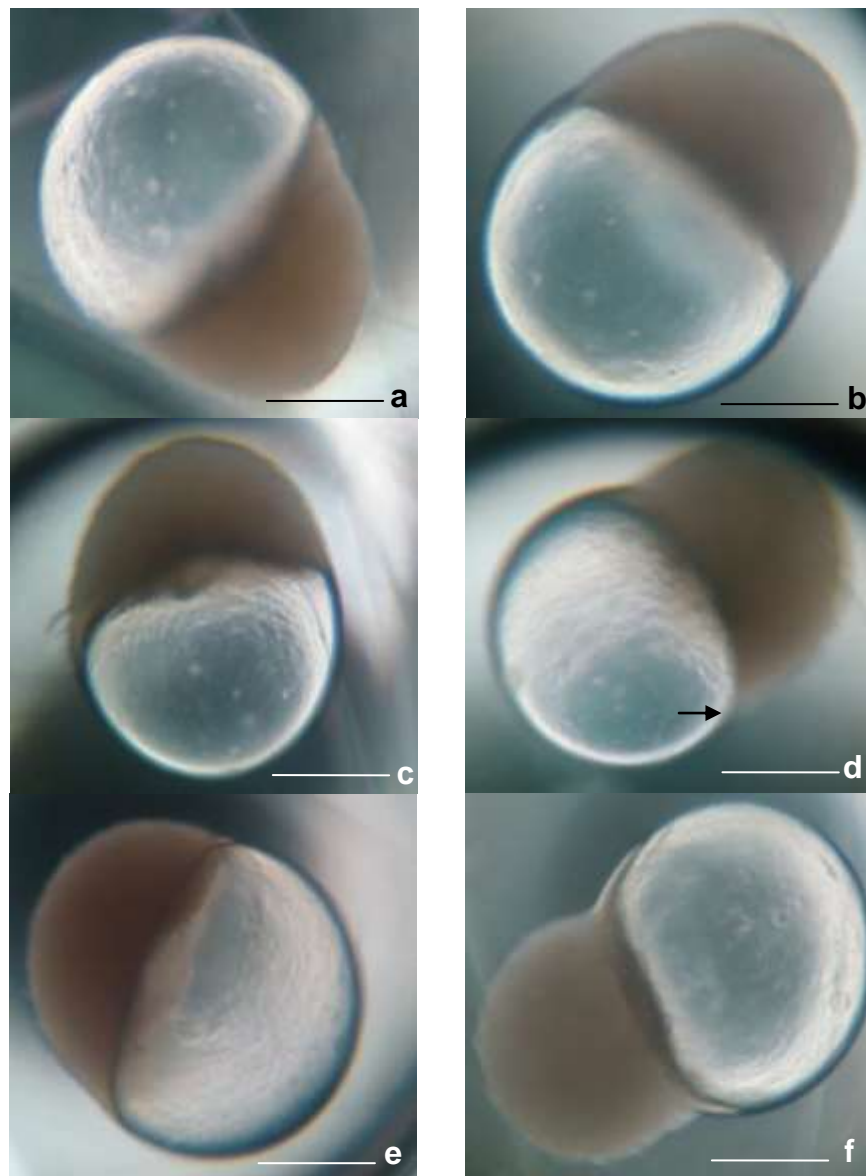


Figura 3 Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento embrionário de *P. lineatus* no período de blástula em 24:00 (a, b), 00:24 (c, d)

Nota: 1K-cell, estágio alto e presença de núcleos da capa sincicial da gema (YSL, 3d), e 12:12 (e, f), início da epibolia em f. (barras: 1 mm).

No fotoperíodo de blástula nas 4,75 hpf também foi observado um desenvolvimento assíncrono dos blastômeros após do estágio oblongo – esfera (figura 4a – 4f). Na figura 4c e 4d se observam também os blastômeros marginais da EVL (membrana que envolve o blastodisco) (4d) e as células das camadas profundas marginais.

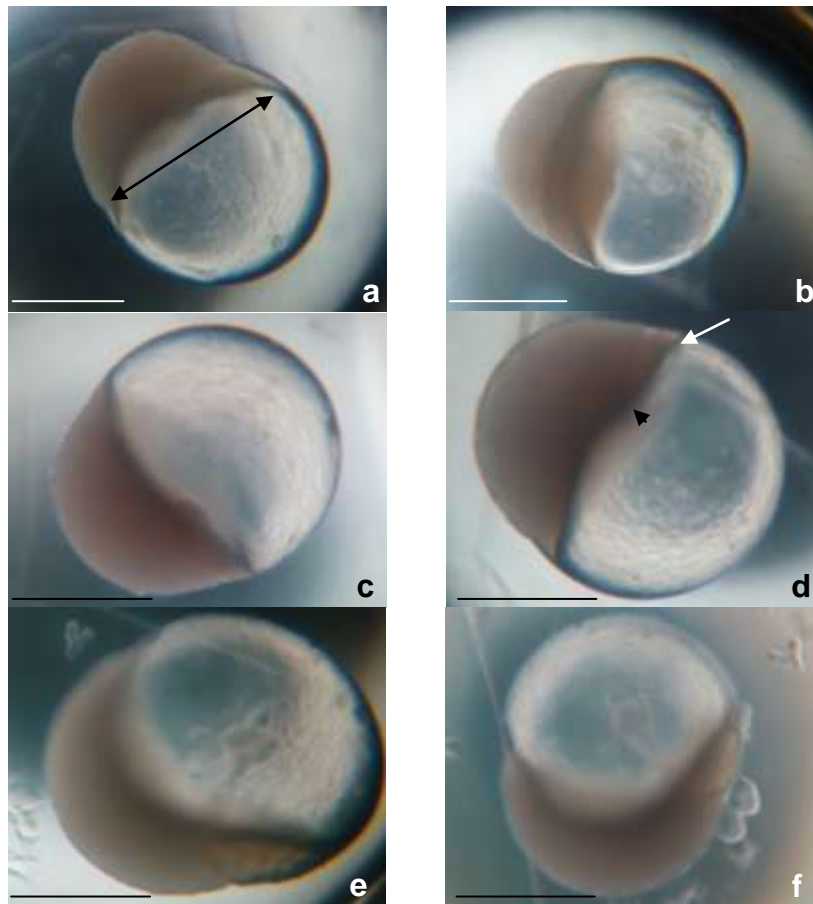


Figura 4 Blástula em 4,75 hpf de *P. lineatus* no período de blástula com desenvolvimento assíncrono dos blastômeros após do estágio oblongo – esfera (figura 4a – 4f). 24:00 (a, b); 00:24: blastômeros marginais da EVL (membrana que envolve o blastodisco) (4c, d) e células das camadas profundas marginais (cabeça de seta); 12:12 (e, f)

Nota: (barras: 1 mm).

3.4 Gástrula

Neste período, às 5,75 hpf os embriões estavam com 70% de epibolia em 24:00, 60% em 24:00 e em 12:12 ainda no início da epibolia (figura 5). Este estágio finalizou às 7,75 hpf no tratamento 24:00 às 8,2 hpf em 00:24 e às 8,75 hpf em 12:12.

Visualizou-se a placa precordial (5a) e o anel germinativo (5b). Nas figuras 5c e 5d se observam embriões em 50% de epibolia com blastoderma de largura uniforme e o início do movimento morfo-genético de involução que marca o início da gastrulação. Além disso, se observou um número crescente de gotas de óleo no vitelo no tratamento de 24:00 (figuras d, g).

No estágio de 75% de epibolia se visualizou a zona fina de evacuação (figuras 5f e 5 g) bem como o escudo embrionário incipiente. Em 70% de epibolia o escudo embrionário é pouco evidente (figura 6c).

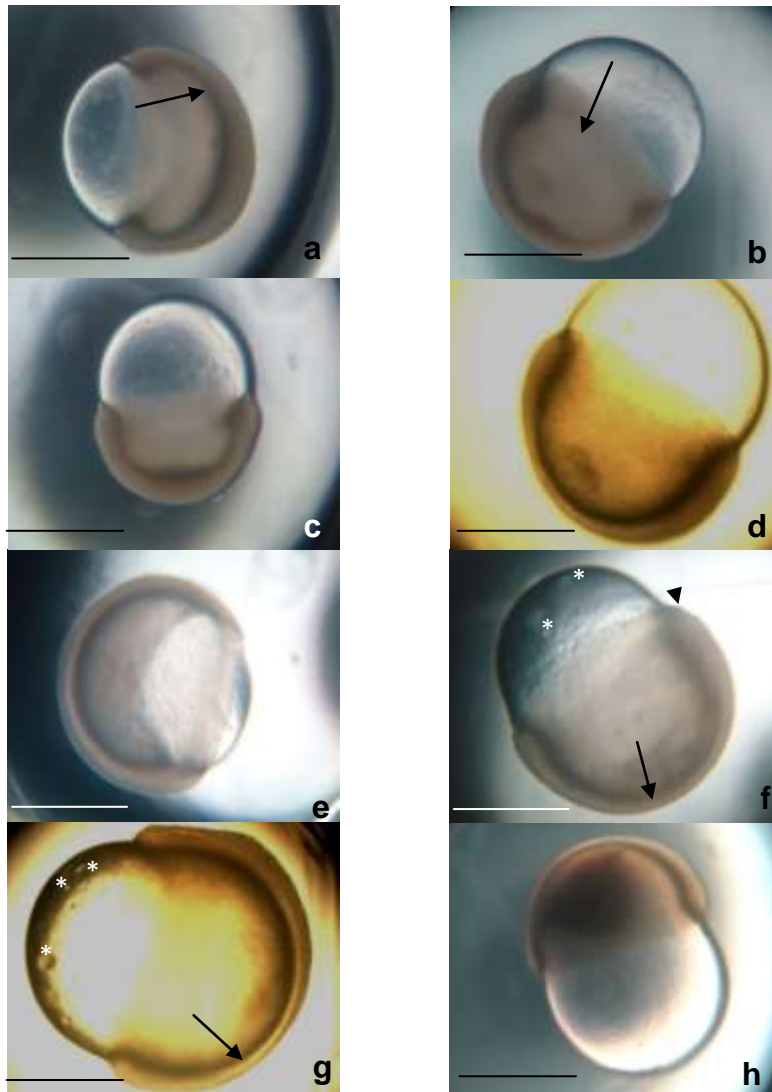


Figura 5 Gástrula de *P. lineatus* às 5,75 hpf em 24:00 (a, b, d, g), 00:24 (c, h) e 12:12 (e, f)

Nota: Placa precordial (a), anel germinativo (b). Embriões em 50% de epibolia e involução (c, d), gotas de óleo no vitelo no tratamento de 24:00 (d, g). Estágio de 75% de epibolia: zona fina de evacuação (seta em f, g) e escudo embrionário incipiente (cabeça de seta em f). Variações do desenvolvimento entre 00:24 e 12:12 (e, h). Asterico: gotas de óleo. (barras: 1 mm).

Às 7,75 hpf é visualizado o escudo embrionário e a blastoderma marginal no tampão do vitelo (figura 6a e 6d, respectivamente).

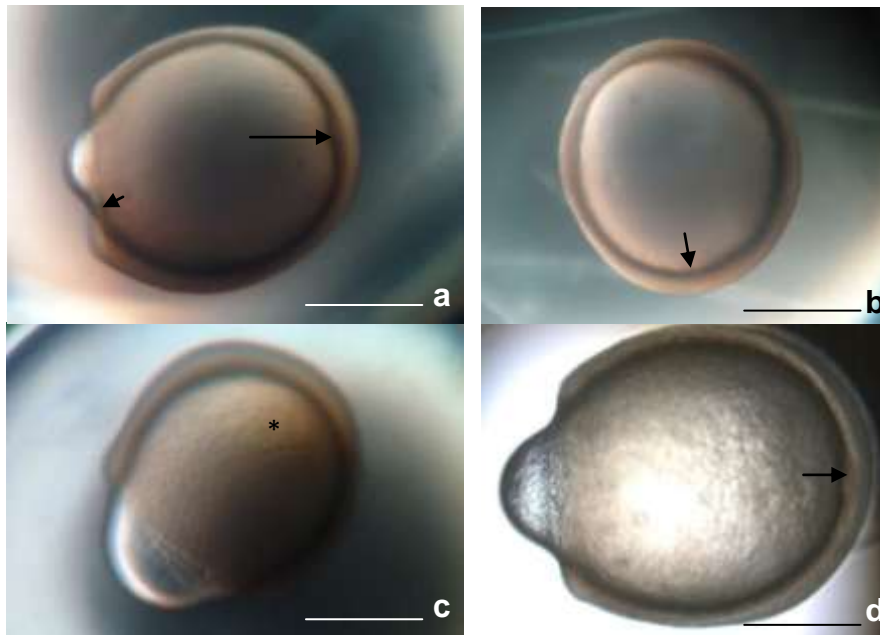


Figura 6 Gástrula em *P. lineatus* às 7.75 hpf em 24:00 (a), primórdio do escudo embrionário (seta horizontal), blastoderma marginal (cabeça de seta); 00:24 (b), anel germinativo; 12:12 (c, asterisco): duas gotas de óleo; 00:24 (b) e 12:12 (d): escudo embrionário

Nota: (barras: 1 mm).

3.5 Segmentação, organogênese e eclosão

Às 9,75 hpf foi atingido 100% de epibolia ou estágio de broto. Entre os estágios de 5 a 6 somitos se visualiza o primórdio cerebral (figura 7a) como um engrossamento na zona cefálica. Igualmente aparece de forma simultânea o primórdio das vesículas ótica e ótica iniciais (figura 7a). Também se observou o primórdio da vesícula de Kupffer.

É observado o primórdio da cabeça e da cauda (figura 7b, seta e cabeça de seta, respectivamente). Neste mesmo tempo aparecem os primeiros três somitos, os quais não são amostrados nas imagens.

Na figura 7c é mostrado um embrião do tratamento 00:24 com vestígio da vesícula ótica.



Figura 7 Segmentação em *P. lineatus* às 9.75 hpf em 24:00 (a): Primórdio cerebral (seta descendente na cabeça embrionária), primórdio da vesícula ótica (seta oblíqua) e da placoda ótica inicial (óvalo), primórdio da vesícula de Kupffer (seta descendente na zona caudal). 12:12 (b): primórdio da cabeça e da cauda (seta e cabeça de seta, respectivamente). 00:24 (c): vesícula ótica (seta)

Nota: Número de somitos: 3 – 6 (difícil visualização). (barras: 1 mm).

Às 11,75 hpf foi atingido o estágio de 14 somitos em 24:00 sendo visível o telencéfalo e a glândula de Kupffer mais definida na região caudal (figura 8a), assim como a glândula da eclosão (figura 8b).

Neste estágio os somitos iniciam uma configuração de “corno de cabra” e o vitelo tem forma de feijão ou de rim, o qual é indício do iminente começo da extensão do vitelo na zona caudal (figura 8c).

Em 00:24 no estágio de 12 somitos, aparece o primórdio do olho totalmente formado e o vestígio do cristalino ocular, bem como numerosas gotas de óleo na região caudal do embrião (figura 8d). Já na figura 8e no tratamento 12:12, em aproximadamente 10 somitos, se observou a presença de um sulco longitudinal (cabeça de seta) no que parece ser a evidência da fenda de Brachet, a qual separa o epiblasto do hipoblasto; igualmente se observa uma alta quantidade de gotas oleosas.

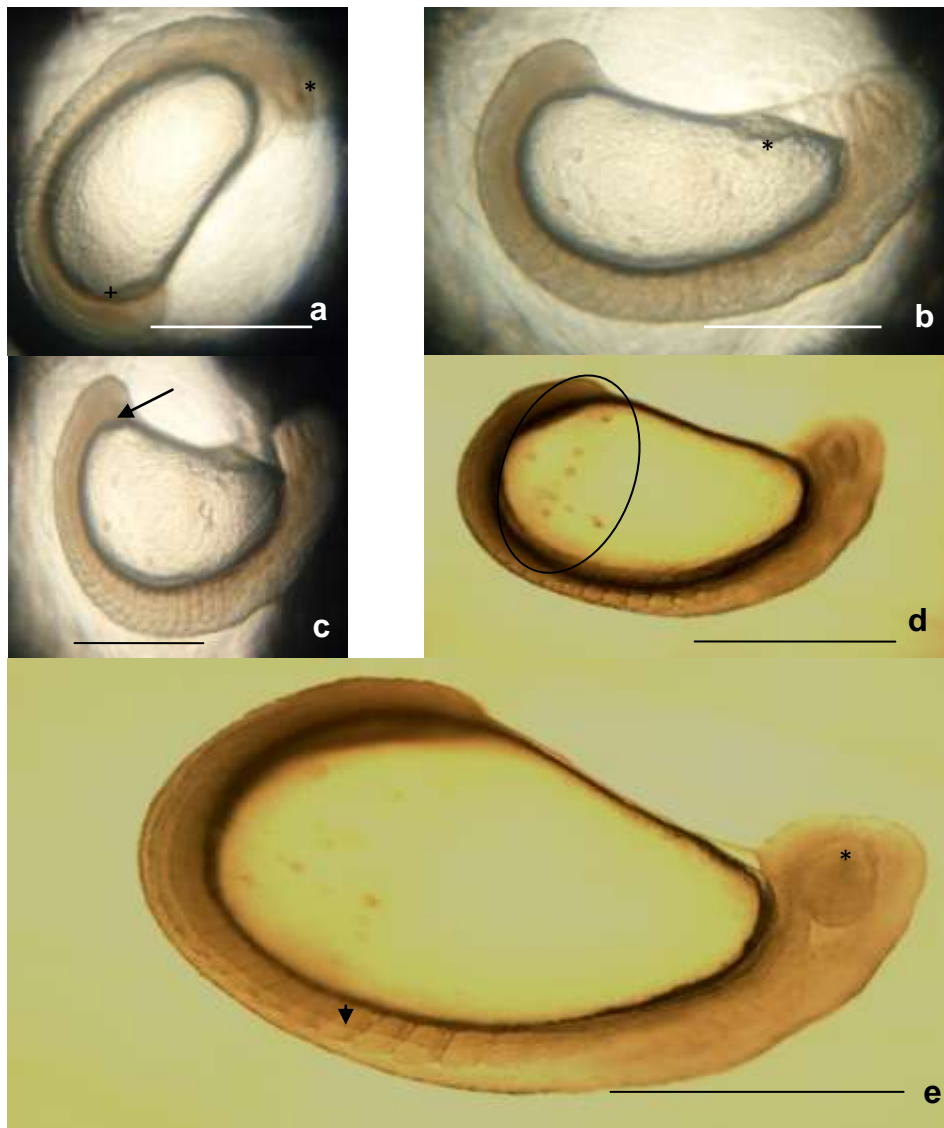


Figura 8 Segmentação em *P. lineatus* às 11.75 hpf em 24:00 (a): telencéfalo (seta branca), vesícula de Kupffer (seta preta); (b): glândula da eclosão (seta); (c): começo da extensão do vitelo na zona caudal (seta). 00:24 (d): vestígio do cristalino ocular (seta), gotas de óleo (óvalo). 12:12 (e): evidência da fenda de Brachet(?) (cabeça de seta), primórdio do cristalino (seta). (14 – 21); em 00:24 (12 - 18); em 12:12 (10 – 17)

Nota: (barras: 1 mm).

Às 13 hpf no tratamento 12:12, nos estágio de 18 – 20 somitos, é evidente o início da extensão da cauda (figura 9a), sendo mais evidente este fato em 20 somitos e estágios seguintes, pois se vê uma depressão clara no vitelo e o desprendimento da cauda (tratamento 00:24, figura 9b e 9c). No tratamento 24:00 nas horas e estágios seguintes continua o alongamento da cauda embrionária para gerar o tubo caudal do vitelo ao tempo que se configura o sistema nervoso central (figuras 9d – 9h). No SNC se destaca a formação ainda rudimentar do cérebro meio (seta inferior), epífise (rudimento do hipotálamo, seta horizontal inferior), mesencéfalo (seta horizontal superior), rombencéfalo (o cerebelo, seta descendente) com rombómeros ainda não evidentes, e o diencéfalo (seta ascendente) (figura 9d).

Igualmente neste tempo já está formada a nadadeira cartilaginosa do embrião (figura 9e), na qual pode se observar a iniciação da formação dos raios da mesma ou actinotriquia. Na figura 9e também é visível o conduto pronéfrico em formação adjacente à região onde se formará o ânus. Na figura 9f se visualiza a depressão da vesícula ótica, sem otólitos aparentes. Nas figuras 9g e 9h se observa o tubo caudal do vitelo com menos largura, assim como o avanço na formação do sistema digestivo (figura 9h).

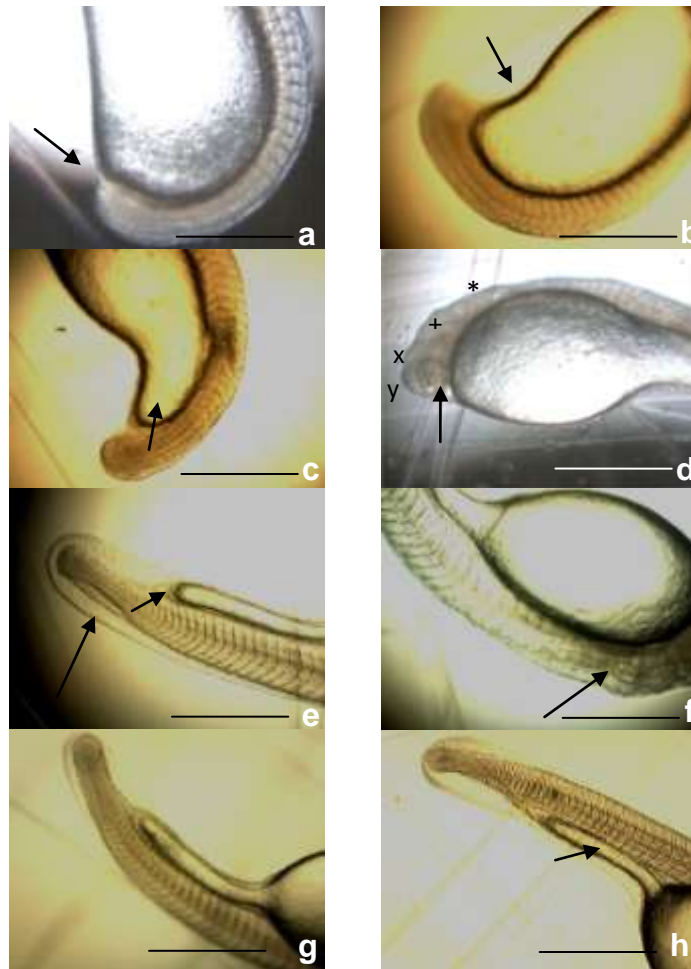


Figura 9 Segmentação em *P. lineatus* às 13 hpf em 12:12: início da extensão da cauda (a). 00:24 depressão no vitelo (b). Desprendimento da cauda (b, c). 24 h 00 min configuração do sistema nervoso central (d): rudimento do cérebro meio (seta inferior), epífise (rudimento do hipotálamo, seta horizontal inferior), mesencéfalo (seta horizontal superior), rombencéfalo (ou cerebello, seta descendente) com rombómeros ainda não evidentes, e o diencéfalo (seta ascendente), tubo caudal do vitelo (h), nadadeira cartilaginosa e conduto pronéfrico (9e, cabeça de seta), depressão da vesícula ótica sem otólitos (f). Tubo caudal do vitelo (9g, h), avanço do sistema digestivo (h)

Nota: Número de somitos: em 24:00 (20 – 30); em 00:24 (18 – 27); em 12:12 (16 – 26). (barras: 1 mm).

Na figura 10 se apresenta o embrião de curimba em 14 hpf. Visualiza-se o cérebro rudimentar mais evidente que em 13 hpf, junto com outras estruturas da região anterior do corpo como a vesícula óptica, o cristalino e a vesícula ótica (figura 10a), assim: Telencéfalo, epífise (parte ventral rudimento do hipotálamo), mesencéfalo, rombencéfalo ou cerebelo e diencéfalo. Na figura 10b é apresentada uma vista mais geral onde se indica o cerebelo faz parte do rombencéfalo, cérebro meio e o rombencéfalo. Além disso, se assinala a vesícula ótica com o início do aparecimento dos otólitos. No fundo das imagens se observa a membrana coriônica com dobraduras causadas pelo aumento da atividade muscular do embrião.

Na mesma figura 10 também há embriões com 16 hpf em estágios entre 30 – 42 somitos (figuras 10c – 10f) nos que se ressalta o aumento na frequência e na intensidade dos movimentos musculares (10c), os otólitos (10d, 10f) e da linha lateral (10f), lugar onde mais tarde se formará a abertura posterior do ânus (10e, seta preta) e o conduto pronéfrico perto do provável lugar de formação do ânus. Neste tempo se apresenta uma similaridade entre os tratamentos 24:00 e 00:24 no desenvolvimento embrionário de curimba (figuras 10a, 10b, 10d, 10e, 10f). A figura 10c corresponde ao desenvolvimento para o tratamento 12:12 que apresenta atraso quando comparado com os outros dois tratamentos.

Além disso, se aprecia uma marcada diferença entre os tratamentos de 24:00 e 00:24 respeito de 12:12 no tubo caudal do vitelo e outras estruturas morfológicas externas como os somitos. Os tempos em atingir cada estágio nos tratamentos se amostram na tabela 1.

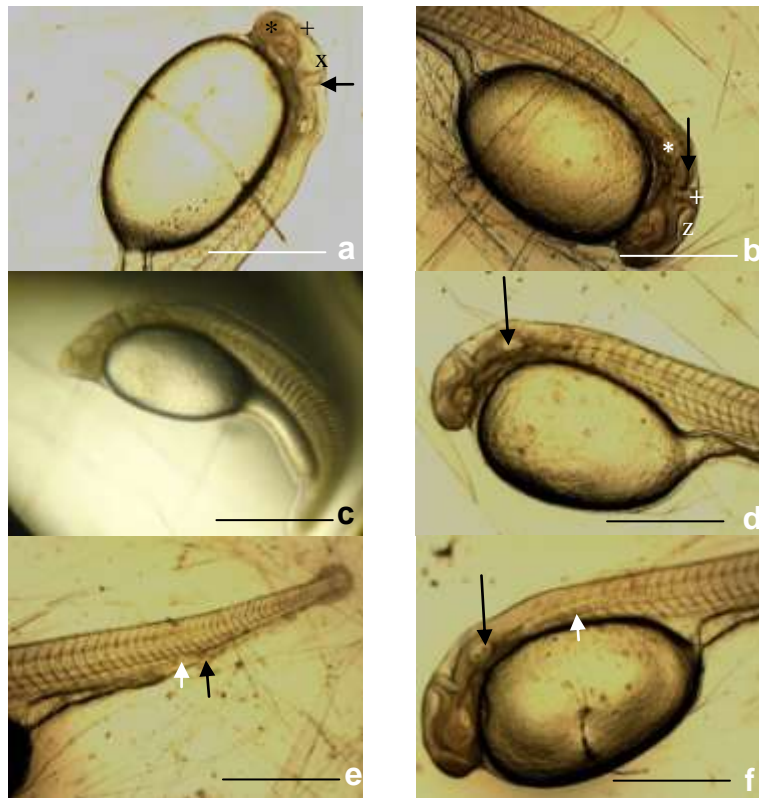


Figura 10 Segmentação e organogênese em *P. lineatus* às 14 hpf em 24:00 (a), 00:24 (b, d, e, f) e 12:12 (c). Além da vesícula óptica, o cristalino e a vesícula ótica, em (a) estão: Telencéfalo (seta horizontal esquerda), epífise (seta oblíqua superior), mesencéfalo (seta oblíqua do meio), rombencéfalo (seta horizontal direita) e diencéfalo (seta descendente vertical). Em b: cerebelo (seta horizontal superior), cérebro meio (seta horizontal inferior) e o rombencéfalo (seta descendente), vesícula e início dos otólitos (seta branca). c – f: embriões em 16 hpf. Em c: embrião retrasado em 12:12 quando comparado com os outros dois tratamentos. Otólitos (d, f), início da linha lateral (f, seta branca), lugar onde se formará o ânus (e, seta preta) e o conduto pronéfrico ou rins (e, seta branca) O tratamento 12:12 (c, ou prim-5) apresenta atraso quando comparado com os outros dois tratamentos

Nota: No fundo das imagens: membrana coriônica com dobraduras. Número de somitos: em 24:00 (38 – 42); em 00:24 (36 - 40); em 12:12 (30 – 33). (barras: 1 mm).

3.6 Taxas de fertilização

As taxas de fertilização foram de 94% em 24:00, de 95% em 00:24 e de 93% em 12:12.

3.7 Taxas de eclosão

A taxa de eclosão foi de 90% e 91% em 24:00 e 00:24, respectivamente, que aconteceu às 16,3 hpf, e às 17,5 hpf em 12:12, com taxa de eclosão de 93%.

Na figura 11 se observa a larva eclodida de *P. lineatus*, de aspecto translúcido e sem pigmentação ocular nem corporal. A diferença no tempo de eclosão entre os tratamentos de 24:00 e 00:24 foi de 1,2 h para o tratamento 12:12.

Também houve diferenças no comprimento total das larvas entre o tratamento 12 h 12 min quando comparado com 24:00 e 00:24 ($p < 0,04$). As médias de cada tratamento foram de $3,16 \pm 0,25$ mm (amplitude 2,7 – 3,6 mm) para 24:00; de $3,13 \pm 0,24$ (amplitude 2,7 – 3,8) para 00:24 e de $2,9 \pm 0,24$ (amplitude 2,4 – 3,5) para 12 h 12 min. Em todos os tratamentos as larvas eclodiram com uma quantidade de somitos similares, exceto para 24:00 onde esta quantidade foi maior com aproximadamente 38 a 42 somitos. No tratamento 00:24 foram contabilizados de 36 a 40 e em 12:12 de 35 a 39, sendo que em 12:12 este evento aconteceu 1,2 horas após.



Figura 11 Larva recém eclodida de *P. lineatus* com aproximadamente 42 somitos

Nota: (barra: 1 mm).

Tabela 1 Comparação do tempo do desenvolvimento embrionário de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos em relação com estudos prévios. SOG: segmentação e órgão - gênese

	Fotoperíodo (este estudo) 26,4±1 °C			Outros estudos (12:12)	
	00:24	24: 00	12:12	<i>P. Lineatus</i> (Botta et al., 2010). 25°C	<i>D. rerio</i> (Kimmel et al., 1995) 28,5 °C
Período	Horas pós-fertilização (hpf)			hpf	hpf
Zigoto	0,17	0,17	0,17	0,17	0 a 0,75
Clivagem	1,75 h	1,75	1,75	1,33 h	¼ a 2 ¼ h
Blástula	3,75 h	3,75	3,75-4,5	4,5 h	2 ¼ a 5 ¼
Gástrula	7,75	8,2	8,75	7	5¼-10 h
SOG	14,75	14,75	16,5	17	10-24 h
Eclosão	16,3	16,3	17,5	18	48-72 h

4 DISCUSSÃO

4.1 Período de zigoto

O espaço perivitelínico da curimba ($1,4 \pm 0,24$ mm) é maior que o de *Prochilodus magdalenae* ($0,92 \pm 0,37$ mm) reportado por Arias-Gallo, Jiménez-Segura e Dorado (2010), apesar de que estas duas espécies têm características ecológicas, morfológicas e fisiológicas similares. Mas esta diferença também pode se dever as variações do ambiente de fertilização nestes dois casos. Igualmente, poderia estar indicando que este amplo espaço possivelmente é uma característica do gênero *Prochilodus* e das espécies migradoras.

O grande tamanho do espaço perivitelínico na 0,5 hpf do período de zigoto pode ser explicado pela forte hidratação do ovo e como resposta adaptativa ao ambiente de migração da curimba. Assim, por estar exposto à correnteza, um maior espaço perivitelínico pode oferecer mais flotação e proteção ao embrião contra a forte movimentação e às agressões mecânicas do meio (LAALE, 1980). Este amplo espaço perivitelínico também é observado em outras espécies de peixes como *Pimelodus Grosskopffi* (VALBUENA et al., 2012) cujo diâmetro é de aproximadamente 1,0 mm e em piracanjuba que é de 1,95 mm (GANECO et al., 2008).

Durante este período se observou a diferenciação do pólo animal e vegetal em *P.lineatus*, sendo que o blastodisco tornou se elíptico. Esta configuração elipsoide permite predizer a orientação de cada clivagem sucessiva, as quais acontecem em planos perpendiculares, verticais, paralelos e horizontais, tomando como referência a região central da elipse. É dizer, a curimba tem ovos com abundante vitelo, ou telolécitos, com divisões meroblásticas parciais por se limitar ao pólo animal, semelhantes aos demais teleósteos.

Este padrão de clivagem foi previamente descrito para curimba por Ninhaus-Silveira, Foresti e Azevedo (2006) e para *Bricon cephalus* por Alexandre et al. (2009), até atingir os 64 blastômeros sob fotoperíodo natural. Esta forma do blastodisco e a orientação das clivagens são características em outros peixes como *Danio rerio*, *Pimelodus grosskopfii* e *Percilia gillissi* (KIMMEL et al., 1995; MONTOYA; ARIAS; OLIVERA-ANGEL, 2010; VALBUENA et al., 2012).

É de ressaltar que durante os períodos de zigoto e clivagem não houve diferenças no desenvolvimento embrionário de curimba entre os três tratamentos. Isto pode se dever a que nesses estágios iniciais as mudanças são pouco evidentes desde o ponto de vista morfológico.

O tempo em atingir as 64 células (1,75 hpf) nos três fotoperíodos do presente estudo foi maior que no experimento de Botta et al. (2010) para curimba que foi de 1,33 hpf e em uma temperatura experimental menor. Esta diferença neste estágio poderia ser atribuída a diversos fatores como a condição dos reprodutores, a qualidade da água, até o fato de usar indutores hormonais de distinta origem. Assim, no experimento de Botta et al. (2010) foi usado o estrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e no presente experimento usou se o estrato bruto de hipófise de catfish (EBHCf). O possível efeito destes indutores em experimentos com fotoperíodo poderia ser abordado em futuras pesquisas em curimba e outras espécies.

4.2 Blástula

Neste trabalho o período de blástula de *P. lineatus* em todos os tratamentos de fotoperíodo teve início às 2 hpf no estágio de 128 células sob uma temperatura $26,7 \pm 1$ °C. Este tempo é menor que o reportado por Ninhaus-Silveira, Foresti e Azevedo (2006) para a mesma espécie de 3 – 4 hpf a uma

temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12:12; mas quando estes autores fizeram o experimento sob 28 °C obtiveram um tempo similar (1,66 – 2 hpf) ao achado na presente pesquisa.

Ao redor das 4 hpf foi possível observar algumas diferenças entre os tratamentos, as quais podem ser atribuíveis ao efeito direto dos câmbios nos períodos de luz:escuridão. O maior desenvolvimento registrado nos embriões submetidos à escuridão ou à luz constante pode ser causado por um processo adaptativo gerado pela exposição permanente a uma destas duas condições fóticas.

Achados como os anteriores têm sido reportados recentemente em *Clarias gariepinus* por Britz e Pienaar (1992) e Mustapha et al. (2012), assim como em fotoperíodos longos em *Oreochromis niloticus* (VERAS, 2011). Não entanto, Almazan-Rueda et al. (2005) também encontraram que em escuridão permanente o crescimento em *C. gariepinus* não teve aumento.

Estes dados sugerem que as condições experimentais deveram ser bem controladas e estandardizadas na geração de pacotes tecnológicos em piscicultura nos que se inclua a manipulação do fotoperíodo como fator modulador da ontogenia.

Tendo em conta o anterior, em curimba se propõe um maior controle em todos os estágios do desenvolvimento embrionário, especialmente depois de atingir as 128 células, pois ao final da blástula ocorre a transcrição do genoma do embrião. Isto pode favorecer o seu processo adaptativo às mudanças ambientais geradas de forma controlada.

Deste modo, é possível que neste estágio o embrião possa responder às variações do fotoperíodo via plasticidade fenotípica (PF). Isto é, modificando a sua estrutura corporal em resposta às sinais variáveis do ambiente (SADEH et al., 2011), neste caso o fotoperíodo. Neste contexto, a International Union of Physiological Sciences - IUPS (2003) assinala que se a resposta ocorre por

condições induzidas experimentalmente o fenômeno chama se de adaptação fenotípica.

No presente trabalho é usado o conceito de adaptação fenotípica para um melhor entendimento do desenvolvimento embrionário da curimba em um ambiente fótico controlado.

Uma evidencia desta resposta adaptativa é a aparição das gotas de óleo nas primeiras horas da blástula em 24:00. Isto pode estar refletindo requerimentos metabólicos específicos maiores pelo efeito da luz constante. De fato, como indicado por Maciel (2006), o glóbulo de óleo tem um papel fisiológico fundamental no desenvolvimento ontogênico dos peixes, pois fornece energia para o crescimento e outros eventos metabólicos.

O início do estágio de domo (figura 3a) é o sinal claro do início da epibolia, o qual é um aspecto característico da blastulação. Em fotoperíodo de luz constante este estágio foi atingido em um tempo similar ao reportado por Botta et al. (2010) quem o reportaram às 4,5 hpf a 25 °C. Nos tratamentos de escuridão constante e 12:12 os embriões tiveram um menor desenvolvimento quando comparado com os dados de estes autores.

Em 30% de epibolia o blastodisco já pode se chamar de blastoderma. A largura do blastoderma não é uniforme, pois tem uma região mais plana que dará origem ao dorso do embrião. No final do período de blástula começa a expressão de genes. Por exemplo, o gene não – cauda (*ntl*) que é essencial no desenvolvimento da notocorda, continua a sua expressão durante a gástrula. Estes autores indicam que o gene *gooseoid* (*gsc*) também inicia a sua atividade durante a transição da blástula média (TBM) e a gastrulação, mas o *gsc* é expresso no hypoblasto axial (placa precordial) antes que seja expresso o *ntl* nas células da notocorda (SCHULTE-MERKER et al., 1994). Os anteriores pesquisadores sugerem que estes dois genes são independentes nas suas funções.

Os blastômeros marginais da membrana que envolve o blastodisco (EVL) se misturam durante o movimento epibólico, enquanto as células das camadas profundas marginais permanecem invariáveis (KIMMEL et al., 1995). A importância morfo-genética destas últimas células é que posteriormente darão origem ao mesoderma, ajudando a dar configuração morfológica ao embrião.

Finalmente, ressalta-se que o período de blástula inicia às 2 hpf acabando ao redor das 4,5 hpf com um desenvolvimento mais rápido no tratamento com luz constante (tabela 1). Este tempo é menor que o reportado por Ninhaus-Silveira, Foresti e Azevedo (2006) para curimba em fotoperíodo natural e em uma temperatura por cima da usada neste experimento. Isto ratifica que os fotoperíodos longos geram um desenvolvimento e crescimento mais acelerados em *P. lineatus*.

4.3 Gástrula

Em curimba este período inicia ao finalizar a gastrulação e se estende aproximadamente até as 8,75 hpf neste estudo sob fotoperíodo natural. Para a mesma espécie, Ninhaus-Silveira, Foresti e Azevedo (2006) determinaram em 6 hpf este período, mas em uma temperatura maior. Já em *B. cephalus* o período de gástrula está compreendido entre as 5 e as 6 hpf (ALEXANDRE et al., 2009).

O início da gastrulação é diferenciável porque os embriões estão em 50% de epibolia, com blastoderma de largura uniforme e se observa o movimento morfo-genético de involução. Além, a configuração da zona fina de evacuação e do broto do escudo embrionário é originada pelo movimento morfo-genético de convergência.

Assim, o escudo embrionário é gerado pelos movimentos morfogenéticos de convergência e durante este estágio a epibolia para momentaneamente e depois continua o movimento do blastoderma até cobrir

totalmente a gema. Também pode se observar o blastoderma marginal que fechará sobre o tampão da gema (figura 6a). Em curimba estas duas estruturas surgiram primeiras no tratamento 24:00, o qual é evidência da sensibilidade dos embriões de curimba às mudanças dos regimes de luz e escuridão.

O anterior também reflete no surgimento de outras estruturas embrionárias em tempos diferentes segundo cada tratamento. Assim, o anel germinativo se forma pelo dobramento do blastoderma sobre se mesmo, originando-se duas capas: o epiblasto e o hypoblasto. O hypoblasto axial formará a cabeça e o hypoblasto paraxial os músculos que movimentam olhos, as mandíbulas e as brânquias; depois se formaram os somitos. O epiblasto dorsal se engrossa e origina a placa neural e a placa neural produzirá o rudimento do SNC. Em curimba estas estruturas tiveram um atraso na sua formação no tratamento 00:24 si comparadas com o tratamento 24:00.

Além, no estágio de 90% de epibolia pode se visualizar o hypoblasto axial da placa precordial, ou seja, é possível distinguir histologicamente o hypoblasto paraxial e o epiblasto separados pela fenda de Brachet (BALLARD; GINSBERG, 1980). As células que permanecem no epiblasto ao finalizar a gastrulação darão origem a epiderme, sistema nervoso central, cresta neural e as placodas sensoriais.

O hipoblasto gerará a mesoderma e a endoderma. O hypoblasto paraxial anterior gerará os músculos oculares, as mandíbulas e as brânquias. O hypoblasto paraxial posterior gerará os somitos, que em curimba podem atingir o número até de 47 entre as fases de embrião e larva.

A zona delgada de evacuação é produzida pela migração celular para o dorso do epiblasto onde se formará a placa neural (KIMMEL et al., 1995). Isto assinala a formação do eixo ântero-posterior do embrião. Em *P. lineatus* esta zona pode se observar na figura 5f e 5g.

Quando aparece o escudo embrionário, o embrião se apresenta mais alongado e as suas primeiras células, que expressam o gene *Gooseoid*, parecem corresponder aos precursores da placa precordial dos tetrápodes que dará origem à glândula da eclosão (8b).

Já no estágio de 90% de epibolia se dá a extensão da placa precordial, tendo muitas células pós-mitóticas que darão origem à notocorda, músculos axiais somitos-derivados e neurônios específicos no cérebro posterior (rombencéfalo). Dentre estas células nervosas podem se citar os neurônios de Mauthner, de grande importância na locomoção, os quais serão abordados na discussão dos períodos de segmentação e organogênese.

4.4 Taxas de fertilização, Segmentação, Organogênese e a Eclosão

Após atingir o 100% de epibolia (estágio de broto), as células posteriores da placa neural darão origem ao tronco da medula espinal.

Além, a aparição dos primeiros somitos é bastante rápida e às vezes de difícil visualização em *P. lineatus* (presente estudo) e em outras espécies como *Danio rerio* (KIMMEL et al., 1995) e em *Pseudoplatystoma spp* (FAUSTINO et al., 2010). Assim, em *D. rerio* a taxa de aparição é de três somitos a cada hora para os primeiros seis somitos e de dois por hora para a formação dos seguintes a 28,5 em zebrafish.

Em curimba os somitos apareceram a uma taxa de entre 5 – 7 somitos por hora, dependendo do tratamento. Desta forma, tendo em conta os dados da tabela 1 e a quantidade de somitos encontrada, para 24:00 a taxa foi de 6,74 somitos/hora, para 00:24 foi de 6,2 somitos/hora e para 12:12 de 5,4 somitos/hora. Isto indica a existência de um desenvolvimento acelerado de curimba quando comparado com zebrafish, o qual é característico dos peixes de piracema (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010).

O primeiro e o segundo somito aparecem quando tem finalizado a epibolia e aparece o broto da cauda (KIMMEL et al., 1995), que em zebrafish acontece às 10,3 hpf. A maior parte das células interiores dos somitos originará um miótomo, miómero ou segmento de músculo. Cada miótomo é separado por um miosepto de tecido conetivo. Também os somitos dão origem ao esclerotomo que vá a produzir posteriormente à cartilagem vertebral.

Em *P. lineatus* no estágio de 5 a 6 somitos o primórdio cerebral aparece como um engrossamento na zona cefálica e o primórdio da vesícula óptica com forma elíptica, às 9,75 hpf. Ambos os primórdios em zebrafish aparecem quase no mesmo estágio (entre os estágios de 4 – 5 somitos, às 11,65 hpf aproximadamente). Igualmente em curimba é observada a placoda ótica, estrutura que em zebrafish está totalmente definida no estágio de 10 somitos. Talvez isto aconteça por zebrafish ter um período de desenvolvimento embrionário muito maior. Neste estágio o embrião de zebrafish mede ao redor de 0,8 mm de comprimento, quase a mesma medida do zigoto. Isto indica que o crescimento nesta etapa é relegado pela formação de estruturas chaves como o sistema nervoso e o sistema sensorial.

É importante ressaltar que tanto o primórdio da vesícula óptica quanto à placoda ótica surgem de forma simultânea em *P. lineatus*. Isto pode ser devido a que o embrião em desenvolvimento está se preparando para a resposta aos estímulos do meio externo.

De igual maneira o primórdio da vesícula de Kupffer é evidente neste estágio, a qual é expressa pelo gene *wdr 18* (GAO et al., 2011), é dizer, a transcrição genética iniciada ao final da blástula continua. Esta vesícula aparece mais desenvolvida em curimba quase no mesmo intervalo de tempo (12 – 18 somitos) que em zebrafish. Mas em curimba aparece primeiro no tratamento 24:00.

A vesícula de Kupffer é uma estrutura embrionária somente presente em embriões de teleósteos e a sua função é ainda discutida (KIMMEL et al., 1995). Tem recebido a denominação de rudimento alantóide até participação na formação da notocorda e do músculo (MELBY; HO; KIMMEL, 1993). O achado de Gao et al. (2011) indica que a participação do gene *wdr 18* pode ajudar a formar a vesícula mesma, o qual faz um aporte importante nesta discussão, pois este gene também participa no processo de lateralização de *Danio rerio*.

Em *P. lineatus*, a glândula da eclosão, que apareceu em 11,75 hpf em 24:00, é o principal derivado da placa precordial. Esta glândula está sobre o vitelo e embaixo da cabeça embrionária (ver figura 8b), tem grânulos que durante a fase de faríngula provavelmente libera enzimas que ajudam no processo da eclosão (KIMMEL et al., 1995). Resultaria interessante fazer estudos histológicos e histoquímicos desta estrutura em curimba para saber de que maneira o fotoperíodo afeta sua atividade enzimática.

A presença de um maior número de gotas de óleo sobre o vitelo em quantidade maior no período de segmentação e órgão-gênese evidencia a alta demanda energética produto de um elevado metabolismo na fase embrionária. Os somitos gerados apresentam configuração de “corno de cabra” no eixo dorso-lateral do embrião e o vitelo tem forma de feijão ou de rim, o qual é indício do começo da extensão da cauda e da gema junto com a cauda.

No estágio de 12 somitos aproximadamente aparece o primórdio do olho totalmente formado em curimba (figura 8d, 8e), o qual em zebrafish é totalmente visível no estágio de nove somitos. Esta diferença na aparição de algumas estruturas e movimentos morfogenéticos é também espécie-específica e pode estar relacionada com a carga genética e às características ecológicas de cada táxon.

Em curimba o telencéfalo é formado no estágio de 16 somitos aproximadamente no tratamento de 24:00 (figura 8a), aparecendo antes que o telencéfalo de zebrafish, no qual esta estrutura é visível no estágio de 18 somitos às 18 hpf.

Também em 16 somitos pode se apreciar o primórdio do cristalino, um sulco longitudinal que parece ser a fenda de Brachet (8e), a qual é o limite entre o epiblasto e o hypoblasto. A fenda de Brachet é visível em zebrafish no estágio de 75% de epibolia (KIMMEL et al., 1995). Na fase embrionária de *P. lineatus* os olhos encontram-se sem pigmentação, contrário ao reportado recentemente para os olhos dos embriões de outros peixes como *Percilia gillisi* que estão pigmentados (MONTROYA; ARIAS; OLIVERA-ANGEL, 2010).

No tratamento 24:00 no estágio de 18 somitos há início da extensão da cauda em *P. lineatus*. Em curimba o processo é mais evidente no estágio de 20 somitos, quando o alongamento caudal é maior e se apresenta uma depressão na porção meio-caudal do vitelo (figura 9). Em zebrafish este movimento inicia quando o embrião tem 14 - 16 somitos e 16 hpf, sendo mais evidente o alongamento no estágio de 20 somitos às 19 hpf. Quando o embrião toma esta configuração, o seu tamanho aumenta consideravelmente, o qual foi observado nesta pesquisa.

No tratamento 24:00 se formam os rudimentos do SNC, sendo de particular importância o rombencéfalo e os sete rombómeros que o conformam. Estes rombómeros estão formados por fibras gliáis e axônios da comissura (TREVARROW; MARKS; KIMMEL, 1990). Os rombómeros morfológicamente são observáveis no estado de larva as 15 e 29,5 horas pós-eclosão (ver no capítulo seguinte, figura 2d), mas a sua funcionalidade inicia horas antes, pois está vinculada à locomoção. Em *Pseudoplatystoma spp.* o rombencéfalo surge entre as 11 e 12 hpf (FAUSTINO et al., 2010).

O avanço do desenvolvimento embrionário em curimba neste estágio evidencia o preparo do embrião para a vida livre. Assim, nesta estrutura inicia a formação da nadadeira cartilaginosa, com evidência de início da actinotriquia na região ventral da nadadeira caudal no estágio de 20 somitos aproximadamente (figura 9e). Esta característica é similar em zebrafish, com a diferença de que em esta última espécie também há presença de melanóforos tanto nos olhos (primeiro) quanto ao longo do corpo (após), o que acontece no estágio high-pec às 42 hpf, é dizer, perto da eclosão. Em *P. lineatus*, ao anterior se soma o aparecimento do conduto pronéfrico que chega até o final do tubo caudal do vitelo, perto do lugar onde se formará o ânus (figura 9e).

Em curimba neste estágio se inicia a conformação do sistema digestivo sem formação do ânus, o qual se forma no fotoperíodo de larva. Este fato é diferente do que acontece em zebrafish no que o tubo digestivo e a abertura do ânus se formam nos estágios entre 21 a 26 somitos da fase embrionária, entre as 20 e 25 hpf. A depressão na vesícula ótica em curimba é claramente visível no estágio de 20 somitos em 13 hpf (9f); em zebrafish esta depressão é observável no estágio de 19 somitos às 18,5 hpf. Neste instante do desenvolvimento os otólitos são de difícil observação em *P. lineatus* e o cérebro tem espaços no seu interior, incluindo o rombencéfalo ou cérebro posterior.

Após da configuração morfológica do sistema neuronal segue a sua funcionalidade. Assim, o neurônio de Mauthner situado no rombencéfalo estende os seus axônios à medula espinal no final da segmentação (KIMMEL et al., 1995). Realmente trata se de dois neurônios de grande tamanho que em osteíctes são os responsáveis da coordenação natatória e da resposta de fuga. Isto permite ao embrião, poucas horas depois, dar respostas comportamentais reflexas como, por exemplo, a movimentação ante um toque sutil sobre a cabeça. Esta capacidade de resposta é mais ou menos evidente em zebrafish às

18 hpf, o seja, no estágio de 18 somitos, mas só é desenvolvido plenamente no período de farínghula.

A evidência da funcionalidade dos neurônios de Mauthner é importante para determinar o grau de resposta neuromuscular ativa dos embriões de curimba neste trabalho e de suas larvas.

O período de farínghula para curimba nesta pesquisa foi nomeado a partir da observação dos anteriores eventos morfológicos e funcionais observados no SNC, pois é quando pode se falar de uma simetria bilateral relativa, a pesar de não apresentar ainda nadadeiras ou vestígios das mesmas antes da eclosão. Mas neste ponto de desenvolvimento já se observa um plano bilateral bastante definido na morfologia corporal do embrião.

Por exemplo, além da simetria externa, ao nível interno também há uma abertura de espaços do sistema nervoso central (SNC), definição do sistema digestivo e, logo após da eclosão, do sistema cardiovascular. O sistema muscular também se configura antes de eclodir, sendo que cada somito gerará um miotomo a cada lado da conformação bilateral do embrião. Este período se inicia no estágio de prim-5 às 24 hpf em zebrafish, que em curimba acontece ao redor das 14 hpf durante o período de farínghula. Às 14 hpf também aparecem na vesícula ótica de curimba os otólitos. Estas estruturas auditivas surgem às 15,5 hpf em *Bricon orbygnianus* (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004), o que demonstra que as taxas do desenvolvimento sensorial também são específicas para cada espécie, ainda dentro de uma mesma família.

Além disso, existe uma grande diferença do embrião de curimba com o de zebrafish e outras espécies na forma do vitelo. Em curimba a forma é elíptica e em zebrafish e *Percilia gillissi* é arredondada, isto faz que o ângulo de curvatura do embrião de curimba seja menor si comparado com as mencionadas espécies.

Nos estágios prim-5 a prim-10 da curimba o tubo de vitelo caudal apresenta o mesmo comprimento que a bola de vitelo, o qual também é observado em zebrafish nestes mesmos estágios. Igualmente, em ambas as espécies se observam os movimentos musculares embrionários nesse tempo.

Nos estágios de 26 somitos até a eclosão há uma diferenciação total da placoda ótica e dos otólitos em *P. lineatus*. Em *P. magdalenae* tem sido reportada a formação da placoda ótica ao momento da eclosão, sem indicar a presença de otólitos (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010). Esta descrição embrionária em particular merece ser revisada tendo em conta que o trabalho destes autores estava focado a descrever as larvas da espécie.

Em zebrafish quando os otólitos são totalmente visíveis, já têm aparecido melanóforos ao redor da placoda ótica, pigmentação que em *P. lineatus* é visível no período larval. Ou seja, pode se pensar que, como muitos outros, o processo de pigmentação trata-se de um evento espécie-específica. Igualmente, o primórdio da linha lateral em zebrafish inicia às 25 hpf no estágio prim-6, junto com a glândula da eclosão a qual também foi identificada em um estágio anterior em *P. lineatus*, pois foi observada cerca do estágio de 18 somitos (figura 8b). Em curimba esta estrutura se formou mais rápido no tratamento de 24:00, ao igual que a maioria das estruturas chaves do desenvolvimento embrionário desta espécie.

No estágio prim-15 da curimba o tubo do vitelo caudal permanece aproximadamente do mesmo comprimento que a bola de vitelo e se apresenta um incremento do tamanho corporal. Isto também é visível em zebrafish que neste estágio tem os primórdios das nadadeiras peitorais e também há migração dos melanóforos à cabeça e à parte dorsal do vitelo (30 hpf) (KIMMEL et al., 1995).

Em curimba no estágio de 20 somitos se iniciam os movimentos musculares, o qual é indício da funcionalidade do sistema nervoso. Além, é uma

circunstância que assinala a preparação à eclosão. Em zebrafish isto ocorre neste mesmo estágio, mas existe evidencia de se apresentar os primeiros movimentos desde o estágio de 17 somitos. O primórdio do coração e os batimentos cardíacos não são evidentes durante a fase embrionária em *P. lineatus*, só são observados em aproximadamente uma hora após da eclosão, já no estado de larva. Em *Danio rerio* o vestígio do coração aparece no estágio embrionário prim-16, às 31 hpf e antes da eclosão há uma alta produção de células sanguíneas.

A partir do Estágio prim-25, às 36 hpf, em zebrafish os melanóforos cobrem também a parte lateral e dorsal do vitelo. O sistema cardiovascular é mais definido com uma circulação evidente, que inclui o vitelo. Este último fato ocorre em curimba só na fase de larva, quando pode se observar a circulação e a hematopoiese (capítulo seguinte). O aspecto que comparte a curimba neste estágio com *Danio rerio* é o aumento na resposta ou reflexo de escape, a qual também se acentua na curimba.

No estágio high-pec às 42 hpf em zebrafish se apresenta uma alta resposta locomotora aos estímulos suaves. Em curimba também existe esta alta sensibilidade aos estímulos luminosos e mecânicos, evidenciando o avanço na maturação do sistema nervoso.

4.5 Eclosão

A curimba apresenta um tempo relativamente curto em atingir o estágio de larva. Isto é um aspecto característico das espécies migradoras com alta fecundidade, sem cuidados parentais e que sua reprodução é de tipo sazonal (VANDEWAALLE et al., 2005). A diferença em tamanho das larvas de *P. lineatus* nos diferentes fotoperíodos reflexa a sensibilidade desta espécie nas suas primeiras fases da sua ontogenia a este fator ambiental.

O tempo da eclosão de *P. lineatus* nos três tratamentos desta pesquisa é maior que em *P. magdalenae* (14 hpf) e em outras espécies da família Characidae como *Bricon cephalus* e *B. orbygnianus* que oscila entre 11 e 14 hpf (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; MACIEL, 2006; NAKATANI et al., 2001).

O maior crescimento e desenvolvimento da curimba na etapa embrionária nos fotoperíodos de 24:00 e 00:24 pode ser explicado de diferentes maneiras. Assim, os embriões com luz constante foram submetidos inicialmente a estresse lumínico, mas após fizeram os ajustes metabólicos necessários para manter a homeostase. Isto tem sido reportado recentemente em estes dois mesmos fotoperíodos em juvenis de *Clarias gariepinus* (MUSTAPHA et al., 2012). Estes autores explicam o maior crescimento por um processo de adaptação a um ambiente constante, luz ou escuridão. Mas no caso dos animais submetidos à escuridão permanente, também a redução do estresse e da mobilidade, pode levar a uma melhor conversão alimentar. No caso dos embriões de curimba isso poderia se traduzir em um melhor aproveitamento dos nutrientes do vitelo e das gotas de óleo.

Já no fotoperíodo 12:12, as constantes mudanças ambientais impedem esse mecanismo adaptativo, refletindo numa menor taxa de crescimento e desenvolvimento devido a uma maior variabilidade fisiológica e metabólica (MUSTAPHA et al., 2012).

É de ressaltar que também têm se encontrado resultados contraditórios em estudos sobre o efeito de fotoperíodos constantes sobre o crescimento de teleósteos. Almazan-Rueda et al. (2005) acharam que sob escuridão constante o crescimento em *C. gariepinus* não aumentou; o contrário ao encontrado na mesma espécie por Britz e Pienaar (1992) que registram um aumento na taxa de crescimento sob as mesmas condições.

O período de eclosão dos embriões de curimba, como as fases anteriores, foi influenciado pelo fotoperíodo, sendo maior o tempo da eclosão no tratamento de luz:escuridão de 12:12. No caso de curimba, pode se dizer que este fotoperíodo é um bom índice para nomear o desenvolvimento embrionário, a pesar de que não há uma sincronização na saída das larvas da membrana coriônica. Em peixes como zebrafish não é recomendável o anterior porque os embriões de uma mesma desova podem ter diferenças de até 24 horas para sair do corion (KIMMEL et al., 1995). Em curimba se observou diferenças de duas horas no máximo, as quais não afetam os resultados das observações, já que o embrião continua em desenvolvimento nesse tempo.

Após da eclosão as larvas de curimba estão viradas lateralmente e com pouca movimentação, a qual aumenta com a aparição dos batimentos cardíacos. Estes batimentos iniciam em zebrafish logo após da pigmentação dos olhos ainda na fase de embrião (KIMMEL et al., 1995).

A larva da curimba é uma larva translúcida, com saco do vitelo elíptico e apêndice tubular. A bola vitelínica elíptica e o vitelo apendicular são também evidentes em outras espécies como pacu e dourado (MACIEL, 2006).

As larvas de curimba eclodem sem pigmentação ocular nem corporal, característica que é compartilhada com *P. magdalenae* nesta mesma fase (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010). Isto demonstra que existe pouca diferença morfológica entre as espécies do gênero *Prochilodus*, sendo um aspecto problemático na avaliação taxonômica e ecológica do grupo do ponto de vista eco-fenotípico (RENNO et al., 2005). Daí a importância de usar múltiplas variáveis morfológicas e morfométricas visando uma maior abrangência desta problemática, como foi realizado no presente estudo.

Em piracanjuba (*Bricon orbygnianus*), do mesmo grupo dos Characiformes, tem se reportado pouca pigmentação nos olhos ao eclodir e ausência desta no corpo (NAKATANI et al., 2001). Já em *B. cephalus* se

evidencia uma leve pigmentação corporal, sendo mais definida na região ocular (ROMAGOSA; NARAHARA; FENERICH-VERANI, 2001). Esta despigmentação total das larvas de curimba recém eclodidas também pode explicar alguns aspectos ecológicos relacionados com a sobrevivência. Assim, as larvas de curimba poderiam evitar os predadores, pois nesta fase inicial apresentam uma alta vulnerabilidade ao permanecerem viradas lateralmente e com pouca capacidade locomotora.

A ausência de pigmentação em curimba é diferente se comparada com outras espécies de teleósteos. Em *Basilichthys australis* desde a fase de embrião existe evidência de melanóforos tanto na região cefálica quanto nos olhos (MONTROYA; ARIAS; OLIVERA-ANGEL, 2010). Também em *Danio rerio* os melanóforos e iridóforos estão presentes na zona lateral do corpo e na retina, respectivamente, mas estes surgem no sentido ântero-posterior, similar a como ocorre em *P. lineatus* na fase de larva. Igualmente ao eclodir o zebrafish tem coloração amarela na cabeça e presença de neuromastos na linha lateral; estas últimas estruturas da linha lateral podem estar também em *P. lineatus* nesta fase, mas não foi determinado nesta pesquisa, daí que seja sugerido fazer o estudo histológico em futuros trabalhos.

O número de pares de somitos é variável em curimba sendo sua quantidade estimada entre 42 a 47 entre o momento da eclosão e a reabsorção do vitelo (próximo capítulo). Em zebrafish a quantidade de somitos é de 30 a 34 pares, mas trata se de um peixe de menor tamanho, o qual pode ser a causa. Daí que também se sugere que futuros estudos sejam feitos para esclarecer este aspecto.

O avanço da actinotriquia no momento da eclosão é pouco evidente em curimba, contrário a zebrafish que tem uma marcada formação dos raios da nadadeira caudal (KIMMEL et al., 1995), o que também indica que trata se de outro evento particular da ontogenia de cada espécie.

Os resultados demonstram que existe influência do fotoperíodo sobre o desenvolvimento e o crescimento embrionário da curimba em condições laboratoriais a partir das 4 hpf, ou seja, ocorre somente nos estágios mais avançados de desenvolvimento embrionário. As diferenças como estas encontradas entre algumas espécies de teleósteos podem se atribuir às necessidades particulares do fotoperíodo em cada táxon. Isto também vai depender da fase do desenvolvimento do organismo (SILVA-GARCIA, 1996).

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, J. S. et al. Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Zygote*: Cambridge University, 2009. 11 p.

ALMAZAN-RUEDA, P. et al. Photoperiod affects growth, behavior and stress variables in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, London, v. 67, n. 4, p. 1029-1039, Oct. 2005.

ARAL, F.; ŞAHİNÖZ, E.; DOĞU, Z. A study on the milt quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Southeastern. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Ankara, v. 7, n. 1, p. 41-44, 2007.

ARIAS-GALLO, M.; JIMÉNEZ-SEGURA, L. F.; DORADO, M. P. Desarrollo larval de *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, 1879) (Pisces: Prochilodontidae), Río Magdalena, Colombia. *Actual Biology*, Charlottesville, v. 32, n. 93, p. 199-208, 2010.

BALLARD, W. W.; GINSBERG, A. S. Mophogenetic movements in acipenserid embryos. *Journal of Experimental Zoology*, New York, v. 213, p. 69-116, 1980.

BOTERO, M. et al. Descripción del desarrollo embrionario de cigotas híbridas obtenidas 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, n. 1, p. 38-45, 2004.

BOTTA, P. et al. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). *Archivos de Medicina Veterinaria*, Valdivia, v. 42, n. 2, p. 109-114, 2010.

BRITZ, P. J.; PIENAAR, A. G. Laboratory experiments on the effect of light and cover on the behavior and growth of African catfish *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Journal of Zoology*, London, v. 227, n. 1, p. 43-62, May 1992.

FAUSTINO, F. et al. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids. International Journal of Developmental Biology, Washington, v. 54, n. 4, p. 723-730, 2010.

GANECO, L. N. et al. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. Zygote, Cambridge, v. 17, p. 93-99, May 2008.

GAO, W. et al. Wdr18 is required for kupffer's vesicle formation and regulation of body Asymmetry in Zebrafish. PLoS ONE, San Francisco, v. 6, n. 8, p. 1-12, Aug. 2011.

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

JOHNSTON, I. I.; VERA, V. V.; ABERCROMBY, M. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. Journal of Experimental Biology, Cambridge, v. 198, n. 6, p. 1389-403, 1995.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LAALE, W. H. The perivitelline space and egg envelopes of Bony fishes: a review. Copeia, Lawrence, v. 2, p. 210-226, 1980.

MACIEL, C. M. R. R. Ontogenia das larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus*, Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). 2006. 244 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

MELBY, A. E.; HO, R. K.; KIMMEL, C. B. An identifiable domain of tail-forming cells in the zebrafish gastrula. ITS World, Brussels, v. 19, p. 445, 1993. Abstract

MONTOYA, G. et al. Primeros estadíos del ciclo de vida de peces nativos del Río San Pedro, Cuenca del Río Valdivia, Chile. Gayana, Concepción, v. 76, n. 1, p. 86-100, 2012.

MUSTAPHA, M. K. et al. Effects of three different photoperiods on the growth and body coloration of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Archives of Polish Fisheries, Warsaw, v. 20, n. 1, p. 55-59, Apr. 2012.

NAKATANI, K. et al. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). Zygote, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 217-229, Aug. 2006.

RAD, F. et al. Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture, Amsterdam, v. 255, n. 1/4, p. 292-300, May 2006.

RENNO, J. F. et al. Biología de las poblaciones de peces de la Amazonía y piscicultura. In: COLOQUIO DE LA RED DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA ICTIOFAUNA AMAZÓNICA, 2., 2005, Manaus. Anais... Manaus: RIIA, 2005. Disponível em: <http://www.riiaamazonia.org/PUBS/RIIA_II_Textos.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2012.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, v. 26, n. 1, p. 67-71, 2004.

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.

SADEH, A. et al. Compensatory development and costs of plasticity: larval responses to desiccated conspecifics. PLoS ONE, San Francisco, v. 6, n. 1, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015602>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

SCHULTE-MERKER, S. et al. No tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development*, Cambridge, v. 120, n. 4, p. 1009-1015, Apr. 1994.

SILVA-GARCIA, A. J. Growth of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared under different photoperiod regimes. *Israel Journal of Aquaculture*, Bamidgeh, v. 48, n. 1, p. 84-93, 1996.

TREVARROW, B.; MARKS, D. L.; KIMMEL, C. B. Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron*, Maryland, v. 4, n. 5, p. 669-679, May 1990.

VALBUENA, V. R. D. et al. Desarrollo embrionario del capaz *Pimelodus grosskopfii* (Steindachner, 1879). *International Journal of Morphology*, Temuco, v. 30, n. 1, p. 150-156, 2012.

VANDEWALLE, P. et al. Early development of the head skeleton in *Brycon moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae). *Journal of Fish Biology*, London, v. 66, n. 4, p. 996-1024, 2005.

VERAS, G. C. Fotoperíodos no comportamento locomotor e desenvolvimento de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2011. 97 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CAPÍTULO 5 Ontogenia larval de curimba (*Prochilodus lineatus*) sob diferentes fotoperíodos

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito de três fotoperíodos sobre o desenvolvimento e o crescimento das larvas de *Prochilodus lineatus* desde a eclosão até a reabsorção do vitelo. Foram usados 1350 larvas recém eclodidas submetidas a regimes de luz:escuridão (24:00, 00:24 e 12:12), sendo 450 larvas em cada tratamento e alocadas em incubadoras experimentais com areação e iluminação (1100 lux) artificiais. Foi monitorado o pH ($7,3 \pm 1$), Oxigênio dissolvido ($8,7 \pm 1,8 \text{ mg L}^{-1}$) e temperatura ($26,4 \pm 1^\circ\text{C}$) da água. Avaliaram-se os principais eventos do desenvolvimento e se determinou o crescimento relativo ou alométrico em diferentes períodos. O desenvolvimento das larvas foi descrito e nomeado em horas pós – eclosão (hpe) e monitorado em microscópio óptico com câmera incorporada. As larvas dos regimes 24:00 e 00:24 atingiram a eclosão antes que as de 12:12. O regime de luz constante acelerou o desenvolvimento e crescimento das larvas de curimba, as quais reabsorveram mais rápido o vitelo em 24:00 (42,5 hpe) e apresentaram maior atividade locomotora; as larvas dos regimes 00:24 e 12:12 culminaram a alimentação endógena às 45 hpe e 50,2 hpe, respectivamente. Os resultados também demonstram que as larvas de curimba apresentam uma alometria positiva nas principais estruturas da região cefálica e padrão de pigmentação acentuado no regime de 00:24. Os eventos centrais do desenvolvimento das larvas de curimba foram atingidos da mesma forma em cada tratamento, variando apenas no tempo em chegar a cada um desses eventos e no tamanho. Os achados podem ser úteis na larvicultura da espécie, pois ajudam no melhoramento de sua produção comercial mediante a geração de pacotes tecnológicos de baixo custo.

Palavras – chave: Desenvolvimento larval. Ambiente fótico. Variação.

CHAPTER 5 Curimba (*Prochilodus lineatus*) larva ontogeny under different photoperiods

ABSTRACT

This study aimed at determining the effect of three photoperiods on development and growth of *Prochilodus lineatus* larvae from hatching until the yolk resorption. Thirteen hundred and fifty newly hatched larvae were submitted to three light:darkness regimes (24:00, 12:24 and 12:12). These larvae were divided into experimental incubators with artificial aeration and lighting (1100 lux), and in which pH (7.3 ± 1), Dissolved Oxygen (8.7 ± 1.8 mg L⁻¹) and temperature (26.4 ± 1 ° C) were monitored. The main development events were evaluated to determine relative growth or allometry in different periods. The development of the larvae was described and indicated in hours post - hatching (hpe) and monitored in an optic microscope with camera embedded. Larvae from regimes 24:0 and 00:24 reached the hatching before those of regime 12:12. The regime of constant light accelerated the development and growth of curimba larvae, which quickly reabsorbed the yolk at 24:00 (42.5 hpe) and presented higher locomotive activity; larvae from regimes 00:24 and 12:12 culminated endogenous feeding at 45 hpe and 50.2 hpe, respectively. The results also showed that the curimba larvae presented a positive allometry in the main structures of the cephalic region and accented pigmentation pattern in regime 00:24. The main events in the development of curimba larvae were affected in the same way in each treatment, varying only in the period of time and size to reach each of these events. The findings may be useful in the production of larvae of this species as they improve commercial production through generating low-cost technology packages.

Keywords: Larval development. Photic environment. Variation.

1 INTRODUÇÃO

O campo da larvicultura é prioritário para pesquisa e produção no Brasil e em muitas regiões do mundo. Mas o período de larva é uma das fases mais críticas do desenvolvimento ontogênico dos teleósteos, sendo especialmente sensível às mudanças ambientais.

Os peixes de piracema como a curimba precisam do estímulo da dinâmica fluvial para o desenvolvimento do seu sistema reprodutor e gametas e, por tanto, em ambientes com características distintas, sua reprodução é difícil (GODOY, 1975). Daí que os projetos que visem à criação de pacotes tecnológicos para melhorar a sobrevivência nas fases embrionária y de larva são de grande importância em qualquer programa de piscicultura. Isto é relevante porque a partir da fase de alevino a taxa de mortalidade diminui marcadamente.

O estudo do aspecto morfológico é de grande importância para o conhecimento da história natural, a taxonomia, ecologia e o comércio das espécies de peixes. E apesar de que as características iniciais das larvas são muito semelhantes, o tempo necessário para o desenvolvimento de cada espécie pode ser diferente. Isto faz que seja essencial o desenvolvimento de pesquisas como o presente.

Neste sentido, nos últimos anos tem crescido o interesse pela embriologia e larvicultura de espécies nativas com potencial produtivo e ecológico (BOTTA et al., 2010; CRUZ, 2001; MACIEL, 2006; MONTOYA; ARIAS; OLIVERA-ANGEL, 2010; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004; VALBUENA et al., 2012).

Geralmente, na maioria das pesquisas nas que se incluem larvas de espécies nativas procura se analisar o desenvolvimento ontogênico sob ambientes físicos estáveis, particularmente do fotoperíodo. Assim, tem sido

estudadas em fotoperíodos naturais as larvas de *Prochilodus magdalenae* (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010), *Brycon orbygnianus* (MACIEL, 2006; MACIEL et al., 2010), *Pimelodus grosskopfii* (VALBUENA et al., 2012), *Brycon siebenthalae* (ATENCIO-GARCIA et al., 2003), *Pseudoplatystoma spp* (FAUSTINO et al., 2010), entre outros outras espécies.

Em *Prochilodus lineatus* também são conhecidos vários aspectos de sua ontogenia, especialmente a sua embriologia sob condições igualmente estáveis do ambiente térmico e fótico (BOTTA et al., 2010; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Mas sua fase de larva tem permanecido pouco estudada e mais ainda é desconhecido o efeito das mudanças fotoperiódicas na sua ontogenia na fase de larva.

Dentre dos aspectos morfológicos mais relevantes em peixes também merece destaque a pigmentação da pele. Esta característica esta relacionada com a supervivência dos animais, pois ajuda no fenômeno de camuflagem frente aos potenciais ou eventuais predadores (LE DOUARIN et al., 2004).

A importância de estudar a pigmentação e os padrões ontogênicos de sua presença ou seqüência de aparição é que pode servir para entender algumas doenças da pele em humanos e outros animais (NORDLUND et al., 2006), Além da importância ecológica e taxonômica já mencionada. Estes autores trabalharam com tilapia (*Oreochromis niloticus*) como modelo biológico, mas também tem abordado o aspecto da coloração em pesquisas com outras espécies como *Danio rerio* (KIMMEL et al., 1995).

Igualmente tem se reportes de estudos sobre a pigmentação em Characiformes. Assim, é conhecida a forma de aparecimento da pigmentação em *Hoplias Lacerdae*, *Brycon orbygnianus* e *Piaractus mesopotamicus* (CORREIA et al., 2010; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004), bem como em algumas espécies do gênero *Prochilodus*. Por exemplo, em *P. costatus* (GODINHO; POMPEU, 2003), *P. argentus* (GODINHO; POMPEU,

2003; MACIEL JÚNIOR, 1996) e *P. magdalenae* (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010). Mas a descrição do padrão de pigmentação em *P. lineatus* é desconhecida.

Mediante este trabalho objetivou-se determinar o efeito de três fotoperíodos sobre o desenvolvimento e o crescimento das larvas de *Prochilodus lineatus* desde a eclosão até o início da alimentação exógena.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

As larvas usadas nesta pesquisa foram obtidas mediante a indução à reprodução de dois casais adultos no Laboratório de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Itutinga, Minas Gerais, Brasil, da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG).

As fêmeas apresentavam peso aproximado de 650 g e os machos de 400 g, os quais foram induzidos segundo o indicado na metodologia do capítulo 4.

Foram usadas 1350 larvas recém eclodidas provenientes e mantidas em três tratamentos de luz:escuridão (24:00, 00:24 e 12:12). Estas amostras previnem dos embriões submetidos aos mesmos três tratamentos do fotoperíodo descrito no capítulo 4. Daí que se considerou o instante da eclosão quando o 90% ou mais dos ovos estavam eclodidos.

Em cada tratamento foram usadas 450 larvas que se repartiram em três incubadoras experimentais contendo 150 larvas cada, contidas em aquários com um sistema de com areação e iluminação (1100 lux) artificiais.

2.2 Parâmetros físico-químicos da água dos aquários

Durante a fase experimental foi monitorado o pH ($7,3\pm 1$), Oxigênio dissolvido ($8,7\pm 1,8$ mg L⁻¹) e a temperatura ($26,4\pm 1$ °C) dos aquários três vezes por dia. Estas medições foram feitas aleatoriamente nas incubadoras dos diferentes tratamentos utilizando oxímetro (modelo) e sonda multi-parâmetros.

2.3 Coleta de amostras para observação e análise

As larvas foram tomadas das incubadoras usando peneiras de malha fina e levadas a placas de petri para observação ao microscópio e ao estereoscópio.

De cada tratamento foram tomadas amostras de cinco (05) larvas em cada estágio de desenvolvimento, e fixadas em formalina tamponada 4% para a posterior análise das variáveis de interesse, até atingirem a reabsorção total do vitelo (RTV). Em total foram realizadas 150 amostragens nos três tratamentos para as análises do desenvolvimento e determinação do crescimento.

Durante as amostragens nos tratamentos de escuridão foi usada uma lâmpada de luz vermelha de 60 W, visando evitar a incidência de luz branca de forma direta sobre as larvas. O anterior para evitar possíveis alterações nos dados. Esta metodologia foi proposta por Larson et al. (2004) e implementada por Veras (2011) sem interferência bons resultados.

2.4 Eventos do desenvolvimento larval analisados

Os eventos de interesse analisados no desenvolvimento larval de curimba foram escolhidos por serem chaves na ontogenia dos peixes, particularmente pela sua repercussão na sobrevivência. Estes eventos são os seguintes:

- a) O tempo da eclosão;
- b) Início dos batimentos cardíacos e da circulação sanguínea;
- c) Início da hematopoiese e da pigmentação dos olhos;
- d) Formação do sistema digestório e das brânquias;
- e) Aparição e padrão do tipo de pigmentação corpórea (melanóforos);

- f) Aparição da fenda bucal, da boca, da bexiga gasosa, do sistema digestivo avançado, do ânus, dos primórdios dentais e das nadadeiras peitorais;
- g) Início dos movimentos bucais, da alimentação exógena e dos primórdios dentais definidos.

Também foram avaliadas a frequência cardíaca (FC), a reabsorção do vitelo e a sobrevivência em cada evento nos três tratamentos.

Além das medições anteriores, foi observada a resposta ou vigor locomotor (VL) durante todo o período de observação. O VL faz referência à determinação subjetiva dos movimentos da larva ao ser estimulada fisicamente (toques suaves na cabeça), assim: movimentos ausentes (-), ativos (+) e muito ativos (++). O VL foi incluído no estudo como complemento das medidas do desenvolvimento, pois pode dar informação adicional da condição ou qualidade real das larvas nos diferentes tratamentos, especialmente no referente ao sistema nervoso, pela funcionalidade dos neurônios de Mauthner por estarem ligados ao grau de resposta neuromuscular (KIMMEL et al., 1995).

2.5 Medição do Crescimento: Características Morfométricas de Interesse

Estas medições foram feitas tomando como referência alguns aspectos do trabalho de Maciel (2006) com algumas modificações, assim:

- a) **Comprimento-total (CT):** distância entre extremidade rostral da cabeça e a extremidade caudal da nadadeira embrionária hialina das larvas (RICKER, 1968).
- b) **Comprimento-padrão (CP):** distância entre a extremidade rostral da cabeça e o início da nadadeira embrionária hialina.

- c) **Diâmetro do olho (DO):** diâmetro do olho medido horizontalmente (BRITSKI; SILIMON; LOPES, 1999).
- d) **Diâmetro do vitelo (DV):** medida vertical do vitelo tomando como referência a linha imaginária entre o dorso da larva no terceiro somito e a parte ventral do vitelo.
- e) **Altura da cabeça (AC):** distância entre a extremidade dorsal e ventral da região cefálica. Esta medida será feita em linha vertical desde a parte dorsal da cabeça (Atravessando o vértice do rombencéfalo) e a porção ventral à altura da parte anterior da vesícula ótica.
- f) **Diâmetro da vesícula ótica (DVot):** distância horizontal desta estrutura com a larva em posição natural.

Faz-se ênfase no crescimento da região anterior da larva porque é nela onde aparecem os órgãos relacionados com os processos sensoriais como o sistema nervoso central, o sistema respiratório e o componente bucofaringiano.

As medições das estruturas de interesse das larvas foram feitas com o campo graduado do microscópio de contraste de fase e com paquímetro digital (Digimac Caliper, precisão de 0,001 mm). Estas medidas foram tomadas nos seguintes tempos após eclosão (hpe): zero ou instante da eclosão, 6, 12, 24, 43, 45, e 50 hpe.

Os valores de cada variável foram comparados nos diferentes tratamentos. Foi realizada ANOVA e aplicado o *test* de Levene para determinar a homogeneidade das variâncias, e como prova *post – hoc* foi usado o *test* de Tukey quando foram encontradas diferenças, sendo considerado o nível de significância dos 5%. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão ($X \pm DP$).

2.6 Relações alométricas das larvas

Foram analisadas algumas relações corporais das larvas em cada um dos tratamentos visando saber que tipo de crescimento alométrico (positivo, negativo ou isométrico) apresenta a espécie *P. lineatus* nesta fase de sua ontogenia. As relações são as seguintes:

- a) **DO/CT**: DO em função do CT.
- b) **DVOt/CT**: DVOt em função do CT.
- c) **AC/CT**: AC em função do CT.
- d) **DO/AC**: DO em função da AC.
- e) **DVOt/AC**: DVOt em função da AC.
- f) **DVOt/DO**: DVOt em função do DO.

Para a determinação do tipo de crescimento alométrico foi usada a função potencial ou equação alométrica $Y=aX^b$, na que Y é a variável dependente (DO, DV, DVOt ou AC) e X a variável independente (CP ou CT); a é a ordenada à origem e b é o coeficiente de crescimento (FUIMAN, 1983). Segundo esta fórmula, quando b vale 1, o crescimento é isométrico; quando b é menor que 1, o crescimento alométrico é negativo; e se b é maior que 1, o crescimento é alométrico positivo. Para obter b , se procedeu assim: $\ln Y = \ln a + b \ln X$. Despejando $b = (\ln Y - \ln a) / \ln X$. No presente experimento Foi usada como variável Independiente o CT.

O desenvolvimento e o crescimento das larvas foram monitorados a intervalos de meia hora nas primeiras 12 pós – eclosão (hpe) e após desse tempo a cada hora até a reabsorção total do vitelo em cada tratamento.

A idade das larvas foi descrita e nomeada em horas pós – eclosão (hpe), tomando como o tempo zero (0) o momento da eclosão. Estes aspectos foram

monitorados em microscópio de contraste de fase com câmera incorporada (MOTIC BA 310, câmera 2.0 MP USB2) e lupa estereoscópica (KEN-A-VISION, 5615 Raytown Road, Kansas City, Missouri).

3 RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento larval de curimba sob três fotoperíodos

O desenvolvimento larval de *Prochilodus lineatus* foi influenciado pelas mudanças no fotoperíodo. A maior taxa de desenvolvimento larval da espécie foi obtida no tratamento de luz constante (24:00). É dizer, as larvas mantiveram a tendência de crescimento e desenvolvimento dos regimes nos que permaneceram na fase embrionária, sendo que em 24:00 e 00:24 haviam eclodido às 16,3 hpf tendo maior vigor locomotor (VL) que em 12:12, cuja eclosão aconteceu às 17,5 hpf.

Os principais eventos do desenvolvimento das larvas de curimba foram atingidos da mesma forma em cada tratamento, variando apenas no tempo em chegar a cada um desses eventos. Estes achados se encontram registrados na tabela 1. Daí que nas figuras (1 - 5) sejam apresentados os eventos como tais, ressaltando aqueles nos que têm algum grau de diferencia pelo efeito pontual dos tratamentos. O anterior se indicará principalmente para os padrões de pigmentação e a frequência cardíaca.

Tabela 1 Variáveis avaliadas do desenvolvimento larval de *P. lineatus* (temperatura 26°C ±1) sob três fotoperíodos.

Evento	Tratamentos									Figura
	24:00			00:24			12:12			
	hpe	RV(%)	VL	hpe	RV(%)	VL	hpe	RV(%)	VL	
Ecloração	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1a
Batimentos cardíacos e início da circulação	1-2	10	+	1-2	10	+	1-2	5	-	1b
Início da hematopoiese	3-4	20	++	3-4	20	++	4-5	10	+	1c, 1e,
Início da pigmentação dos olhos (cristalino)	7,5	30	+	5	20	+	8	10	+	1d
Início da formação do tubo digestivo (hepato-pâncreas)	8	30	++	9	30	++	11	20	+	1d
Início das brânquias	8,5	30	++	9,0	30	+	12	20	+	2a
Primeiros melanóforos no corpo	11	40	++	9,0	30	++	14	25	+	2b, c
Início da fenda bucal, dos arcos branquiais e do ânus	11-12	50	++	13-14	40	++	18-20	30	+	2c,d,e,f
Rombómeros e primórdios das nadadeiras peitorais	18	50	++	20	40	+	24	30	+	2d,e
Diferenciação e migração da fenda bucal	20-23	60	++	22-25	50	++	26-28	40	+	3a, b,c
Bexiga gasosa e sistema digestivo avançado	28	70	++	29	60	++	33	50	+	3d
Boca em estado avançado	31	80	++	33	70	++	35	60	+	3c
Vestígio dos primórdios dentais	35	90	++	37	70	++	40	70	++	3e,f,g
Mvtos. bucales (alimentação exógena), olhos laterais	38,5	95	++	41	85	++	45	75	+	3e,f,g
Primórdios dentais definidos	42-43	98	++	45	98	++	50	98	+	3e,f,g
Pó - larva (excreção)	>43	100	++	>45	100	++	>50	100	+	3g,h, 4

Nota: hpe: horas pós-fertilização; RV (%): porcentagem de reabsorção do vitelo; VL (vigor locomotor): movimentos ausentes (-), ativos (+) e muito ativos (++)

Com o aparecimento dos batimentos cardíacos (BC) e o início da circulação sanguínea não se evidenciaram células vermelhas aparentes. A frequência cardíaca (FC) das larvas apresentou diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$), particularmente entre o tratamento de luz constante e de fotoperíodo natural ($p = 0,036$, $F: 3,62$). A FC foi de $124,7 \pm 18,8$ batimentos.minutos⁻¹ (Mínimos e máximos de 90 – 147) em 24:00, de $118,5 \pm 19,4$ (mínimos e máximos de 84 – 142) em 00:24, e de $106,7 \pm 17,4$ (mínimos e máximos de 84 – 134) em 12:12.

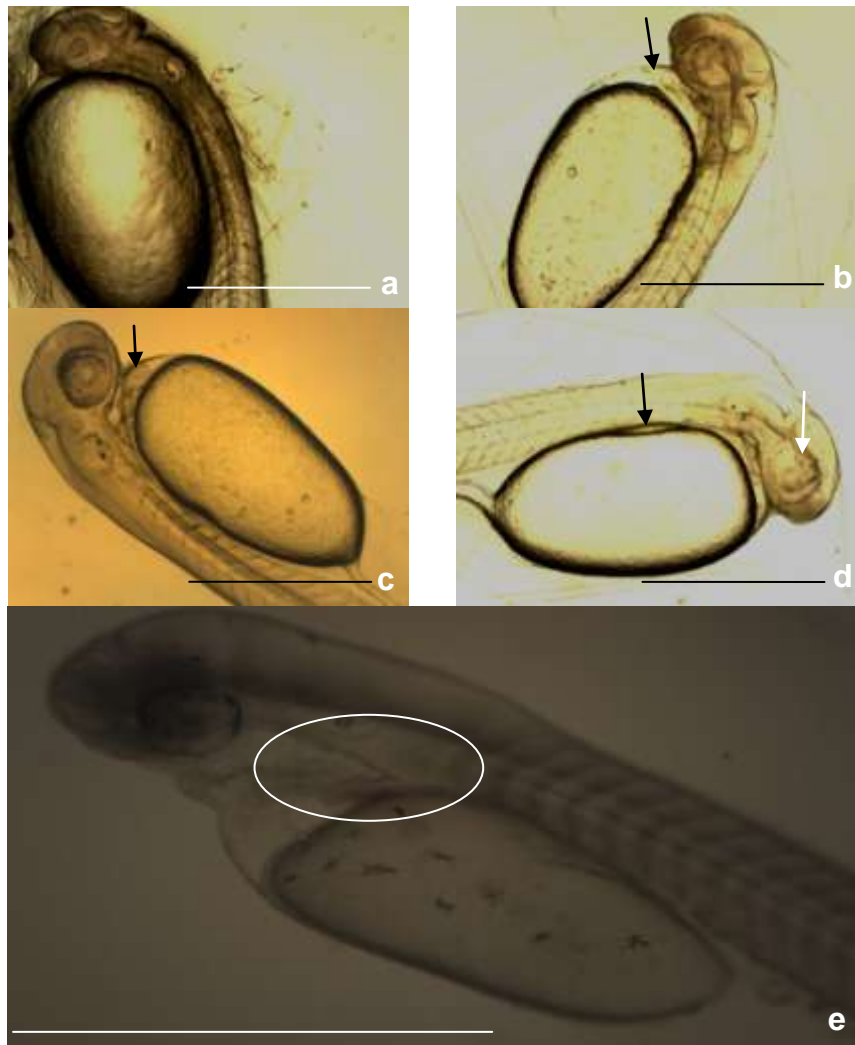


Figura 1 Larvas de *P. lineatus* em Eclosão em 24:00, tempo zero (a), início dos batimentos cardíacos e circulação sanguínea, 1 – 2 hpe (b, seta assinala o coração), início da hematopoiese, 3 – 4 hpe (c, seta indica o coração e presença de circulação sanguínea), início da pigmentação em 7,5 hpe (d, seta branca) e evidência do sistema digestivo – hepatopâncreas – em 8 hpe (d, seta preta) e larva pigmentada e em oito horas após de iniciada a hematopoiese (e, óvalo indica a presença de sangue com pigmentos de hemoglobina)

Nota: Início da pigmentação às 7,5 hpe que continua após da reabsorção do vitelo no período de post – larva. (barras: 1 mm).

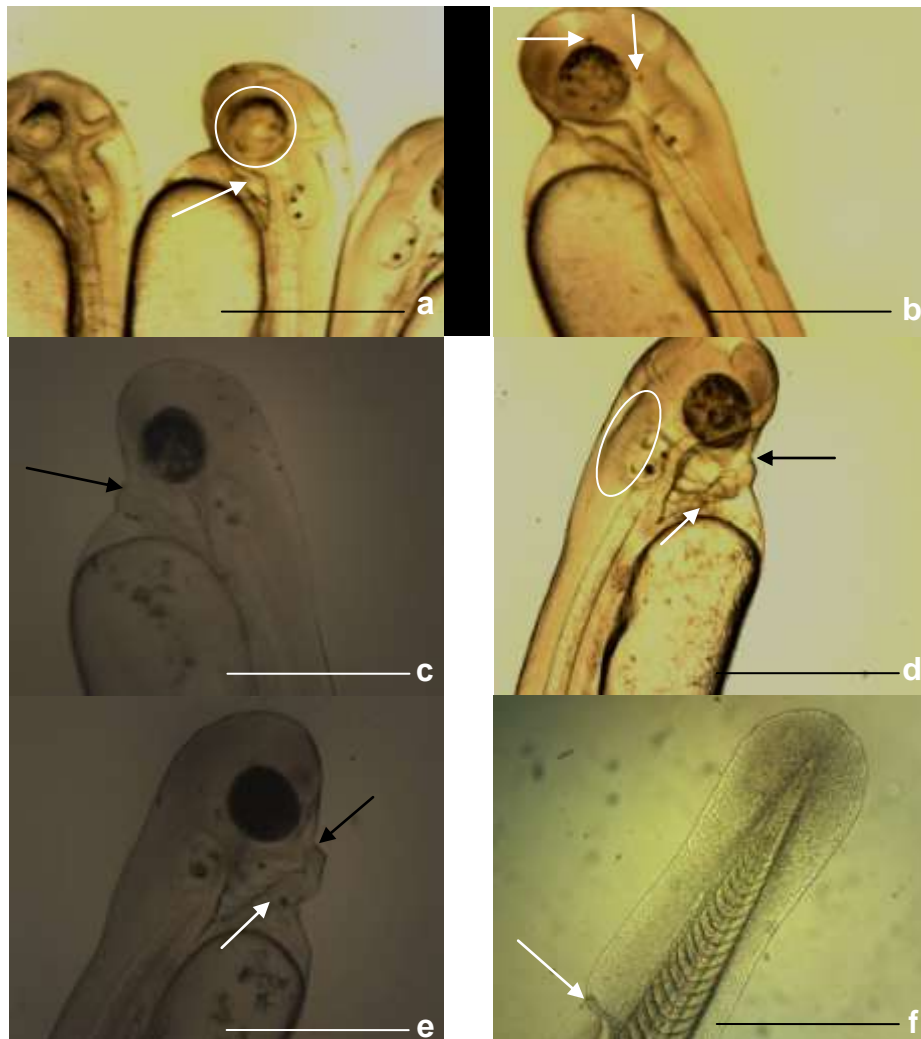


Figura 2 Larvas de *P. lineatus* nos eventos de formação do primórdio das brânquias em 8,5 hpe (a, seta) e o início da pigmentação ocular (a, círculo) e do corpo em 11 hpe (b, c, setas), primórdio bucal em 11 – 12 hpe (c,d, e, setas pretas. Em e, a boca cresce para diante), rombómeros em 18 hpe (d, óvalo), primórdio das nadadeiras peitorais em 18 hpe (e, seta branca) e formação do ânus em 12 hpe (f, seta branca)

Nota: Barras: 1 mm.

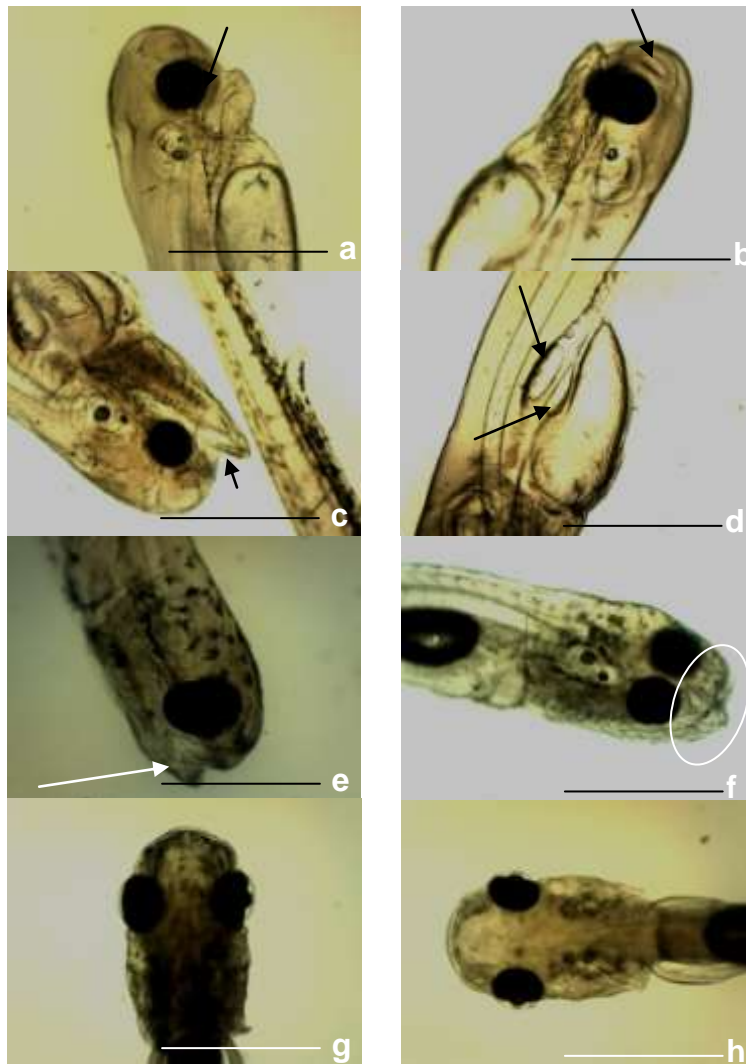


Figura 3 Larvas de *P. lineatus* nos eventos de alongamento da maxila em 20 – 23 hpe (a,b,c, setas pretas), bexiga gasosa e sistema digestório avançado em 28 hpe (d, setas), vestígio dos primórdios dentais em 35 hpe (e), movimentos bucais e olhos laterais em 38,5 hpe (f, óvalo) e alimentação exógena 35 – 38,5 hpe (e,f,g), reabsorção total do vitelo e início da etapa de post – larva em >42 hpe (g,h)

Nota: (barras: 1 mm).

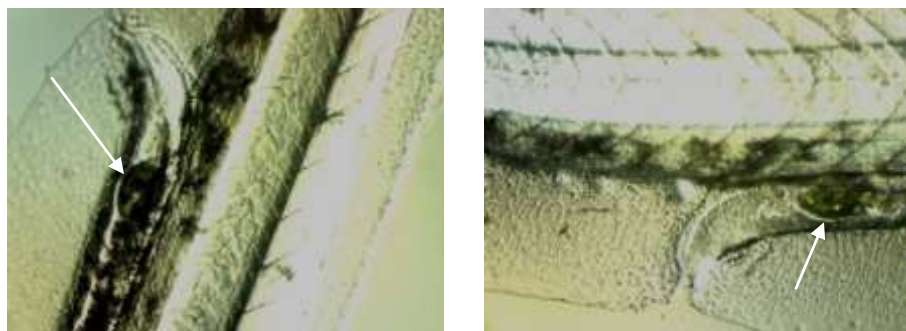


Figura 4 Parte posterior do trato digestivo de larvas de *Prochilodus lineatus* após de iniciada a alimentação exogena

Nota: Excreção (setas).

3.2 Padrão de pigmentação

A pigmentação do corpo da curimba consiste em três formas de melanóforos: os puntiformes restritos principalmente ao olho e os dendriformes na região lateral, dorsal ântero-posterior e no vitelo. Além disso, a espécie também apresenta alguns melanóforos fluorescentes na região anterior da cabeça. Na figura 5 se apresenta uma caracterização geral dos melanóforos e do padrão no que a pigmentação acontece nesta espécie.

O padrão de pigmentação de *P. lineatus* inicia com a pigmentação puntiforme da zona anterior do olho que acaba por cobri-lo totalmente surgindo alguns melanóforos dendriformes fora da vesícula ocular (figura 5a) e na parte dorsal da cabeça (figura 5b). Os melanóforos extraoculares começam a migrar pela zona ventral atingindo o vitelo (figura 5c) e depois parte da nadadeira embrionária ao longo da parte inferior da notocorda (figuras 5d, 5e).

Ao atingir o extremo caudal da notocorda os melanóforos viram seguindo o percorrido na zona dorsal da notocorda até atingir a região cefálica que já está pigmentada nesse momento (figura 5f). Os melanóforos da região ventral são predominantemente dendriformes (figura 5g) e na zona cefálica

dorsal pode haver uma mistura de melanóforos dendríformes e fluorescentes (figura 5h).

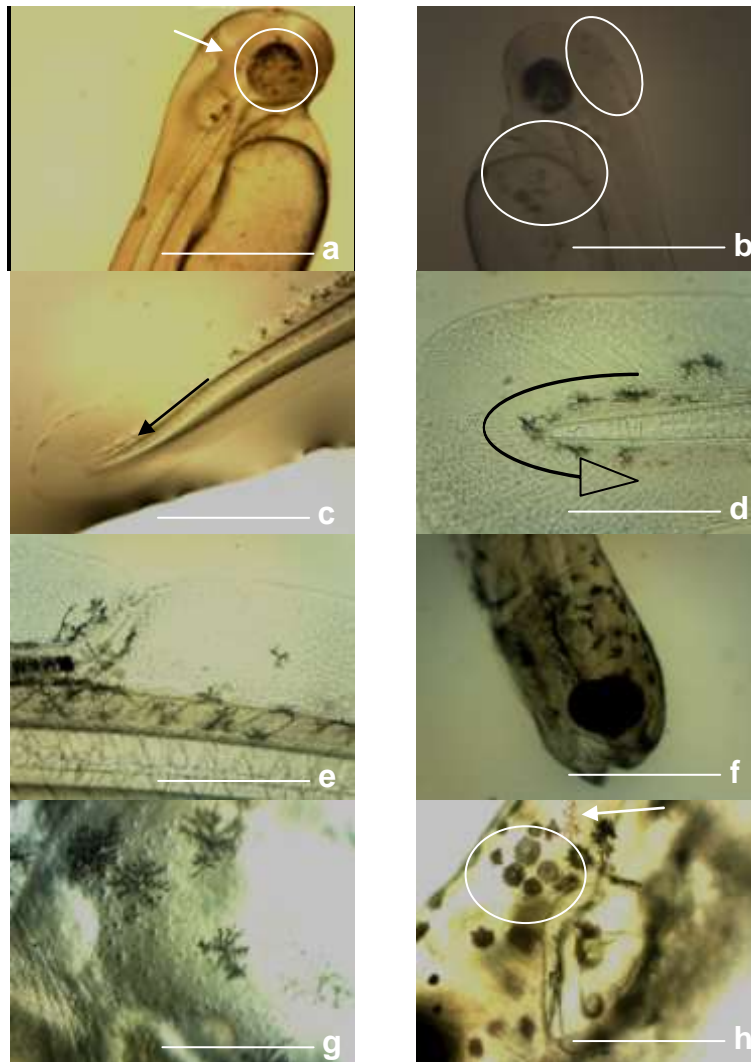


Figura 5 Padrão de pigmentação em *P. lineatus* na fase de larva. Pigmentação puntiforme no olho (círculo) e melanóforos dendriformes (seta) extra-oculares (a) e no dorso da cabeça (b, óvalo). Migração dos melanóforos ao vitelo (b, círculo) e à nadadeira embrionária ao longo da parte inferior da notocorda (c,e). Migração para a zona dorsal da notocorda (c,d, sentido das setas). Melanóforos dendriformes da região ventral (g) e mistura de melanóforos dendriformes (seta) e fluorescentes (círculo) na zona cefálica dorsal (h)

Nota: Barras: 1 mm.

3.3 Crescimento

Os valores das variáveis morfométricas estudadas para cada tratamento, e as comparações estatísticas das larvas de *P. lineatus* até a reabsorção do vitelo, encontram-se sumarizadas nas tabelas 2 a 8. A taxa de crescimento das larvas ao final do experimento nos três tratamentos foi de 0,156 mm/hora para 24:00, de 0,146 mm/hora para 00:24 e de 0,134 mm/hora para 12:12. As taxas de sobrevivência das larvas foram de 88%, 82% e 71% para os tratamentos de 24:00, 00:24 e 12:12, respectivamente.

Tabela 2 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas recém eclodidas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos à zero hora pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	3,16±0,25 ^a	2,7-3,6	3,13±0,24 ^a	2,7- 3,8	2,9±0,24 ^b	2,4 - 3,5
CP	3,05±0,27 ^a	2,53-3,86	3,02±0,23 ^a	2,6-3,63	2,77±0,24 ^b	2,3-3,37
DO	0,18±0,016 ^a	0,15-0,21	0,19±15 ^a	0,16-0,21	0,17±0,013 ^a	0,15-0,21
DVOt	0,12±0,01 ^a	0,09-0,14	0,11±0,01 ^a	0,09-0,13	0,1±0,008 ^a	0,09-0,13
DV	0,76±0,02 ^a	0,7-0,83	0,79±0,03 ^a	0,73-0,84	0,79±0,02 ^a	0,75-0,84
AC	0,47±0,02 ^a	0,43-0,51	0,48±0,02 ^a	0,43-0,52	0,43±0,02 ^b	0,38-0,49

Nota: CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; DO: diâmetro do olho; DVOt: diâmetro da vesícula ótica; DV: Diâmetro do vitelo; AC: altura da cabeça. X±DP: média ± desvio padrão.

Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 3 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos às seis horas pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	4,36±0,20 ^a	3,5-4,56	4,12±0,35 ^a	3,4- 4,8	3,5±0,30 ^b	3,1 - 3,7
CP	4,2±0,37 ^a	3,5-4,54	3,98±0,30 ^a	3,8-4,3	3,36±0,21 ^c	3,1-3,34
DO	0,21±0,013 ^a	0,19-0,28	0,23±0,025 ^a	0,19-0,28	0,2±0,011 ^a	0,17-0,23
DVOt	0,15±0,01 ^a	0,12-0,18	0,14±0,01 ^a	0,12-0,19	0,13±0,006 ^a	0,11-0,16
DV	0,60±0,03 ^a	0,5-0,78	0,69±0,02 ^b	0,63-0,75	0,70±0,03 ^{bc}	0,65-0,76
AC	0,65±0,03 ^a	0,48-0,71	0,58±0,02 ^b	0,49-0,68	0,56±0,03 ^{bc}	0,48-0,63

Nota: . CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; DO: diâmetro do olho; DVOt: diâmetro da vesícula ótica; DV: Diâmetro do vitelo; AC: altura da cabeça. X±DP: média ± desvio padrão.

Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 4 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos às 12 horas pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	4,66±0,25 ^a	4,0-5,06	4,38±0,24 ^b	3,9- 5,0	3,98±0,20 ^c	3,8 - 4,6
CP	4,4±0,26 ^a	3,8-5,0	4,03±0,28 ^b	3,8-4,8	3,62±0,21 ^a	3,52-4,23
DO	0,24±0,02 ^{bc}	0,19-0,30	0,27±0,20 ^b	0,21-0,33	0,23±0,014 ^{cd}	0,19-0,27
DVOt	0,18±0,01 ^a	0,14-0,21	0,16±0,01 ^a	0,14-0,20	0,16±0,01 ^a	0,14-0,20
DV	0,50±0,06 ^a	0,46-0,68	0,57±0,03 ^b	0,57-0,65	0,65±0,02 ^c	0,64-0,70
AC	0,96±0,04 ^a	0,80-0,98	0,88±0,02 ^b	0,79-0,97	0,69±0,05 ^c	0,62-0,73

Nota: CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; DO: diâmetro do olho; DVOt: diâmetro da vesícula ótica; DV: Diâmetro do vitelo; AC: altura da cabeça. X±DP: média ± desvio padrão.

Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 5 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos às 24 horas pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	5,7±0,3 ^a	5,1-6,3	5,3±0,21 ^b	4,5- 5,4	4,78±0,10 ^c	4,2 - 5,6
CP	5,4±0,36 ^a	4,8-6,0	4,97±0,14 ^b	4,4-5,3	4,52±0,15 ^a	4,32-5,23
DO	0,49±0,04 ^a	0,43-0,50	0,55±0,03 ^b	0,5-0,63	0,47±0,015 ^a	0,43-0,51
DVOt	0,37±0,02 ^a	0,32-0,41	0,36±0,02 ^a	0,33-0,40	0,34±0,02 ^a	0,31-0,40
DV	0,43±0,04 ^a	0,42-0,53	0,47±0,04 ^{ab}	0,45-0,56	0,51±0,03 ^{bc}	0,49-0,61
AC	1,46±0,10 ^a	1,0-1,56	1,38±0,12 ^{ab}	1,06-1,57	1,33±0,15 ^{bc}	0,98-1,43

Nota: CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; DO: diâmetro do olho; DVOt: diâmetro da vesícula ótica; DV: Diâmetro do vitelo; AC: altura da cabeça. X±DP: média ± desvio padrão.

Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 6 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos às 42,5 horas pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	7,3±0,33 ^a	6,5-7,5	6,93±0,35 ^b	6,2- 7,3	6,48±0,40 ^c	6,0 - 7,4
CP	6,93±0,27 ^a	5,7-6,6	6,58±0,25 ^b	6,2-7,0	6,12±0,28 ^c	5,92-7,1
DO	0,54±0,03 ^a	0,48-0,59	0,59±0,04 ^b	0,53-0,65	0,53±0,02 ^{ac}	0,49-0,61
DVOt	0,39±0,03 ^a	0,32-0,43	0,37±0,013 ^{ab}	0,35-0,41	0,35±0,014 ^{cb}	0,32-0,41
DV*	0,1±0,05 ^a	0,09-0,15	0,27±0,03 ^b	0,25-0,36	0,40±0,04 ^c	0,38-0,51
AC	1,52±0,20 ^a	1,1-1,6	1,43±0,22 ^b	1,28-1,61	1,37±0,14 ^c	1,10-1,46

Nota: CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; DO: diâmetro do olho; DVOt: diâmetro da vesícula ótica; DV: Diâmetro do vitelo; AC: altura da cabeça. X±DP: média ± desvio padrão. Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05). *Às 43 hpe o vitelo foi totalmente reabsorvido no tratamento 24:00 e as larvas já haviam iniciado a alimentação exógena.

Tabela 7 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos às 45 horas pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	7,4±0,2 ^a	6,5-7,7	7,0±0,32 ^b	6,3- 7,5	6,52±0,30 ^c	6,1 - 7,5
CP	7,02±0,30 ^a	6,0-6,9	6,80±0,31 ^a	6,2-7,1	6,33±0,20 ^b	6,23-7,3
DO	0,55±0,02 ^a	0,48-0,60	0,59±0,03 ^b	0,54-0,66	0,55±0,03 ^a	0,49-0,65
DVot	0,40±0,04 ^a	0,35-0,44	0,37±0,015 ^{ac}	0,35-0,43	0,36±0,011 ^c	0,33-0,42
DV	0	0	0	0	0,31±0,02	0,29-0,40
AC	1,55±0,30 ^a	1,3-1,62	1,49±0,33 ^{ab}	1,32-1,62	1,39±0,20 ^c	1,2-1,49

Nota: Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 8 Estatística descritiva das variáveis morfométricas determinadas nas larvas de *P. lineatus* sob diferentes fotoperíodos às 50 horas pós – eclosão (hpe)

Variáveis	Tratamentos					
	24:00		00:24		12:12	
	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude	X±DP	Amplitude
CT	7,8±0,3 ^a	6,8-8,1	7,3±0,22 ^b	6,6- 7,7	6,7±0,25 ^c	6,4 - 7,6
CP	7,4±0,32 ^a	6,5-7,7	6,97±0,37 ^b	6,4-7,5	6,4±0,30 ^c	6,3-7,2
DO	0,57±0,03 ^a	0,51-0,61	0,61±0,03 ^b	0,57-0,67	0,56±0,05 ^a	0,49-0,66
DVOt	0,41±0,03 ^a	0,35-0,45	0,39±0,03 ^{ab}	0,35-0,44	0,37±0,02 ^{bc}	0,34-0,43
DV	0	0	0	0	0	0
AC	1,6±0,2 ^a	1,34-1,70	1,50±0,10 ^{ab}	1,41-1,64	1,43±0,1 ^c	1,3-1,54

Nota: CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; DO: diâmetro do olho; DVOt: diâmetro da vesícula ótica; DV: Diâmetro do vitelo; AC: altura da cabeça. X±DP: média ± desvio padrão. Os valores de uma mesma linha com letras distintas como supra-índice indicam diferenças significativas (P<0,05).

3.4 Relações entre as variáveis morfométricas

Nas tabelas 9 a 11 estão resumidos os valores dos coeficientes de crescimento para cada tratamento das diferentes horas nas que foram mensuradas as variáveis de interesse.

Tabela 9 Relações corporais das larvas de *P. lineatus* durante a fase de larva submetidas a fotoperíodo de luz constante (24:00) em diferentes tempos apos da eclosão

RC	Tempo (hpe)						
	0	6	12	24	42,5	45	50
DO/CT	2,86	3,0	2,9	2,4	2,6	2,59	2,6
DVOt/CT	0,96	1,13	1,38	1,09	1,03	1,04	1,03
DO/AC	3,27	3,37	3,25	2,73	2,92	2,91	2,94
DVOt/AC	1,36	1,46	1,67	1,37	1,36	1,35	1,36
DVOt/DO	0,40	0,33	0,29	0,28	0,32	0,318	0,33
AC/CT	1,90	1,90	1,57	1,36	1,56	1,56	1,58

Nota: Os valores representam o coeficiente de crescimento *b*. **DO**: diâmetro do olho, **CT**: comprimento total, **DVOt**: diâmetro da vesícula ótica, **AC**: altura da cabeça, **DV**: diâmetro do vitelo. **RC**: relação corporal.

Tabela 10 Relações corporais das larvas de *P. lineatus* durante a fase de larva submetidas a escuridão constante (00:24) em diferentes tempos após da eclosão

RC	Tempo (hpe)						
	0	6	12	24	42,5	45	50
DO/CT	2,80	2,88	2,78	2,26	2,46	2,47	2,48
DVOt/CT	0,93	0,924	1,18	0,92	0,88	0,926	0,89
DO/AC	3,34	3,38	3,30	2,68	2,93	2,94	2,92
DVOt/AC	1,47	1,42	1,70	1,34	1,35	1,39	1,34
DVOt/DO	0,54	0,49	0,52	0,42	0,46	0,46	0,44
AC/CT	1,87	1,96	1,60	1,34	1,57	1,54	1,58

Nota : Os valores representam o coeficiente de crescimento *b*. **DO**: diâmetro do olho, **CT**: comprimento total, **DVOt**: diâmetro da vesícula ótica, **AC**: altura da cabeça, **DV**: diâmetro do vitelo. **RC**: relação corporal.

Tabela 11 Relações corporais das larvas de *P. lineatus* durante a fase de larva submetidas a fotoperíodo natural (12:12) em diferentes tempos após da eclosão

RC	Tempo (hpe)						
	0	6	12	24	42,5	45	50
DO/CT	2,83	2,86	2,85	2,31	2,50	2,47	2,48
DVOt/CT	0,92	1,02	1,09	1,04	0,94	0,92	0,93
DO/AC	3,36	3,29	3,21	2,64	2,91	2,89	2,89
DVOt/AC:	1,45	1,46	1,46	1,36	1,36	1,35	1,35
DVOt/DO	0,53	0,43	0,36	0,32	0,41	0,42	0,41
AC/CT	1,91	1,83	1,75	1,27	1,55	1,54	1,54

Nota: Os valores representam o coeficiente de crescimento *b*. **DO**: diâmetro do olho, **CT**: comprimento total, **DVOt**: diâmetro da vesícula ótica, **AC**: altura da cabeça, **DV**: diâmetro do vitelo. **RC**: relação corporal.

Houve alometria positiva em todos os tratamentos e nos sete tempos para as relações DO/CT ($b > 2$), AC/CT ($b > 1,27$), DVOt/AC ($b > 1,34$) e DO/AC ($b > 2,60$), Foi encontrada alometria negativa na relação DVOt/DO ($b > 0,28$) em todos os casos. Ver detalhes nas tabelas 9, 10, 11.

Já no caso da relação DVOt/CT foi encontrada uma alometria negativa moderada em alguns períodos como no tempo zero em todos os tratamentos. No tratamento 24:00 o DVOt foi ligeiramente positiva a partir do tempo de 6 hpe até as 24 hpe. Em 12 hpe da maioria dos tratamentos o crescimento do DVOt/CT foi ligeiramente positivo. A tendência nesta relação foi a decrescer a partir das 24 hpe tornando se quase isométrica em 24:00 e com isometria negativa em 00:24 e 12:12.

4 DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e padrões de pigmentação larval da curimba

A larva de curimba no momento da eclosão carece totalmente de pigmentação tanto no sistema visual quanto no resto do corpo e não tem cromatóforos até após da reabsorção do vitelo. Isto é diferente ao reportado por alguns autores em outras espécies de teleósteos nos que a pigmentação é marcada e com presença de pigmentos coloridos desde a fase embrionária (KIMMEL et al., 1995; KYÛSHIN, 1975; VALBUENA et al., 2012).

Estes pigmentos em curimba apareceram primeiro no tratamento de escuridão constante, às cinco horas pós – eclosão, e quase simultaneamente em luz permanente e em fotoperíodo natural as oito hpe aproximadamente. Os achados deste estudo são similares parcialmente aos reportados por Correia et al. (2010) em *Brycon orbygnianus* nos que a pigmentação apareceu às sete hpe. Igualmente, os dados concordam com o reportado por Hisar et al. (2005) quem obtiveram o mesmo resultado com juvenis de catfish africano que foram mais pigmentados quando submetidos a escuridão constante. Os dados encontrados em curimba nos tratamentos de luz constante e fotoperíodo natural corroboram o indicado por estes autores, pois os primeiros pigmentos corporais apareceram às 11 hpe e 14 hpe, respectivamente. Portanto, é evidente que a escuridão constante gera a produção de melanóforos em varias espécies e em diferentes estágios de desenvolvimento.

O fato da falta de pigmentação inicial das larvas de curimba pode favorecer a sua sobrevivência e a toma do alimento, pois uma forte pigmentação em águas claras, por exemplo, pode atrair predadores e fazer difícil a captura das presas, já que a larva pode ser detectada mais facilmente. Isto é corroborado por

Bolker e Hill (2000) ao indicar que durante o desenvolvimento a despigmentação é indicativa do tipo de ambiente onde habita o animal.

Mas o ritmo no que uma espécie de peixe se desenvolve nas etapas iniciais de sua ontogenia pode variar se comparada com outras, inclusive com táxons dentre de uma mesma família sob fotoperíodos iguais ou diferentes. O anterior é o caso de varias das espécies dos Characiformes distribuídas no Brasil. Assim, a piracanjuba tem um fotoperíodo de larva mais curto, de aproximadamente 35 hpe sob fotoperíodo natural (MACIEL, 2006; MACIEL et al., 2009; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004) que as larvas de curimba em qualquer tratamento de luz:escuridão do presente experimento (tabela 1).

Também em espécies dentre de um mesmo gênero podem existir marcadas diferenças no seu desenvolvimento, por exemplo, no gênero *Prochilodus*. O tempo de larva em *P. lineatus* do presente trabalho foi maior tanto para fotoperíodos longos (42,5 hpe) como para escuridão constante (45 hpe) e 12:12 (50 hpe), quando comparado com *P. magdalenae* cuja fase larval foi de 38 hpe sob fotoperíodo natural (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010).

Estas diferenças entre grupos taxonômicos próximos indicam que o desenvolvimento ontogênico na fase de larva é espécie – específico. O anterior a pesar das dificuldades taxonômicas reportadas no gênero *Prochilodus* quando são usados rasgos fenotípicos para a identificação das espécies nas fases de juvenil ou adulto (RENNO et al., 2005). Isto quer dizer que o estudo do desenvolvimento larval no gênero *Prochilodus* não pode se extrapolar ou estender de uma espécie para outra, particularmente quando se faz modulação da ontogenia com a manipulação de fatores ambientais como o fotoperíodo.

Portanto, os achados da presente pesquisa são relevantes para os programas de piscicultura e futuros trabalhos nos que se inclua a curimba como

espécie íctica de interesse comercial ou como modelo biológico para fins científicos.

Em aspectos pontuais do desenvolvimento da curimba também são encontradas marcadas diferenças entre espécies relacionadas, ou não, taxonomicamente. Assim, o tempo de eclosão nos três fotoperíodos das larvas de *P. lineatus* desta pesquisa foi diferente do tempo necessário para eclodir de outros teleósteos submetidos ao fotoperíodo natural. Deste modo, a piracanjuba atingiu a eclosão às 18,5 horas pós – fertilização (hpf) (MACIEL et al., 2009; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004), *P. magdalenae* às 14 hpf (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010) e zebrafish entre as 48 às 72 hpf (KIMMEL et al., 1995).

Como se observa na tabela 1, o tempo em atingir a fase de larva na curimba é curto, aspecto característico da família Prochilodontidae (NAKATANI et al., 2001), ou seja, peixes migradores e de reprodução sazonal. Segundo estes autores, em outros Characiformes como *Hoplias sp.* o início do período de larva é mais demorado, possivelmente porque não realiza migrações dentre da sua estratégia reprodutiva.

O início da pigmentação das larvas de *P. lineatus* aconteceu as cinco hpe no tratamento de escuridão constante, sendo o mais rápido do experimento, pois nos outros dois tratamentos este fato ocorreu entre 2,5 e 3,0 horas após (tabela 1). Nos três casos aqui reportados o surgimento da pigmentação foi similar que em algumas espécies e menor que em outras. Assim, tem-se reportado tempos de 16 a 26 hpe em *P. magdalenae* (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010) e de mais de 24 hpe em *Hoplias lacerdae* (CORREIA et al., 2010) em condições fóticas naturais. Segundo estes mesmos autores já para *Piaractus mesopotamicus* (pacu) os primeiros melanóforos surgiram as cinco hpe na região posterior do saco vitelino, sendo igual que o tempo de aparição da pigmentação das larvas de curimba no tratamento de escuridão constante. Mas

existe uma marcada diferença no padrão de pigmentação do pacu e da curimba, pois em curimba a pigmentação inicia na zona anterior do olho e em pacu a pigmentação ocular acontece às 24 hpe. Este último fato evidencia o efeito do ambiente escuro no aumento da pigmentação em *P. lineatus*, evidenciando-se uma resposta adaptativa de tipo fenotípica frente às mudanças do ambiente, como proposto pela International Union of Physiological Sciences - IUPS (2003).

Além disso, foi observada a migração dos melanóforos em *P. lineatus*. Este fenômeno também foi reportado para outras espécies como zebrafish (KIMMEL et al., 1995) e tilapia (ZAGOLIN; XAVIER NETO; HILSDORF, 2009). Em curimba esta migração foi evidente em todo o saco vitelino, especialmente na parte superior do mesmo e daí à região caudal (ver figura 5b, 5c) e dorsal até chegar à região cefálica. Em zebrafish a migração dos melanóforos se dá no estágio prim-15 e acontece mais rapidamente na parte anterior que na posterior do corpo do embrião (KIMMEL et al., 1995). Sugere-se realizar uma verificação pontual deste aspecto para maior detalhe, particularmente do mecanismo neural do surgimento e da migração dos melanóforos em *P. lineatus* no período larval.

Igualmente, as larvas de curimba evidenciam uma forte pigmentação escura na bexiga gasosa quando observadas ao microscópio. Esta pigmentação também tem sido reportada no embrião de *Danio rerio* por Kimmel et al. (1995). Em curimba não é conhecida a função e a movimentação desta pigmentação nesta estrutura, pelo qual se requer aprofundar neste aspecto.

É de ressaltar que em *D. rerio* além da presença dos melanóforos também tem iridóforos na fase de embrião, estando presentes na zona lateral do corpo e na retina, respectivamente; estes pigmentos surgem no sentido ântero-posterior, similar a como ocorre em *P. lineatus* na fase de larva. Mas com a

diferença de que em *P. lineatus* os melanóforos surgem ao longo de todo o período de larva e os iridóforos após da reabsorção do vitelo.

Os melanóforos em *P. lineatus* são marcadamente dendriformes ao longo de todo o corpo da larva, o qual tem sido reportado em estudos feitos em outros teleósteos (CORREIA et al., 2010; VALBUENA et al., 2012). Mas em *P. lineatus* também se evidenciaram melanóforos de forma florescente na região da cabeça (ver figura 5h). Estes melanóforos são distintos dos puntiformes e estrelados reportados por Correia et al. (2010) e Maciel et al. (2009) quem relatam que esse tipo de melanóforos estrelados se formam pela união de grânulos destes pigmentos dispersos. O padrão de maior pigmentação na escuridão em curimba também foi mantido no começo da fase de post – larva, característica similar à encontrada em juvenís do catfish africano por Mustapha et al. (2012).

O aspecto translúcido das larvas recém eclodidas de curimba se deve a que, além de serem carentes de pigmentos, as células vermelhas estão ausentes, pois a hematopoiese inicia entre as três a quatro hpe. Isto é uma característica de muitas espécies de peixes nos que a hematopiese começa tempo após da eclosão, o qual é também assinalado por Bone, Marshall e Blaxter (1995) ao relatar que o sangue neste tempo é desproveste de hemoglobina e a larva não tem pigmentação corpórea. No entanto, em *Danio rerio* já existe o primórdio do coração no estágio embrionário prim-16, às 31 hpf e antes da eclosão pode ser observada a pigmentação vermelha dos eritrócitos, o que indica a presença de hemoglobina.

Além disso, em curimba com o início dos batimentos do coração nas primeiras hpe se aprecia uma frequência cardíaca maior no tratamento de luz constante, o que pode se dever a que os processos fisiológicos acontecem mais rapidamente sob essas condições. Deste modo, esta é uma evidencia a mais que

demonstra a forte influência das mudanças nos regimes de luz:escuridão sobre as larvas da espécie estudada.

Mas esta aparência corporal clara é de muita importância para a sobrevivência da larva, pois no tempo seguinte à eclosão esta é mais vulnerável à predação por ter uma escassa coordenação natatória.

Esta pouca coordenação locomotora pode estar relacionada com a falta de maturidade do sistema nervoso central (SNC) e porque a bexiga gasosa permanece sem se expandir. É sabido que no SNC das larvas de peixes, a partir do encéfalo, se estendem os neurônios de Mauthner que estão comprometidos na resposta neuromuscular (KIMMEL et al., 1995). Igualmente, em curimba aparecem primeiro os sete rombómeros no rombencéfalo (figura 2d) no tratamento 24:00, o qual explica a razão da maior atividade ou vigor locomotor (VL) ao longo das observações neste tratamento em relação aos outros dois, particularmente em 12:12 no que o VL é menor. Isto tem uma grande importância em termos de supervivência, pois uma estratégia adaptativa usada por muitos organismos como os peixes para sobreviver é mediante o aumento da atividade locomotora (JUAN et al., 2006).

Além, como indicado por Trevarrow, Marks e Kimmel (1990), os rombómeros estão formados por fibras gliáis e axônios da comissura, é dizer, são células nervosas que controlam o ambiente iônico, os níveis de neurotransmissores e o processamento da informação. Nas larvas de curimba os rombómeros são observáveis entre as 15 e 29,5 hpe, mas é evidente que a sua atividade começa em horas prévias a sua visualização morfológica, pois desde antes de eclodir o embrião está se movimentando.

Este efeito dos fotoperíodos no desenvolvimento da curimba também se observa em outros eventos cruciais como o enchimento da bexiga gasosa para formar o aparelho de Weber (audição) e no desenvolvimento total das nadadeiras peitorais para dar maior equilíbrio e flotação à larva. Igualmente as

mudanças no fotoperíodo têm conseqüências no movimento para o frente da mandíbula e nos movimentos bucais, na alimentação exógena, a excreção e a reabsorção total do vitelo.

Os anteriores são os eventos prévios à transformação total da larva de olhos laterais e nado horizontal para logo após atingir o período de post – larva (tabela 1). Estes eventos registrados na curimba são atingidos em tempos diferentes em outros táxons dos Characiformes como *Brycon insignis*, *B. orbygnianus* e *Prochilodus magdalenae* (ANDRADE-TALMANELLI et al., 2001; ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; MACIEL et al., 2009).

Assim mesmo, é de ressaltar que a quantidade de somitos ao longo do período de larva vitelínica em *P. lineatus* foi de 42 a 47 e houve pouca variação desta característica merística entre o final da fase embrionária, a eclosão e a reabsorção total do vitelo. Este número de miómeros é parecido ao encontrado em *Bregmaceros cantori* que foi de 45 a 48 (BLAS-CABRERA; SÁNCHEZ-RAMÍREZ; OCAÑA-LUNA, 2006), e em piracanjuba de de 43 a 48 (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004). Estas quantificações merísticas são maiores que a reportada para zebrafish que é de 30 a 34 pares. O tamanho do peixe nas fases posteriores de sua ontogenia pode estar determinado por esta característica merística, pelo qual é sugerido incluir este aspecto em futuros estudos com curimba.

Durante a fase larval o avanço da actinotriquia na nadadeira caudal, e após na peitoral, é evidente como amostrado nas figuras 2f, 3h e 5d, nas que se observam os raios de cartilagem da nadadeira caudal. Em *Danio rerio*, este evento acontece no período de embrião e ao eclodir se encontra com as nadadeiras definitivas formadas (KIMMEL et al., 1995). Isto explica a maior vulnerabilidade de curimba frente aos predadores, entre os quais se encontra a piracanjuba (MACIEL, 2006; SCHÜTZ; NUÑER, 2007), pois a sua capacidade

natatória é reduzida no começo da fase de larva. A pouca habilidade para nadar se deve, entre outras coisas, a que a bexiga gasosa ainda não está expandida ao momento da eclosão.

Deste modo, as taxas diferenciais do desenvolvimento das larvas de *P. lineatus* sob condições variáveis de luz deixam em evidência a importância do controle do fotoperíodo nos sistemas de produção comercial, nos programas de manejo e repovoamento e na pesquisa básica e aplicada. Daí que os dados obtidos neste trabalho podem servir de base para a geração de pacotes tecnológicos de baixo custo, visando melhorar o manejo da curimba nas primeiras fases de sua ontogenia, aumentando a sua sobrevivência. Isto concorda com o assinalado por Valbuena et al. (2012) acerca da importância do estudo cronológico da morfologia que leva à formação de um novo indivíduo, pois isso permite estabelecer as técnicas mais adequadas para a incubação e a larvicultura da espécie.

4.2 Crescimento larval em *P. lineatus*

A manipulação do fotoperíodo em condições de laboratório afeita a ontogenia de *P. lineatus* na sua fase larval. Isto foi observado na presente pesquisa onde um fotoperíodo longo, 24:00, favoreceu o crescimento, o desenvolvimento e a supervivência das larvas desta espécie. Também em escuridão constante houve um aumento no comprimento das larvas, mas foi menor sob condições de fotoperíodo natural ou 12:12.

Estes resultados concordam com o indicado por Bouef e Le Bai (1999) quem acharam que o fotoperíodo é um dos fatores físicos mais importantes que afeta o crescimento e a supervivência das larvas de peixes.

Assim, Dugué et al. (2005) acharam que as larvas do surubi (*Pseudoplatystoma fasciatum*) apresentam melhor fator de condição e

subvivência em condições de escuridão constante. Por outro lado, Shan et al. (2008) encontraram que as larvas de *Miiuy croaker* *Miichthys miiuy*, apresentam menor sobrevivência em escuridão constante e há uma mortalidade total depois dos sete dias após eclosão.

Desta maneira, o crescimento larval de *P. lineatus* pode ser acelerado ou diminuído mediante a manipulação do fotoperíodo, sendo que as larvas crescem mais rápido quando mantidas com luz permanente (24:00). Recentemente Mustapha et al. (2012) reportam que a manipulação do fotoperíodo pode acelerar o crescimento dos peixes nos primeiros estágios de desenvolvimento. Isto pode se dever a que este fator atua como um modulador dos ritmos endógenos dos níveis hormonais. Estes autores encontraram um maior crescimento em juvenis de *Clarias gariepinus* no fotoperíodo de luz permanente, similar ao achado nas larvas de curimba. Estes achados corroboram dados prévios (JUAN et al., 2006) que assinalam que a modificação dos padrões metabólicos e do crescimento é uma evidência de adaptação dos peixes ao meio ambiente.

No início e durante todo o experimento da fase de larva de *P. lineatus* as variáveis morfométricas de maior variação foram o comprimento total (CT), o comprimento padrão (CP), o diâmetro do olho (DO) e a altura da cabeça (AC) (tabelas 4 – 8). Mas o CT, o CP e a AC foram maiores no tratamento de luz permanente (24:00) e o DO foi maior em escuridão total (00:24). Essencialmente isto foi devido ao efeito dos tratamentos de procedência, mas foi uma tendência geral nos eventos seguintes na medição da maioria das variáveis. O anterior é corroborado por Souza Júnior, Viana e Sakersampaio (2002) quem indicam que as diferenças morfológicas em populações ou grupo de peixes pode revelar diferentes pressões ambientais e biológicas. Neste sentido, Machado e Foresti (2012) acharam similaridades morfométricas entre indivíduos de *P. lineatus* de uma mesma população no Brasil.

Uma experiência realizada com larvas de bacalhão (MEEREN; TJELLDAL; NARDI, 2012) indica que o DO e o CT foram maiores em larvas criadas em luz constante. Mas esse trabalho comparou o tratamento de 24:00 com larvas mantidas sob 8:16, é dizer, com um fotoperíodo distinto. No entanto, outros achados assinalam que nos peixes que habitam zonas escuras o diâmetro do olho é maior. Além, em espécies migradoras como a *Anguilla*, o diâmetro do olho pode aumentar até o dobro antes da migração ao mar e os pigmentos são predominantemente bastões, o qual indica que deve fazer importantes adaptações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas (NICOL, 1989). O maior DO da curimba sugere um fato adaptativo similar, mas se precisa de maiores detalhes ultraestruturais para comprovar este aspecto. O antes citado é relevante porque os olhos atuam, junto com o órgão pineal, como sincronizador dos eventos ambientais e fisiológicos (MAITRA; SETH; CHATTORAJ, 2006).

O CT e o CP maiores em curimba no tratamento 24:00 podem ser explicados por um possível metabolismo acelerado devido à incidência de luz constante. Este efeito foi determinado em catfish africano e outras espécies de peixes (BROMAGE; PORTER; RANDALL, 2001; MUSTAPHA et al., 2012) e de outros vertebrados (FLOYD, 1985).

Os parâmetros morfométricos da curimba foram ligeiramente menores que as mesmas medidas das larvas de piracanjuba feitas por Maciel (2006) e Maciel et al. (2009) sob fotoperíodo de 12:12. Talvez este maior crescimento se deva às características ecológicas e fisiológicas da piracanjuba, por exemplo, a sua capacidade de captura e digestão de presas por se tratar de uma espécie canibal na sua fase larval (MACIEL et al., 2009; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004; SILVA et al., 2009). Mas o crescimento em CT e CP foram maiores em curimba que em uma espécie do mesmo gênero (*P. magdalenae*), sendo que o DO foi maior nesta última, de acordo com os dados de Arias-Gallo, Jiménez-Segura e Dorado (2010).

Deste modo, os dados obtidos demonstram que o crescimento das larvas de curimba apresenta uma alta sensibilidade frente às mudanças fotoperiódicas, especialmente nos fotoperíodos longos. Os achados são úteis na larvicultura desta espécie, pois podem ajudar no melhoramento de sua produção comercial.

4.3 Relações alométricas do crescimento de *P. lineatus*

Como pode se observar nos dados das tabelas 9, 10 e 11, a larva de curimba ao atingir o estágio de reabsorção total do vitelo (RTV) tem a cabeça e os olhos relativamente grandes em comparação com o seu comprimento total. Isto se evidenciou nos valores do coeficiente de crescimento alométrico ($b > 1$), especialmente em escuridão permanente (00:24). Achados como o anterior são reportados para larvas de *Bergmaceros cantori* no México que apresentaram um maior crescimento da cabeça em relação à longitude do corpo (BLAS-CABRERA; SÁNCHEZ-RAMÍREZ; OCAÑA-LUNA, 2006) em condições naturais de luz:escuridão.

No caso da alometria positiva da relação entre o DO e a altura da cabeça (AC), também explica a relevância do olho na fotorrecepção segundo o ambiente, pois geralmente os animais que habitam zonas com pouca ou nenhuma iluminação têm olhos de maior tamanho. Como reportado por Nicol (1989) este fato pode ser entendido nos termos de uma adaptação anatômica (fenotípica). Isto é reforçado pelos dados de Arias-Gallo, Jiménez-Segura e Dorado (2010) quem sob fotoperíodo de 12:12 acharam uma alometria negativa entre o DO e a AC em *P. magdaleanae*, espécie que é taxonômica e ecologicamente muito próxima a *P. lineatus*, mas com distribuições diferentes.

O crescimento alométrico positivo das principais características de *P. lineatus* determinadas nesta pesquisa, como o diâmetro dos olhos, a altura da cabeça e o diâmetro da vesícula ótica, concordam com a sua aparência externa.

Assim, na medida em que o crescimento avança, a larva de *P. lineatus* apresenta o corpo mais delgado e a região cefálica ampla (figura 3h), sendo uma larva de “cabeça e olhos grandes”. Uma alometria positiva foi reportada faz algumas décadas por Kyûshin (1975) em *Aptocyclus ventricosus* ($b > 1,4$), espécie que tem uma larva morfologia similar a *P. lineatus*, especialmente na região cefálica. Igualmente, Blas-Cabrera, Sánchez-Ramírez e Ocaña-Luna (2006) indicam que em *B. cantori* as relações no crescimento alométrico das larvas de *B. cantori* tendem a diminuir com as etapas sucessivas, pois o corpo dos animais torna se mais fino. A mesma tendência também foi observada por Peña e Dumas (2007) na cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*) na que a relação do DO com a LT apenas foi levemente positiva ($b = 1,11$) nas fases larvais avançadas. Assim mesmo, Hernández et al. (2002) assinalam que o tamanho grande dos olhos das larvas de alguns peixes pode se explicar pela anatomia cranial e o início alimentação, o qual tem um alto significado ecológico e evolutivo.

Em curimba é necessária a determinação do crescimento alométrico em ambientes fóticos variáveis nas fases seguintes de sua ontogenia (post – larva, alevino e juvenil) visando complementar os presentes dados. Mas é de esperar que as larvas que atingiram maior tamanho e vigor locomotor durante a fase vitelínica, tenham mais capacidade para capturar as presas e escapar dos predadores, o que pode garantir uma maior sobrevivência nas fases sucessivas. É de particular importância a verificação do efeito do fotoperíodo no início da alimentação exógena, pois é uma das fases críticas após da reabsorção do vitelo.

A alometria negativa encontrada na relação DVO_t/DO em todos os tratamentos também ratifica a forte influência da ausência de luz sobre o tamanho do olho em *P. lineatus*. O DVO_t é variável no seu crescimento quando relacionado com a comprimento total. Relação similar tem sido achada em outras espécies de peixes (ARIAS-GALLO; JIMÉNEZ-SEGURA; DORADO, 2010; PEÑA; DUMAS, 2007).

Deste modo, os dados alométricos desta pesquisa põem em evidência a plasticidade fenotípica da curimba no início da sua ontogenia, sendo que o fotoperíodo atua como modulador do crescimento de algumas estruturas-chaves nestas primeiras fases, sem desconhecer a importância de outros componentes morfológicos. Dentre de estas estruturas-chaves é de ressaltar, em conjunto, as dimensões da altura da cabeça, o diâmetro dos olhos e o padrão de pigmentação ocular e do corpo, os quais foram diferentes em cada regime de luz: escuridão.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-TALMELLI, E. et al. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 149-154, 2001.
- ARIAS-GALLO, M.; JIMÉNEZ-SEGURA, L. F.; DORADO, M. P. Desarrollo larval de *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, 1879) (Pisces: Prochilodontidae), Río Magdalena, Colombia. **Actual Biology**, Charlottesville, v. 32, n. 93, p. 199-208, 2010.
- ATENCIO-GARCÍA, V. et al. Influência da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem de yamú *Brycon siebenthalae* (Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 61-72, 2003.
- BLAS-CABRERA, J.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, M.; OCAÑA-LUNA, A. Desarrollo larvario de algunas especies del género *Bregmaceros* (Pisces: Bregmacerotidae) del sureste del Golfo de México. **Revista Biología Tropicales**, Bogotá, v. 54, n. 2, p. 561-575, jun. 2006.
- BOLKER, J. A.; HILL, C. R. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 56, n. 5, p. 1029-1052, May 2000.
- BONE, Q.; MARSHALL, N. B.; BLAXTER, J. H. S. **Biology of fishes**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 332 p.
- BOTTA, P. et al. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 42, n. 2, p. 109-114, 2010.
- BOUEF, G.; LE BAI, P. Y. Does light have influence on fish growth? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1/4, p. 129-152, July 1999.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1999. 184 p.

BROMAGE, N. R.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/2, p. 63-98, 2001.

CORREIA, M. A. et al. Ontogenia da pigmentação das larvas de três espécies de characiformes, criadas em incubatório. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-14, 2010.

CRUZ, V. L. **Criopreservação de sêmen de curimbatá *Prochilodus lineatus* = *scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

DUGUÉ, R. et al. Influencia del fotoperiodo y del ritmo de alimentación sobre la sobrevivencia larval del surubí (*Pseudoplatystoma fasciatum*). In: COMUNICACIONES DEL PRIMER COLOQUIO INTERNACIONAL DE LA RED DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA ICTIOFAUNA AMAZÓNICA, 1., 2005, Iquitos. **Anales...** Paris: IIAP, 2005. p. 199-204.

FAUSTINO, F. et al. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids. **International Journal of Developmental Biology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 723-730, 2010.

FLOYD, R. B. Effects of photoperiod and starvation on the temperature tolerance of larvae of the giant toad, *Bufo marinus*. **Copeia**, Lawrence, v. 3, n. 3, p. 625-631, Aug. 1985.

FUIMAN, L. A. Growth gradients in fish larvae. **Journal of Fish Biology**, London, v. 23, p. 117-123, 1983.

GODINHO, H. L.; POMPEU, P. S. A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco de Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC-Minas, 2003. p. 361-372.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: Subordem Characoidei**. São Paulo: Franciscana, 1975. 6 v.

HERNÁNDEZ, L. P. et al. Functional morphology and developmental biology of zebrafish: reciprocal illumination from an unlikely couple. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 222-231, Apr. 2002.

HISAR, S. A. et al. Effect of photoperiod on plasma thyroxine hormone level of mirror carp (*Cyprino carpio*) raised at low water temperature in a controlled environment - Isr. **Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 57, n. 1, p. 19-24, 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES. Glossary of terms for thermal biology. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 75-106, 2003.

JUAN, J. de et al. **Influencia del sistema visual en la reproducción de los peces**. Alicante: Universidad de Alicante, 2006. 27 p.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KYŪSHLN, K. The embryonic and larval development, growth, survival and changes in body form, and the effect of temperature on these characteristics of the smooth lumpsucker, *Aptocyclus ventricosus* (Pallas). **Bulletin of the Faculty Fisheries Hokkaido University**, Tokyo, v. 26, n. 1, p. 49-72, 1975.

LARSON, E. T. et al. Social stress affects circulating melatonin levels in rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 136, n. 3, p. 322-327, May 2004.

LE DOUARIN, N. M. et al. Neural crest cell plasticity and its. **Development**, Cambridge, v. 131, p. 4637-4650, Oct. 2004.

MACHADO, M. R. F.; FORESTI, F. Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847), of the migratory and resident stocks of the river Mogí-Guaçu, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 341-346, Oct./Dec. 2012.

MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia das larvas de piracanjuba *Brycon orbygnianus*, Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. 2006. 244 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

MACIEL, C. M. R. R. et al. Desenvolvimento morfológico das larvas de *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (Characiformes, Erythrinidae), da eclosão até a metamorfose, relacionado com a capacidade de capturar alimento exógeno. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 103-111, set. 2009.

_____. Desenvolvimento morfológico e comportamental das larvas de piracanjuba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 5, p. 961-970, set./out. 2010.

MACIEL JÚNIOR, A. **Desenvolvimento inicial de larvas de Curimatá-Pacu (*Prochilodus marginatus* Walbaum, 1792) (Characiformes, Prochilodontidae) submetidas a diferentes temperaturas de incubação**. 1996. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

MAITRA, S. K.; SETH, M.; CHATTORAJ, A. Photoperiod, pineal photoreceptors and melatonin as the signal of photoperiod in the regulation of reproduction in fish. **Journal of Endocrinology and Reproduction**, Dublin, v. 10, n. 2, p. 73-87, 2006.

MEEREN, T. van der; TJELLDAL, P. G.; NARDI, G. **Continuous light versus photoperiod: effects on eye size and deformities larval and juvenil cod**. Disponível em: <http://www.aquaculture.ugent.be/larvi/larvi09/posters/Van_der_Meeren.pdf>. Acesso em: 4 nov. 2012.

MONTOYA, A.; ARIAS, M.; OLIVERA-ANGEL, M. Embryonic Development of *Bryconamericus caucanus* (Characidae: Tetragonpterinae) under laboratory conditions. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 28, n. 3, p. 869-872, 2010.

MUSTAPHA, M. K. et al. Effects of three different photoperiods on the growth and body coloration of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). **Archives of Polish Fisheries**, Warsaw, v. 20, n. 1, p. 55-59, Apr. 2012.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NICOL, J. A. C. **The eyes of fishes.** Oxford: Clarendon, 1989. 244 p.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1256840/pdf/janat00043-0246a.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2012.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 217-229, Aug. 2006.

NORDLUND, J. J. et al. The genetics and histology of red, blond and associated colour variants in *Oreochromis niloticus*. **Genetica**, Dordrecht, v. 76, n. 2, p. 127-137, Mar. 2006.

PEÑA, R.; DUMAS, S. Desarrollo de la retina em larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculofasciatus* (Percoide: Serranidae) bajo condiciones de cultivo. **Ciencias Marinas**, Ensenada, v. 33, n. 3, p. 293-300, 2007.

RENNO, J. F. et al. Biología de las poblaciones de peces de la Amazonía y piscicultura. In: COLOQUIO DE LA RED DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA ICTIOFAUNA AMAZÓNICA, 2., 2005, Manaus. **Anais...** Manaus: RIIA, 2005. Disponível em: <http://www.riiaamazonia.org/PUBS/RIIA_II_Textos.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2012.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 67-71, 2004.

RICKER, W. E. **Methods for assessment of fish production in fresh waters.** Philadelphia: F. A. Davis, 1968. 328 p. (IBP Handbook, 3).

SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. O. Growth and survival of Dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 435-444, May 2007.

SHAN, X. et al. Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 281, n. 1/4, p. 70-76, Sept. 2008.

SILVA, M. O. et al. Crecimiento y supervivencia de postlarvas de piracanjuba (*brycon orbignyanus*). **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 58, n. 222, p. 285-288, 2009.

SOUZA JÚNIOR, J. P.; VIANA, M. S.; SAKERSAMPAIO, S. Diversificação intra-específica do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey, no Norte e Nordeste do Brasil: I, caracteres morfométricos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 973-980, 2002.

TREVARROW, B.; MARKS, D. L.; KIMMEL, C. B. Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. **Neuron**, Maryland, v. 4, n. 5, p. 669-679, May 1990.

VALBUENA, V. R. D. et al. Desarrollo embrionario del capaz *Pimelodus grosskopfii* (Steindachner, 1879). **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 30, n. 1, p. 150-156, 2012.

VERAS, G. C. **Fotoperíodos no comportamento locomotor e desenvolvimento de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 97 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ZAGOLIN, G. B.; XAVIER NETO, J.; HILSDORF, A. W. S. Estudo da migração das células da pigmentação da crista neural de duas variedades de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus* var. Red-Stirling e var. Chitralada) e seu híbrido utilizando técnicas de Imunohistoquímica. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2009, São Paulo. **Anais...** Mogi das Cruzes: Universidade de Mogi das Cruzes, 2009. Disponível em: <http://www.umc.br/_img/_diversos/pesquisa/pibic_pvvc/XII_congresso/projetos/Gustavo_Botton.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2012.