

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Análise do desenvolvimento embrionário de espécimes provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus*.**

*Isângela Rodrigues de Oliveira Almeida*

**BOTUCATU / SP**

**2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Análise do desenvolvimento embrionário de espécimes provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus*.**

*Isângela Rodrigues de Oliveira Almeida*

*Orientador: Prof. Dr. Fábio Porto Foresti*

*Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia.

**BOTUCATU / SP**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP  
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Almeida, Isângela Rodrigues de Oliveira.

Análise do desenvolvimento embrionário de espécimes  
provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre  
*Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus* /  
Isângela Rodrigues de Oliveira Almeida. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011

Orientador: Fábio Porto Foresti

Co-orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

Capes: 20602006

1. Peixe - Embriologia. 2. Cruzamento (Genética)

Palavras-chave: Embrião; Híbridos; Jandiá; Morfologia; Peixe;  
Pintado

“Escolha um trabalho que você ame e não terá de trabalhar um único dia em sua vida”.

*Confúcio*

*Dedicatória*

*Dedico este trabalho ao meu Deus, ao Amado Jesus e ao Amigo Espírito Santo.*

*Agradecimentos*

*A DEUS por me dar a oportunidade de conhecer os mistérios da sua criação..*

*Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti pela oportunidade oferecida, pela confiança em mim depositada, pela orientação e paciência.*

*Ao Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira pela confiança em mim depositada a 5 anos, por todos os ensinamentos, pela orientação, pela PACIÊNCIA, dedicação, conselhos e principalmente pela sua amizade.*

*Ao Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu com seu Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de realizar meu curso de Mestrado.*

*A Fapesp pela concessão da bolsa, sem a qual eu não poderia realizar este trabalho.*

*Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade - CEPTA/ICMBio por disponibilizar toda infraestrutura e por ter fornecido material biológico. Agradeço em especial a Rita, João e Gordo por toda ajuda nas coletas realizadas e por muitas risadas.*

*Ao Prof. Dr. José Augusto Senhorini, pela confiança, por toda ajuda e por disponibilizar o seu conhecimento.*

*A Piscicultura Buriti, na pessoa de José Mário Ribeiro Mendes, pela confiança e por disponibilizar o material biológico para o estudo.*

*Ao Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.Neo/UNESP- Ilha Solteira,SP.) por fornecer toda a infraestrutura para o desenvolvimento do estudo e por ser minha segunda casa.*

*A Profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira pelo apoio, pelos ensinamentos, pelos conselhos e por toda amizade.*

*Aos Amigos do L.I.Neo (Diógenes, Giovana, Rafael, Amanda, Mirian, Matheus, Cristiane, Aline, Laíza e Felipe) pela AJUDA, pelo apoio e grandes amizades.*

*Aos funcionários do Dpto. De Biologia e Zootecina, UNESP, Ilha Solteira/SP, super agradecimento a Meiri, Cleusa, Zeneide e Sidval por toda colaboração, socorro, amizade e muitas risadas.*

#### *Agradecimentos especiais*

*Ao Meu Esposo João Vitor (Amado) por todo Apoio, Amor, Carinho, PACIÊNCIA, Incentivo, Ajuda, Orações e Esperas. Louvo a Deus por sua vidas. Não conseguiria este título sem você.*

*Aos meus Pais (Mãe Rô e Pai Dê) por toda ajuda (Sempre), pelo carinho, pelo incentivo e amor. Este trabalho é fruto de vocês.*

*Ao meu Irmão Igor, por todo incentivo, carinho e amizade.*

*Aos meus Avós (Vô Isael, Vó Angelina e Vó Claudia) pelo carinho, ajudinhas, conselhos e muito amor.*

*Aos meus Sogros (Almeida e Fátima) por todo carinho, incentivo, amor, amizade e muitas orações.*

*Aos Tios (Carlos e Laurentina) por me acolherem em sua casa e por cuidarem de mim como uma filha.*

*A toda minha família por todo o apoio, carinho, amizade e orações (principalmente tia Amélia e Tio Ademar).*

*A família Silveira (Alexandre, Rosi e Gabi) por toda amizade e carinho.*

*A meu Amigo Larika por toda amizade que esta sendo construída a 7 anos, pelas conversas, pelas ajudas, pelas brigas e perdões. Você é mais que amigo, é um irmão.*

*A todos os meus Amigos e Companheiros, pela amizade inestimável e por tudo que fizeram por mim.*

**ABSTRACT**

The main of this research project was analyze the embryos development from the inter-specific crossing between the neotropical teleostei species, pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e jandiá (*Leiarius marmoratus*). The samples were realized in the National Research and Conservation Nucleus of Continental Fishes – CEPTA/ICMbio, Pirassununga – SP in the Buriti Fish Farming, Nova Mutum – MT. The reproduction was made through the hormonal induction, using gross extract of pituitary from carpa. The eggs were incubated in vertical incubators and collected since the fertilization time until the larval hatching. The eggs of the parents *P. corruscans* e *L. marmoratus* and their hybrids, are spherical, demersal, distinct chorion and small perivitelline space after the hydration without observation of the presence of drop oil in the vitelline vesicle during all embryonic development. The mean of the perivitelline space of the *L. marmoratus* was 215,9µm, in the *P. corruscans* was 352,5µm, in the hybrid I was 589,6µm and 247,2µm in the hybrid II. The mean diameter of the egg in *L. marmoratus* was 589,6µm, in *P. corruscans* was 867,3µm, in the híbrido I was 765,3µm and 581µm in the hybrid II. The incubation period of *P. corruscans* and the híbrido I was 13 hours, in the mean temperature of 28,7°C. However in *L. marmoratus* and Hybrid II was 14 hours for the parental and 12 hours for the hybrid in the mean temperature of 28,3°C. It was established the following embryonic stages: zygote, cleavage, gastrula, organogenesis and hatching and this divided in phases. The cleavage stage was divided in the phases 2, 4, 8, 16, 32, 64 cells and in the morula phase. The gastrula stage showed the phases 25%, 50%, 75%, 90% and 100% of morphogenetic movements of epiboly and the organogenesis stage was divided in the neurula, segmentation and larval phases. The cleavage is meroblastic or incomplete, following the pattern 2x1x1; 2x2x1; 2x4x1; 4x4x1; 4x8x1; 4x8x2. The morula phase and the establishment of the blastoderm finish the cleavage stage. The gastrula stage was characterized by the start of the morphogenetics movements of epiboly, involution and convergence that will produce the first embryonic follicles and axis, finishing with the close of the yolk plug. The organogenesis stage was characterized by the formation of the somites, of the notochord, neural tube and the initial intestinal delimitation, with the growth and elongation of the embryo, principally in the head-tail axis. The larval phase of the organosenesis stage was characterized by the free tail, by the absent of the Kupffer vesicle, notochordal extension until the tail, well defined posterior intestine and start of the spasmodic movements realized by the embryo. In this phase, was found in the parents and hybrids the presence of one non identified structure made by three pairs of massive elevations localized under the optical vesicle, being two localized before and one posterior to the optical vesicle. With the scan electron microscopy, was

visualized the presence of embryonic veins and olfactory plates. The hatching stage was characterized by the total disruption of the chorion and the larval free natation.

Key-word: embryo; hybrids ; jandiá; morphology; fish; pintado.

## RESUMO

Este projeto de pesquisa teve como objetivo analisar o desenvolvimento de embriões provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre as espécies de teleósteos neotropicais, pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e jandiá (*Leiarius marmoratus*). As coletas foram realizadas no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO, Pirassununga – SP e na Piscicultura Muriti, Nova Mutum – MT. A reprodução foi feita através de indução hormonal, utilizando extrato bruto de hipófises de carpa. Os ovos foram incubados em incubadoras verticais e coletados desde o momento da fertilização até a eclosão das larvas. Os ovos dos parentais *P. corruscans* e *L. marmoratus* e seus híbridos, são esféricos, demersais, córion nítido e espaço perivitelínico pequeno após a hidratação, não sendo observada a presença de gota de óleo na vesícula vitelínica durante todo o desenvolvimento embrionário. A média do espaço perivitelínico do *L. marmoratus* foi de 215,9µm, do *P. corruscans* foi de 352,5µm, do híbrido I foi de 561µm e do híbrido II foi de 247,2µm. O diâmetro médio do ovo do *L. marmoratus* foi de 589,6µm, do *P. corruscans* foi de 867,3µm, do híbrido I foi de 765,3µm e do híbrido II foi de 581µm. O período de incubação do *P. corruscans* e do híbrido I foi de 13 horas, à temperatura média de 28,7°C respectivamente. Já para o *L. marmoratus* e do híbrido II foi de 14 horas para o parental e 12 horas para o híbrido, a uma temperatura média de 28,3°C. Sendo estabelecidos os seguintes estágios embrionários: zigoto, clivagem, gástrula, organogênese e eclosão e estes divididos em fases. O estágio de clivagem foi dividido nas fases de 2, 4, 8, 16, 32, 64 células e na fase de mórula. O estágio de gástrula apresentou as fases de 25%, 50%, 75%, 90% e 100% do movimento morfogenético de epibolia e o estágio de organogênese foi dividido nas fases de nêurula, de segmentação e larval. O tipo de clivagem é meroblástica ou incompleta, seguindo o seguinte padrão: 2x1x1; 2x2x1; 2x4x1; 4x4x1; 4x8x1; 4x8x2. Sendo, a fase de mórula e o estabelecimento da blastoderme finalizam o estágio de Clivagem. O estágio de gástrula caracterizou-se pelo início dos movimentos morfogenéticos de epibolia, involução e de convergência, que irão produzir os primeiros folhetos e eixos embrionários, finalizando com o fechamento do tampão vitelino. O estágio de organogênese foi caracterizado pela formação dos somitos, da notocorda, tubo neural e a delimitação intestinal inicial, com crescimento e alongamento do embrião, principalmente no eixo céfalo-caudal. A fase larval do estágio de organogênese caracterizou-se pelo despregamento da cauda, pela ausência da vesícula de Kupffer, extensão notocorda até a cauda, intestino posterior bem definido e início dos movimentos espasmódicos feitos pelos embriões. Nesta fase, constatou nos parentais e nos híbridos a presença de uma estrutura não identificada formada por três pares de

elevações maciças localizadas abaixo da vesícula ótica, sendo que duas encontram-se anterior à vesícula ótica e uma posterior a ela. Com a utilização da microscopia eletrônica de varredura, visualizou a presença de veias embrionárias e placas olfatórias. O estágio de eclosão foi caracterizado pelo rompimento total do córion e a livre natação das larvas

Palavras-Chave: embrião; híbridos; jandiá; morfologia; peixe; pintado.

## **Sumário**

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 Hibridação interespecífica em peixes	02
1.2 Vantagens e riscos ocasionados pela hibridação interespecífica	07
1.3 Considerações sobre as espécies parentais e seus híbridos	09
1.4 Estudos da reprodução de peixes	13
1.5 Desenvolvimento embrionário	14
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
2.1 Obtenção dos embriões	21
2.2 Formas de coleta	24
2.3 Análise sob Estereomicroscopia e Morfometria	24
2.4 Análise histológica sob Microscopia Óptica	25
2.5 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura	26
<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
3.1 Embriogênese	28
3.1.1 Estágio de Zigoto	29
3.1.2 Estágio de Clivagem	29
3.1.3 Estágio de Gástrula	31
3.1.4 Estágio de Organogênese	33
3.1.5 Estágio de Eclosão	36
<b>Tabelas</b>	<b>38</b>
<b>Figuras</b>	<b>42</b>

<b>DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIA</b>	<b>77</b>

## **INTRODUÇÃO**

A aquicultura constitui atualmente uma atividade em expansão do segmento agrícola mundial, com um aumento anual de menos de um milhão de toneladas no início dos anos 50 para 51,7 milhões de toneladas em 2006 (FAO, 2008). O aumento da demanda por peixes como resultado do acelerado crescimento mundial, aumento da disponibilidade de renda e preferência por pescado sobre outras fontes protéicas de origem animal seja por razões pessoais, culturais ou de saúde aceleram o crescimento do setor (WEBSTER & LIM, 2002).

Essa atividade vem apresentando um bom desenvolvimento, sendo que em 1999 houve expansão ao redor de 9%, e nos últimos anos esse número vem crescendo principalmente em consequência dos mercados de pesque-pague e do pescado processado (ROUBACH et al., 2003).

O Brasil possui grande potencial hídrico, climático e a mais rica fauna de peixes de água doce do mundo destacando-se como um dos países de maior potencial para a expansão da aquicultura. Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (2010), a produção brasileira de pescado aumentou 25% nos últimos oito anos passando de 990.899 toneladas anuais para 1.240.813 no ano de 2009. Somente nos últimos dois anos, houve um crescimento de 15,7%, conforme os dados estatísticos de 2008 e 2009, sendo que a aquicultura apresentou uma elevação 43,8%, passando de 289.050 toneladas/ano para 415.649 toneladas/ano (MPA, 2010). Contudo, a piscicultura ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento, devido aos processos de produção adotados e a falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico e deficiência de dados científicos acerca de sua biologia, especialmente a

reprodutiva (GODINHO, 2007). Mesmo com o aprimoramento das técnicas de reprodução, alimentação e manejo na piscicultura, muitos problemas precisam ainda ser resolvidos, principalmente com relação as fases iniciais do cultivo de espécies nativas, que acarreta altas taxas de mortalidade até a fase de alevino (MACIEL, 2006).

### **1.1 Hibridação interespecífica em peixes**

A hibridação pode ser conceituada como o cruzamento de grupos ou indivíduos geneticamente diferenciados, e pode envolver tanto cruzamentos entre linhagens dentro de uma mesma espécie quanto entre indivíduos de espécies diferentes (BARTLEY et al., 2001).

Em peixes a hibridação tem sido estudada desde o final do século XIX e, ao contrário dos demais vertebrados, a ocorrência de híbridos naturais e artificiais é um fenômeno bastante comum (CALCAGNOTTO, 1999). Admite-se que tal processo nos peixes seja mais comum que em mamíferos, aves e répteis devendo-se isto a um conjunto de fatores que, em maior ou menor grau, facilitam os mecanismos de isolamento reprodutivo, tais como: abundância desigual das espécies parentais, competição por locais de desova limitadas e falhas nos mecanismos etológicos de isolamento (CAMPTON, 1988 citado por CALCAGNOTTO, 1999).

Grande parte dos híbridos naturais de peixes são encontrados em águas continentais, onde a frequência de hibridação e especiação é notavelmente maior que a encontrada em espécies marinhas, em que os híbridos são geralmente raros (HUBBS, 1955 citado por PORTO-FORESTI et al., 2010). Porém a grande maioria dos híbridos encontrados atualmente são aqueles produzidos artificialmente, e entre os principais objetivos da hibridação artificial está a produção de animais com melhor desempenho

que suas espécies parentais, como o aumento da taxa de crescimento, maior qualidade da carne, resistência a doenças e capacidade de tolerar variações ambientais, além do aperfeiçoamento de diversas outras características a fim produzir peixes mais proveitosos para o cultivo, o que também pode ser chamado de vigor híbrido (TOLEDO-FILHO et al., 1994 e 1998).

A técnica de hibridação pode ser realizada e classificada em três tipos: a **hibridização intraespecífica**, isto é, entre indivíduos da mesma espécie, mas de variedades diferentes, comum na piscicultura ornamental para a obtenção de variedades com novas cores, formatos de cauda como no caso de kinguios, platys e ciclídeos; a **hibridização interespecífica**, entre espécies diferentes, mas do mesmo gênero, como é o caso do cruzamento entre o surubim cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* e o surubim pintado *Pseudoplatystoma corruscans*; e a **hibridização intergenérica**, entre espécies de gêneros diferentes, como entre surubins do gênero *Pseudoplatystoma* e o jundiá amazônico *Leiarius marmoratus* e entre os peixes redondos como o tambaqui *Colossoma macropomum* e o pacu *Piaractus mesopotamicus* (FERNANDES, 2010). Os resultados da hibridação são mais evidentes quanto mais diferentes forem os grupos genéticos utilizados (LOPEZ-FANJUL & TORO, 1990).

A hibridação interespecífica é considerada por diversos autores um método de melhoramento genético de difícil compreensão, uma vez que os produtos obtidos do acasalamento de diferentes espécies podem originar diversos produtos genéticos tais como Ginogenéticos e Androgenéticos Haplóides ou Diplóides, Híbridos Diplóides simples, Triplóides ou até indivíduos Tetraplóides (TOLEDO-FILHO et al., 1998).

O uso da hibridação permite agregar, de forma rápida, num mesmo grupo genético, características desejáveis de espécies ou linhagens diferentes; com apenas uma geração de acasalamentos é possível obter indivíduos adaptados a determinadas situações de cultivo e que tenham produção superior aos progenitores. Contudo, a manutenção desta superioridade, é dependente da continuidade dos acasalamentos de indivíduos geneticamente distintos e que apresentem superioridade para as características de interesse (RESENDE et al., 2010).

A aplicação da hibridação interespecífica é utilizada no sistema de manejo nas grandes pisciculturas que visa produzir animais que possam obter melhor desempenho que as espécies parentais (vigor híbrido), como o aumento da taxa de crescimento, melhor qualidade da carne, resistência a doenças e capacidade de tolerar variações ambientais, além do aperfeiçoamento de diversas outras características a fim produzir peixes mais proveitosos para o cultivo (QUAGGIO et al., 2009).

O objetivo, ao realizar a hibridação, é explorar o vigor do híbrido ou heterose (RESENDE et al., 2010). O termo heterose ou vigor híbrido é utilizado para caracterizar a superioridade média dos filhos em relação à média dos pais, independentes da causa (PEREIRA, 2004 citado por REIS-NETO, 2007). Ele se aplica, ainda, ao fenômeno no qual a descendência de acasalamentos entre linhagens consangüíneas, ou entre populações de raças puras, apresenta desempenhos superiores à média das duas populações, excedendo a melhor destas.

O uso da hibridação artificial em peixes foi iniciado cerca de 30 anos no Brasil pelo Departamento de Obras Públicas Contra a Seca (DNOCS) e envolveu Diferentes espécies de tilápias (TOLEDO-FILHO et al., 1998). Em 1985 o Centro de Pesquisa de Peixes Continentais (CEPTA, Pirassununga, SP) produziu o “tambacu”, híbrido

interespecífico entre a fêmea de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e macho de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (BERNARDINO et al., 1986 citado por PRADO, 2010). Hoje em dia, envolve um grande número de cruzamentos interespecíficos entre espécies de peixes Neotropicais (PORTO-FORESTI et al., 2010).

Dentro da piscicultura, o cultivo de híbridos tem recebido especial atenção, como o objetivo de aproveitar as características favoráveis das espécies parentais, bem como melhorar o seu desempenho para a exploração em cativeiro. Ou seja, a hibridação como técnica praticada em explorações aquícolas pretende melhorar o nível de produção, de maneira que o sistema se torne mais competitivo e o produto final tenha maior aceitação por parte dos consumidores (BOTERO et al., 2004).

Martino (2002) citado por Botero (2004) reporta que na Venezuela já há casos da hibridação artificial de espécies de bagres como *Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*. Kossowski (2001) comenta sobre o bom desempenho no crescimento e na engorda dos híbridos intragenéricos *Calophysus macropterus* x *Leiarius marmoratus*, *Calophysus macropterus* x *Pimelodus blochii*, *Calophysus macropterus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*, e *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pimelodus blochii*.

No Brasil existem diversos exemplos de híbridos na piscicultura, tais como: tambatinga (pirapitinga - *Piaractus brachypomus* X tambaqui - *Colossoma macropomum*), piaupara (piaçu - *Leporinus macrocephalus* X piapara *Leporinus enlongatus*), cachapira (cachara - *Pseudoplatystoma reticulatum* X pirarara - *Phractocephalus hemiliopterus*), cachapinta (cachara - *Pseudoplatystoma reticulatum* X pintado - *Pseudoplatystoma corruscans*) e outros (PORTO-FORESTI et al., 2008).

Lopez-Fanjul e Toro (1990) relatam que os resultados da hibridação são mais evidentes quanto mais diferentes forem os grupos genéticos utilizados. Segundo Resende et al. (2010), nas situações em que os híbridos são inférteis, obrigatoriamente os cruzamentos serão terminais com máxima exploração da heterose. Porém, nas situações em que os híbridos geram descendentes, a manutenção da heterose dependerá da escolha das espécies que serão acasaladas com a F<sub>1</sub>. A utilização de uma das espécies parentais causará redução do vigor do híbrido e possível diminuição da vantagem do cruzado. A utilização de uma terceira espécie demandará maior organização do sistema de produção, pois serão necessárias estruturas de produção para animais da mesma espécie, para os híbridos de primeira geração e os híbridos de segunda geração, em que cada grupo genético possui exigências específicas quanto ao manejo reprodutivo, de alimentação e aspectos sanitários.

Atualmente os piscicultores já estão praticando o cruzamento entre híbridos F<sub>1</sub> e híbridos F<sub>1</sub> com uma terceira espécie. Exemplo disto é o cruzamento do Cachapinta (*Pseudoplatystoma reticulatum* com *Pseudoplatystoma corruscans*) com o *Leiarius marmoratus*, estudos mostraram que seus juvenis são viáveis (PONZETTO et al., 2010).

Há, portanto, necessidade de mais estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes híbridos, bem como do impacto ambiental que podem vir a causar antes da exploração em larga escala destes animais (FAUSTINO et al., 2007).

Os expressivos resultados obtidos com o uso de técnicas de hibridação em peixes interespecíficos devem ser cuidadosamente interpretada em face dos riscos biológicos que os híbridos representam para o ambiente (PORTO-FORESTI et al., 2010) e desta maneira, estudos na compreensão da dinâmica da hibridação

interespecífica em peixes, fornecendo subsídios, conhecimento básico que envolvam a técnica da hibridação, podendo contribuir em programas destinados à conservação biológica.

## **1.2 Vantagens e riscos ocasionados pela hibridação interespecífica**

Fernandes (2010) reporta várias justificativas para se produzir um híbrido na piscicultura, como a redução do tempo de engorda (ganho de peso mais rápido), obtenção de populações monossexo sem a utilização de hormônios, obtenção de indivíduos mais dóceis e aptos ao manuseio comum na piscicultura, o aumentar da resistência à patógenos e a certas condições ambientais, como salinidade, temperaturas altas ou baixas, baixos teores de oxigênio dissolvido, entre outras.

A produção do híbrido proveniente do cruzamento entre *Pseudoplatystoma reticulatum* com *Pseudoplatystoma corruscans*, deve se ao fato dos alevinos serem mais dóceis, aprenderem a se alimentar mais facilmente e possivelmente apresentarem taxa de crescimento mais elevada (CREPALDI et al., 2003 citado por CARVALHO et al., 2007).

Crepaldi et al. (2004) comparou o desempenho do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com o híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*), e concluíram que a hibridização promoveu ganho de peso superior.

A hibridação interespecífica é considerada uma das clássicas metodologias de manipulação genética mais aplicada nas pisciculturas, visando principalmente o aumento da produtividade e obtenção de linhagens estéreis (PORTO-FORESTI et al., 2010).

O impacto genético nos estoques selvagens varia de intensidade conforme os produtos híbridos sejam estéreis, parcial ou totalmente férteis, ou ainda, caso sejam provenientes dos parentais nativos ou exóticos (FERGUSON & THORPE, 1991 citado por TOLEDO-FILHO et al., 1994). Segundo Resende et al. (2010) a ocorrência de híbridos férteis pode causar problemas ambientais caso estes animais sejam liberados de forma acidental na natureza. Os peixes híbridos podem se constituir em sérios riscos biológicos ao meio ambiente e às populações naturais, de forma a “contaminar geneticamente” os estoques e competir de diversas maneiras com as linhagens parentais (PORTO-FORESTI et al., 2010).

Carvalho et al. (2008) relataram a ocorrência de híbridos em rios do Brasil e da venda de animais híbridos como reprodutores “puros”, indicando que cuidados devem ser tomados na utilização destes animais, pois podem conduzir a resultados positivos na piscicultura brasileira, incrementando o desempenho, porém podem causar grandes impactos nos estoques naturais, reduzindo a biodiversidade existente (RESENDE et al., 2010).

O impacto genético mais sério pode ocorrer quando híbridos artificiais totalmente férteis são introduzidos em ambientes naturais onde já existam os parentais selvagens (TOLEDO-FILHO et al., 1994).

Uma das principais causas de perda de espécies de peixes nos EUA, chegando a ter um impacto de quase 40%, é a liberação em ambientes naturais de híbridos de diferentes espécies (PRIMACK & RODRIGUES, 2001 citado por MARQUES & JEFFMAN, 2003). Salmões criados em tanques-rede e que escaparam para a natureza, cruzaram com salmões de vida livre (cruzamento intraespecífico), provocando uma

diminuição da variabilidade genética destes últimos (MALZONO & MIYASHITA, 2003 citado por MARQUES & JEFFMAN, 2003).

Orsi & Agostinho (1999) fizeram um levantamento na bacia do rio Paranapanema e encontraram o híbrido tambacu, cruzamento do pacu (*Piractus mesopotamiais*) com Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Os "pesque-pague", recentes estabelecimentos comerciais de lazer que exploram a pesca esportiva de diferentes espécies de peixes, representam riscos adicionais, principalmente devido ao despreparo dos proprietários em relação a aspectos da conservação ambiental e ao fato que os escapes são praticamente inevitáveis (FERNANDES et al., 2003).

Toledo-Filho et al. (1994) relata que é difícil prever, a longo prazo, os resultados do impacto dos híbridos sobre a integridade genética das populações parentais selvagens já existentes num ambiente natural.

### **1.3 Considerações sobre as espécies parentais e seus híbridos**

A ordem Siluriforme constitui um grupo de peixes que se divide em 34 famílias, compostas por 412 gêneros e 2.405 espécies, das quais 1.300 habitam a região neotropical e o restante está distribuído nas regiões tropicais da África e Ásia (NELSON, 2006).

A família Pimelodidae é um agrupamento heterogêneo dos Siluriformes neotropicais e compreende um dos grupos mais diversificados de peixes, composta por aproximadamente 300 espécies distribuídas em cerca de 30 gêneros conhecidos (PINNA, 1998). A sistemática deste grupo ainda é confusa, embora recentemente várias revisões estejam sendo realizadas, para uma melhor compreensão das relações entre as espécies. Recentemente, a subfamília Rhamdiinae foi elevada à categoria de família

por Reis et al. (2003), que a trataram como família Heptaridae. Também a subfamília Pseudomipelodinae foi elevada à categoria de família, com bases em caracteres morfológicos (PINNA, 1998).

Poucas informações existem sobre a alimentação e desenvolvimento inicial desta família, destacando-se os trabalhos realizados em laboratório por Behr (1997) e Furuya (2001) com pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Kossowski (1991) com cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), Zaniboni Filho e Barbosa (1992) com jaú (*Paulicea luetkeni*), Luz et al. (2001) e Luz e Zaniboni Filho (2002) com mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*), e em ambiente natural o trabalho de Rossi (2001) com jurupê (*Sorubim lima*).

Dentro desta família, destacam-se espécies pertencentes aos gêneros *Brachyplatystoma* (piraíbas e douradas), *Pseudoplatystoma* (pintados e sorubins) e *Zungaro* (jaú) (BRITSKI, 1972). Espécies do gênero *Pseudoplatystoma* compreendem os maiores peixes desta família e pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica, do Prata e do São Francisco (WELCOMME, 1985; PETRERE, 1995; NAKATANI et al., 2001; MARQUES et al., 2008).

Nos últimos anos, somente três espécies eram reconhecidas neste gênero: *Pseudoplatystoma corruscans*, popularmente conhecida como pintado ou sorubim, restrita às bacias do Prata e São Francisco; *Pseudoplatystoma reticulatum*, popularmente conhecida como cachara, amplamente distribuída pelas bacias do Prata, Amazônica, Orinoco, rio Magdalena, e rios das Guianas e *Pseudoplatystoma tigrinum*, também chamada de caparari ou pirambucu, nas bacias do Orinoco e Amazônica (LUNDBERG & LITTMANN, 2003).

Contudo, estudos realizados por Buitrago-Suárez e Burr (2007), utilizando análises morfológicas, sugerem uma maior diversidade neste gênero, com 8 espécies reconhecidas. Segundo estes autores *Pseudoplatystoma tigrinum* passa a ser denominada *Pseudoplatystoma metaense* nas bacias do Orinoco e *Pseudoplatystoma tigrinum* na bacia Amazônica. A espécie anteriormente identificada como *Pseudoplatystoma reticulatum* corresponde a 5 espécies distintas: *Pseudoplatystoma reticulatum* na região das Guianas, *Pseudoplatystoma punctifer* na bacia Amazônica, *Pseudoplatystoma orinocoense* na bacia do Orinoco, *Pseudoplatystoma magdaleniatum* no rio Magdalena (Colômbia) e *Pseudoplatystoma reticulatum* nas bacias do Prata e Amazônica. Já *Pseudoplatystoma corruscans* continua com a mesma classificação, distribuída nas bacias do Prata e São Francisco.

A espécie *Pseudoplatystoma corruscans* é considerada de grande porte que apresenta manchas escuras arredondadas pelo corpo (FAUSTINO et al., 2007). Exibe desova total, fertilização externa e sem cuidado parental (VAZZOLER, 1996). Essa espécie apresenta também um grande potencial para a pesca esportiva e interesse como peixe ornamental, no caso de alevinos (VAZ et al., 2000). O período reprodutivo se estende de novembro a fevereiro (NAKATANI et al., 2001).

Essa espécie ocupa um habitat crescentemente alterado pelas ações antrópicas, tais como as construções de barragens, constantes hidrelétricas em operação, entre outros fatores ambientais, tem transformado os grandes rios em lagos artificiais, interferindo no comportamento migratório das espécies, causando prejuízos a reprodução da espécie, levando-a a ameaça de extinção (MANGETTI, 2006). Segundo Mello et al. (2009) a preservação dos habitats naturais e matas ciliares, a proibição da

pesca predatória e a redução na construção de novas barragens, são medidas importantes para conservação da espécie.

Atualmente *Pseudoplatystoma corruscans* pode ser considerado, juntamente com outras espécies nacionais como o pirarucu (*Arapaima gigas*), o dourado (*Salmonis maxillosus*), os tucunarés (*Cichla* sp.) e a pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*), todas espécies de hábito alimentar carnívoro/piscívoro com potencial para criação, seja, para alimentação, para pesca esportiva ou mesmo como peixe ornamental para o mercado nacional e para exportação (TOLEDO, 1991; CURY, 1992; RABELLO, 1992; KUBITZA, 1995; BEELEN et al., 1998 citado por LUNDSTEDT, 2003).

Outra espécie utilizada no presente trabalho é *Leiarius marmoratus* que se distribui nas bacias hidrográficas da América do Sul do Amazonas, Essequibo e do Orinoco. Pode atingir cerca de 50 cm de comprimento e caracteriza-se por possuir um maior número de raios ramificados na nadadeira dorsal (nove ou dez). Além disso, o padrão de colorido do corpo e das nadadeiras é peculiar, consistindo as manchas escuras sobre um fundo marrom – amarelado (CAÚPER, 2006). Segundo, Ramirez-Gil e Ajiaco-Martinez (1997) seu peso é de aproximadamente 12 kg e é encontrado em ambientes fundos de água doce, com um pH variando de 5,8 a 7,2 e uma temperatura média de 24 a 26 ° C. Em ambientes naturais apresenta hábito alimentar piscívoro (LAYMAN et al., 2005).

A partir de 1986, houve a prática da sua reprodução induzida (KOSSOWSKI, 1986; ESCOBAR & MOJICA, 1997), que permitiu a sistemática produção de alevinos de pequena escala, sustentada por reprodutores de segunda e terceira geração (MORA, 2003; MORA & KOSSOWSKI, 2006).

Estudos relatam que o *Leiarius marmoratus* tem uma adaptação ao confinamento e ao consumo de dietas secas, com resultados preliminares de um bom crescimento nos primeiros estágios de vida, quando submetidos a processos de adaptação à dieta úmida (CRUZ-CASALLAS et al., 2008).

Alguns estudos têm sido realizados sobre a obtenção de seus híbridos com as espécies, *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pimelodus blochii* (KOSSOWSKI, 1991, 1992a, b, 1994, 1996a, b), sua nutrição (SÁNCHEZ et al., 2009), sua estocagem (CRUZ-CASALLAS et al., 2010) e fisiologia reprodutiva (POLEO & MORA, 2008; MIRA et al., 2010). Porém são poucos os dados descritos sobre sua biologia na literatura especializada, sendo necessários maiores estudos sobre sua biologia, principalmente, com relação a essa espécie que já está sendo explorada comercialmente e utilizada na produção de híbridos.

#### **1.4 Estudos da reprodução de peixes**

As espécies de peixes desenvolveram diferentes estratégias de vida, ligadas a diferentes funções vitais, as quais habilitam a se manterem presentes nos distintos habitats. Em relação à reprodução, essa estratégia está associada às condições favoráveis ao desenvolvimento inicial dos ovos e larvas, destacando-se locais e épocas com maior disponibilidade de abrigo e alimentação, migração, cuidado com a prole, tipo de desova, fecundidade e tipo de ovo (tamanho, reservas, envoltórios, adesividade, pigmentos), tempo de incubação e desenvolvimento embrionário, são aspectos dessas estratégias (NAKATANI et al., 2001).

A reprodução é o processo biológico mais importante dos organismos, já que dela depende a sobrevivência e perpetuação das espécies, por isso, a possibilidade de

controlar o ciclo reprodutivo dos organismos submetidos a condições de confinamento é um dos fatores de maior importância para assegurar o êxito da piscicultura (ROMAGOSA, 2003 citado por PAES, 2008).

A reprodução induzida tornou-se um processo muito importante, especialmente para espécies reofílicas devido ao perigo de extinção de algumas destas espécies nobres, em virtude do desaparecimento das matas ciliares, das lagoas marginais e da construção de grandes barragens hidrelétricas que alteram seu habitat e dificultam sua reprodução natural (CASTAGNOLLI, 1992 citado por PAES, 2008).

Apesar dos avanços tecnológicos na reprodução artificial e na incubação dos peixes, alguns aspectos básicos que estão relacionados com as fases embrionárias, da fertilização à incubação, ainda não estão bem avaliados (SHARDO, 1995 citado por MARQUES et al., 2008). O estudo das fases iniciais do ciclo de vida é essencial para a elucidação taxonômica e questões ecológicas (SANCHES et al., 1999 citado por MARQUES et al., 2008).

### **1.5 Desenvolvimento Embrionário**

A importância do conhecimento dos estágios iniciais do ciclo de vida para o entendimento das variações na abundância das espécies tem sido documentada em estudos sobre crescimento, reprodução e mortalidade em populações de peixes (KELSO & RUTHERFORD, 1996 citado por NAKATANI et al., 2001).

O desenvolvimento embrionário é um processo que se inicia com a fertilização do ovócito e vai até a eclosão das larvas (KIMMEL et al., 1995). Após a fertilização, o ovo absorve água e ocorre a formação do espaço perivitelino, com a separação entre o córion e a membrana vitelina (PAES, 2008). Ribeiro et al. (1995) sugerem que a

morfologia do ovo, apresentando amplo espaço perivitelino logo após a fecundação, protege o embrião contra as injúrias do meio ambiente permitindo um desenvolvimento externo harmonioso. Os ovos dos peixes são telolécitos, com um elevado suprimento de vitelo, do qual o embrião irá se nutrir durante a embriogênese, assim como as larvas durante algum tempo após a eclosão (NAKATANI et al., 2001).

O desenvolvimento inicial em teleósteos começa com a fertilização e termina com a completa absorção do vitelo (KUNZ, 2004). É um processo altamente dinâmico, com mudanças ontogenéticas refletindo em mudanças morfofuncionais dos principais sistemas orgânicos, consequência da rápida evolução morfológica e fisiológica pela qual atravessam os embriões e larvas de peixes durante seu desenvolvimento (OSSE et al., 1997).

A descrição dos estádios embrionários de uma espécie pode fornecer inúmeras vantagens, tais como: o reconhecimento de seus embriões em ambientes naturais, o que permite uma melhor avaliação do local de desova daquela espécie e a detecção das alterações no seu desenvolvimento nas incubadoras, as quais poderão acarretar mal-formações larvais e baixa produtividade (ALVES & MOURA, 1992).

Os estudos de embriologia das espécies de peixes são relevantes para o conhecimento global de sua biologia e sistemática, particularmente em aspectos relacionados à variação ontogênica na morfologia, crescimento, alimentação, comportamento e mortalidade. Além de ser uma ferramenta para a detecção de novos estoques, avaliação e manejo de estoques pesqueiros, além da grande importância na identificação dos corpos d'água que participam do recrutamento das espécies (HEMPEL, 1973 citado por NAKATANI et al., 2001).

O conhecimento da ontogenia das espécies de peixes favorecerá o desenvolvimento da biotecnologia e permitirá utilizar o padrão ontogenético como bioindicador ambiental permitindo uma avaliação sobre os efeitos de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática. Como também, contribuir nas pesquisas relacionadas ao cultivo desses animais e abre possibilidades para estudos das relações evolutivas, da hereditariedade, dos mecanismos de desenvolvimento e das influências ambientais nas características estruturais dos organismos. Deste modo, verifica-se que o conhecimento do desenvolvimento embrionário das espécies de peixes pode ser utilizado em abordagens multifuncionais (LAGLER, 1959; FLORES et al., 2002; BOTERO et al., 2004; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; MARQUES et al., 2008).

Para que possam ser desenvolvidas técnicas para sua preservação “ex situ”, como a criopreservação de embriões de peixes, é imprescindível o conhecimento da embriogênese das espécies. O desenvolvimento desta biotecnologia trará enormes benefícios para a conservação dos ecossistemas aquáticos e para a humanidade, através da possibilidade da preservação da diversidade genética das espécies e no implemento da produção aquícola, favorecendo ao aumento da produção de alimento (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006). Pinto e Castagnolli (1984) também afirmam que o estudo dos primeiros dias de vida dos peixes é muito importante, especialmente para espécies selvagens com potencial para a piscicultura.

Em relação ao número de espécies nativas brasileiras de interesse econômico, muito pouco conhece a cerca do seu desenvolvimento embrionário. Dentre as espécies neotropicais que apresentam estudos de embriogenia destacam-se: *Colossoma macropomum* (ALBUQUERQUE et al., 1994), *Brycon cephalus* (LOPES et al., 1995), *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001), *Brycon orbignyanus* (GANECO,

2003), *Leporinus piau* (BORÇATO et al., 2004), *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Salminus brasiliensis* (NAKAGHI et al., 2006) e *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (SAMPAIO, 2006 citado por PAES, 2008).

Entre os siluriformes encontramos trabalhos de embriogênese do *Rhamdia hilarii* (GODINHO et al., 1978) com um período de incubação de 27 horas, em uma temperatura média de 23 °C, seus ovos são esféricos, transparentes, dermensais e não adesivos; o *Rhamdia sapo* (CUSSAC et al., 1985) com incubação de 30 a 45 horas (22 a 24 °C); o *Pseudoplatystoma corruscans* (CARDOSO et al., 1995) com tempo de desenvolvimento embrionário de 19 horas (23,5 a 25 °C), possuindo ovos não adesivos; o *Parauchenipterus galeatus* (SANCHES et al., 1999) com um período de incubação de 65 horas (27 °C) possui ovos grandes, adesivos e com dupla membrana; o *Pimelodus maculatus* (LUZ et al., 2001) o tempo de embriogênese foi de 21 horas (23 °C); o *Rhinelepis aspera* (PERINI et al., 2009) o desenvolvimento embrionário foi de 45 horas (24 °C), seus ovos são de pequeno espaço perivitelinio, envolto por uma camada gelatinosa e o *Rhamdia quelen* teve um período de incubação de 25 horas (24 °C), ovos esféricos, não adesivos e de coloração amarela (AMORIM et al., 2009; RODRIGUES-GALDINO et al., 2009).

Poucos estudos de desenvolvimento embrionário são realizados com os híbridos, entre eles temos: Ribeiro et al. (1995) que compara o parental Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e com o híbrido Tambacu e conclui que o desenvolvimento embrionário do pacu diferiu do desenvolvimento do tambaqui e tambacu, quanto ao tempo de embriogênese, ao tamanho do ovo e larva; Botero et al. (2004) com o híbrido *Piaractus brachypomus* com *Colossoma*

*macropomum*.teve um período de incubação de 19 horas em uma temperatura de 27°C; Faustino et al. (2007) com o híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* com *Pseudoplatystoma reticulatum* o tempo de desenvolvimento variou entre 14 horas em um temperatura média de 27°C, os ovos eram esféricos, com espaço perivitelínico amplo e coloração amarelada e Faustino et al. (2010) comparou os parentais *Pseudoplatystoma corruscans* e o *Pseudoplatystoma reticulatum* com o híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* com *Pseudoplatystoma reticulatum*, utilizando análise estrutura e ultraestrutural.

Assim sendo, estudos envolvendo o desenvolvimento embrionário, de híbridos é de grande importância para conhecimento da biologia reprodutiva destes animais, onde as informações obtidas poderão ser vitais nos estudos sobre biologia reprodutiva dos híbridos das espécies parentais, como também auxiliar nas pesquisas sobre impacto ambiental que pode advir pela exploração econômica destes híbridos e pelo seu escape para o meio ambiente.

## **OBJETIVOS**

Considerando que os estudos comparativos morfológicamente a nível estrutural do desenvolvimento embrionário dos híbridos interespecíficos provenientes dos cruzamentos de *Pseudoplatystoma corruscans* (♀) x *Leiarius marmoratus* (♂) e *Pseudoplatystoma corruscans* (♂) x *Leiarius marmoratus* (♀), ainda são escassos e, em sua maioria, não estão relacionados a projetos de cultivo, o presente projeto tem como objetivos principais:

- 1)** Identificar, as diversas fases do desenvolvimento embrionário dos híbridos interespecíficos acima mencionados, com análise dos diversos eventos morfológicos que ocorrem durante este período, sob estereomicroscopia, microscopia de luz e eletrônica de varredura.
  
- 2)** Comparar morfo-temporalmente a embriogênese dos híbridos relacionados com o desenvolvimento embrionário das espécies parentais (*Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus*);
  
- 3)** Observar e analisar as possíveis alterações morfológicas advindas do processo de hibridação envolvendo as espécies parentais;
  
- 4)** Promover a ordenação de dados biológicos de espécies e de linhagens híbridas que representem informações importantes para o cultivo destes, com relação à dinâmica do processo de hibridação, tanto para fins comerciais como para fins de pesquisa básica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na fase reprodutiva dos parentais *Pseudoplatystoma corruscans* (Figura 1A) e *Leiarius marmoratus* (Figura 1B) no período de janeiro a fevereiro de 2010, sendo que para obtenção dos embriões foram utilizados reprodutores pertencentes ao plantel existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, em Pirassununga – SP (Figura 2A) e na Piscicultura Muriti, Nova Mutum – MT (Figura 2B).



A



B

**Figura 1:** Exemplos dos parentais. **A** - *Pseudoplatystoma corruscans* e **B** – *Leiarius marmoratus*.



A



B

**Figura 2:** **A** - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio (Pirassununga – SP) e **B** - Piscicultura Muriti (Nova Mutum – MT).

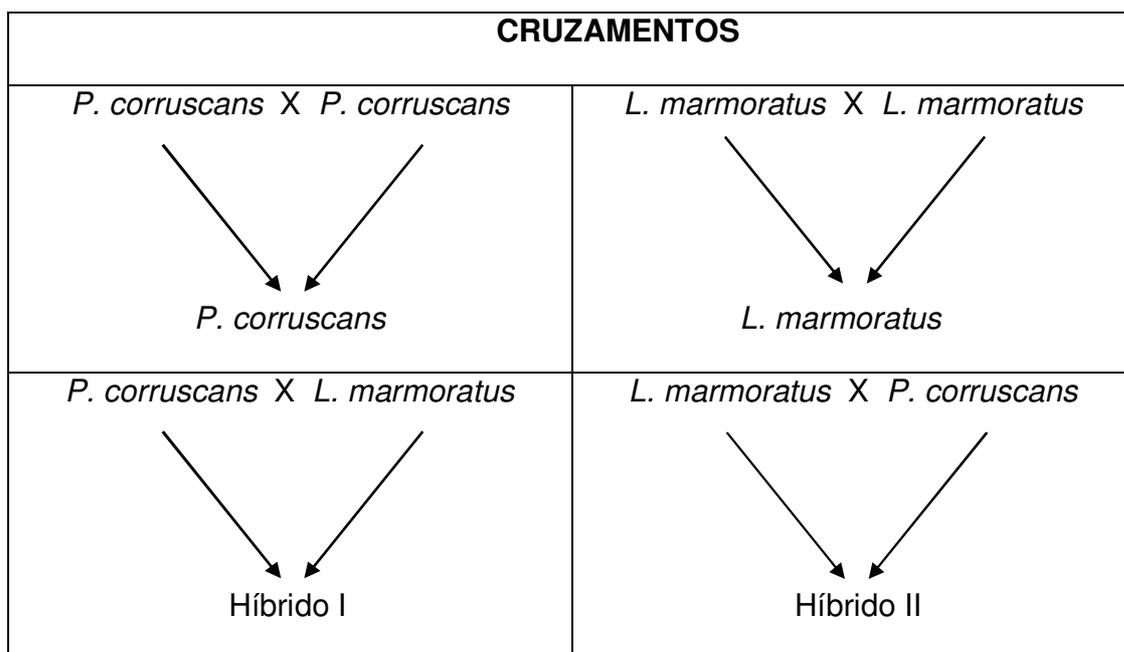
## 2.1 Obtenção dos embriões

A obtenção dos embriões foi feita através de indução hormonal das fêmeas e dos machos, utilizando-se solução de extrato bruto de hipófise de carpa (*Cyprinus carpio*), seguindo o método descrito por Woynarovich & Hórvath (1980). Foram ministradas duas doses de extrato hipofisário nas fêmeas de *P. corruscans* e *L. marmoratus*, sendo a primeira dosagem com 0,5 mg/kg de peso vivo, e após um intervalo de 12 horas uma segunda aplicação com 5,0 mg/kg de peso vivo. Neste momento, os machos receberam uma dosagem com 1 mg/kg de peso vivo.

Aproximadamente 10 horas após a última aplicação do hormônio, realizou-se a extrusão dos ovócitos e dos espermatozoides por massagem abdominal, no sentido antero-posterior do corpo dos reprodutores (Figura 4A; 4B; 4C). A fertilização dos ovócitos foi feita pelo método “a seco”, onde a mistura dos espermatozoides com os ovócitos foi efetuada em um recipiente seco, sem contato com água (Figura 5A). Após a mistura dos gametas adicionou-se água para a ativação dos espermatozoides,

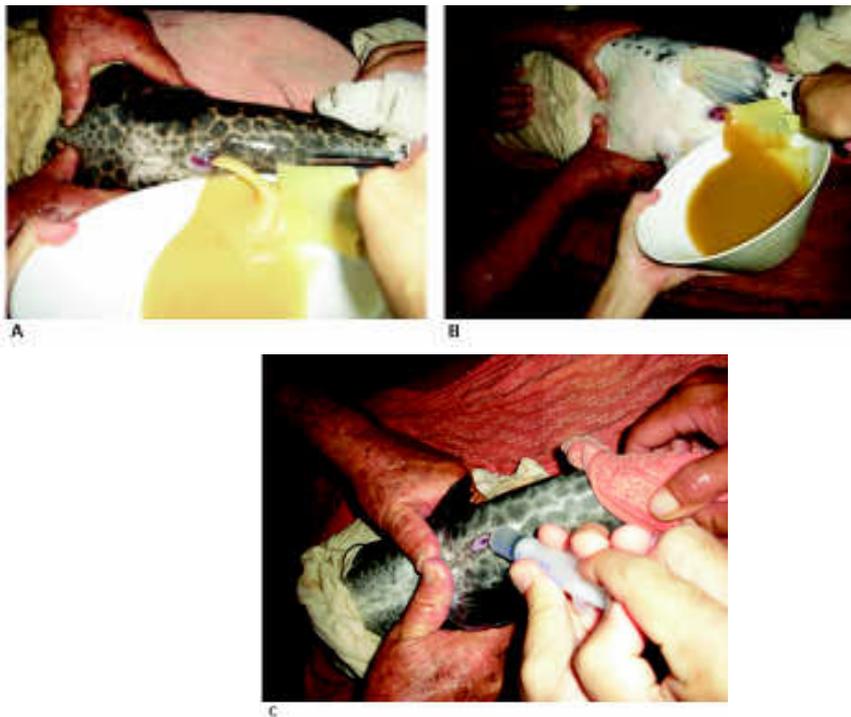
fertilização e hidratação dos ovócitos (Figura 5B). Depois de fecundados os ovos foram colocados em incubadoras verticais para a efetivação do desenvolvimento embrionário (Figura 5C).

Foram realizados 4 cruzamentos, sendo eles: *P. corruscans* x *P. corruscans*; *L. marmoratus* x *L. marmoratus*; *P. corruscans* (♀) x *L. marmoratus* (♂) e *P. corruscans* (♂) x *L. marmoratus* (♀) (Figura 3). Ao citar um cruzamento de híbridos utiliza-se o nome da fêmea primeiro e depois o nome do macho.

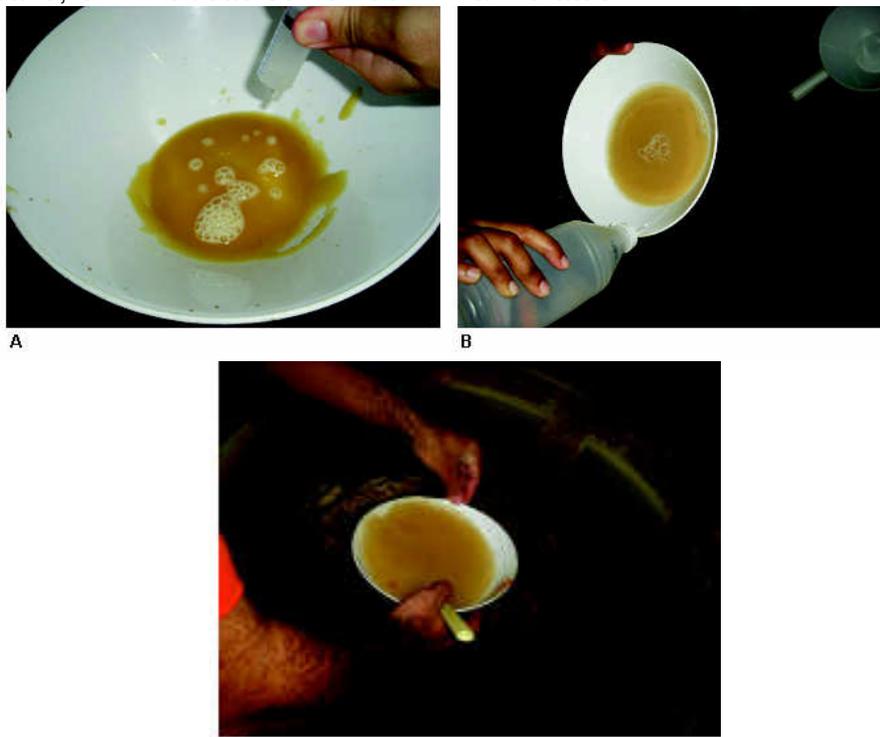


**Figura 3:** Esquema dos cruzamentos.

Durante a coleta foram registrados também, dados de temperatura.



**Figuras 4:** **A** – Extrusão ovócito de *L. marmoratus*; **B** – Extrusão ovócito de *P. corruscans*; **C** – Extrusão sêmen de *L. marmoratus*.



**Figura 5:** **A** – Método de fertilização “a seco”; **B** – Hidratação do ovócito e ativação do espermatozóide; **C** – Incubadora Vertical.

## **2.2 Formas de coleta**

A primeira coleta foi no momento que os ovos foram colocados nas incubadoras, sendo que as coletas seguintes foram realizadas com intervalos de 5 minutos na primeira hora, e, em seguida, de 10 em 10 minutos até completar 2 horas do desenvolvimento embrionário. Transcorridas essas duas horas a coleta foi feita em intervalos de uma hora até a eclosão das larvas. Os embriões coletados foram divididos em duas parcelas: uma fixada em solução de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, sendo após transferidas para álcool 70% e a segunda parcela foi fixada e mantida em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,3.

## **2.3 Análise sob Estereomicroscopia e Morfometria**

Os embriões foram analisados no Laboratório de Ictiologia Neotropical – L.I.NEO., Departamento de Biologia e Zootecnia, UNESP, Campus de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. Para a análise e fotomicrografia “in toto”, sob estereoscópio, os embriões pré-fixados foram separados por estágio embrionário, retirado o córion com o auxílio de pinça de relojoeiro e agulhas e realizado o procedimento de coloração com hematoxilina de Harris, seguindo as seguintes etapas:

- 1- Hidratar os embriões em água destilada por 1 minuto;
- 2- Passagem rápida na hematoxilina;
- 3- Lavar em água destilada;
- 4- Diferenciador (álcool 70% e ácido clorídrico) por 5 minutos;
- 5- Lavar em água destilada;
- 6- Conservar em álcool 70%.

Por fim, os embriões foram analisados e fotomicrografados em máquina digital (Moticam 2500/ 5.0 Mega Pixels USB 2.0), sob estereomicroscópio Motic SMZ 168.

## **2.4 Análise histológica sob Microscopio Óptico**

Para os estudos histológicos, os embriões selecionados de cada estágio foram incluídos em glicol metacrilato (Technovit 7100/historesina) seguindo a seguinte metodologia:

- 1- Álcool 70 % por no mínimo 12 horas;
- 2- Álcool 95% por 2 horas;
- 3- Solução 1:1 de mistura de álcool 95% e resina de infiltração por 5 horas;
- 4- Resina de infiltração por 12 horas (“over-night”);
- 5- Inclusão da amostra: sobre as amostras previamente depositadas e posicionadas nos histomoldes foi colocada a mistura da resina de inclusão (glicol metacrilato) mais o endurecedor, deixando o material secar por no mínimo três dias.

A seguir as amostras incluídas foram submetidas à microtomia para a obtenção de cortes seriados transversais e sagitais de 3 e 2  $\mu\text{m}$ . Os cortes foram depositados sobre lâminas histológicas e então corados com hematoxilina de Harris-eosina seguindo a metodologia abaixo:

- 1- Hidratação dos cortes em água destilada;
- 2- Hematoxilina por 25 minutos;
- 3- Lavar em água destilada por 10 minutos;
- 4- Desidratar os cortes em álcool 90%;
- 5- Eosina por 5 a 6 minutos;

- 6- Lavar em água destilada;
- 7- Passagem rápida no álcool 70%;
- 8- Passagem rápida no álcool 80%;
- 9- Passagem rápida no álcool 95%;
- 10- Passagem rápida no álcool absoluto I;
- 11- Passagem rápida no álcool absoluto II;
- 12- Passagem rápida no xilol I;
- 13- Passagem rápida no xilol II;
- 14- Xilol III;
- 15- Montagem em Permont.

Após este processo as lâminas histológicas foram analisadas sob microscópio de luz (Olympus – CX 41) e fotomicrografados (MOTICAM 2500 – 5.0 MPixel USB 2.0).

## **2.5 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), os embriões pré-fixados em glutaraldeído a 2,5% foram preparados seguindo a metodologia descrita abaixo:

- 1- Retirar do fixador;
- 2- Lavar em água destilada por três vezes de 5 minutos cada;
- 3- Colocar em solução de tetróxido de ósmio a 0,5% por 30 minutos;
- 4- Álcool 7,5% por duas vezes de 10 minutos cada;

- 5- Álcool 15% por duas vezes de 10 minutos cada;
- 6- Álcool 30% por duas vezes de 10 minutos cada;
- 7- Álcool 50% por duas vezes de 10 minutos cada;
- 8- Álcool 70% por três vezes de 15 minutos cada;
- 9- Álcool 90% por duas vezes de 15 minutos cada;
- 10- Álcool 100% por duas vezes de 10 minutos cada;
- 11- Desidratar em aparelho de ponto crítico (Balzers Union);
- 12- Montar as amostras em suportes especiais (Stubs);
- 13- Cobrir com uma película de ouro, com espessura de 10nm em Metalizador (MED 010 da Balzers Union),

Preparadas segundo a metodologia acima descrita, as amostras foram observadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (SEM Quanta 200 da Fei).

## RESULTADOS

Os ovos dos parentais *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus* e seus híbridos são esféricos, demersais, espaço perivitelínico pequeno, córion nítido e transparente após a hidratação, não sendo observada a presença de gota de óleo na vesícula vitelínica durante todo o desenvolvimento embrionário. Observou-se nos ovos do parental *P. corruscans* e do híbrido I (Figura 6B; 6D) a presença de uma camada gelatinosa transparente envolvendo o córion. Esta camada gelatinosa não foi detectada no parental *L. marmoratus* e no híbrido II (Figura 6A; 6C). Os ovos dos parentais e de seus híbridos são de coloração amarelada após a hidratação.

A média do espaço perivitelínico do parental *L. marmoratus* foi de 215,9 $\mu$ m, do parental *P. corruscans* foi de 352,5 $\mu$ m, do híbrido I foi de 561 $\mu$ m e a média do híbrido II foi de 247,2 $\mu$ m.

O diâmetro médio do ovo do parental *L. marmoratus* foi de 589,6 $\mu$ m, do parental *P. corruscans* foi de 867,3 $\mu$ m, do híbrido I foi de 765,3 $\mu$ m e o diâmetro médio do híbrido II foi de 581 $\mu$ m.

### 3.1 Embriogênese

O período de incubação do *P. corruscans* e do híbrido I desde o momento de fertilização até a eclosão da larva foi de 13 horas (h), à temperatura média de 28,7°C. Já o período de incubação do *L. marmoratus* e do híbrido II foi de 14 h para o parental e 12 h para o híbrido, a uma temperatura média de 28,3°C. Sendo estabelecidos estágios e fases para descrever o desenvolvimento embrionário dos parentais e de seus híbridos. Os estágios foram classificados como zigoto, clivagem, gástrula, organogênese e eclosão. Os estágios são divididos em fases tais como, no estágio de

clivagem, a fase de 2 células, 4 células, 8 células, 16 células, 32 células, 64 células e a fase de mórula; o estágio de gástrula encontramos a fase de 25% de epibolia, movimento morfogenético em que a blastoderme recobre o vitelo, 50% de epibolia, o ovo encontra-se com 50% do vitelo recoberto, 75% de epibolia e 90% de epibolia e o estágio de organogênese com as fases de nêurula, de segmentação e larval (Tabelas 1 a 4; Figura 6 a 11).

Foi observada certa heterogeneidade no desenvolvimento dos embriões, ou seja, em um mesmo momento foram encontrados embriões em diferentes fases e/ou estágios da embriogênese.

### **3.1.1 Estágio de Zigoto**

Após a fertilização e a hidratação dos ovos foi observado o aumento do espaço perivitelínico e a delimitação dos pólos animal (Zigoto ou Célula-ovo) e vegetal (Vesícula vitelínica). O pólo animal é constituído pelo citoplasma ativo e um núcleo podendo ser identificado “in vivo” mais translúcido e o pólo vegetal mais denso “in vivo”, sendo composto por vesículas globosas de vitelo. Por apresentar o pólo animal e vegetal dividido os ovos foram classificados como telolécitos. Este estágio foi de 0,20 h para o híbrido II, de 0,25 h para o híbrido I, de 0,30 h para o *L. marmoratus* e de 0,70 h para o *P. corruscans* (Figura 6A a 6D; 7A; 9A; 10A; 11A).

### **3.1.2 Estágio de Clivagem**

As primeiras divisões celulares foram detectadas primeiramente no híbrido I com o 0,30 h de desenvolvimento embrionário, em seguida encontramos o parental *L.*

*marmoratus* com 0,40 h, depois o híbrido II com 0,50 h e por fim o parental *P. corruscans* com 0,8 h.

O tipo de clivagem dos ovos dos parentais e seus híbridos são meroblástica ou incompleta, sendo observado o seguinte padrão: a primeira clivagem foi vertical, originando 2 blastômeros de igual tamanho; a segunda foi vertical e perpendicular à primeira, dando origem a 4 blastômeros; a terceira foi vertical e paralela à primeira, originando 8 blastômeros, em arranjo 4x2; a quarta foi vertical e paralela à segunda, dando origem a 16 blastômeros, em uma formação de 4x4; a quinta foi vertical e paralela à primeira, originando 32 blastômeros, em formação 4x8; a sexta clivagem foi horizontal, dando origem a duas camadas de células, num total de 64 blastômeros (Figura 7A a 7E; 9B a 9D; 10B a 10E; 11B; 11C) . A fase de mórula (+100 células) as células mostraram-se arranjadas em muitas camadas, formando um maciço celular semelhante a uma meia amora (Figura 7F; 9E; 10F; 10G; 16A; 21A).

Apesar de a maioria dos embriões clivarem segundo o padrão descrito, foram observadas clivagens ímpares onde os embriões possuíam 6, 13 e 15 blastômeros. As maiores variações ocorreram nos primeiros momentos do estágio de clivagem (0,2 a 4 h), neste período também foram encontrados embriões com a soltura de blastômeros e deformidades no vitelo. Os ovos do parental *L. marmoratus* e do híbrido II foram os que apresentaram um número elevado de ovos mal formados (Figura 26A; 26B).

Os blastômeros no princípio aumentam em número e diminuem de tamanho, porém suas células são homogêneas. Até a 5ª clivagem (4x8) as células não são clivadas completamente, pois devido a grande quantidade de vitelo, o sulco de clivagem é impedido de atravessá-lo. A partir da 6ª clivagem, começam a aparecer blastômeros de tamanhos diferentes e a clivagem completa.

A análise com microscopia óptica mostrou que nas primeiras clivagens a blastoderme não apresentava uma camada distinta que a separava do vitelo. Observou-se também que os glóbulos de vitelo penetravam nos blastômeros de forma fragmentada, provavelmente para facilitar a absorção deste pelas células. Foi possível verificar também que durante os primeiros estágios de clivagem até um total de 64 blastômeros não foram encontrados núcleos individualizados. A partir da fase de mórula foram detectados os primeiros núcleos e divisões nucleares. Nesta mesma fase ocorreu o início da formação da camada sincicial de vitelo ou periblasto (Figura 16A; 21A). Não há a formação de uma blástula e sim a formação de uma blastoderme mais compacta, que ao final do estágio de clivagem tem a forma de uma meia amora achatada recobrando um pólo do vitelo.

### **3.1.3 Estágio de Gástrula**

O estágio de gástrula caracterizou-se pelo início do movimento morfogenéticos sendo eles o movimento de epibolia, em que as células da blastoderme passam por rápidas divisão mitóticas, então as células da superfície começam a achatarse, enquanto as células internas intercalam-se com as células da externas e vão estender-se, recobrando desta maneira o vitelo completamente; o movimento de involução celular, em que uma camada em expansão dobra sobre si mesma e forma uma segunda camada, que continua a estender-se em sentido contrário a primeira camada e o movimentos de convergência, ocorre quando as camadas celulares iniciam em locais distintos e convergem para o mesmo ponto. Estes movimentos morfogenéticos irão produzir os primeiros folhetos e eixos embrionários (caudo-cefálico e latero-lateral).

O movimento de epibolia foi observado a partir da quarta hora de embriogênese para todos os cruzamentos. Nesta hora os embriões do parental *P. corruscans* e dos híbridos estavam em 25% e 50% de epibolia e o parental *L. marmoratus* estava com 50% de epibolia (Figura 7G; 7H; 12A; 12B; 16B). No momento que os embriões estão com 50% do vitelo recoberto ocorre um espessamento da borda da blastoderme formando o anel germinativo. Perpendicular ao anel germinativo, observa-se um acúmulo de células que darão origem ao escudo embrionário. Nesta fase também iniciou o movimento de involução que ocorre em toda a margem no anel germinativo e dividirá a blastoderme em dois folhetos embrionários, a camada da externa ou epiblasto e a camada interna ou hipoblasto. Neste momento ocorre também o movimento de convergência que direcionará as camadas celulares do escudo embrionário, que irão estabelecer os eixos embrionários (dorso-ventral e caudo-cefálico) (Figura 12A; 12B; 12C; 16B).

Na quinta hora todos os ovos possuíam 75% do vitelo recoberto pela blastoderme (Figura 9F; 11D). Na sexta hora os embriões se encontravam com 90% de epibolia, possuindo apenas uma pequena porção do vitelo exposta, o tampão vitelino ou blastóporo (Figura 7I; 9G; 10I; 16C).

Análise com microscopia de luz mostrou que o periblasto forma um “franja” a frente da borda da blastoderme, desde sua formação até o fechamento do blastóporo (Figura 16D). O periblasto caracterizou-se como uma camada citoplasmática com vários núcleos, porém sem uma membrana que os separassem e apresentava glóbulos de vitelo fragmentados no seu citoplasma (Figura 16B; 16C; 16D). Com o auxílio da microscopia foi possível visualizar nos parentais e no híbrido II várias células apresentando núcleos com dois nucléolos. No híbrido I as células apresentavam

apenas um nucléolo. Neste mesmo híbrido no momento em que houve o fechamento do blastóporo, foi possível visualizar na região oposta ao tampão um aglomerado de células organizando se em forma circular para dar origem a notocorda e o sulco neural. Nos parentais e no híbrido II não foi observado esta organização celular no mesmo momento (Figura 16E; 16F; 16G).

O estágio de gástrula terminou entre a sexta e a sétima hora para todos os cruzamentos, com envolvimento completo do vitelo pelas células embrionárias e o fechamento do blastóporo pelo periblasto.

### **3.1.4 Estágio de Organogênese**

Este estágio foi caracterizado pela formação dos rudimentos dos órgãos e sistemas a partir dos folhetos embrionários. Ocorrendo a formação dos somitos, da notocorda, tubo neural, vesículas óptica e ótica, encéfalo e a delimitação intestinal inicial, com conseqüente crescimento e alongamento do embrião, principalmente no eixo céfalo-caudal.

Com o tempo de sete horas de embriogênese todos os embriões encontravam-se na fase de nêurula, com a diferenciação das regiões cefálica e caudal e do sulco neural (Figura 8A; 9H; 10J; 11E; 12C). Neste momento pode-se observar no parental *P. corruscans* a presença da vesícula óptica, estrutura oval formada por um conjunto de células localizadas centralmente na região cefálica, que dará origem ao cálice óptico e o cristalino (Figura 8B; 8C; 9I; 10J; 10K; 11E; 11F; 13B).

Nesta etapa, o espessamento epiblasto dorsal provocou a formação do sulco neural que posteriormente fundiu-se formando a placa neural. A notocorda possuindo suas células alongadas e alinhadas encontra se abaixo da placa neural. Lateralmente a

notocorda visualizamos o mesendoderma que passará por segmentações e originará os somitos (Figura 25A; 25B).

Neste estágio formar se também o tubo neural e através do crescimento diferencial de suas porções originará a região encefálica, delimitam-se as regiões do telencefalo, diencefalo e mesencéfalo (Figura 18A).

Com oito horas de desenvolvimento os embriões apresentavam vesícula óptica e a segmentação dos primeiros somitos. Neste período foi possível observar no parental *L. marmoratus* presença da vesícula de Kupffer, estrutura oval encontrada na região caudal, formada por uma camada de células de formato cúbico possuindo no seu centro uma luz. No parental e nos híbridos a vesícula de Kupffer só foi visualizada na nona hora (Figura 8B; 8C; 17A).

Nesta mesma hora para todos os cruzamentos detectou se a vesícula ótica que foi encontrada entre a vesícula óptica e o primeiro somito, sendo composta por uma camada de células alongadas e organizadas paralelamente. Seus núcleos localizavam se na região basal da célula. No interior da vesícula ótica observou a presença de dois otólitos (Figura 8C; 9I; 10K; 11G; 14A; 14B; 18D; 22B).

A partir das 10 horas de embriogênese não houve mais a visualização da vesícula de Kupffer em nenhum dos cruzamentos. Nos parentais e no híbrido I foi observada a presença dos primeiros pigmentos (cromatóforos) espalhados pela membrana do saco vitelino próximo a região cefálica (Figura 15B; 18E; 21B; 23B).

A fase denominada de larval, pelo embrião já apresentar uma forma parecida com a larva eclodida larval, foi caracterizada pela presença evidente de uma cauda, que está despregada do saco vitelino, pela ausência da vesícula de Kupffer e inicio do desenvolvimento do intestino posterior (Figura 8D; 9J; 10L; 11G; 17C; 19A; 22A; 24A).

Para os híbridos a fase larval foi observada às 10 horas de embriogênese, enquanto para os parentais às 11 horas.

Neste período a notocorda já se estendia desde a região cefálica até a cauda. O intestino primitivo posterior encontrou-se bem definido (Figura 19A). O processo de miogênese foi detectado nos somitos, ocorrendo à diferenciação dos mioblastos, com núcleos esféricos e grandes, em miômeros com núcleos achatados (Figura 13E; 17B; 19C).

A análise com microscopia eletrônica de varredura mostrou o desenvolvimento da placa olfatória no parental *P. corruscans* e nos híbridos (Figura 20A; 20B; 22C; 22D). Na região dorsal do saco vitelino observou-se a presença de veias vitelinas (Figura 20C; 22B). No *P. corruscans* e no híbrido I visualizou a formação do ânus (Figura 19B).

Nesta fase, constatou nos parentais e nos híbridos a presença de uma estrutura não identificada formada por três pares de elevações maciças localizadas abaixo da vesícula ótica, sendo que duas encontram-se anterior à vesícula ótica e uma posterior a ela. A estrutura com forma circular é composta por um aglomerado de células. No parental *L. marmotarus* observou a presença de um par desta estrutura na região posterior ao cérebro (Figura 17C; 20C; 22D; 24B).

Outra característica deste estágio foi à ocorrência de movimentos espasmódicos feitos pelos embriões, que foram aumentando com o decorrer do desenvolvimento embrionário. Ao final deste estágio os embriões já apresentavam movimentos bem vigorosos de natação, importantes para o rompimento do córion.

### **3.1.5 Eclosão**

Este período é caracterizado pelo rompimento total do córion e a livre natação das larvas (Figura 8E; 9K; 10K; 13A).

Neste estágio as larvas possuíam a cabeça aderida à região anterior do saco vitelino, ausência de nadadeiras, havendo apenas uma nadadeira embrionária revestindo toda a região caudal.

A análise de microscopia de luz observou a presença de um coração rudimentar (Figura 13D; 18E) e o desenvolvimento do cálice óptico, formado por um conjunto de células com núcleos alongados que estão envolvendo um aglomerado de células que darão origem ao cristalino (Figura 13C; 15B; 23A).

Neste estágio em todos os cruzamentos, os cromatóforos encontravam concentrados na região cefálica e caudal da membrana do saco vitelino, apenas alguns pigmentos localizavam se espalhados no saco vitelino. Com a utilização da microscopia óptica constatou se que os cromatóforos envolviam as células. Observou também a presença de pigmentos ao redor da vesícula óptica do híbrido I, no *L. marmoratus* os pigmentos foram visualizado na região cefálica e no híbrido II os cromatóforos encontravam se na região cefálica e na superfície da vesícula óptica. No parental *P. corruscans* não foi visualizada a presença de pigmentos nesses locais (Figura 8C; 8D; 8E; 9J; 9K; 13D; 15B; 18C; 18D; 21B; 23B; 24B).

Neste período observou a diferenciação das células da notocorda que anteriormente eram alongadas e alinhadas, e tornaram se oval e sendo separadas por espaços existentes entre as células (Figura 13E; 17B).

A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou o desenvolvimento do órgão olfatório, em forma de uma pequena depressão circular, apresentando no seu

interior o desenvolvimento de estruturas com características morfológicas semelhantes a cílios. Esta técnica revelou também que a estrutura não identificada persistia no momento da eclosão em todos os cruzamentos (Figura 20A; 20B; 22C; 22D).

A primeira eclosão ocorreu às 12 horas com o híbrido II. Com 13 horas de desenvolvimento houve a eclosão do parental *P. corruscans* (Figura 9K) e do híbrido I (Figura 10K). E, este período terminou com a eclosão do parental *L. marmoratus* às 14 horas (Figura 8K).

**Tabela 1.** Desenvolvimento embrionário do *Pseudoplatystoma corruscans*, à temperatura média de 28,7 °C.

Tempo (Horas)	Estágio	Descrição
0 – 0,7	Zigoto	Espaço perivitelínico pequeno; camada gelatinosa envolvendo o córion; vitelo abundante; migração do citoplasma e formação do pólo animal e vegetal.
0,8	Clivagem	Divisões mitóticas originando a formação de 2, 4, 8, 16, 32 e 62 blastômeros terminando na fase de mórula (+100 células). Clivagem do tipo meroblástica discoidal.
4.0	Gástrula	Formação do epiblasto e hipoblasto. 25% de epibolia – início do movimento morfogênético de epibolia; 25% do vitelo recoberto pela blastoderme. 50% epibolia (migração das células embrionárias) – formação do anel germinativo e escudo embrionário.
5.0	Gástrula	75% epibolia (migração das células embrionárias) – vitelo recoberto pela blastoderme em 75%.
6.0	Gástrula	90% epibolia – formação do tampão vitelino (porção de vitelo não recoberta pelas células embrionárias).
7.0		Fase Segmentação - Fechamento completo do blastóporo; Formação do eixo embrionário, da notocorda e sulco neural; diferenciação das regiões cefálica e caudal e a visualização da vesícula óptica.
8.0		Fase Segmentação - Segmentação dos primeiros somitos.
9.0	Organogênese	Fase Segmentação - Observação da vesícula ótica; vesícula de Kupffer e embrião possuindo em média 15 somitos.
10.0		Fase Segmentação - Ausência da vesícula de Kupffer; embriões com em média de 18 somitos e a presença dos primeiros pigmentos (cromatóforos) espalhados pela a membrana do saco vitelino.
11.0		Fase Larval - Região caudal despregada do saco embrionário e início do desenvolvimento do intestino.
12.0		Fase Larval - Alongamento do embrião; desenvolvimento rápido da cauda e embrião com uma média de 30 somitos.
13.0	Eclosão	Eclosão das larvas - total rompimento do córion e livre natação das larvas.

**Tabela 2.** Desenvolvimento embrionário do *Leiarius marmoratus*, à temperatura média de 28,3 °C.

Tempo (Horas)	Estágio	Descrição
0 - 0,3	Zigoto	Espaço perivitelínico pequeno; vitelo abundante; migração do citoplasma e formação do pólo animal e vegetal.
0,4	Clivagem	Divisões mitóticas originando a formação de 2, 4, 8, 16, 32 e 62 blastômeros terminando na fase de mórula (+100 células). Clivagem do tipo meroblástica discoidal. Deformidades em alguns ovos.
4.0	Gástrula	Formação do epiblasto e hipoblasto. 50% epibolia (migração das células embrionárias) – 50% do vitelo recoberto pela blastoderme; formação do anel germinativo e escudo embrionário.
5.0	Gástrula	75% epibolia (migração das células embrionárias) – vitelo recoberto pela blastoderme em 75%.
6.0	Gástrula	90% epibolia – formação do tampão vitelino (porção de vitelo não recoberta pelas células embrionárias).
7.0		Fase de segmentação - Fechamento completo do blastóporo; Formação do eixo embrionário, da notocorda e sulco neural; diferenciação das regiões cefálica e caudal.
8.0		Fase de segmentação - Observação da vesícula óptica, vesícula de Kupffer e segmentação primeiros somitos.
9.0	Organogênese	Fase de segmentação - Visualização da vesícula ótica e embrião possuindo média 12 somitos.
10.0		Fase de segmentação - Ausência da vesícula de Kupffer e presença dos primeiros pigmentos (cromatóforos) espalhados pela a membrana do saco vitelino.
11.0		Fase Larval - Região caudal despregada do saco embrionário e início do desenvolvimento do intestino.
12.0		Fase Larval - Alongamento do embrião; desenvolvimento da cauda e os embriões possuíam em média 24 somitos.
13.0		Fase Larval - Pré-eclosão; alongamento do embrião e movimentos vigorosos de natação.
14.0	Eclosão	Eclosão das larvas - total rompimento do córion e livre natação das larvas.

**Tabela 3.** Desenvolvimento embrionário do híbrido I (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Leiarius marmoratus*), à temperatura média de 28,7 °C.

Tempo (Horas)	Estágio	Descrição
0 – 0,25	Zigoto	Espaço perivitelínico pequeno; camada gelatinosa envolvendo o córion; vitelo abundante; migração do citoplasma e formação do pólo animal e vegetal.
0,3	Clivagem	Divisões celulares originando a formação de 2, 4, 8, 16, 32 e 62 blastômeros terminando na fase de mórula (+100 células). Clivagem do tipo meroblástica discoidal.
4.0	Gástrula	Formação do epiblasto e hipoblasto. 25% de epibolia – início do movimento morfogênético de epibolia; 25% do vitelo recoberto pela blastoderme. 50% epibolia (migração das células embrionárias) – formação do anel germinativo e escudo embrionário.
5.0	Gástrula	75% epibolia (migração das células embrionárias) – vitelo recoberto pela blastoderme em 75%.
6.0	Gástrula	90% epibolia – formação do tampão vitelino (porção de vitelo não recoberta pelas células embrionárias).
7.0		Fase Segmentação - Fechamento completo do blastóporo; Formação do eixo embrionário, da notocorda e sulco neural; diferenciação das regiões cefálica e caudal.
8.0		Fase Segmentação - Observação da vesícula óptica e segmentação primeiros somitos.
9.0		Fase Segmentação - Visualização da vesícula ótica; vesícula de Kupffer e embrião possuindo em média 14 somitos.
10.0	Organogênese	Fase Larval -Região caudal despregada do saco embrionário; início do desenvolvimento do intestino; ausência da vesícula de Kupffer e a presença dos primeiros pigmentos (cromatóforos) espalhados pela a membrana do saco vitelino.
11.0		Fase Larval -Alongamento do embrião; desenvolvimento da cauda e embriões com em média 27 somitos.
12.0		Fase Larval -Pré-eclosão; alongamento do embrião com em média 30 somitos e movimentos vigorosos de natação.
13.0	Eclosão	Eclosão das larvas - total rompimento do córion e livre natação das larvas.

**Tabela 4.** Desenvolvimento embrionário do híbrido II (*Leiarius marmoratus* X *Pseudoplatystoma corruscans*), à temperatura média de 28,3 °C.

Tempo (Horas)	Estágio	Descrição
0 – 0,2	Zigoto	Espaço perivitelínico pequeno; camada gelatinosa envolvendo o córion; vitelo abundante; migração do citoplasma e formação do pólo animal e vegetal.
0,5	Clivagem	Divisões mitóticas originando a formação de 2, 4, 8, 16, 32 e 62 blastômeros terminando na fase de mórula (+100 células). Clivagem do tipo meroblástica discoidal. Deformidades em alguns ovos, principalmente soltura de blastômeros.
4.0	Gástrula	Formação do epiblasto e hipoblasto. 25% de epibolia – início do movimento morfogênético de epibolia; 25% do vitelo recoberto pela blastoderme. 50% epibolia (migração das células embrionárias) – formação do anel germinativo e escudo embrionário.
5.0	Gástrula	75% epibolia (migração das células embrionárias) – vitelo recoberto pela blastoderme em 75%.
6.0	Gástrula	90% epibolia – formação do tampão vitelino (porção de vitelo não recoberta pelas células embrionárias).
7.0		Fase Segmentação - Fechamento completo do blastóporo; Formação do eixo embrionário, da notocorda e sulco neural; diferenciação das regiões cefálica e caudal. Alguns embriões apresentavam deformidades no corpo.
8.0		Fase Segmentação - Observação da vesícula óptica e segmentação primeiros somitos.
9.0	Organogênese	Fase Segmentação - Visualização da vesícula ótica; vesícula de Kupffer e embrião possuindo em média 16 somitos.
10.0		Fase Larval - Região caudal despregada do saco embrionário; início do desenvolvimento do intestino e ausência da vesícula de Kupffer.
11.0		Fase Larval - Alongamento do embrião com em média 22 somitos e a presença dos primeiros pigmentos (cromatóforos) espalhados pela a membrana do saco vitelino.
12.0	Eclosão	Eclosão das larvas - total rompimento do córion e livre natação das larvas.

**Figura 6:** **A** – Ovo do parental *L. marmoratus* após a hidratado; **B** – Ovo do parental *P. corrsicans* apresentando uma camada gelatinosa envolvendo o córion; **C** – Ovo do híbrido II; **D** – Ovo do híbrido I, com uma camada gelatinosa envolvendo o córion.  
Legendas: ↔ - camada gelatinosa.

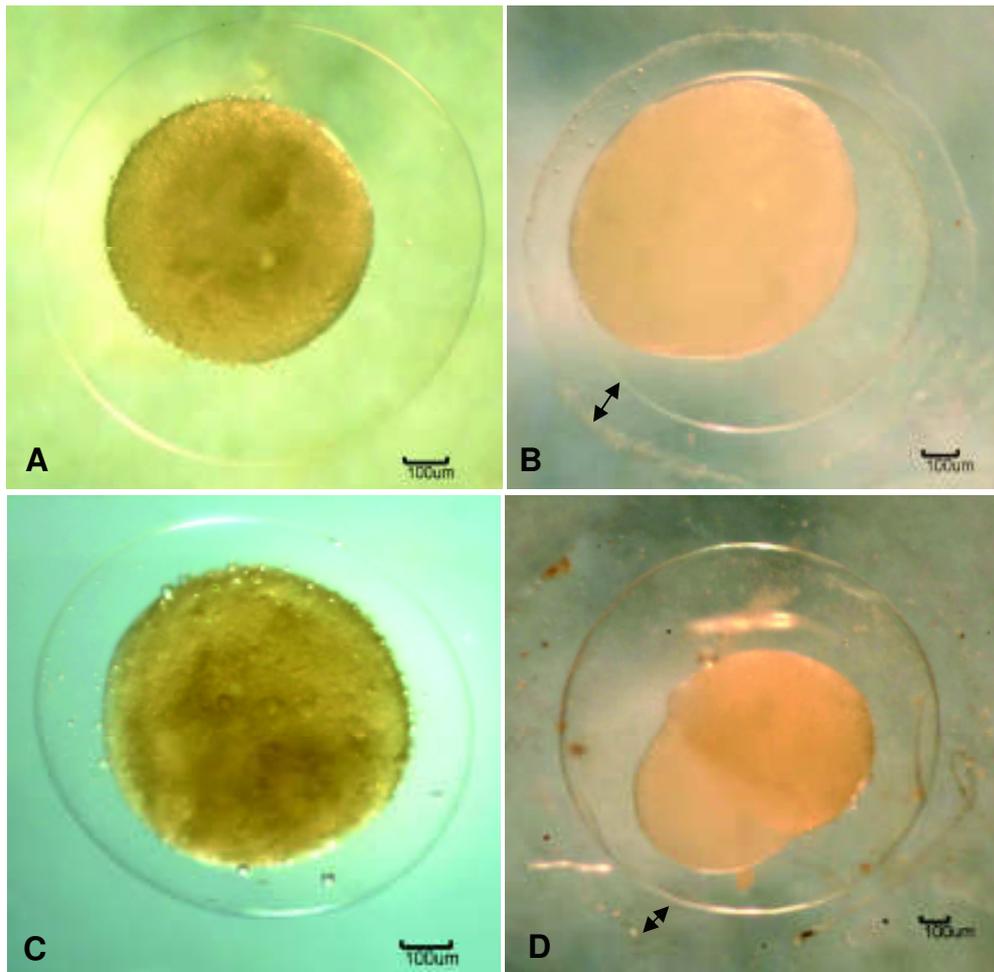


Figura 6

**Figura 7:** Fases do desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus*. **A** – pós-fertilização sem o córion; **B** – embrião com 2 células; **C** – com 4 células; **D** – com 8 células; **E** - com 32 células; **F** - mórula; **G** – gástrula (25% de epibolia); **H** – gástrula (50% de epibolia); **I** – gástrula (90% de epibolia). Legendas: BI - Blastômero;  - tampão vitelínico; v - vitelo.

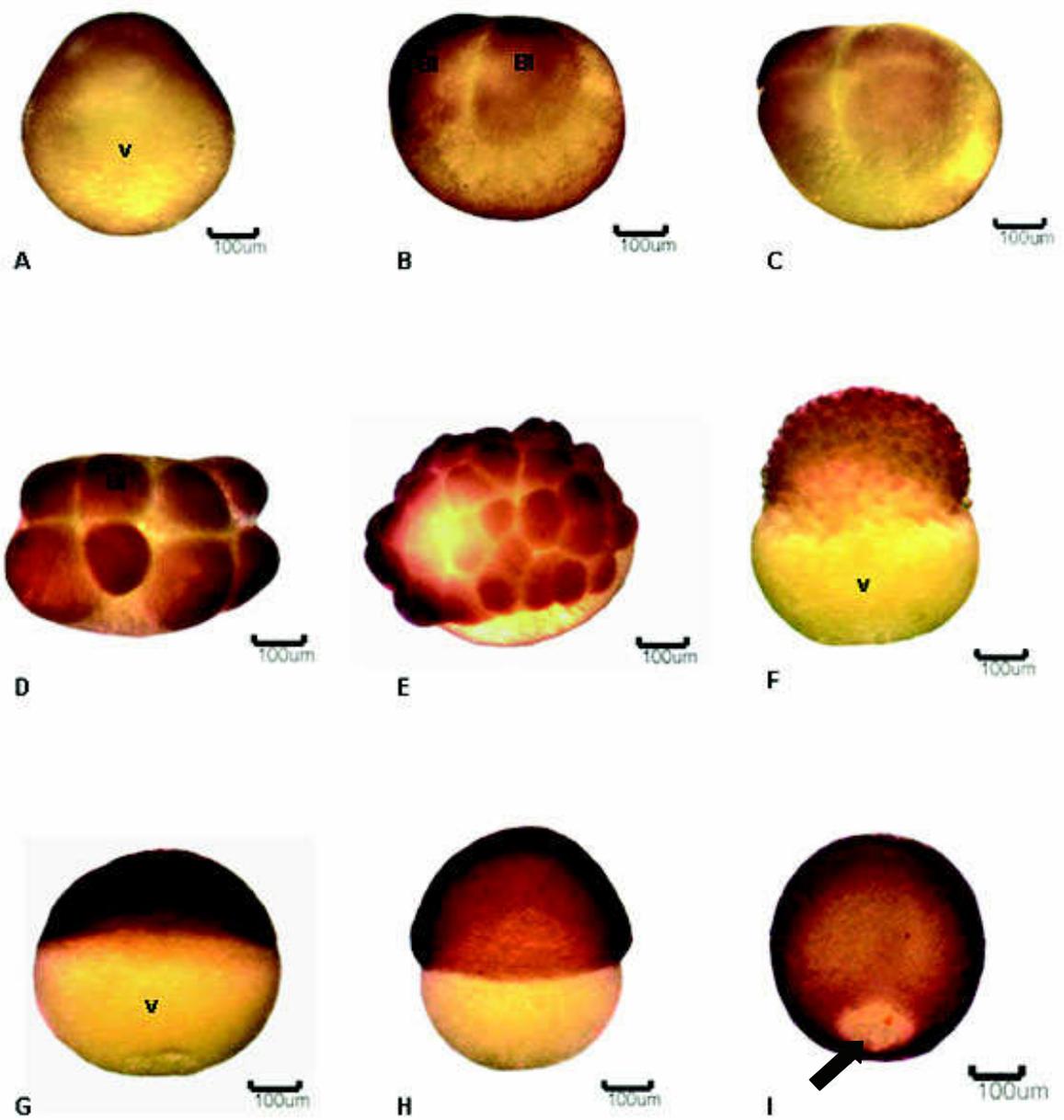


Figura 7

**Figura 8:** Fases do desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus*. **A** – nêurula, com sulco neural; **B** – segmentação dos primeiros somitos, vesícula óptica e de Kupffer; **C** – embrião com vesícula óptica e ótica; **D** – alongamento do embrião, presença da vesícula de Kupffer e cauda solta; **E** - Larva eclodida. Legendas: v - vitelo; \* - sulco neural; vk - vesícula de Kupffer; ► - somitos; op - vesícula óptica; ot - vesícula ótica; N - notocorda; —► - pigmentos (cromatóforos); ip - intestino posterior.

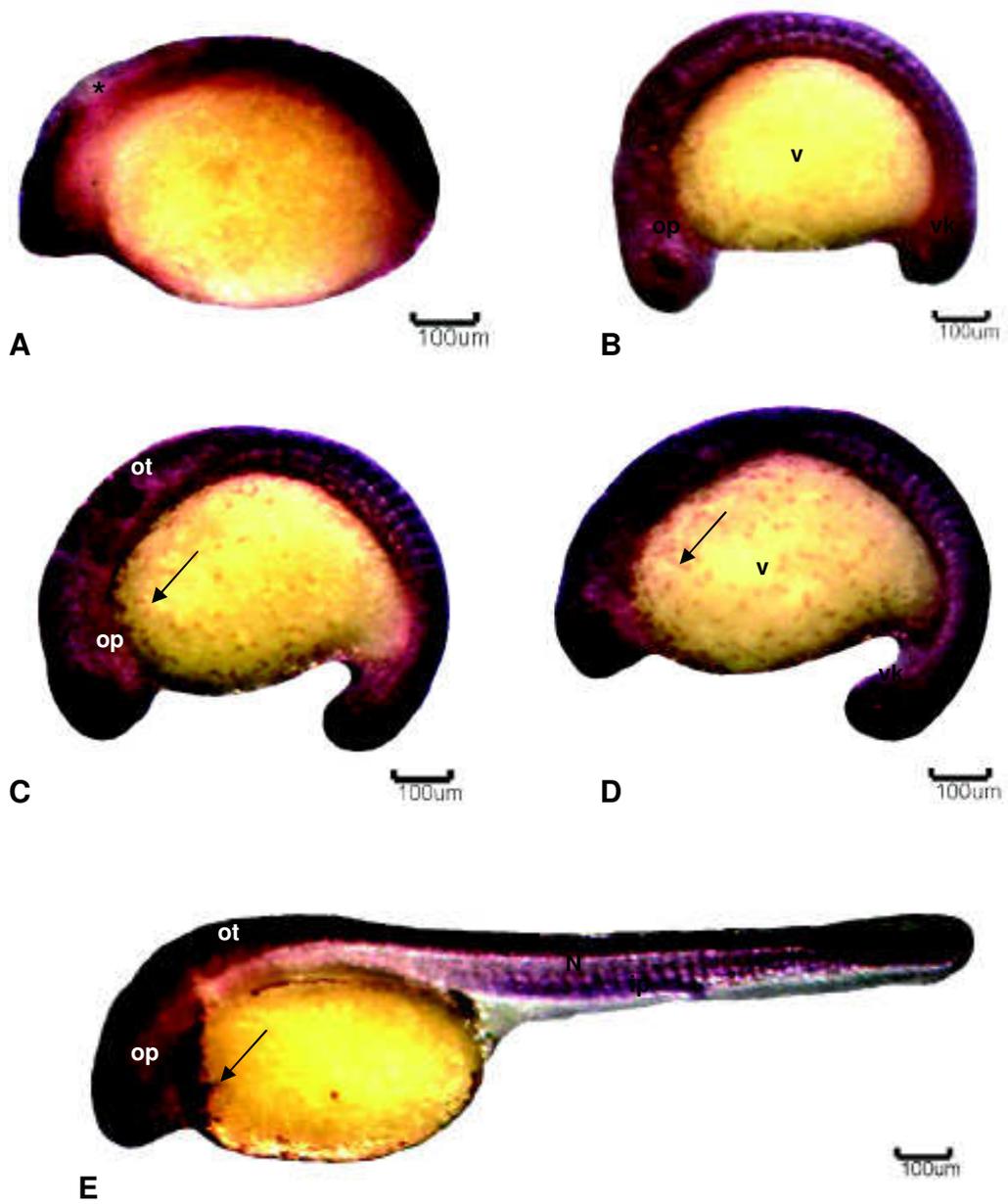


Figura 8

**Figura 9:** Fases do desenvolvimento embrionário de *P. corruscans*. **A** – pós-fertilização sem o córion; **B** – embrião com 4 células; **C** – com 8 células; **D** – com 64 células; **E** - mórula; **F** - gástrula (75% de epibolia); **G** – gástrula (90% de epibolia); **H** – nêurula inicial; **I** – segmentação dos primeiros somitos, vesícula óptica e ótica; **J** - embrião com cerca de 23 somito, vesícula ótica e cauda solta; **K** - Larva eclodida. Legendas: Bl - Blastômero; v - vitelo;  - tampão vitelínico; op - vesícula óptica; ot - vesícula ótica; N – notocorda;  - somitos;  - pigmentos (cromatóforos).

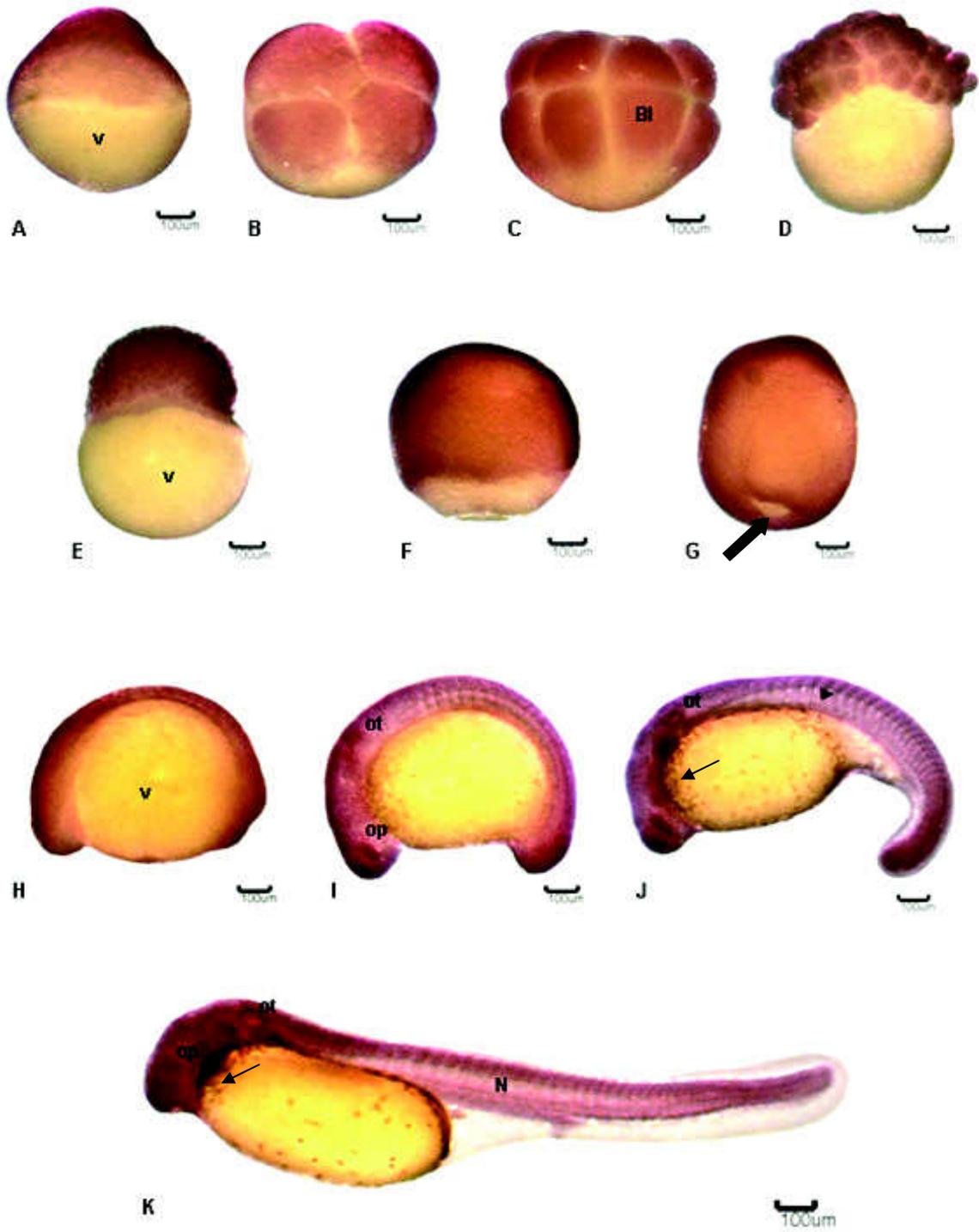


Figura 9

**Figura 10:** Fases do desenvolvimento embrionário do híbrido I (*P. corruscans* com *L. marmoratus*). **A** – pós-fertilização sem o córion; **B** – embrião com 4 células; **C** – com 8 células; **D** – com 16 células; **E** – com 32 células; **F** – mórula inicial; **G** – mórula; **H** - gástrula (50% de epibolia); **I** - gástrula (90% de epibolia); **J** – nêurula inicial, presença da vesícula óptica; **K** – segmentação dos primeiros somitos, vesícula óptica e ótica; **L** - embrião com cerca de 23 somito, vesícula óptica, ótica e cauda solta; **K** - Larva eclodida. Legendas: Bl - Blastômero; v - vitelo;  - tampão vitelínico;  - somitos; op - vesícula óptica; ot - vesícula ótica; N - notocorda;  - pigmentos (cromatóforos); ip - intestino posterior.

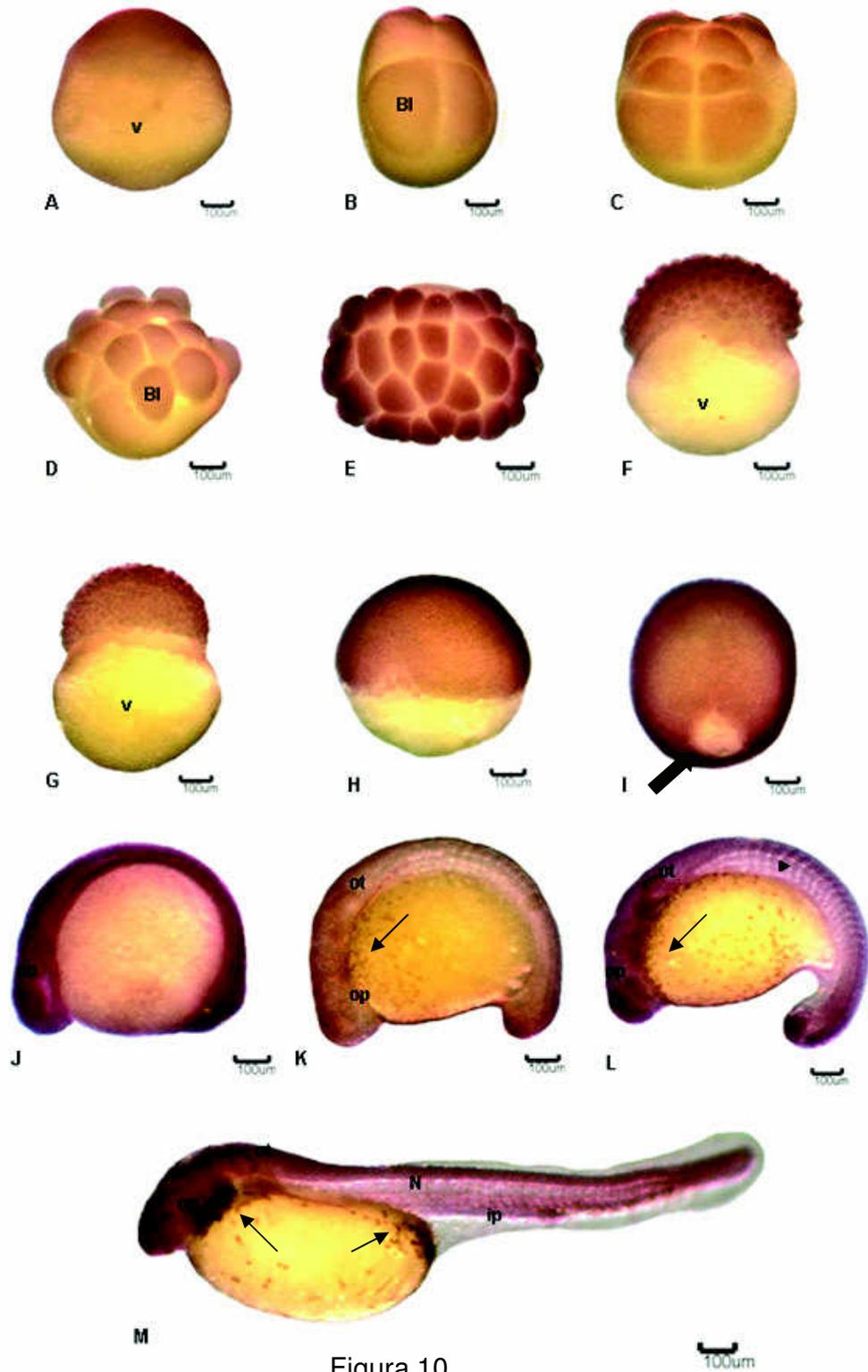


Figura 10

**Figura 11:** Fases do desenvolvimento embrionário do híbrido II (*L. marmoratus* com *P. corruscans*). **A** – pós-fertilização sem o córion; **B** – embrião com 2 células; **C** – com 4 células; **D** – gástrula (75% de epibolia); **E** - nêurula, com sulco neural; **F** - segmentação dos primeiros somitos e vesícula óptica; **G** – embrião com vesícula óptica, ótica e cauda solta; **H** – embrião com cerca de 23 somito e vesícula ótica. Legendas: Bl - Blastômero; v - vitelo; \* - sulco neural; op - vesícula óptica; → - pigmentos (cromatóforos); ► - somitos; ot - vesícula ótica.

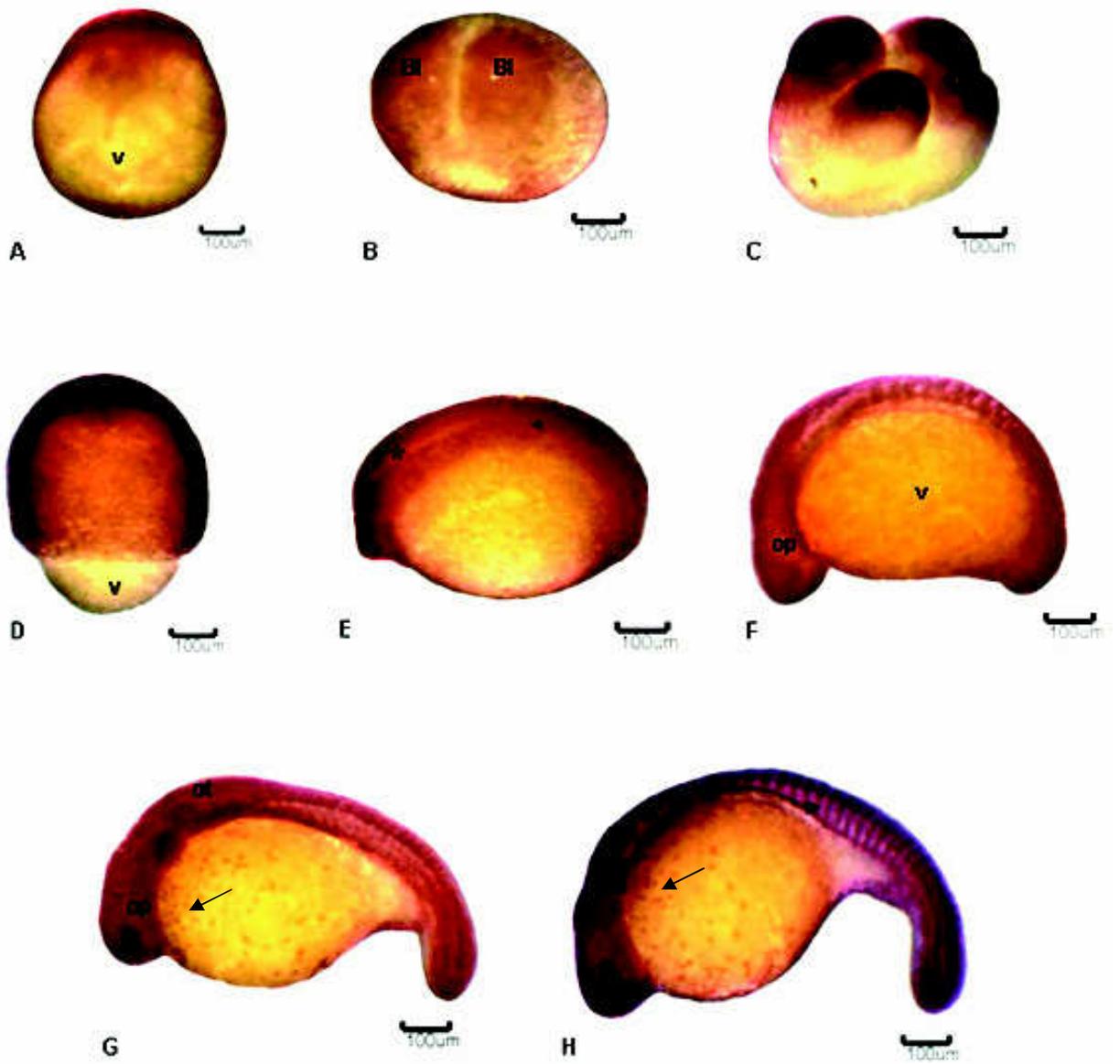


Figura 11

**Figura 12:** Análise sob Microscopia ótica do *L. marmoratus*, corados com hematoxilina – Harris e eosina (HE). **A** – gástrula (50% de epibolia); **B** – gástrula (50% de epibolia), mostrando o anel embrionário e movimento de involução; **C** – nêurula visualização do epiblasto e hipoblasto. Legendas: Bl – blastômeros; gv – glóbulos de vitelo; e - epiblasto; h – hipoblasto; csv – camada sincicial do vitelo;  - seta demonstrando o movimento de involução.

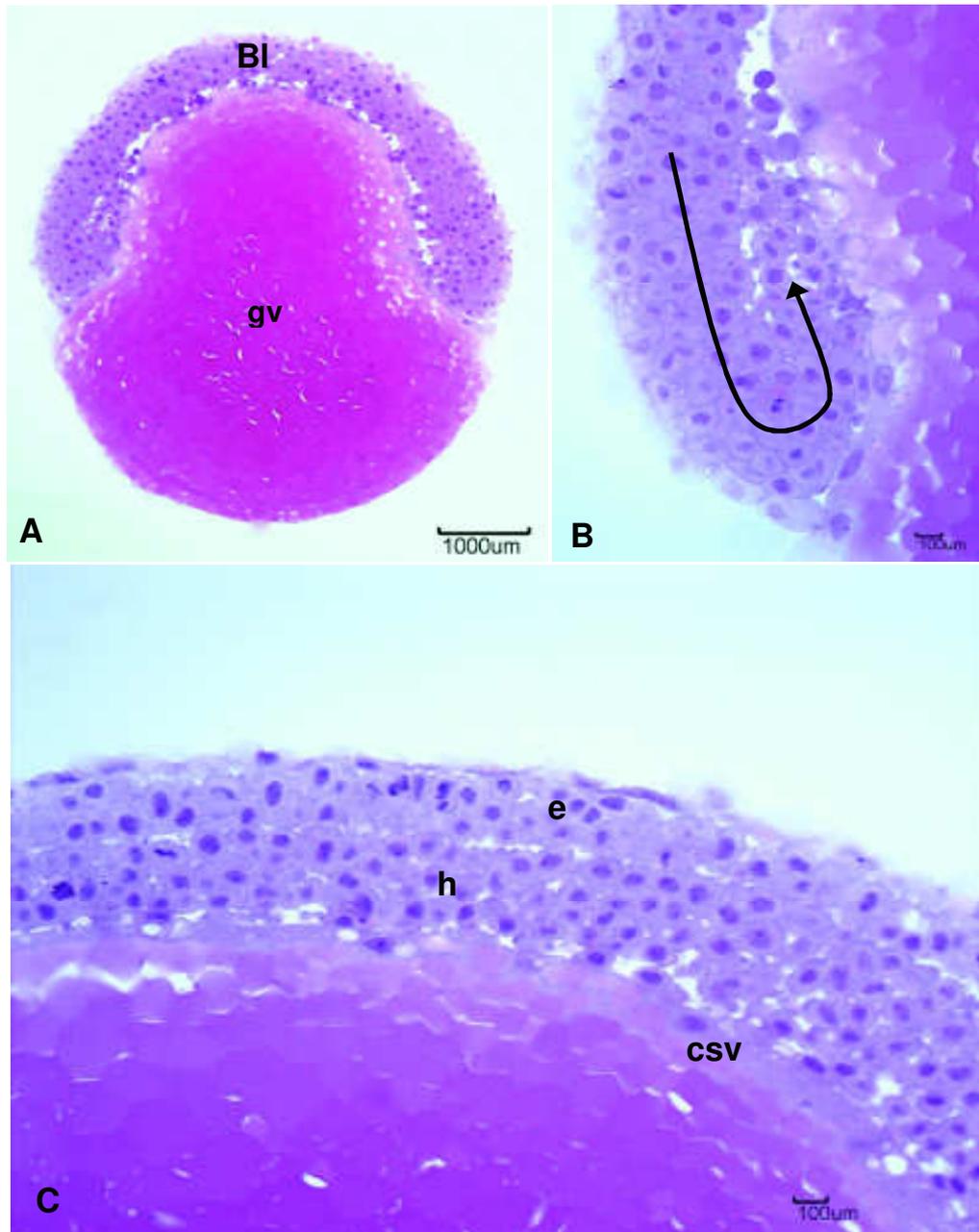


Figura 12

**Figura 13:** Detalhe em Microscopia de Luz do parental *L. marmoratus*. Coloração HE. **A** – região cefálica da larva recém eclodida; **B** – detalhe da vesícula óptica; **C** – cálice óptico, primórdio do cristalino e primeiros pigmentos (cromatóforos) encontrados na região cefálica; **D** – Coração rudimentar (circulo); **E** – detalhe das células da notocorda e do processo de miogênese nos somitos. Legendas: ot – vesícula ótica; op – vesícula óptica; N – notocorda; gv – glóbulos de vitelo; → - pigmentos (cromatóforos); ○ - coração rudimentar; csv – camada sincicial do vitelo; co – cálice optico; primórdios do cristalino; S – somitos.

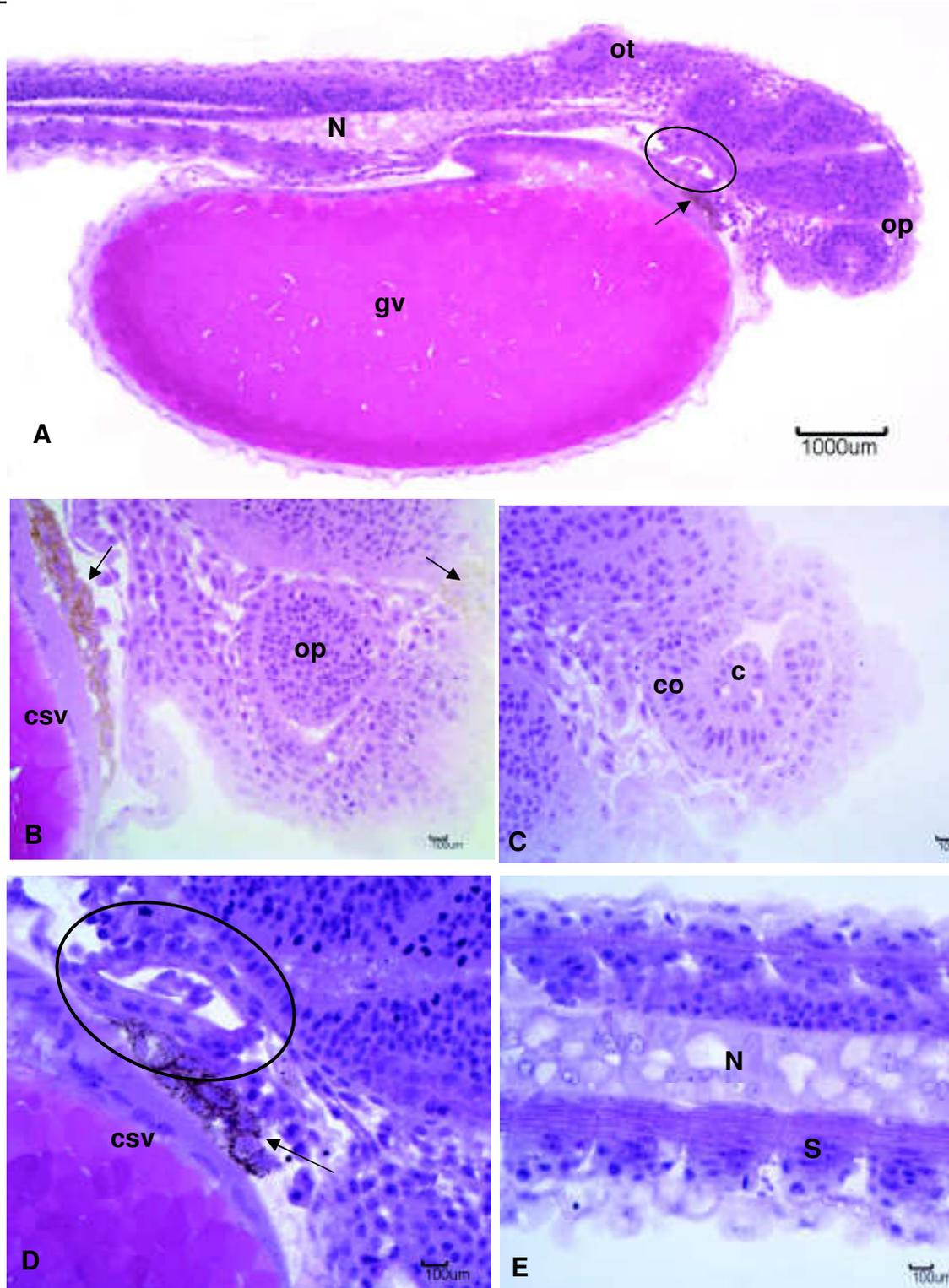


Figura 13

**Figura 14:** Parental *L. marmoratus*. **A** – análise sob microscopia óptica da vesícula ótica e presença dos otólitos (HE); **B** – análise sob microscopia eletrônica de varredura da vesícula ótica. Legendas: ot – vesícula ótica; o – otólitos; N – notocorda.

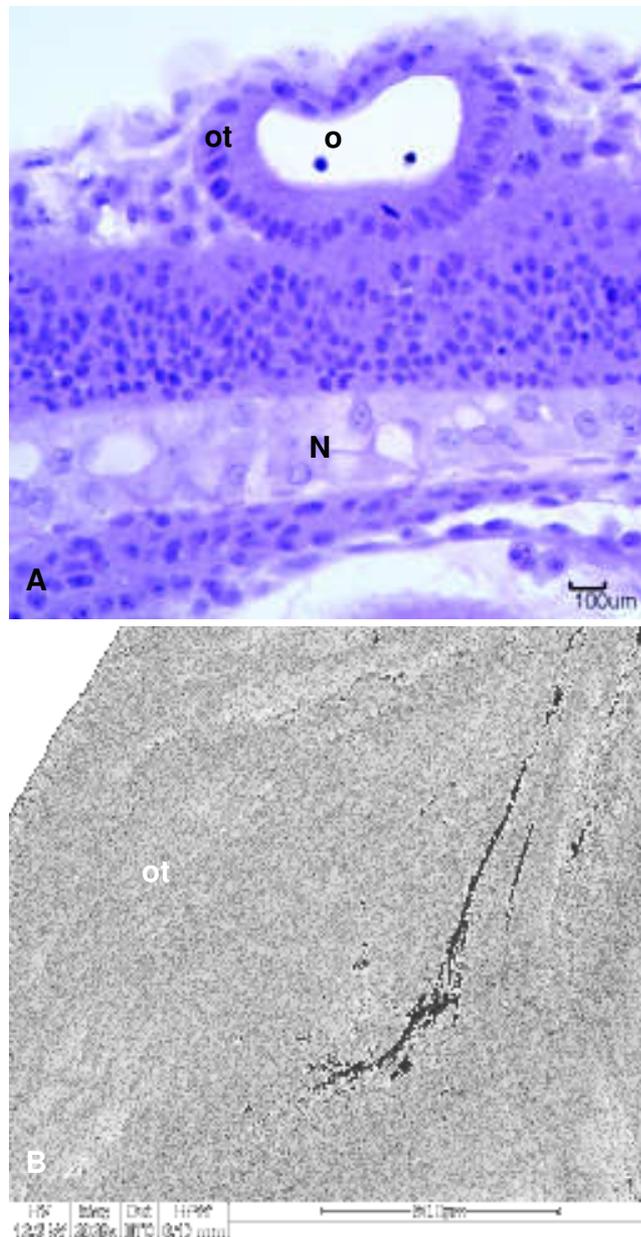


Figura 14

**Figura 15:** Detalhe em microscopia óptica da Estrutura não identificada no *L. marmoratus* (HE). **A** – par da estrutura não identificada; **B** – estrutura não identificada, cálice óptico, primórdios do cristalino e cromatóforos na região cefálica e na membrana do saco vitelino. Legendas: eni – estrutura não identificada; csv – camada sincicial do vitelo; → - cromatóforos; co – cálice óptico; c – cristalino.

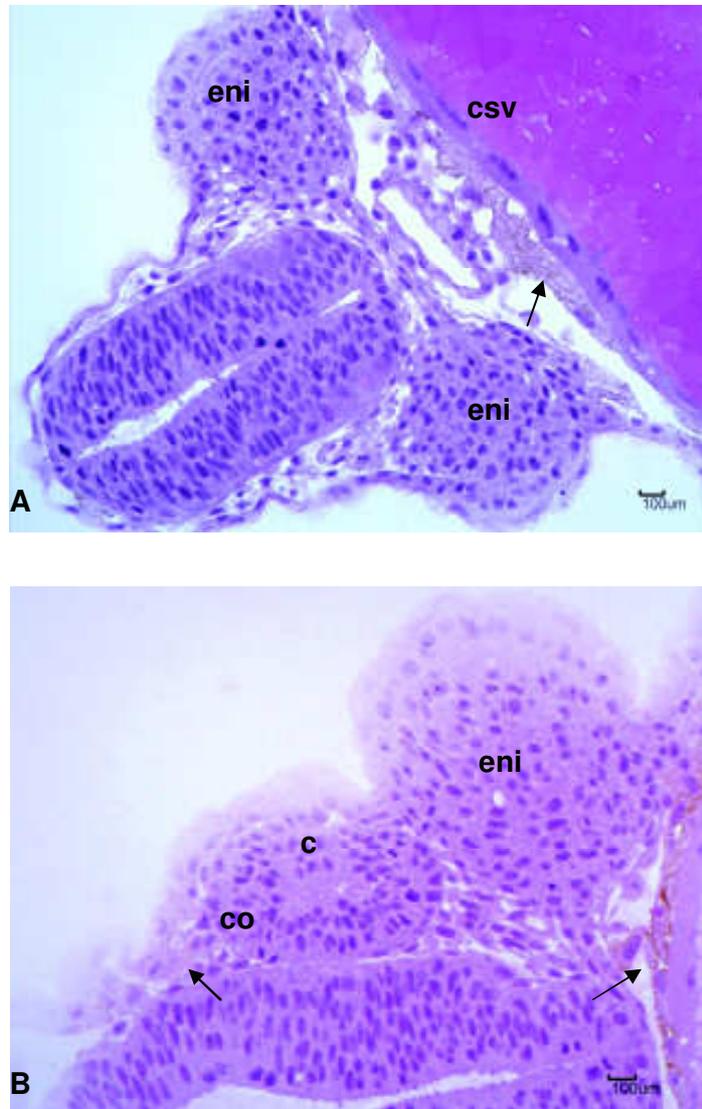


Figura 15

**Figura 16:** Análise sob microscopia óptica do híbrido I (HE). **A** – estágio de clivagem, fase de mórula observação da camada sincicial do vitelo; **B** – gástrula com 50% de epibolia; **C** – gástrula (90% de epibolia) visualização do tampão vitelino ou blastóporo; **D** – fechamento do tampão vitelino; **E** – detalhe da camada sincicial em forma de “franja”; **F** – fechamento do tampão vitelino, detalhe da organização das células para formar o sulco neural; **G** – detalhe do fechamento do blastóporo. Legendas: BI – blastômeros; gv – glóbulos de vitelo; csv – camada sincicial do vitelo; ★ - organização das células tv – tampão vitelino.

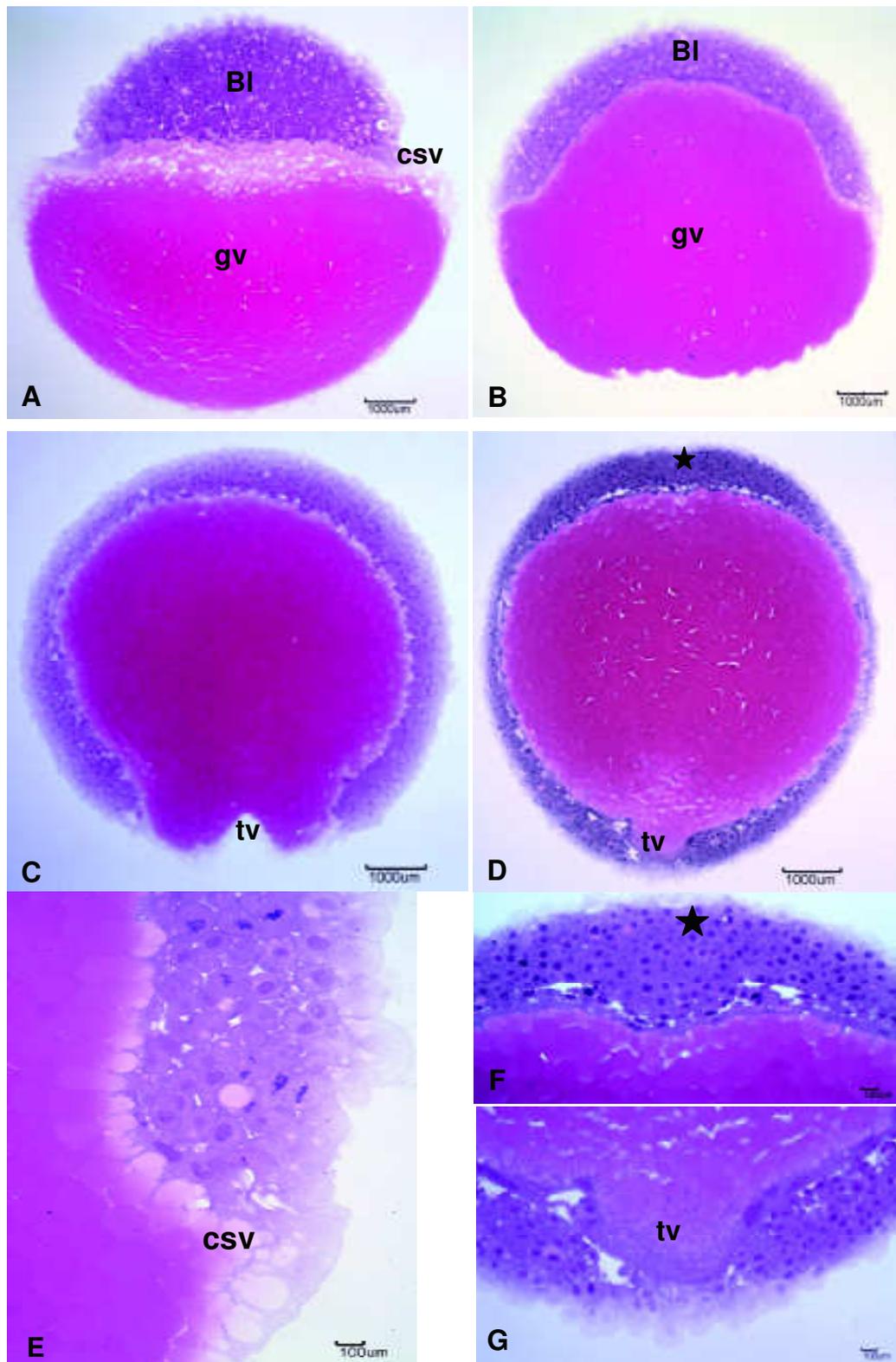


Figura 16

**Figura 17:** Detalhes do desenvolvimento embrionário do híbrido I. **A** – análise em microscopia de luz detalhando a vesícula de Kupffer (HE); **B** – Visualização dos somitos e da notocorda em microscopia óptica (HE); **C** - estágio de organogênese, fase larval observação do embrião em microscopia eletrônica de varredura. Legendas: vk – vesícula de Kupffer; S – somitos; csv – camada sincicial do vitelo; N – notocorda; ot – vesícula ótica; eni – estrutura não identificada.

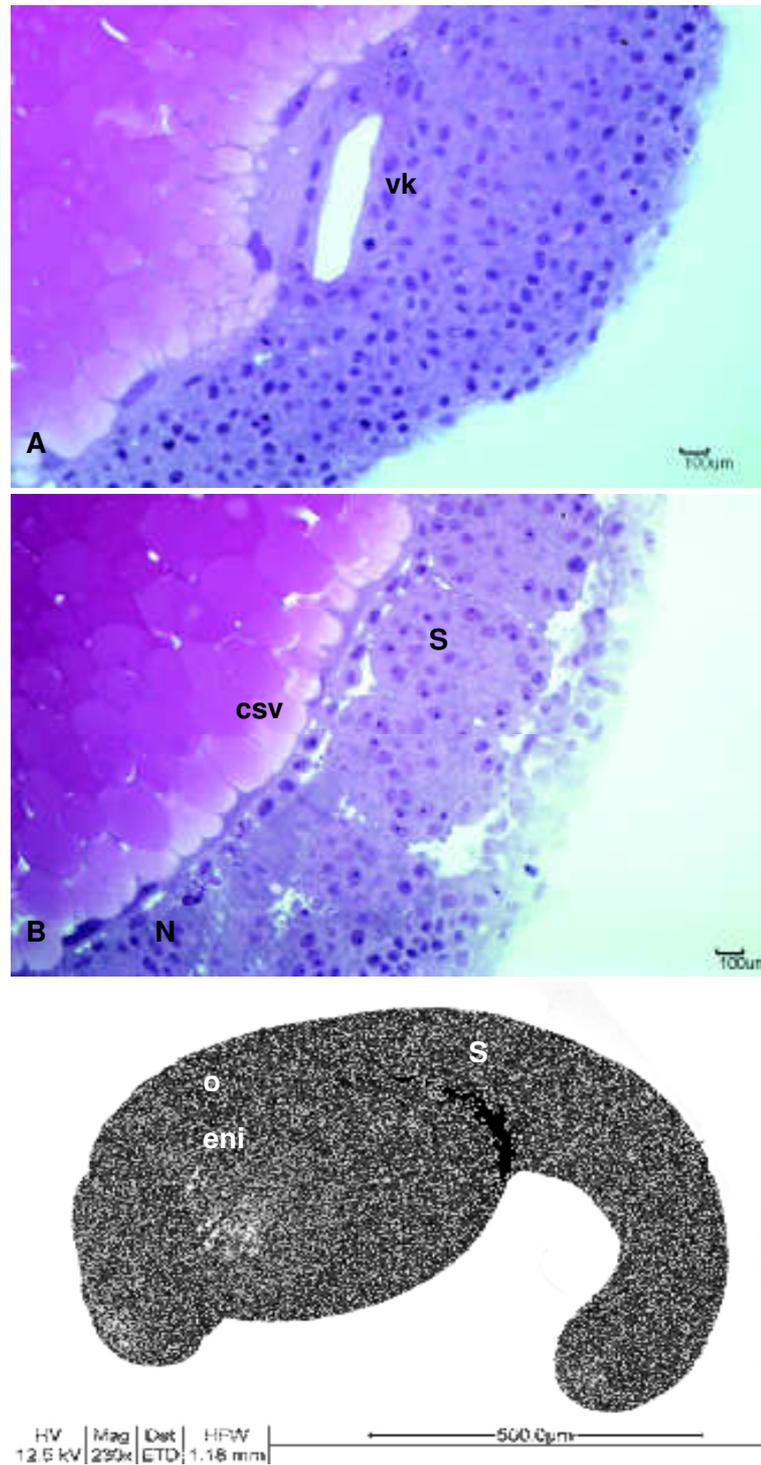


Figura 17

**Figura 18:** Análise do estágio de eclosão do híbrido I. **A** – detalhe da região cefálica do embrião sob microscopia de luz (HE); **B** – visualização da região cefálica sob microscopia eletrônica de varredura; **C** – observação da vesícula óptica e dos primeiros cromatóforos na superfície da vesícula óptica (HE); **D** – vesícula ótica e otólitos; **E** - detalhe do coração rudimentar e pigmentos na membrana do saco vitelino. Legendas: T – telencefálo; D – diencéfalo; M – mesencéfalo; PF – placa de fundo;  - coração; op – vesícula óptica; eni – estrutura não identificada;  - pigmentos (cromatóforos) ot – vesícula ótica.

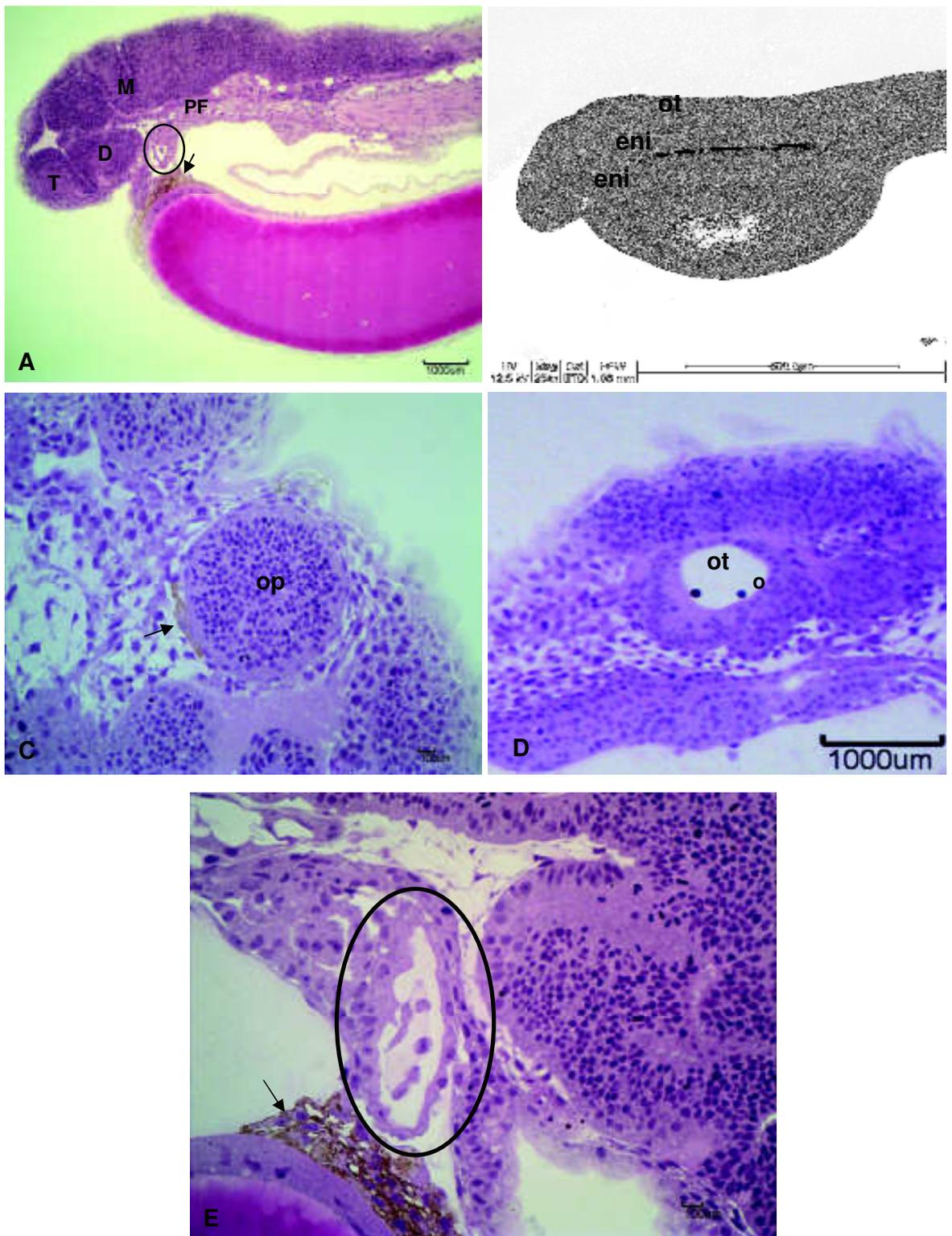


Figura 18

**Figura 19:** Detalhes sob microscopia eletrônica de varredura (**A** e **B**) e sob microscopia óptica (**C**). **A** – região caudal, observação dos somitos e intestino posterior; **B** – formação do ânus; **C** – visualização dos mioblastos nos somitos. Legendas: S – somitos; ip – intestino posterior; a – ânus.

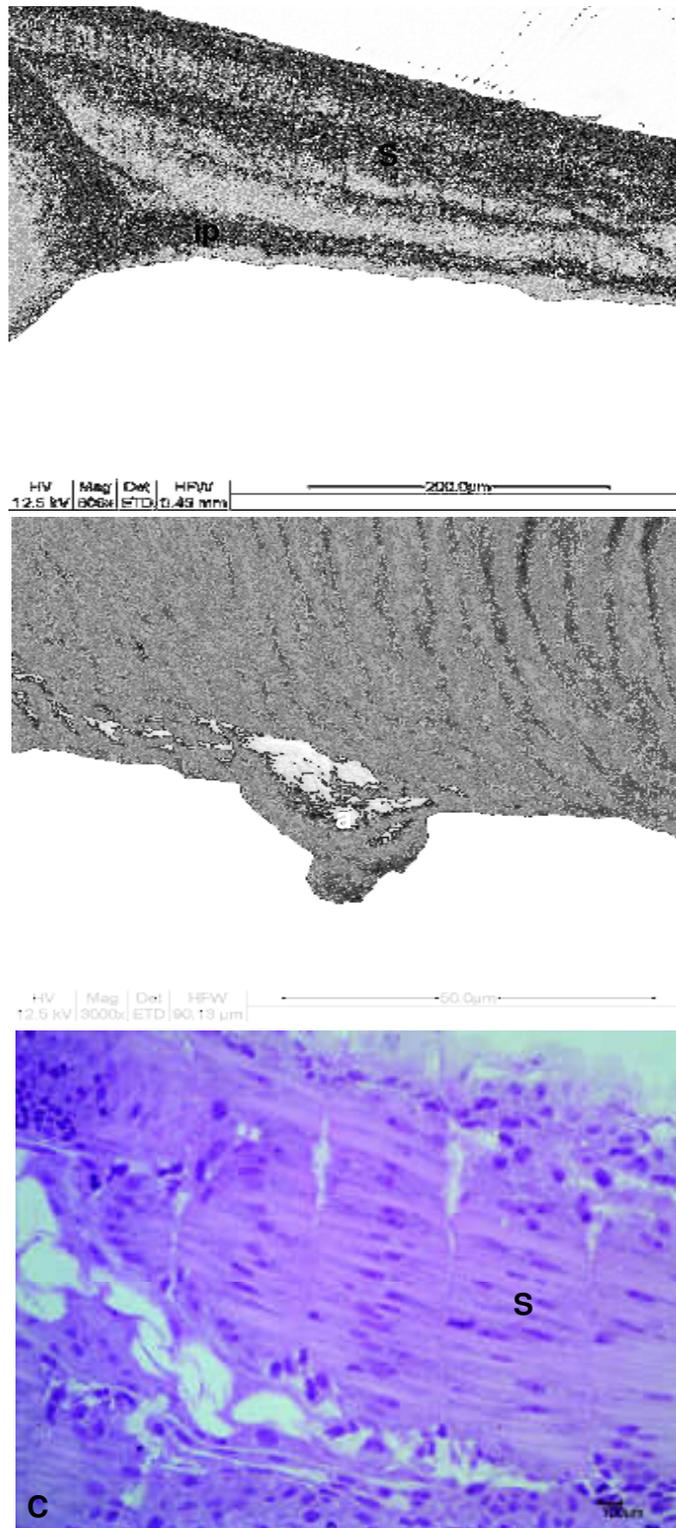


Figura 19

**Figura 20:** Análise sob microscopia eletrônica de varredura do híbrido I. **A** – desenvolvimento das placas olfatórias; **B** – detalhe das placas olfatórias com o desenvolvimento de estruturas semelhantes a cílios; **C** – estrutura não identificada. Legendas: □ - placa olfatória; ▽ - estruturas semelhantes aos cílios; eni – estrutura não identificada; ve – veia embrionária.

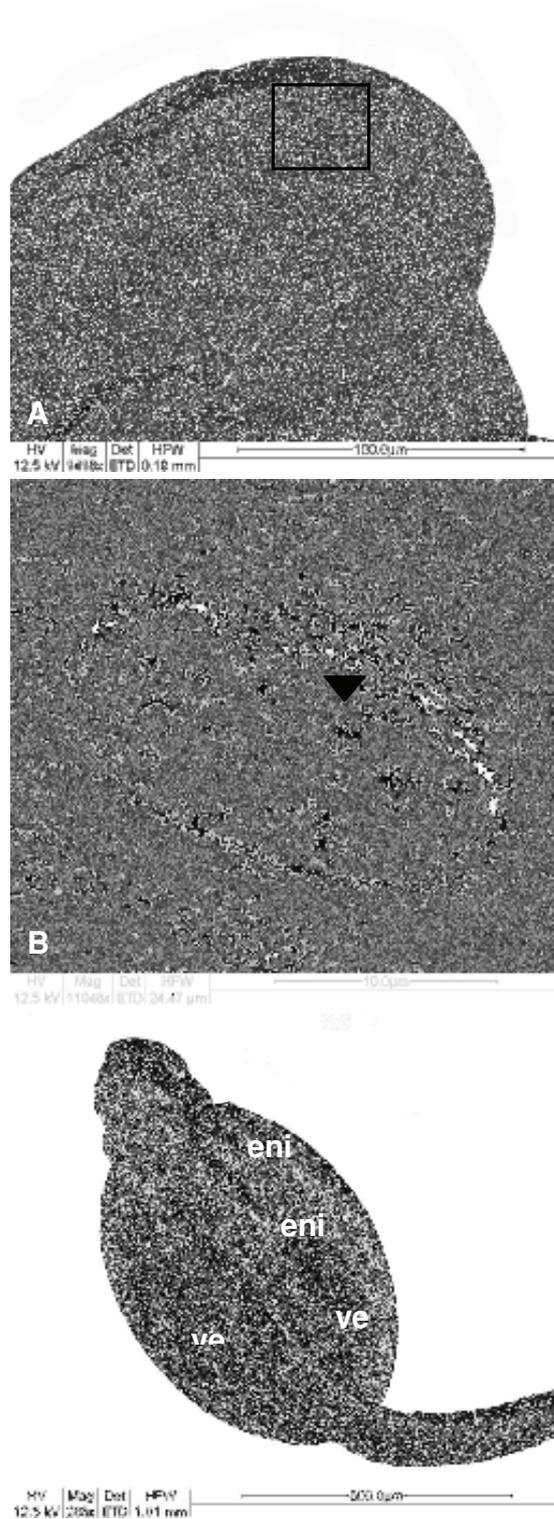


Figura 20

**Figura 21:** Detalhes em microscopia de luz dos embriões do parental *P. corruscans* (HE). **A** – estágio de clivagem, fase de mórula com detalhe da camada sincicial do vitelo; **B** – observação dos pigmentos (cromatóforos) na membrana do saco vitelino. Legendas: BI – blastômeros; csv – camada sincicial do vitelo; → - pigmentos (cromatóforos); gv – glóbulos de vitelo.

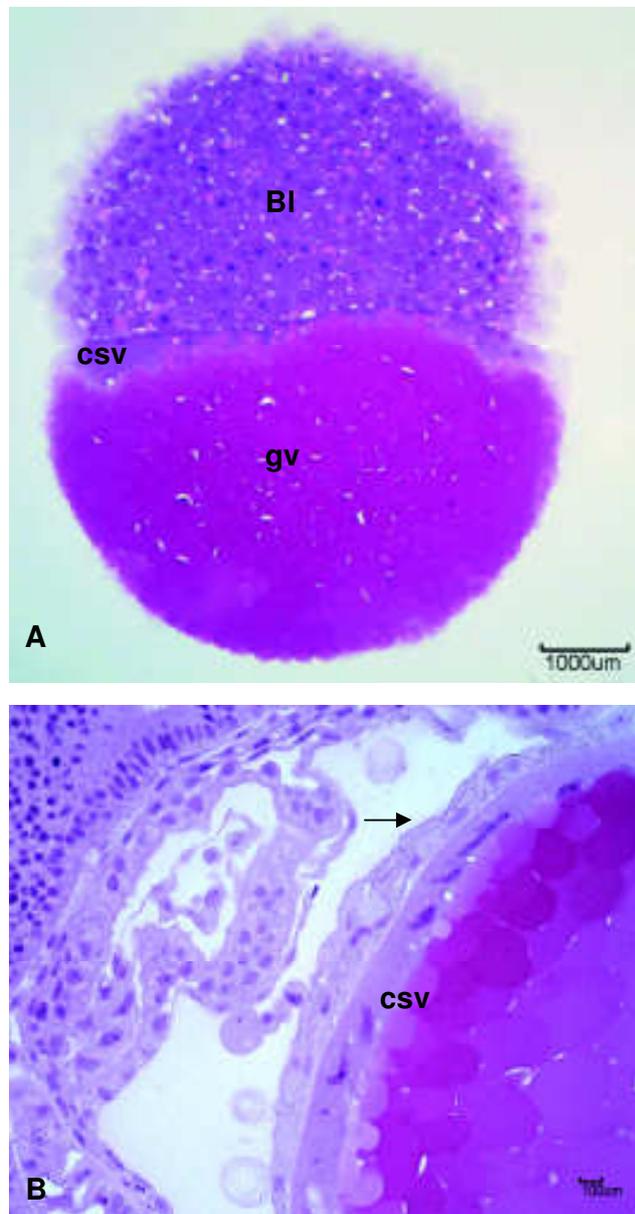


Figura 21

**Figura 22:** Detalhes sob microscopia eletrônica de varredura do *P. corruscans*. **A** – estágio de organogênese, fase larval; **B** – estágio de eclosão, detalhe da região cefálica presença da vesícula óptica; da vesícula ótica e da estrutura não identificada; **C** – desenvolvimento das placas olfatórias; **D** – detalhe das placas olfatórias com o desenvolvimento de estruturas semelhantes a cílios. Legendas: op – vesícula óptica; ot – vesícula ótica; eni – estrutura não identificada; □ - placa olfatória; ▽ - estruturas semelhantes a cílios; ve – veias embrionárias.

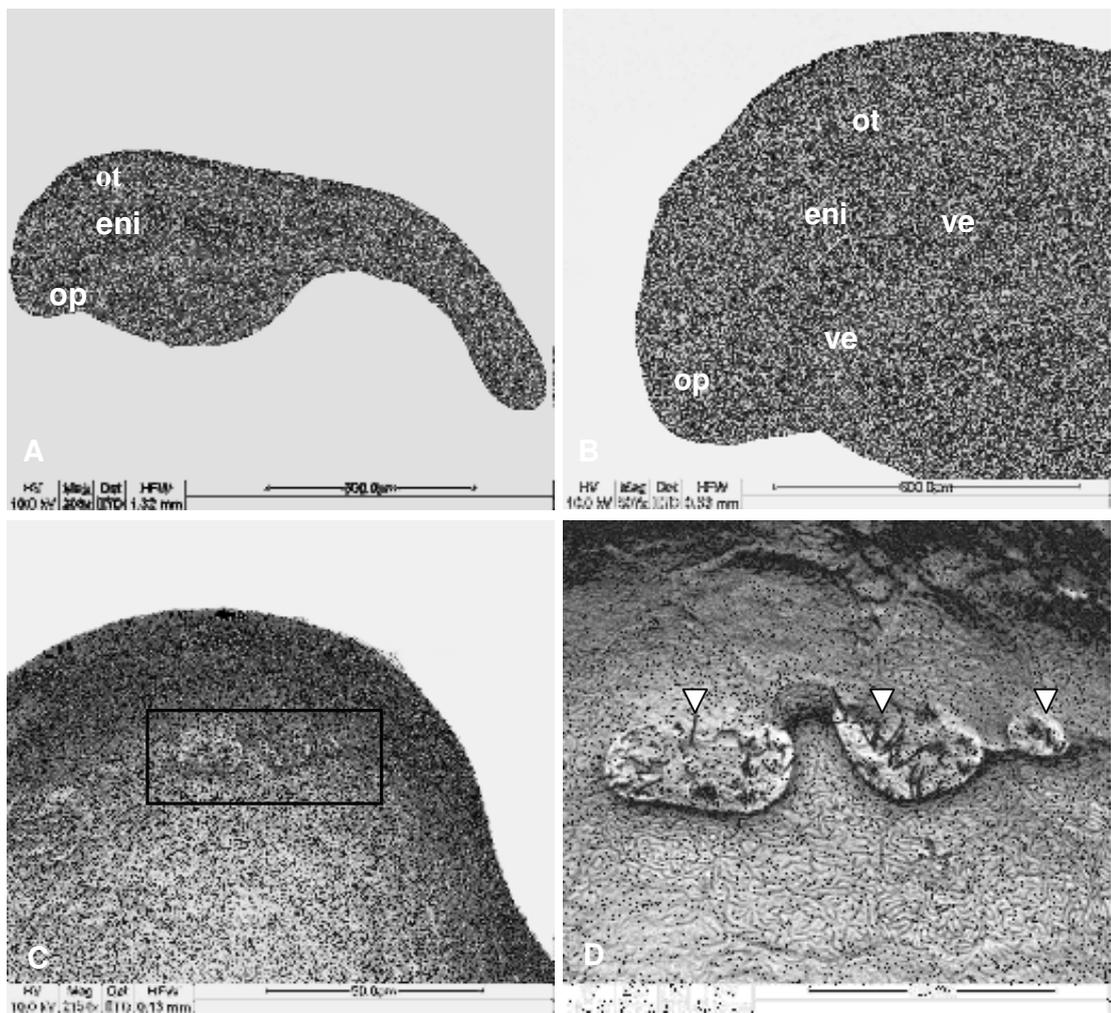


Figura 22

**Figura 23:** Análise sob microscopia óptica do híbrido II (HE). **A** – detalhe do cálice óptico e primórdios do cristalino; **B** – observação dos pigmentos (cromatóforos) localizados na membrana do saco vitelino. Legendas: → - pigmentos (cromatóforos); co – cálice óptico; c – cristalino.

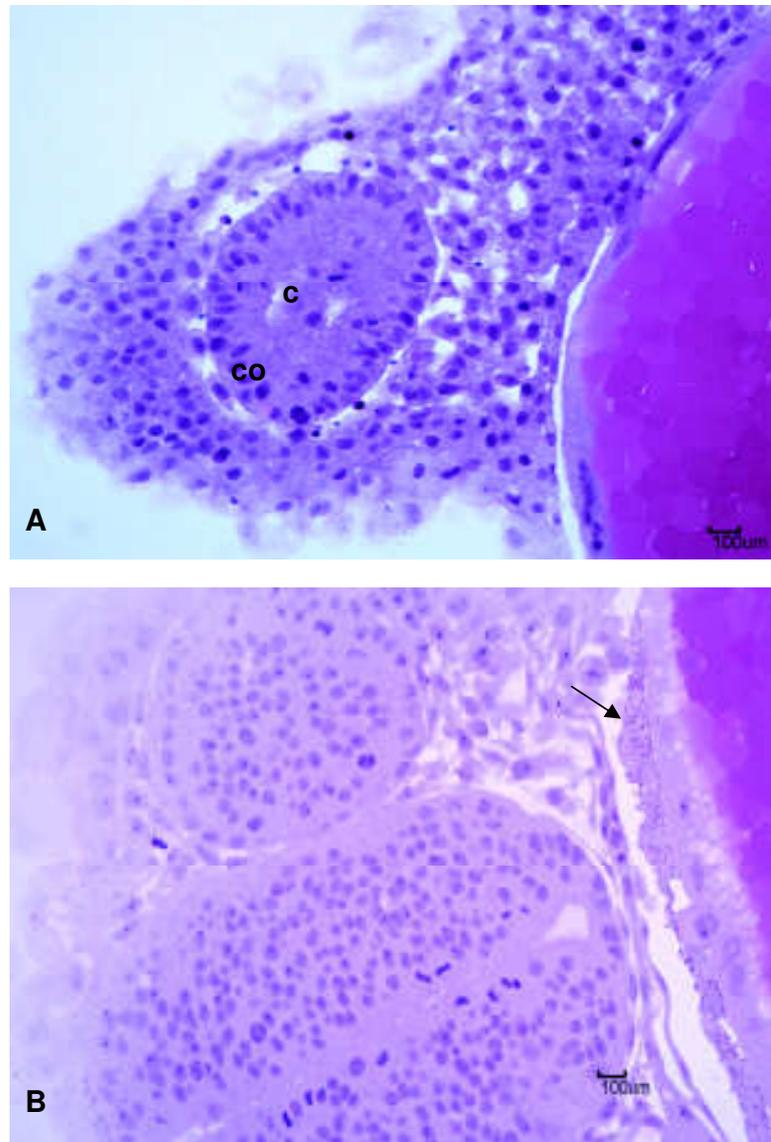


Figura 23

**Figura 24:** Detalhes do desenvolvimento embrionário do híbrido II. Observação sob microscopia eletrônica de varredura em A e C, e sob microscopia de luz em B. **A** – embrião em estágio de organogênese, fase larval; **B** – região cefálica, visualização da vesícula ótica e da estrutura não identificada; **C** – detalhe da estrutura não identificada e pigmentos (cromatóforos). Legendas: ot – vesícula ótica; → - pigmentos (cromatóforos); eni – estrutura não identificada; ve – veia embrionária.

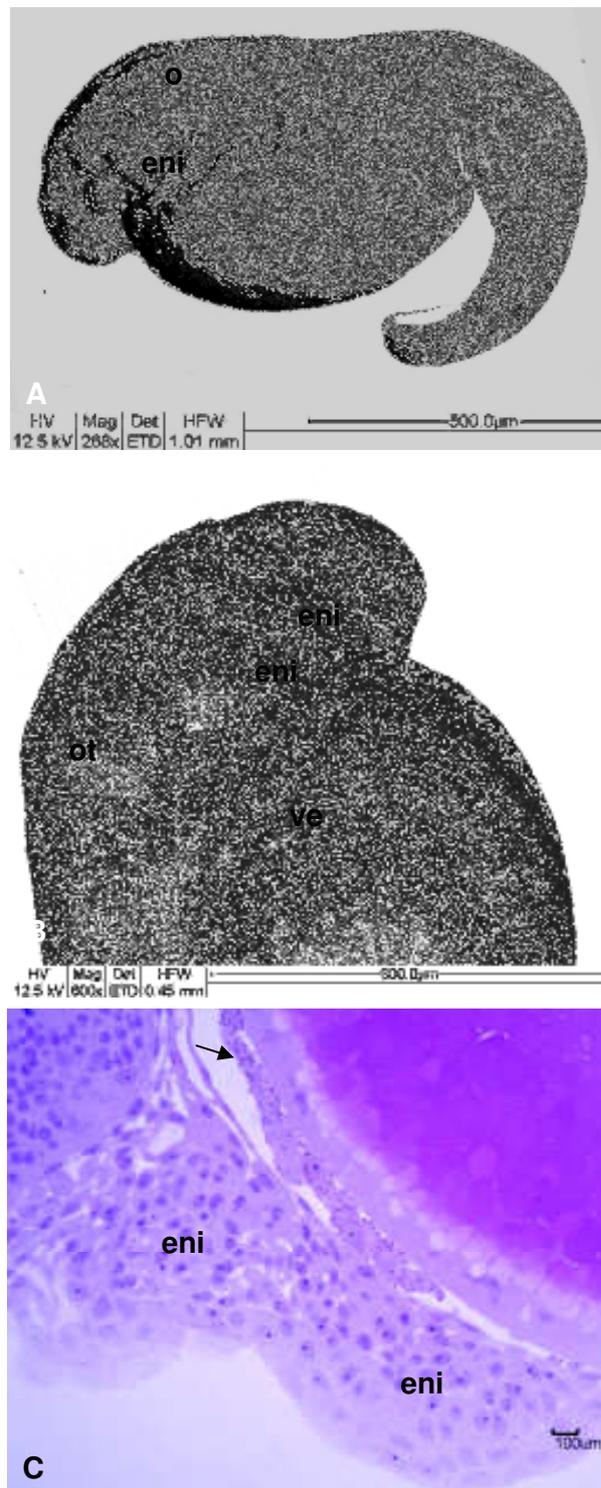


Figura 24

**Figura 25:** Detalhe da notocorda, da placa neural e dos somitos. **A** – parental *L. marmoratus*; **B** – parental *P. corruscans*.

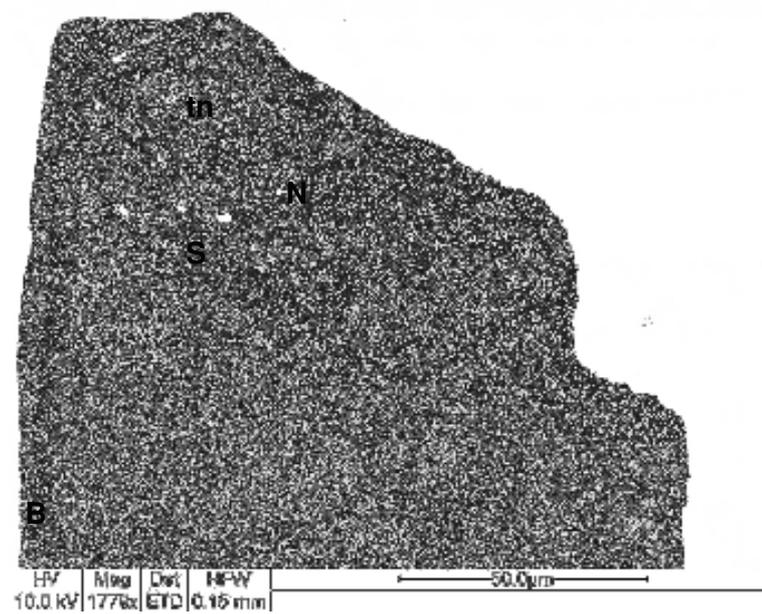
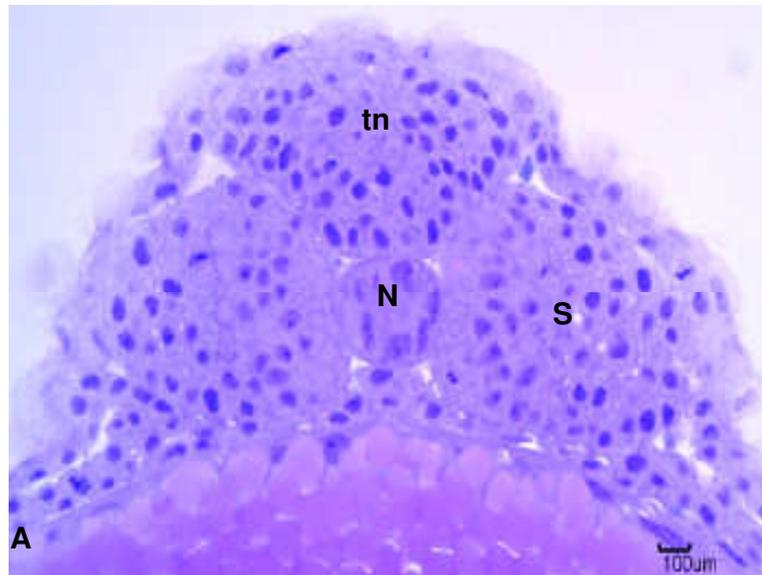


Figura 25

**Figura 26:** Deformidades encontradas no desenvolvimento embrionário do híbrido II. **A** – ovos com blastômeros soltos; **B** – larva com a coluna vertebral deformadas. Legenda: BI – blastômeros; → - coluna deformada.

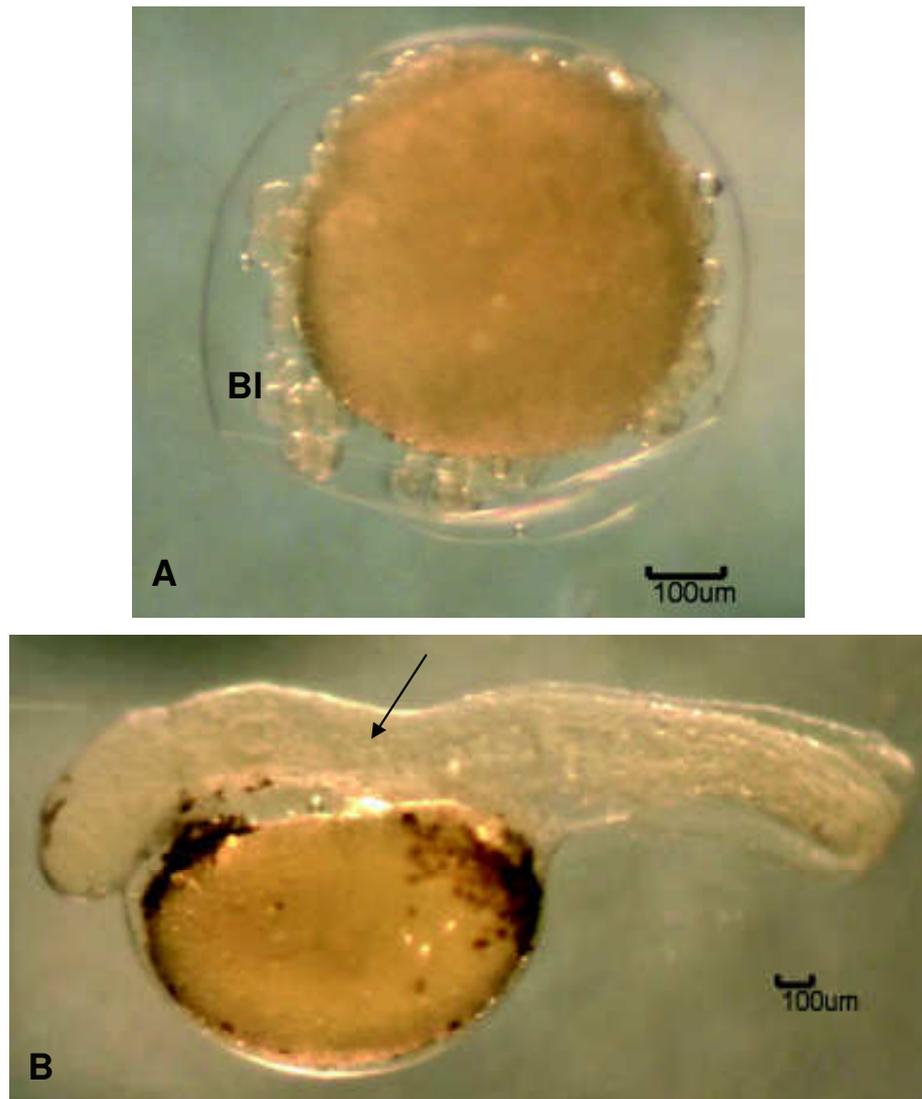


Figura 26

## DISCUSSÃO

Os ovos de peixes são classificados como polilécitos, devido à grande quantidade de vitelo, e telolécitos por apresentarem vitelo concentrado no pólo vegetativo e o citoplasma com suas organelas no pólo animal (RIBEIRO et al., 1995; LEME DOS SANTOS & AZOUBEL, 1996; GANECO, 2003; MARQUES et al., 2008). Estas características foram observadas em *Prochilodus lineatus* (CASTELLANI et al., 1994; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* (FAUSTINO et al., 2007), *Pseudoplatystoma corruscans* (MARQUES et al., 2008), *Zungaro jahu* (MARQUES, 2008), *Rhinelepis aspera* (PERINI et al. 2009) e no presente estudo com os ovos dos parentais *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus* e seus híbridos *P. corruscans* com *L. marmoratus* (híbrido I) e *L. marmoratus* com *P. corruscans* (híbrido II).

Espécies como *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Brycon orbignyanus* (GANECO, 2003), *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum* (RIBEIRO et al., 1995) apresentam ovos com um grande espaço perivitelínico que protege o embrião contra injúrias durante a embriogênese, contribuindo para maior sobrevivência em águas correntes. Em ovos de *Rhamdia hilarii*, o espaço perivitelínico apresenta-se reduzido (GODINHO et al., 1978), como foi observado também nos ovos de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus* e seus híbridos, após a hidratação dos ovos. Levando em consideração as funções atribuídas ao córion e o espaço perivitelínico, tais como: proteção mecânica, regulação osmótica, flutuação, nutrição e prevenção à polispermia (SHARDO, 1995), esta diferença de tamanho do espaço perivitelínico ocorre devido às diferentes estratégias reprodutivas das espécies

acima mencionadas e ao ambiente aonde os ovos se desenvolvem e no caso das espécies estudadas, no fundo dos rios.

Godinho et al. (1978) relataram o aparecimento de uma camada gelatinosa hialina que envolvia os ovos de *Rhamdia hilarii*. Tal camada também foi observada em *Pimelodella lateristriga* (IHERING & AZEVEDO, 1936). Segundo Rizzo et al. (2002) esta camada gelatinosa é encontrada nos Siluriformes sendo constituída por um emaranhado de fibrilas delicadas. Esta característica foi observada em *Astronotus ocellatus* (PAES, 2008), no híbrido entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* (FAUSTINO et al., 2007), *Rhinelepis aspera* (PERINI et al., 2009) e no presente estudo nos ovos do parental *P. corruscans* e no híbrido I.

A cor amarelada é característica dos ovócitos de Siluriformes (SATO et al., 2003; MARQUES et al., 2008), estando associada com a presença de pigmentos carotenóides obtidos através da alimentação. Característica esta também encontrada nos ovócitos e ovos dos espécimes estudadas neste trabalho durante todo o desenvolvimento embrionário. Estes pigmentos constituem uma fonte de oxigênio endógeno quando o sistema respiratório é ineficiente para a obtenção de oxigênio exógeno (BALON, 1977; AMORIM et al., 2009 citado por PERINI et al., 2009). Esta característica pode ser observada em *Brycon cephalus* (LOPES et al., 1995), *Salminus maxillosus* (MORAES & SCHUBART, 1955 citado por LOPES et al., 1995) e *Pseudoplatystoma corruscans* (MARQUES et al., 2008).

Segundo Mello (1989), nos peixes ósseos podem existir gorduras em forma de grandes gotas dentro da massa do vitelo, sendo o número e o tamanho das mesmas, típicos para as diferentes famílias de peixes, como relatado para *Brycon cephalus* (LOPES et al., 1995) e para o peixe marinho *Abudefduf sexfasciatus* (SHADRIN &

EMEL'YANOVA, 2007). Nos ovos das espécies analisadas não foi observada a presença de gotas de gordura no interior do vitelo, semelhante ao relatado para *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Brycon orbignyanus* (GANECO, 2003) e *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001).

Brummett e Dumont (1981) observaram que logo após a ruptura dos alvéolos corticais, uma cobertura protoplasmática acumula no pólo animal, formando o blastodisco, onde ocorre a clivagem do zigoto em blastômeros. Segundo Faustino et al. (2010) após a reação cortical nos ovos do híbrido proveniente do cruzamento de *P. corruscans* com *P. reticulatum*, ocorreu um movimento citoplasmático, levando à diferenciação de ambos os pólos animal e vegetativo e início de clivagem.

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

Os estágios observados durante o desenvolvimento embrionário das espécies e seus híbridos descritos neste trabalho (zigoto, clivagem, gástrula, organogênese e eclosão), também foram relatadas por Faustino et al. (2007) para o híbrido de *P. corruscans* com *P. reticulatum*, por Marques et al. (2008) para *P. corruscans*, por Marques (2008) para *Z. jahu* e por Faustino et al. (2010) para *P. corruscans* com *P. reticulatum*.

A clivagem no *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus* e dos híbridos I e II é do tipo meroblástica ou parcial, como descrito para a maioria dos teleósteos (CASTELLANI et al., 1994; LAGLER et al., 1977; LEME DOS SANTOS & AZOUBEL, 1996; GANECO, 2003; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; MARQUES et al., 2008; PERINI et al., 2009; AMORIM et al., 2009; FAUSTINO et al., 2010).

A primeira clivagem divide o blastodisco em duas células, de igual tamanho, semelhante ao encontrado para *Xiphister atropurpureus* (WOURMS & EVANS, 1974), *Cynolebias* (CARTER & WOURMS, 1991), *Oryzias latipes* (IWAMATSU, 1994) e *Brachidanio rerio* (KIMMEL et al., 1995). As clivagens iniciam do centro para as bordas do blastodisco (MATKOVIK et al., 1985; SHARDO, 1995). O plano das primeiras clivagens se caracteriza de acordo com as espécies estudadas *P. corruscans* e *L. marmoratus* e seus híbridos. Em *O. latipes* (IWAMATSU, 1994) foi observado que no ovo com 16 células um arranjo de 4 blastômeros centrais e 12 blastômeros periféricos formando uma única camada celular e quando atingem 32 células, formam 4 fileiras de 8 células cada. O mesmo foi observado em *Rhamdia sapo* (MATKOVIK et al., 1985); *Alosa sapidissima* (SHARDO, 1995) e para *Brycon orbignyanus* (GANECO, 2003). Entretanto, a maioria dos teleósteos apresenta nesta fase, 4 fileiras de 4 células cada, formando uma única camada de células (KIMMEL et al. 1995; SHARDO, 1995). Este arranjo de 4X4 também foi descrito para *Catostomus commersoni* (LONG & BALLARD, 1976), *Danio rerio* (KIMMEL et al., 1995), *Oreochromis niloticus* (MORRISON et al., 2001) e nas espécies estudadas neste trabalho.

As divisões mitóticas da clivagem ocorrem para que a relação existente entre o núcleo e citoplasma no pólo animal atinja um novo equilíbrio, ou seja, o enorme volume do citoplasma zigótico é dividido cada vez mais em células menores, enquanto o volume citoplasmático não aumenta (GILBERT, 2003). Segundo Castellani et al. (1994) durante a clivagem dos peixes, o número de blastômeros aumenta e o seu tamanho vai diminuindo. Isto pode ser observado em *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Salminus brasiliensis* (NAKAGHI et al., 2006) e *P. corruscans* com *P.*

*reticulatum* (FAUSTINO et al., 2010), assim como nas espécies e nos híbridos analisados neste trabalho.

Morrison et al. (2001) sugerem que a variação da taxa de embriogênese e as variações (assincronia e malformação) no desenvolvimento dos embriões, estão ligadas à temperatura de incubação e à idade dos reprodutores. Ninhaus-Silveira et al. (2006) relatam que em *Prochilodus lineatus*, mesmo utilizando reprodutores novos (1 a 2 anos de idade) e temperatura da água constante, a incubação à temperatura de 24°C, apresentou uma maior assincronia no desenvolvimento embrionário e uma variação mais elevada na divisão dos blastômeros do que quando incubados a 28°C. Kimmel et al. (1995) e Morrison et al. (2001) relatam que mesmo dentro de uma desova fertilizada e incubada em condições ótimas, existe assincronia no tempo de desenvolvimento embrionário. Hisaoka e Firlit (1960) relatam que em “zebrafish” as divisões mitóticas até 32 células são sincrônicas, mas tornam-se assincrônicas no estágio de 64 células. As observações feitas neste experimento com *P. corruscans*, *Leiarius marmoratus* e nos híbridos I e II são corroboradas pelas citações acima, indicando que as características genéticas e ambientais são fundamentais no desenvolvimento embrionário dos teleósteos.

Marques (2008) em *Z. Jahu*, notou que os glóbulos de vitelo fragmentam-se penetrando nos blastômeros, o mesmo foi observado nas espécies estudadas e seus híbridos. Segundo Ninhaus-Silveira (2006) esta fragmentação dos glóbulos de vitelo ocorre para facilitar a absorção do mesmo pelas células.

O periblasto ou camada sincicial do vitelo é uma camada citoplasmática sincicial contínua localizada entre o blastodisco e o vitelo, formada pela divisão incompleta do citoplasma do blastodisco. Inicialmente tem a forma de um anel ao redor do blastodisco,

mas com o passar do tempo, esta se espalha por debaixo de toda a blastoderme (KIMMEL, 1995).

A camada sincicial do vitelo possui uma grande importância para o desenvolvimento embrionário dos teleósteos (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007). Kimmel et al. (1995) afirmaram que ela constitui um órgão e é encontrada apenas em teleósteos, se posicionando de forma extraembrionária, não contribuindo portanto, para a formação do corpo do embrião (BALINSKY, 1970). Esta camada de células também denominada periblasto se diferencia das demais células da blastoderme por apresentar maior basofilia que estas últimas (HISAOKA & FIRLIT, 1960) e é significativa na quebra do vitelo tornando-o disponível para o embrião, permitindo o seu desenvolvimento (BALINSKY, 1970).

O surgimento do periblasto na fase de mórula foi relatado em *Catostomus commersoni* (LONG & BALLARD, 1970), *P. lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006) e *Z. jahu* (MARQUES, 2008), sendo mesmo observado nas espécies analisadas neste trabalho. Enquanto outros autores observaram sua formação no estágio de blástula (WOURMS & EVANS, 1974; IWAMATSU, 1994; KIMMEL et al., 1995; GANECO, 2003; FAUSTINO et al., 2010a, b).

A camada sincicial do vitelo sofre o processo de crescimento e envolvimento do vitelo independentemente da blastoderme e servindo como um motor primário para o movimento de epibolia da blastoderme (BETCHAKU & TRINKAUS, 1986; DEVILLERS, 1961; TRINKAUS, 1993, NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007). Segundo estes autores a camada sincicial do vitelo periférica sofre contração, que irá resultar em vários eventos como a facilitação da migração dos núcleos para a porção mais interna desta, completando sua formação o seu afinamento e avanço da camada sincicial do vitelo em

direção ao pólo vegetativo junto com a blastoderme, a qual está firmemente aderida, dando início ao movimento de epibolia.

O resultado da clivagem é a geração de uma camada celular em forma de bola, a blástula, quando a clivagem é holoblástica ou o blastodisco quando a clivagem é meroblástica (ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009). A formação da blástula ou da blastoderme caracteriza o fim do estágio de clivagem.

O estágio de blástula caracteriza-se pela formação da blastocele, abertura formada abaixo da blastoderme ou a formação de espaços irregulares entre algumas células da blastoderme, como descrito por vários autores (KIMMEL & LAW, 1985; TRINKAUS, 1984; KIMMEL et al., 1995; GANECO, 2003; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; MARQUES, 2008). Em *Brachidanio rerio* foi observada a presença de espaços irregulares entre as células da blastoderme (KIMMEL et al., 1995), sugerindo que este estágio seja melhor definido como “estereoblástula” uma vez que não apresenta blastocele (KIMMEL et al., 1995). Espécies como *Hippocampus reidi* (SILVEIRA, 2001) e a truta (LAGLER, 1977 citado por NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006) foi descrita a presença de uma cavidade de blastocele típica entre a blastoderme e o periblasto. Entretanto, para espécies como *Oreochromis niloticus* (MORRISON, 2001), para o híbrido proveniente do cruzamento entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* (FAUSTINO et al., 2010) e para as espécies caracterizadas neste estudo, não foi identificada nenhuma cavidade característica, nem os espaços irregulares que caracterizariam a “estereoblástula”.

O estágio de gástrula inicia com o começo do movimento de epibolia (LEME DOS SANTOS & AZOUBEL, 1996), se completa com fechamento do blastóporo pela blastoderme e formação do botão da cauda (KIMMEL et al., 1995). Estas observações

estão de acordo com o que foi detectado para os parentais, para os híbridos I e II, e também para o *B. orbignyana* (GANECO, 2003), para o *P. lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), para o *R. aspera* (PERINI et al., 2009) e para o *B. gouldingi* (FAUSTINO et al., 2010).

O movimento de epibolia, no qual as células embrionárias divergem no sentido do pólo vegetativo, formando o epiblasto que originará a ectoderme e seus derivados e o hipoblasto que originará mesoderme e endoderme. Segundo Trinkaus (1992), as células que sofrem epibolia em torno do vitelo, também passam por involução nas margens do anel embrionário e o escudo embrionário passa por conversão, direcionando-as anteriormente e dorsalmente. Estes movimentos formam a cordamesoderme, o precursor da notocorda. As células adjacentes a cordamesoderme, as células da mesoderme paraxial, são os precursores dos somitos mesodermicos (KIMMEL et al., 1995). Estas afirmações estão de acordo com o observado em *P. corruscans* e *L. marmoratus* e dos híbridos I e II, e também descritas por Ninhaus-Silveira et al. (2006) e Castellani et al. (1994) para *Prochilodus lineatus*, Ganeco (2003) para *Brycon orbignyana*, Ribeiro et al. (1995) para *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum*, Marques (2008) para *Zungaro jahu*, Amorim et al. (2009) para *Rhamdia quelen* e Faustino et al. (2010) para os híbridos de *P. corruscans* com *P. reticulatum*. Já para *Oreochromis niloticus* devido ao tamanho do saco vitelino, o embrião não se estende por todo o pólo vegetal e, portanto, a organogênese rudimentar (segmentação dos somitos) começa antes do fim do movimento de epibolia (MORRISON et al., 2001).

Ao término do estágio de gástrula foi observado o surgimento de tecidos mesodermais que se alongaram em ambos os lados da notocorda, organizando-se em

segmentos denominados somitos, semelhante ao descrito em *Brachidanio rerio* (HISAOKA & FIRLIT, 1960; KIMMEL et al., 1995), *Oreochromis niloticus* (GALMAN & AVTALION, 1989), *Oryzias latipes* (IWAMATSU, 1994) e *Brycon orbignyianus* (GANECO, 2003). No entanto, Lagler et al. (1977) já descreveram a formação dos somitos durante o processo de gástrula, como afirma Morrison et al. (2001) em relação à espécie *Oreochromis niloticus*.

Kimmel et al. (1995) considerou que a fase de nêurula está inclusa no estágio de organogênese. Brummett & Dumont (1978) e Morrison et al. (2001) encontraram a vesícula de Kupffer nas fases iniciais do estágio de organogênese. Em *L. marmoratus*, *P. corruscans* e nos híbridos foi observado a presença desta vesícula a partir da fase de nêurula. Segundo Hisaoka & Firlit (1960) a vesícula de Kupffer representa uma estrutura remanescente do arquenteron e se localiza acima do periblasto e abaixo da notocorda. Em *Oncorhynchus keta* (MAHON & HOAR, 1956 apud HISAOKA & FIRLIT, 1960) a vesícula de Kupffer é descrita como uma cavidade oblíqua e alongada, com paredes de epitélio colunar, a qual é separada do periblasto por uma camada de células endodérmicas semelhante ao descrito por Ninhaus-Silveira et al., (2006) em *P. lineatus* e, similar ao descrito para *L. marmoratus*, *P. corruscans* e híbridos. Segundo Kimmel et al. (1995) a vesícula de Kupffer é transitória e encontrada somente em peixes teleósteos. Sua importância é muito questionada na literatura.

Brummett & Dumont (1978) levantaram uma hipótese de que esta poderia ter uma função digestiva, auxiliando na absorção do vitelo pelo embrião, devido à constatação da presença de células ciliadas na vesícula de Kupffer e no intestino de *Fundulus heteroclitus*. Essner et al. (2005) mostrou que no *Danio rerio* esta vesícula possuía fluido e cílios e é uma estrutura embrionária transitória responsável pela

assimetria dos órgãos durante o desenvolvimento. Esta vesícula também foi visualizada em Faustino et al. (2007) em híbrido *Pseudoplatystoma* spp e como nas espécies tratadas neste estudo, não foram identificados cílios no epitélio de revestimento da vesícula nem detectada a vestígios de fluidos.

Durante o estágio de organogênese, ocorre o processo de formação do tubo neural, rudimento do sistema nervoso central (FAUSTINO, 2009). A formação da placa neural embrionária e, sua transformação em tubo neural, no processo de neurulação, é alcançado através de uma série de movimentos celulares, interações indutivas e mudanças na expressão gênica (ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009). Segundo Gilbert (2003) o tubo neural se origina de um sólido cordão de células da placa neural formando uma estrutura com aspecto de cordão que migra dentro do embrião fechando-se para formar o tubo.

De acordo com Silveira (2001) a ectoderme sobre a notocorda transforma-se em uma placa neural, a qual deprime-se centralmente formando o sulco neural, que posteriormente irá se fechar por fusão das pregas neurais, dando origem ao tubo neural. A porção mais anterior do tubo neural sofre mudanças drásticas, expandindo-se em três vesículas primárias, cérebro anterior (prosencefalo), cérebro médio (mesencefalo) e cérebro posterior (rombencefalo) (GILBERT, 2003). Segundo Kimmel et al. (1995) o cérebro anterior subdivide-se em telencefalo, diencefalo e o cérebro médio ou mesencefalo. Nas espécies *P. corruscans* e *L. marmoratus* e dos híbridos I e II a região anterior do tubo neural se expandiu formando as três regiões, semelhante ao observado em *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Brycon orbignyanus* (GANECO, 2003), *Brachidanio rerio* (KIMMEL et al., 1995 citado por

GANECO, 2003), *Rhamdia sapo* (CUSSAC et al., 1985 citado por GANECO, 2003) e *P. corruscans* (MARQUES et al., 2008).

A notocorda foi detectada no estágio de organogênese nos parentais e nos híbridos. Segundo Gilbert (2003) a notocorda é um órgão transitório cuja principal função inclui a indução da formação do tubo neural e estabelece o eixo corporal antero-posterior. A maior parte da notocorda degenera, mas a porção existente entre as vértebras forma o tecido dos discos intervertebrais. No *R. sapo* (CUSSAC et al., 1985) as células da notocorda começam a formar vacúolos que deslocam os núcleos para a periferia. Falk-Petersen (2005) relata que a notocorda é formada por células vacuoladas separadas por finas membranas celulares.

Os resultados da análise histológica desta estrutura nos espécimes estudados neste trabalho, corroboram com os dados apresentados acima.

Com o surgimento do coração inicia-se o desenvolvimento do sistema circulatório, continuando durante o desenvolvimento larval (LANGELAND & KIMMEL, 1997; YELON & STAINIER, 1999; HU et al., 2000). Segundo Hu et al. (2000) o coração é o primeiro órgão definitivo a se desenvolver e tornar-se funcional durante a embriogênese. O coração rudimentar foi visualizado na região anterior ao saco vitelino nas espécies em estudos e seus híbridos. Outros autores relatam que o coração aparece inicialmente como um tubo simples com uma parede de várias camadas (MORRISIN et al., 2001; HALL et al., 2004 e FAUSTINO et al., 2010). Observou-se nos parentais e nos híbridos o desenvolvimento de veias embrionárias. Rodrigues-Galdino et al. (2009) relata a presença de veias vitelinas com circulação de sangue no *R. quelen*.

Os músculos embrionários em forma de "V" originam os miômeros estabelecidos no início da somitogênese (PATTERSON et al., 2008). Contrações musculares podem ocorrer inicialmente em miômeros individuais, e depois em séries coordenadas de miômeros. Mais tarde, quando os reflexos motores-sensoriais desenvolvem funcionalidade, ocorrem rajadas de contrações nos embriões (ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009). Segundo Rodrigues-Galdino et al. (2009) os somitos transformam-se em miômeros em forma de "V" que permitem a flexão lateral do corpo do embrião.

Nos parentais e seus híbridos a cápsula ótica ou vesícula ótica foi estabelecida no início do período de organogênese e os otólitos puderam ser visto na última parte da organogênese, estando de acordo com as observações feitas por ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009. Rogrigues-Galdino et al. (2009) relata que um par de otólitos aparece como pequenos grânulos encostados contra a superfície interna de cada otocisto.

As placas olfatórias são estabelecidas quando esta próxima a eclosão das larvas (BLAXTER, 1988), fato este observado nos parentais e nos híbridos. No *Z. jahu* (MARQUES, 2008) e no *B. gouldingi* (FAUSTINO, 2009) o órgão olfativo foi observado no estágio de eclosão, com pequenas quantidades de cílios rudimentares. As placas olfatórias com cílios estão presentes nas bordas anteriores aos olhos (ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009).

A eclosão de muitos peixes ósseos é auxiliada pela a secreção de glândulas de eclosão. Antes da eclosão as glândulas secretam enzimas proteolíticas, corionases, que decompõem a camada interna do córion facilitando a eclosão do embrião (ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009). Segundo o autor, os movimentos da cauda e do corpo

também ajudam o processo de eclosão. Estes movimentos foram observados nas espécies em estudo e seus híbridos.

A formação dos pigmentos e desenvolvimento padrão em uma espécie ocorre de maneira específica (ZHANG, BHATTACHARYA & LI, 2009). A análise dos cromatóforos e dos pigmentos dos olhos e corpo são importantes para a determinação taxonômica e identificação das espécies (MEIJIDE & GUERREIRO, 2000). As células do epitélio reticular e os melanofóros da pele são os primeiros pigmentos a originar durante a embriogênese (KIMMEL et al., 1995), estando de acordo com as observações feitas nos parentais e seus híbridos e, em outras espécies como *Z. jahu* (MARQUES, 2008) e *R. aspera* (PERINI et al., 2009).

Cussac et al. (1985) relata três pares de uma estrutura, semelhante à estrutura observada nos parentais e nos híbridos, chamada de pacotes mesodérmicos anteriores, localizados na região dorsal do embrião do *R. sapo*. O autor relata que o primeiro pacote mesodérmico anterior não mostra diferenciação na eclosão, o segundo pacote diferencia formando a parede antero-externa da cavidade opercular e o terceiro pacote observa-se ordenamentos paralelos de células que se abriam em fissuras branquiais. Faustino et al. (2010) observou em microscopia eletrônica de varredura a mesma estrutura no híbrido de *P. corruscans* com *P. reticulatum* e identificou como sendo primórdios de barbilhões. Segundo Faustino et al. (2010) esta estrutura também foi identificada por primórdios de barbilhões em *P. corruscans* (CESTAROLLI, 2005). Estudos detalhados de estágios posteriores devem ser elaborados para a identificação correta desta estrutura.

A embriogênese das espécies *P. corruscans* e *L. marmoratus* e dos híbridos *P. corruscans* com *L. marmoratus* e *L. marmoratus* com *P. corruscans*, desde a

fecundação a eclosão das larvas, durou de 12 a 14 horas. Este intervalo de tempo foi relatado também por Faustino et al. (2010) para o híbrido de *P. corruscans* com *P. reticulatum*. Esta variação no período embrionário deveu-se ao fato de que o desenvolvimento dos teleósteos ser muito sensível às mudanças ambientais, principalmente à temperatura. O período de desenvolvimento é geralmente menor em temperaturas elevadas do que em temperaturas mais baixas (LEME DOS SANTOS, 1995).

Segundo para Vandewalle et al. (2005) citado por Faustino et al. (2010) o rápido desenvolvimento embrionário é típico de espécies migratórias com estratégias reprodutivas sazonais e de alta fecundidade e sem cuidados parentais. Como as espécies *P. corruscans* e *L. marmoratus* utilizadas para produzir os híbridos no presente estudo. Blaxter (1969) citado por Faustino et al. (2010) mostrou que a maioria das larvas de peixes recém-eclodidos faltam a boca, o intestino, o ânus, as brânquias, a bexiga natatória, as nadadeiras, a pigmentação e acuidade visual. Nos parentais e híbridos em estudos a boca, as brânquias e a bexiga natatória também estavam ausentes nas larvas recém-eclodidas das espécies estudadas e seus híbridos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M. O., BEZERRA E SILVA, J. W., KÖVACS, G. Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. **Bol. Tec. DNOCS**, 47/42, 1/2: 1-240, 79-100, 1994.
- ALVES, M. S. D.; MOURA A. Estádios de desenvolvimento embrionário de curimatã-pioa, *Prochilodus affinis* (Reinhardt, 1874) (Pisces, Prochilodontidae). In: Encontro anual de aqüicultura de Minas Gerais, Belo Horizonte. **Anais...Três Marias: CODEVASF**, p. 61 – 71, 1992.
- AMORIM, M. P.; GOMES, B. V. C.; MARTINS, Y. S.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**. v. 40, p. 170-180, 2009.
- ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E.T.; ROMAGOSA, E.; FENERICH-VERANI, N. Embryonic and larval development of the “Piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (PISCES, CHARACIDAE). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 27 (1): 21-28, 2001.
- BALINSKY, B. I. **An introduction embryology**. Philadelphia: Saunders Company, p. 698, 1970.
- BALON, E. K. Early ontogeny of *Labeotropheus* Ah1, 1927 (Mbuna, Cichlidae, Lake Malawi), with a discussion on an advanced protective styles in fish reproduction and development. **Environ. Biol. Fish.** v. 2, p. 76-147, 1977.
- BARTLEY, D. M.; RANA K. E IMMINK A. J. The use of hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 10: 325-337, 2001.

- BEHR, E. R. **Efeitos de diferentes dietas sobre a sobrevivência e crescimento de larvas de *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Pisces:Pimelodidae).** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 1997.
- BETCHAKU, T.; TRINKAUS, J. P. Programmed endocytosis during epiboly in *Fundulus heteroclitus*. **Am. Zool.** v. 26, p. 9-193, 1986.
- BORÇATO, F. L.; BAZZOLI, N.; SATO, Y. Embriogenesis and larval ontogeny of the “piau-gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. **Rev. Bras. Zoologia**, 21 (1), p. 117-122, 2004.
- BOTERO, M. et al. Descripción Del desarrollo embrionario de zigotos híbridos obtenidos por El cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Rev. Col. Cienc. Pec.**, Medellín, v. 17, p. 38-45, 2004.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo-Sistemática. In: **Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Paraguai ed. Poluição e Piscicultura.** Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Instituto de Pesca, 79-108, 1972.
- BRUMMETT, A.R.; DUMONT, J. N. Kupffer's vesicle in *Fundulus heteroclitus*: a scanning and transmission electron microscope study. **Tissue Cell.** v. 10, p. 11-22, 1978.
- BRUMMETT, A. R.; DUMONT, J. Cortical vesicle breakdown penetration into the eggs of *Fundulus heteroclitus*. **J. Exp. Zool.** v. 216, p. 63-79, 1981.
- BUITRAGO-SUÁREZ, U. A. and Burr, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, 1512 (1): 1-38, 2007.

- CALCAGNOTTO, D. et al. Biochemical-genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. **Aquacult.**, Amsterdam, v.174, p. 51-57, 1999.
- CARDOSO E. L.; ALVES M. S. D.; FERREIRA R. M. A.; GODINHO, H.P. Embryogenesis of the neotropical freshwater siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. **Aquat. Living. Res.**, v. 8, p. 343-6, 1995.
- CARTER, C. A. & WOURMS, J. P. Cell behavior during early development in the South American annual fishes of the genus *Cynolebias*. **J. Morphol.** 210, p. 66-247, 1991.
- CARVALHO, D. C. et al. Diversidade genética de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*P. fasciatum*) e do seu híbrido interespecífico. In: 1º Congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce. Dourados, Mato Grosso do Sul. **Resumo**. 2007.
- CARVALHO, D. C. et al. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.215-219, 2008.
- CASTELLANI, L.R. et al. Desenvolvimento embrionário do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). **Rev. Bras. Cienc. Morfol.** 1994; 11(2): 99-105, 1994.
- CÁUPER, G. C. B. Biodiversidade Amazônica – Flora Amazônica. **Centro cultural dos povos da Amazônia – CCPA**. Manaus, AM. v. 2, 2006.
- CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829): aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2005.

- CREPALDI, D. V.; Miranda, M. O.T.; Ribeiro, L. P.; Teixeira, E. A.; Melo, D. C.; Sousa, A. B. Comparação do desempenho de surubim puro, *P. corruscans* e o híbrido *P. corruscans* x *P. fasciatum* em 3 densidades de estocagem. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.
- CRUZ-CASALLAS, N. E. et al. Acondicionamiento a dieta seca de larvas de yaque (*Leiarius marmoratus*) obtenidas por reproducción artificial. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu.** v. 21, p. 455-522, 2008.
- CRUZ-CASALLAS, N. E. et al. Desempeño productivo del yaque (*Leiarius marmoratus* Gill, 1870) bajo diferentes densidades de siembra en estanques en tierra. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu.** v. 23, n. 3, 2010.
- CUSSAC, V. E.; MATKOVIC, M.; MAGGESE, M. C. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae) II. Organogénesis media, organogénesis tardia y eclosión. **Rev. Brasil. Biol.** v. 45 (1/2), p. 149-160, 1985.
- DEVILLERS, C. Structural and dynamics aspectos of the development of the teleostean egg. **Adv. Morphol.** v. 1, p. 379-428, 1961.
- ESCOBAR, L. & MOJICA, H.O. Ensayos preliminares de reproducción inducida del yaque, *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) (Pisces:Siluriformes:Pimelodiade) en la Orinoquía colombiana. **Bol. Cien. INPA**, 5: 9- 26. 1997.
- ESSNER, J. J.; AMACK, J. D.; NYHOLM, M. K.; HARRIS, E. B.; YOST, H. J. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. **Development**, v. 132, p. 1247-1260, 2005.

FALK-PETERSEN, I.B. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. **Fish Shellfish Immunol.** v.19, p. 397–412, 2005.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture – 2006 (SOFIA). **Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO Fisheries and Aquaculture Department**, Roma. (2008)

FAUSTINO, F. et al. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta. Sci. Biol. Sci.** Maringá, v. 29, n.1, p. 49-55, 2007.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; MARQUES, C.; GANECO, L. N.; MAKINO, L. C. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids. **Int. J. Dev. Biol.** v. 54, p. 723-730, 2010a.

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**, p. 13, 2010b.

FERNANDES, R.; GOMES, L. C.; AGOSTINHO, A. A. Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas?. **Acta Scientiarum: Biological Sciences.** Maringá, v. 25, n. 1, p. 115-120, 2003.

FERNANDES, J. B. K. Produção de híbridos na piscicultura: Tecnologias como a indução hormonal e reprodução artificial, tornam a produção de peixes híbridos uma prática relativamente simples. 2010 [online]. Disponível em:<<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=21564&acao=Colunas%20Assinadas>>. Acesso em jan. 2011.

FLORES, J. C. B.; ARAIZA, M. A. F.; VALLE, M. R. G. Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon idellus* (Carpa Herbívora). [online], **CIVA**. <http://www.civa2002.org/>, p. 7- 792, 2002.

FURUYA, V. R. B. **Alimentação e desenvolvimento do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Pisces:Pimelodidae): Macrófitas aquáticas e utilização do isótopo estável de carbono (13C).** (Tese:Doutorado) Universidade Estadual de Maringá. 2001.

GALMAN, O.R.; AVTALION, R.R. Further study of the embryonic development of *Oreochromis niloticus* (Ciclidae, Teleostei) using scanning electron microscopy. **Journal of Fish Biology**. v. 34, p. 653-664, 1989.

GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento.** 5ª ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 962p. 2003.

GODINHO, H.M. et al. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.38, n.1, p.151-156, 1978.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Rev. Brasil. de Reprod. Animal**, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

HALL, T. E.; SMITH, P.; JOHNSTON, I. A. Stages of embryonic development in the Atlantic Cod *Gadus morhua*, **J. Morphol.** v. 259, p. 255-270, 2004.

- HISAOKA, K.K.; FIRLIT, C.F. Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachidanio rerio* (Hamilton-Buchanan). **J. Morphol.**, v. 107, 205-25, 1960.
- HU, N.; SEDMERA, D.; POST, H. J.; CLARK, E. B. Structure and function of the developing zebrafish heart. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 148-157, 2000.
- IWAMATSU, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. **Zoological Science**. v. 11. p. 825-839. 1994.
- IHERING, R.; AZEVEDO, P. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 7: 107-118, 1936.
- KIMMEL, C. B.; LAW, R. D. Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. **Dev. Biol.** v. 108, p. 86-93, 1985.
- KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of zebrafish. **Dev Dyn.** 203: 253-10, 1995.
- KOSSOWSKI, C. Observaciones preliminares sobre reproducción inducida y ontogénesis temprana del bagre negro, *Leiarius marmoratus* (Piscis, Siluriformes). **Memorias 26<sup>ma</sup> Convención Anual AsoVAC**. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 1986.
- KOSSOWSKI, C. Experiências iniciais sobre La hibridización de *Leiarius marmoratus* (GILL, 1871) por *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus) 1766 (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). **Acta Científica Venezolana**, v.42, p.48-50. 1991.
- KOSSOWSKI, C. Experiencia en varias hibridaciones artificiales logradas en Pimelodidos (Siluriformes). **Memorias 7<sup>mo</sup> Simposium Latinoamericano**

- Acuicultura.** Univ. Centrooccidental "Lisandro Alvarado" Barquisimeto, Venezuela. 1992a.
- KOSSOWSKI, C. Avances en la hibridación artificial de (*Pseudoplatystoma fasciatum* (L. 1766) x *Leiarius marmoratus* (Gill, 1871) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). **Bol. Red Acuicult.**, 6: 3-7. 1992b.
- KOSSOWSKI, C. Nota inicial sobre la fertilidad del híbrido *Pseudoplatystoma fasciatum* por *Leiarius marmoratus* (F1) y su retrocruza con especies padres (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). **Resúmenes 7<sup>mo</sup> Congreso Latinoamericano Acuicultura. Asoc. Lat. Acuicultura**, Cildeserc y Coldeciencias. Santa Fé de Bogotá, Colombia. 1994.
- KOSSOWSKI, C. Observaciones sobre el policultivo del híbrido de *Pseudoplatystoma fasciatum* por *Leiarius marmoratus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Memorias 9<sup>no</sup> Congreso Latinoamericano Acuicultura. Asoc. Lat. Acuicultura**. Coquimbo, Chile. 1996a.
- KOSSOWSKI, C. Perspectives de l'élevage des poissons-chats (Siluroidei) em Amerique du Sul. *Aquat. Living Res.*, 9: 189-195. 1996b.
- KOSSOWSKI, C. Hibridación del brage zamurito *Calophysus macropterus* (Pisces, Pimelodidae). **Bioagro**. v. 13, n. 2, p. 71-77, 2001.
- KUNZ, Y. W. **Developmental biology of teleosts fishes**. Dordrecht, Springer, 652p. 2004.
- LAGLER, K.F. **Freshwater fishery biology**. 2. ed. Dubuque: W.M.C. Brown Company, 421 p. 1959.
- LAGLER, K.F. et al. **Ichthyology**. 2<sup>o</sup> ed. New York: John Wiley & Sons; 1977.

- LANGELAND, J. A.; KIMMEL, C. B. **Fishes**. In: Embryology. Constructing the organism (GILBERT, S. F.; RAUNIO, A. M., eds), Sunderland, MA: Sinauer Associates, p. 383-407, 1997.
- LAYMAN, C. A.; WINEMILLER, K.; ARRINGTON, A. A.; JEPSEN, D. B. Body size and trophic position in a diverse tropical food web. **Ecology**, 86 (9): 2530-2535. 2005.
- LEME DOS SANTOS, H. S. Anatomia microscopia dos ovos de teleósteos nas diferentes etapas do desenvolvimento embrionário. In: Semana sobre histologia de peixes da FCAV-UNESP, 2, 1995. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FCAVJ-UNESP, 1995.
- LEME DOS SANTOS, H. S.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. Jaboticabal: FUNEP; 1996.
- LONG, W. L.; BALLARD, W. W. Normal embryonic stages of the white suckers, *Catostomus commersoni*. **Copeia**. v. 2, p.342-51, 1976.
- LOPEZ-FANJUL, C.; TORO, M. A. **Mejora Genética de peces y moluscos**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 107, 1990.
- LOPES, R. N. M., SENHORINI, J. A., SOARES, M. C. F. Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã, *Brycon cephalus* Gunther, 1869 (PISCES; CHARACIDAE). **Bol. Tec. do CEPTA**, v.8, 25-39, 1995.
- LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis, R., Kullander, S.O. e Ferraris, C.J. Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, p. 432-455, 2003.

- LUNDSTEDT, L. M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- LUZ, R. K.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; FERREIRA, A. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Desenvolvimento embrionário e estagios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, n.1, p.49-55, 2001.
- LUZ, R.K.; ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura do mandiamarelo *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes:Pimelodidae) em diferentes densidades de estocagem nos primeiros dias de vida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v.31, n.2, p.560-565. 2002.
- MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)*.** Tese (título de Doctor Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2006.
- MANGETTI, A. J. Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MARQUES, R. V.; JEFFMAN, J. Princípios de conservação ambiental que necessitam ser respeitados para que seja possível uma real sustentabilidade da atividade de aquacultura. **Rev. Cent. Ciênc. Admin.**, Fortaleza, v. 9, n. 2, p. 220-228, 2003.
- MARQUES, C. **Análise Histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de Jaú (*Zungaro jahu*).** 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

- MARQUES, C. et al. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. **Zygote**. Cambridge, v. 16, p. 333-342, nov. 2008.
- MATKOVIC, M. V. et al. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1940) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces; Pimelodidae). I. Segmentación morfogénesis y organogénesis temprana. **Rev. Bras. Biol.**, 45, p. 30-50, 1985.
- MEIJIDE, F. J. & GUERRERO, G. A. Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. **Jor. Zool. Lond.** v. 252, p. 93-481, 2000.
- MELLO, R. A. **Embriologia comparada e Humana**. Ed. Livraria Atheneu. p. 289. 1989.
- MELLO, P. H. Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). **Environ. Biol. Fish** v. 85, p. 359–360, 2009.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Produção de pescado aumenta 25% nos últimos oito anos. 2010. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/>>. Acesso em jan. 2011.
- MIRA, T. M. L.; MEDINA-ROBLES, V. M. & CRUZ-CASALLAS, P. E. Morfología testicular del yaque *Leiarius marmoratus* (Pisces: Siluridae) en estadio de madurez reproductiva. **Int. J. Morphol.**, v. 28, n. 2, p. 421-420, 2010.
- MORA, J.A. Avances y perspectivas de la producción comercial de bagres em Venezuela. **El Acuicultor**, 5: 9-14. 2003.
- MORA, J. A. & KOSSOWSKI, C. Reproducción inducida del bagre yaque, *Leiarius marmoratus* (Gil 1870) con aplicación de LHRHa. **Memórias 13<sup>er</sup> Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Asoc. Venezolana de**

- Producción e Industria Animal y Universidad Rómulo Gallegos**, San Juan de Los Morros, Venezuela. 2006.
- MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT JR., J. R.; Histological study of development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). **Journal of Morphology**, v. 247, p. 172-196, 2001.
- NAKAGHI, L. S.O. et al. Desenvolvimento embrionário do dourado (*Salminus brasiliensis*) por meio de microscopia eletrônica de varredura. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 19, p. 9-19, 2006.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: UEM, Nupélia, 378 p. 2001.
- 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 (August), p. 217-229, 2006.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**. v. 15, p. 267-271, 2007.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4 rd ed., John Wiley e Sons, Inc., New York, USA, 2006.
- ORSI, M. L.; Agostinho, A. A. Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Zool.** v. 16, n. 2, p. 557-560, 1990.

- OSSE, J. W. M.; VAN DEN BOOGAART, J. G.; VAN SNIK, G. M. J.; VAN DER SLUYS, L. Priorities during early growth of fish larvae. **Aquaculture**. v. 155, p. 249-258, 1997.
- PAES, M. C. F. **Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- PATTERSON, S. E. et al. Growth in the larval zebrafish pectoral fin and trunk musculature. **Developmental Dynamics**. v. 237, p. 307-315, 2008.
- DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L. R. et al. (Eds.), **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, p. 279-330, 1998.
- PRADO, F. D. **Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- PERINI, V. R.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Biology of eggs, embryos and larvae of *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces: Siluriformes). **Zygote**. v. 18, p. 159-171. May, 2009.
- PETREIRE Jr., M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**. 19 (110): p. 28-33. 1995.

- PINTO, M.L.G.; CASTAGNOLLI, N. Desenvolvimento inicial do pacu *Colossoma mitrei* (Berg, 1895). IN: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3, 1982, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, p. 523-535, 1984.
- POLEO, G. A.; MORA, J. A. Ensayos preliminares de preservación a corto plazo de sêmen de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontes*). **Ciencia**: Maracaibo, Venezuela, v. 16, n. 4, p. 396-401, 2008.
- PONZETTO, J. M. et al. Reprodução induzida de híbridos de siluriformes em cativeiro: potencialidades e ameaças à conservação das espécies nativas. In: XXII **Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2010, Marília. Resumo...Universidade Estadual Paulista, 2010.**
- PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; ALVES, A. L.; ALMEIDA, R. B. C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1 (suppl), p. 195-202, 2008.
- PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. (Gráfica da Universidade Federal de Santa Maria). 2 ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, v.1, p. 589-601, 2010.
- QUAGGIO, A. D. N. V. et al. Estudo da Hibridação Interespecífica em espécies no gênero Brycon (Characidae, Bryconidae). In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Água de Lindóia. **Resumo...**Água de Lindóia, São Paulo, 2009.

- RAMÍREZ, G. & AJIACO, M. R. Aspectos preliminares de la biología pesquera de yaque, *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) (Pisces: Siluriformes: Pimelodiade) en la parte alta del río Meta (Orinoquía colombiana). **Bol. Cien. INPA**. 5: p. 9 -26. 1997.
- REIS NETO, R. V. **Avaliações morfométricas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, p. 63, 2007.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South America**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 729, 2003.
- RESENDE, E. K.; OLIVEIRA, C. A. L.; LEGAT, A. P.; RIBEIRO, R. P. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. **Anais...Maringá**, 2010.
- RIBEIRO, C. R. et al. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (Pacu, *Piaractus mesopotamicus*; Tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido Tambacu). **Rev. Brás. Biol.**, São Carlos, v. 55, p. 65-78, 1995.
- RIZZO, E.; SATO, Y. BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Jor. Fish Biol.** v. 61, p. 32- 615, 2002.
- ROBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aqüicultura Brasileira. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.13, n. 76, p. 47-57, 2003.
- RODRIGUES-GALDINO, A. M. et al. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**. v. 18, p. 131-144, 2009.

- ROSSI, L. M. Ontogenetic diet shifts in a neotropical catfish, *Sorubim lima* (Scheider) from the River Parana System. **Fish.Managem and Ecology**, Oxford, v.8, p.141-152, 2001.
- SANCHES, P. V.; NAKATANI, K.; BIALETZKI, A. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper paraná river. **Rev. Brasil. Biol.** v. 59, n. 3, p. 429-438, 1999.
- SÁNCHEZ, J. A. M.; MOYETONES, F.; CERDÁ, M. J. Influencia del contenido proteico en el crecimiento de alevines de bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, alimentados com concentrados comerciales. **Zootecnia Trop.** v. 27, n.2, p. 187-194. 2009.
- SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; NUÑER, A. P. O.; GODINHO, H. P.; VERANI, J. R. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais** (eds. H. P. GODINHO & A. L. GODINHO), Editora PUC Minas. Belo Horizonte:CNPq/PADCT. Pp. 229-79, 2003.
- SHADRIM, A. M.; EMEL'YANOVA, N.G. Embryonic-Larval Development and Some Data on the Reproductive Biology of *Abudefduf sexfasciatus* (Pomacentridae: Perciformes). **Journal of Ichthyology**, Moscow, v. 47, n.1, p. 67-80, 2007.
- SHARDO, J. D. Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the American Shad, *Alosa sapissima* (Wilson, 1811). **J. Morphol.**, New York, v. 225, p. 125-167, 1995.
- SILVEIRA, R. B. Alguns aspectos da reprodução e do desenvolvimento de cavalos-marinhos. In: GARCIA, S. M. L.; FERNANDES, C. G. **Embriologia**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 22-212, 2001.

- TRINKAUS, J. P. The midblastula transition, the YSL transition and the onset of gastrulation in *Fundulus*. **Development**. p. 75-80, 1992.
- TRINKAUS, J. P. The yolk syncytial layer of *Fundulus heteroclitus*: origin and history and its significance for early embryogenesis. **Jor. Exp. Zool.** v. 265, p. 84-258, 1993.
- TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BERNARDINO, G.; CALCAGNOTTO, D. Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. **Cadernos de Ictiogenética 2**, CCS/USP, São Paulo, 1994.
- TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; CALCAGNOTTO, D.; FONTELES-SANTOS, S. B. A.; BERNARDINO, G. **Cadernos de Ictiogenética 4: Programas Genéticos de Seleção, Hibridação e Endocruzamento Aplicados à Piscicultura**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 56 pp. 1998.
- VAZ, M. M. et al. (Org.). **Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: Cemig/ Cetec. 114p. 2000.
- VAZZOLER, A.E.A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Eduem, 1996.
- ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Larvicultura na CEMIG. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA DE MINAS GERAIS, 10., 1992, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: Cemig, p.36-42. 1992.
- ZHANG, S.; BHATTACHARYA, H.; LI, H. Embryogenesis and Development. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and bony fishes)**. Enfield, NH, USA. v. 8, p. 485- 511, 2009.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. E. **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. CABI Publishing, 418 p. 2002.

WELCOMME, R. L. **River Fisheries: Food and Agriculture Organization of the United Nations** – FAO, Roma, 330 p. (FAO Fisheries Technical Papers, 262). 1985.

WOURMS, J. P. & EVANS, D. The embryonic development of the black prickleback, *Xiphister atropurpureus*, a Pacific Coast blennioid fish. **Can. J. Zool.**, v. 52, p. 879-887, 1974.

YELON, D. & STAINIER, D. Y. R. Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. v. 10, p. 93-98, 1999.