

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

JOÃO FELIPE MOUTINHO SANT`ANNA

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DO SURUBIM DO IGUAÇU (*Steindachneridion melanoderdatum*) E COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO COM O JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*).

Ponta Grossa - PR

2009

JOÃO FELIPE MOUTINHO SANT`ANNA

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DO SURUBIM DO IGUAÇU (*Steindachneridion melanoderdatum*) E COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO COM O JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*).

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Ponta Grossa – PR

2009

Ficha catalográfica elaborada pelo setor de processos técnicos BICEN/UEPG.

S232v Sant'Anna, João Felipe Moutinho
Variáveis reprodutivas do surubim do Iguaçu
(*Steindachneridion melanoderdatum*) e comparação do
desenvolvimento ontogenético com o jundiá (*Rhamdia quelen*) /
João Felipe Moutinho Sant'Anna. Ponta Grossa, 2009.
73 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de
concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta
Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

1. Surubim do Iguaçu – reprodução e cultivo. 2. Piscicultura
comercial. 3. Jundiá – reprodução e cultivo. I. Artoni, Roberto
Ferreira. II. Vicari, Marcelo Ricardo. III. Mestrado em Ciências
Biológicas. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. T.

CDD: 597.49



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 06/2009

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo(a) candidato(a) **JOÃO FELIPE MOUTINHO SANT'ANA**. Aos dois dias do mês de outubro de dois mil e nove, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **JOÃO FELIPE MOUTINHO SANT'ANA**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (orientador), Dr. Claudinei Cruz, Dr. Marcelo Ricardo Vicari e Dr^a Verônica Oliveira Viana. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao(a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Variáveis reprodutivas do Surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*) e comparação do desenvolvimento ontogenético com o jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Ponta Grossa, 02 de outubro de dois mil e nove.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof. Dr. Claudinei Cruz

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Prof^a Dr^a Verônica Oliveira Viana

“Penso que a maior arma do mundo é o tempo.

Assim, a evolução precisa apenas de tempo.”

EU POSSO!

João Felipe Moutinho Sant`Anna

Dedico esta dissertação resultado de um longo trabalho à meus pais, Caubi e Elizete, por terem sustentado por anos as bases da estrutura consolidada que hoje a nossa família possui. Parabéns a estas duas pessoas. Aproveito para agradecer o companheirismo de minhas duas lindas irmãs, Natalia e Renata, estas que serão a ponte para o meu passado. Não podendo deixar meus avós paternos e maternos, que são a fonte genética e estrutura que ainda mantém nossas vidas ligadas.

A todos, o meu muito obrigado.

Agradecimentos

Para finalizar mais uma meta com sucesso em minha vida e poder continuar criando e conquistando novas e maiores metas, gostaria de agradecer várias pessoas que possibilitaram a minha formação intelectual e emocional até o momento.

- Às Universidades Estaduais de Ponta Grossa e Centro Oeste pela audácia e visão em desenvolver este curso de pós-graduação.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, campus de Ponta Grossa, e ao seu coordenador e meu orientador, Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni por possibilitar o meu crescimento acadêmico e intelectual na área de biologia evolutiva e aquacultura, e também por entender e apoiar o meu desenvolvimento profissional durante o curso. Afinal, sou o João “Flipper”, que vive de saltos e obstáculos. Obrigado!

- Aos colegas do Laboratório de Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Em especial ao amigo Miguel, pelas boas risadas, mas principalmente pela confiança e aposta em meu trabalho.

- Ao Prof. Marcelo Ricardo Vicari, pelo apoio oferecido antes e durante o curso.

- À Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Mattiello e à Dra. Viviane Nogaroto Vicari, pelas correções na qualificação.

- Ao Dr. João Batista, professor da Universidade Estadual de São Paulo, pelo apoio oferecido e as lições dadas sobre aquacultura.

- Ao Dr. Claudinei da Cruz, professor e pesquisador da Universidade Estadual de São Paulo, pelo apoio técnico em diversos momentos.

- Ao Américo Neto, que participou em parceria do projeto, juntamente das coletas na Estação de Piscicultura da COPEL.

- À COPEL – Companhia de Energia Elétrica do Paraná, pela oferta e liberação para uso da unidade de piscicultura da Usina Hidrelétrica de Salto Segredo. Juntamente neste espaço, agradeço ao Sr. Luiz Ludwig, Sr. Éder Gomes e equipe de campo pelo apoio e confiança no sucesso do trabalho.

- Ao Dr. Fabiano Bendack, coordenador do Centro de Produção e Propagação de Organismos Marinhos, que entendeu na época a oportunidade de eu fazer o mestrado e finalizou o contrato que eu possuía, para poder seguir na carreira acadêmica.

- Aos meus novos colegas de trabalho na BAYER S/A, Sérgio Saud, Alfredo Freire, Delton Pereira, e os demais colegas. Viva a BAYER AQUACULTURA. Obrigado pela atenção de todos.

- A todos os Professores que ministraram disciplinas junto ao Programa de Pós – Graduação de Biologia Evolutiva, por compartilharem conhecimentos e experiências.

- Aos meus colegas da pós-graduação, por entenderem muitas vezes a minha ausência no laboratório, fato este pela minha escolha profissional.

- Aos colegas Aparício Streit e Thaís Saad Szczepanski pelo empenho e ajuda na formatação dos artigos científicos.

- Aos grandes amigos Nilton Ishikawa e Leonardo Cericato, grandes facilitadores e professores da minha vida profissional na aquacultura.

- Agradeço aos amigos, pela contribuição, ajuda e amizade oferecida sempre. E todos os colegas que de uma forma ou de outra me incentivaram com pelo menos palavras de apoio e admiração. Muito obrigado!

- Aos meus familiares que sempre tiveram o carinho e o respeito por minha pessoa e por minhas escolhas. Amo cada um de vocês.

- À pessoa que esteve no início e sempre estará do meu lado. A pessoa que amo. Flávia, muito obrigado!

- A todos aqueles que de alguma forma participaram de minha formação e sempre me incentivaram na minha Carreira Universitária, aqui omitidos, porém não esquecidos. A todos, o meu MUITO OBRIGADO!

Resumo

Espécies de grande porte e valor comercial são encontradas na bacia do Iguaçu, tendo como destaques, representantes da ordem Siluriforme. O gênero *Steindachneridion* pertence à ordem dos Siluriformes e possui distribuição restrita aos rios de algumas bacias da América do Sul. O endêmico surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*), assim como outros siluriformes, apresenta características que vêm despertando grande interesse para o cultivo. Outro representante dos Siluriformes, com ampla representação no rio Iguaçu, é o jundiá (*Rhamdia quelen*), espécie esta já introduzida com sucesso na piscicultura comercial. O intuito deste trabalho foi de investigar os processos reprodutivos em laboratório a fim de definir melhores estratégias para reprodução induzida, taxa de fecundação, e desenvolvimento embrio-larval destes Siluriformes. O experimento foi realizado em viveiros de piscicultura da Estação de Estudos Ictiológicos da Usina Ney Braga, localizada na represa de Salto Segredo, PR. Com o objetivo de avaliar características qualitativas e quantitativas do sêmen de surubim, *S. melanoderdatum*, utilizaram-se onze machos com peso entre 1,1 e 2,4 kg, submetidos ao tratamento de hipofisacção. O volume de sêmen coletado variou de 0,4 a 2,5 mL. A motilidade dos espermatozoides após a coleta manteve-se entre 85 a 292 segundos, quando ativados com água do tanque, e de 66 e 268 segundos, quando ativados com água destilada. Para a concentração espermática, foram encontrados valores que oscilaram entre 28 e 88 x10⁶ espermatozoides/mm³. Entre 0 à 74 horas pós fertilização, foram realizadas 37 coletas à cada duas horas, para cada espécie. Foi observada a organogênese, eclosão com boca e ânus fechados, formação do coração, olhos, nadadeiras e trato digestório. As larvas de *S. melanoderdatum* e *R. quelen* possuem características similares durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: piscicultura; reprodução; bagre; *Steindachneridion*, *Rhamdia*, rio Iguaçu.

Abstract

Species of large size and commercial value are found in the basin of the Iguaçu, with the highlights, representatives of the order Siluriformes. The genus *Steindachneridion* belongs to the order Siluriformes and has restricted distribution of some rivers basins of South America. The endemic Iguaçu's surubim (*Steindachneridion melanoderdatum*) as well as other catfish, has characteristics that have attracted great interest for cultivation. Another representative of Siluriformes, with broad representation in the Iguaçu river, the jundiá (*Rhamdia quelen*), this species has already successfully introduced in commercial farming. The purpose of this study was to investigate the reproductive processes in the laboratory in order to define better strategies for induced spawning, fertilization rate and embryo-larval development of Siluriformes. The experiment was conducted in fishponds Station studied ichthyology Plant Ney Braga, located in the reservoir of Salto Segredo, PR. In order to evaluate qualitative and quantitative characteristics of semen surubim, *S. melanoderdatum*, used the eleven males weighing between 1.1 and 2.4 kg were subjected to treatment hypophysation. The volume of semen collected from 0.4 to 2.5 mL. Sperm motility after collection has remained between 85 to 292 seconds when activated with water tank, and 66 and 268 seconds when activated with distilled water. For sperm concentration, we found values that ranged between 28 and 88 x10⁶ sperm / mm³. From 0 to 74 hours after fertilization, were performed on 37 samples every two hours for each species. Was observed organogenesis, hatching with closed mouth and anus, formation of the heart, eyes, fins and digestive tract. The larvae of *S. melanoderdatum* and *R. quelen* have similar characteristics during development.

Keywords: fish-farming; reproduction; catfish; *Steindachneridion*, *Rhamdia*, Iguaçu river.

Lista de figuras

FIGURA 1- FOTOGRAFIAS DO LOCAL DE COLETA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS. A) FOTO DA USINA HIDRELÉTRICA DE SALTO SEGREDO, PARANÁ; B) FOTO DA ZONA ALAGADA DA REPRESA DE SALTO SEGREDO, PARANÁ.....	08
FIGURA 2- BAGRES PIMELODÍDEOS ESTUDADOS DA BACIA DO RIO IGUAÇU. A) EXEMPLAR ADULTO DE <i>STEINDACHNERIDION MELANODERMATUM</i> ; B) EXEMPLARES JUVENIS DE SURUBIM DO IGUAÇU, NASCIDOS NA ESTAÇÃO DE PISCICULTURA DA COPEL. C) EXEMPLAR JUVENIL DE JUNDIÁ, <i>RHAMDIS QUELÉN</i>	09
FIGURA 3- FOTOGRAFIAS DO LOCAL DE PESQUISA. A) TANQUES DE ENGORDA DE PEIXES NATIVOS DO RIO IGUAÇU – ESTAÇÃO DE PISCICULTURA DA COPEL; B) DESPESCA DE EXEMPLARES DE SURUBIM DO IGUAÇU, ALOJADOS NOS TANQUES DA ESTAÇÃO	10
FIGURA 4- FOTOGRAFIAS DO LOCAL DE PESQUISA. A) TANQUES INTERNOS PARA ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS SELECIONADOS; B) ANÁLISE MORFOLÓGICA DO GRAU DE MATURAÇÃO DOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA HIPOFISAÇÃO.....	11
FIGURA 5- FOTOGRAFIA VENTRAL PARCIAL DE UM MACHO EM A) E DE UMA FÊMEA EM B) DE <i>S. MELANODERMATUM</i> . DESTAQUE PARA A PAPILA UROGENITAL DESENVOLVIDA, DEMONSTRANDO QUE O ANIMAL ESTÁ EM ELEVADO GRAU DE MATURAÇÃO E PRONTO PARA A DESOVA E COLETA DO SÊMEN	12
FIGURA 6- FOTOMICROGRAFIA DOS ESPERMATOZÓIDES DE SURUBIM DO IGUAÇU, (<i>S. MELANODERMATUM</i>), APÓS O TRATAMENTO DE COLORAÇÃO POR VERDE-MALAQUITA 10%. AVALIAÇÃO QUALITATIVA (FORMA E PADRÃO) DOS ESPERMATOZÓIDES..	13
FIGURA 7- BACIA COM OVOS COLETADOS DE FÊMEA DE SURUBIM DO IGUAÇU, <i>S. MELANODERMATUM</i> , APÓS O MISTURA COM SÊMEN COLETADO DO MACHO. INCUBADORA DE 120 L UTILIZADA PARA A FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DOS OVOS E LARVAS	14
FIGURA 1 (CAPÍTULO I)- FOTOMICROGRAFIA DE ESPERMATOZÓIDES DE SURUBIM, <i>STEINDACHNERIDION MELANODERMATUM</i> AO AUMENTO DE 1000X E MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO. (A) COLORAÇÃO COM FUCSINA ÁCIDA. (B), (C), (D) E (F) COLORAÇÃO COM	

VERDE MALAQUITA. AS SETAS INDICAM ESPERMATOZÓIDE PADRÃO EM (B), CAUDA CURTA EM (C), CAUDA LONGA EM (D) DUPLA CAUDA E CABEÇA OVALADA EM (E) E CABEÇA PEQUENA E AUSÊNCIA DE PEÇA INTERMEDIÁRIA EM (F). A BARRA CORRESPONDE A 50 μ M 28

FIGURA 1 (CAPÍTULO II)- SEQUÊNCIA DE FOTOMICROGRAFIAS DESTACANDO OS PRINCIPAIS EVENTOS DO DESENVOLVIMENTO ONTOGÊNICO DE *STEINDACHNERIDION MELANODERMATUM*, SURUBIM DO IGUAÇU. AUMENTO DE 400X. (A) 0 HPF. (HORAS PÓS-FERTILIZAÇÃO); (B) 12 HPF.; (C) 22 HPF; (D) 36 HPF; (E) 44 HPF; (F) 56 HPF; (G) 64 HPF; (H) 64 HPF; (I) 74 HPF; (J) 74 HPF; (K) 70 HPF; E (L) 70 HPF – CANIBALISMO. BARRA FIG. J = 0,2 CM. BARRA FIG. L = 1 CM 37

FIGURA 2 (CAPÍTULO II)- SEQUÊNCIA DE FOTOMICROGAFIAS DESTACANDO OS PRINCIPAIS EVENTOS DO DESENVOLVIMENTO ONTOGÊNICO DE JUNDIÁ, *RHAMDIA QUELEN*. AUMENTO DE 400X. (A) 0 HPF (HORAS PÓS-FECUNDAÇÃO); (B) 8 HPF; (C) 14 HPF; (D) 24 HPF; (E) 36 HPF; (F) 40 HPF; (G) 48 HPF; (H) 58 HPF; (I) 74 HPF;. BARRA CORRESPONDE À 0,5 CM 41

Lista de tabelas

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE SURUBIM DO IGUAÇU, <i>STEINDACHNERIDION MELANODERMATUM</i> , EM TANQUES DE PISCICULTURA DA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DE ESTUDOS ICTIOLÓGICOS, USINA NEY BRAGA, SALTO SEGREDO, PARANÁ	27
---	----

Lista de anexos

ANEXO 1. PARECER 02/2008 (PROTOCOLO 04509/08) DA SUBCOMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.....	56
ANEXO 2. LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO EMITIDA PELO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA (PROC. NO. 15115-1).....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
	A BACIA DO RIO IGUAÇU E SUA DIVERSIDADE ICTIOLÓGICA	01
1.2	O GÊNERO <i>STEINDACHNERIDION</i> , SUA DIVERSIDADE, POTENCIAL PARA A PISCICULTURA E CONSERVAÇÃO	02
1.3	<i>RHAMDIA QUELEN</i> : UM BAGRE EM DESTAQUE NA BACIA DO RIO IGUAÇU	03
1.4	CÉLULAS ESPERMÁTICAS E SUA IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO	03
1.5	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	05
2	OBJETIVOS	07
3	MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1	CARACTERIZAÇÃO	08
3.2	METODOLOGIAS	10
3.2.1	<i>Reprodução induzida</i>	10
3.2.2	<i>Variáveis quantitativas de células espermáticas</i>	11
3.2.3	<i>Variáveis qualitativas de células espermáticas</i>	12
3.2.4	<i>Caracterização de fases do desenvolvimento ontogenético</i>	13
4	RESULTADOS.....	15
4.1	CAPÍTULO 1 – VARIÁVEIS QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS DO SÊMEN DO SURUBIM DO IGUAÇU (<i>STEINDACHNERIDION MELANODERMATUM</i> GARAVELLO, 2005).....	16
4.2	CAPÍTULO 2 – BIOLOGIA COMPARADA DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DO SURUBIM DO IGUAÇU (<i>STEINDACHNERIDION MELANODERMATUM</i> GARAVELLO, 2005) E DO JUNDIÁ (<i>RHAMDIA QUELEN</i>)	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7	ANEXOS	56
7.1	ANEXO I	56
7.2	ANEXO II	57

1 Introdução

1.1 A bacia do rio Iguaçu e sua diversidade ictiológica

A fauna de peixes neotropicais é a mais rica em espécies conhecidas dentre todas as regiões zoogeográficas (MATTHEWS, 1998; LOWE-McCONNELL, 1999). As razões para esta pronunciada diversidade são comumente atribuídas a eventos históricos e ecológicos ao longo de milhões de anos de evolução desde a separação de Gondwana até o presente. A ictiofauna da América do Sul é a mais rica e diversa do mundo, com uma expectativa de mais de 8000 espécies (SCHAEFER, 1998). Muito desta fauna ainda é pouco conhecida em diferentes aspectos da sua biologia. Dentre a ictiofauna neotropical destacam-se os pimelodídeos, geralmente espécies de grande porte e muito afetados no seu ambiente natural pelas atividades antrópicas (AGOSTINHO e ZALEWSKI, 1996).

A bacia hidrográfica do Rio Iguaçu é o maior complexo hídrico do estado do Paraná, ocupando área de 55.024 km² (SUDERHSA, 1995). É caracterizada pelo seu elevado grau de endemismo, estimado em 75% (ZAWADZKI et al., 1999) e por ser possuidora de um pequeno número de espécies de peixes quando comparada a outros rios da Bacia do Rio Paraná (JULIO Jr. et al., 1997).

O rio Iguaçu é um afluente do rio Paraná e também o maior rio do estado do Paraná, Brasil. O curso do rio segue o sentido geral leste/oeste com algumas partes servindo de divisa natural entre o Paraná e Santa Catarina, bem como em certo trecho do seu baixo curso faz a fronteira entre o Brasil e Argentina (província de Misiones). Os desníveis que originaram as quedas d'água, fizeram este rio ser um dos maiores rios brasileiros na contribuição da geração de energia elétrica. Existem no seu percurso cinco represas para aproveitamento hidroelétrico.

Atualmente, 84 espécies de Teleostei foram descritas para esta bacia (INGENITO et al., 2004), incluindo espécies de grande porte e valor comercial com

potencial para a piscicultura, tendo como destaques, representantes da ordem Siluriforme.

1.2 O gênero *Steindachneridion*, sua diversidade, potencial para a piscicultura e conservação.

A família Pimelodidae é a mais diversificada entre os siluriformes neotropicais, com aproximadamente 300 espécies em 50 a 60 gêneros (MEES, 1974).

O gênero *Steindachneridion* pertence a família Pimelodidae e possui distribuição restrita aos rios de algumas bacias da América do Sul. Em registro, existem cinco espécies que compreendem este gênero, sendo uma característica comum o endemismo regional. Podemos destacar assim, *Steindachneridion scripta* dos rios Paraná e Uruguai; *Steindachneridion doceanum*, do rio Doce; *Steindachneridion parahybae* do rio Paraíba; *Steindachneridion amblyurum* do rio Jequitinhonha; e *Steindachneridion melanoderdatum* do rio Iguaçu (GARAVELLO, 2005).

O surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*), espécie reconhecida originariamente por GARAVELLO (1991) como *Steindachneridion* sp., confirmada por SEVERI e CORDEIRO (1994) e recentemente nomeada por GARAVELLO (2005), assim como outros siluriformes, apresenta características que vêm despertando grande interesse zootécnico, entre elas: ótima qualidade de carne, ausência de espinhos intramusculares, bom rendimento de carcaça e, ainda, por exemplares selvagens com ótima adaptação ao cativeiro e à dietas artificiais. Porém, a região de ocorrência desta espécie na bacia do rio Iguaçu encontra-se muito impactada pelos represamentos e pela intensa ocupação antrópica da região, colocando a espécie em risco de extinção.

NAKATANI et al. (2001) citaram que existem poucos estudos sobre a biologia do *Steindachneridion*, principalmente na fase inicial de desenvolvimento. Para evitar a extinção da espécie, são necessárias ações de preservação ambiental (AGOSTINHO et al., 2002b). Para a produção de jovens, é importante o conhecimento de seu desenvolvimento, pois a espécie apresenta bons resultados em criação experimental (FEIDEN et al. 2001a, b). LUDWIG et al. (2005), citaram que com tecnologias de reprodução em cativeiro, possibilita-se a conservação e reposição dos estoques no ambiente natural.

1.3 *Rhamdia quelen*: um bagre em destaque na bacia do rio Iguaçu

Outro representante dos Siluriformes, com ampla representação no rio Iguaçu é o jundiá, *Rhamdia quelen*. Esta espécie é encontrada desde o centro da Argentina até o sul do México, e seu cultivo está aumentando no sul do Brasil. A *R. quelen* pode atingir 50cm de comprimento e 3 Kg de peso, possui hábito noturno e habita locais calmos e profundos dos rios. Esse peixe é onívoro, com tendência piscívora e sua maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida apresentando dois picos reprodutivos por ano, um na primavera e outro no verão, e desova múltipla (DE CARVALHO GOMES et al., 2000).

Segundo FERREIRA (2000), a criação do jundiá, vem crescendo no sul do Brasil em função de seu aparente potencial de crescimento no inverno, apresentando rusticidade e aclimação às baixas temperaturas.

1.4 Células espermáticas e sua importância para a conservação

A preservação de gametas é considerada uma importante ferramenta para laboratórios de produção de alevinos, implicando em economia na manutenção dos reprodutores e prevenção de perdas de linhagens geneticamente melhoradas. Permite

ainda, facilidade no transporte de material genético entre laboratórios, dentro e fora do país e maior cuidado na prevenção de transmissão de doenças, viabilizando a introdução de novas linhagens com risco mínimo de patógenos em peixes cultivados (TIERSCH, 1995).

BILLARD e COSSON (1992) observaram que amostras de sêmen coletadas no início e ao final da época de reprodução, geralmente não são de boa qualidade. A causa da baixa qualidade no início não é conhecida, entretanto, ao final da época de reprodução, pode estar relacionada ao envelhecimento dos espermatozóides nos testículos, consequentemente diminuindo a viabilidade espermática.

TOTH et al. (1997) e LAHNSTEINER (2000), ressaltaram a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozóides, para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas.

O sêmen é composto pelo líquido seminal e pelos espermatozóides. Entretanto, a concentração dos componentes do líquido seminal pode variar de indivíduo para indivíduo, dentro de uma espécie. A sua função é proporcionar um ótimo ambiente para o armazenamento dos espermatozóides dentro e fora dos testículos (CIERESZKO et al, 2000).

A caracterização de células espermáticas é de grande relevância, portanto para o manejo reprodutivo e para a conservação das espécies, contudo, dada a variabilidade interindividual e sazonal em algumas espécies, destaca-se a importância em se obter parâmetros quantitativos e qualitativos para uma melhor caracterização em relação a fertilidade e sanidade.

1.5 Desenvolvimento embrionário

A ontogenia inicial em peixes se caracteriza por uma série de importantes mudanças na estrutura e função dos principais sistemas orgânicos, reflexo da rápida evolução morfológica, fisiológica e de hábitos e comportamentos, pelas quais atravessam embriões e larvas de peixes durante seu desenvolvimento inicial (OSSE et al., 1997).

NAKATANI et al. (2001) destacam que existem poucos estudos sobre a biologia do gênero *Steindachneridion*, principalmente na fase inicial de desenvolvimento.

A organogênese inicial vem sendo estudada para compreender a biologia do desenvolvimento de espécies, além de auxiliar nos estudos sistemáticos e taxonômicos, auxiliando na identificação de amostras obtidas de ictioplâncton (NAKATANI et al., 2001).

O estudo do desenvolvimento inicial em peixes é, da mesma maneira, uma ferramenta fundamental nos sistemas de produção de jovens para criação, fornecendo informações definitivas para os processos de incubação, larvicultura e produção de juvenis.

Pouco se conhece a cerca da biologia do desenvolvimento de peixes neotropicias, especialmente bagres da família Pimelodide. Os bagres do gênero *Rhamdia* estão entre os peixes nativos neotropicais melhores caracterizados em sua biologia reprodutiva. Dos *Steindachneridion*, apenas *S. scriptum* do rio Uruguai, foi caracterizado em suas fases do desenvolvimento embrionário e larval.

Aspectos particulares da espécie no desenvolvimento ontogenético, podem ser relacionados a capacidade de sobrevivência, por exemplo, com destaque para fases em que ocorrem terminação do sistema digestório e a retração do saco vitelínico. Isto indica que o animal passa a buscar alimento quer seja em ambiente de cultivo ou na

natureza, a fim de promover o desenvolvimento estrutural. Entender estas fases deve garantir sobrevivência principalmente em ambientes de cultivo.

2. Objetivos

Com o objetivo de investigar os processos reprodutivos em laboratório a fim de definir melhores estratégias de reprodução induzida, biologia reprodutiva, taxa de fecundação, desenvolvimento embrio-larval e conservação de material genético de Siluriformes, foram utilizadas duas espécies de peixes de couro, o surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) e o jundiá (*Rhamdia quelen*) de ocorrência na bacia do rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Assim, foram determinadas variáveis biológicas para a evolução e conservação das espécies.

Este trabalho teve como objetivo:

1. Determinar a viabilidade espermática de *Steindachneridion melanodermatum*;
2. Comparar a eficiência de diferentes corantes para coloração de espermatozóides do surubim do Iguaçu;
3. Comparar a eficiência de diferentes substâncias ativadoras para análise de motilidade de espermatozóides do surubim do Iguaçu;
4. Descrever e demonstrar comparativamente as fases do desenvolvimento ontogênico do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) e do jundiá (*Rhamdia quelen*);
5. Comparar estrutural e evolutivamente as variáveis reprodutivas obtidas com dados da literatura para outros Siluriformes e entre as espécies estudadas.

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização do local do experimento

O trabalho foi realizado, em sua fase de indução e reprodução artificial das espécies, na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos (EEEI) da Usina Ney Braga, Companhia Paranaense de Energia Elétrica (COPEL), localizada na Represa de Salto Segredo, Paraná (Figura 1). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.



Figura 1. Fotografias do local de coleta das espécies estudadas. a) Foto da Usina Hidrelétrica de Salto Segredo, Paraná; b) Foto da zona alagada da Represa de Salto Segredo, Paraná.

Em janeiro de 2008, foram selecionados peixes pertencentes à ordem dos Siluriformes e a família Pimelodidae sendo, 11 reprodutores de *Steindachneridion melanoderdatum* (Figura 2a, b), com peso médio de 2,345 kg e 8 de *Rhamdia quelen*, com peso médio de 0,897 kg (Figura 2c) do Iguaçu, pertencentes ao plantel de reprodutores provenientes do rio Iguaçu (Salto Caxias), com idade de 1 a 3 anos. Os peixes permanecem em tanques da Estação (Figura 3a) para fins de reprodução induzida e repovoamento na mesma bacia hidrográfica. A escolha de janeiro de 2008 para execução dos trabalhos de reprodução induzida, deve-se ao histórico de resultados apresentado pelo laboratório de reprodução de peixes da COPEL, que

anualmente realiza as reproduções das espécies reofílicas entre os meses de novembro e fevereiro.

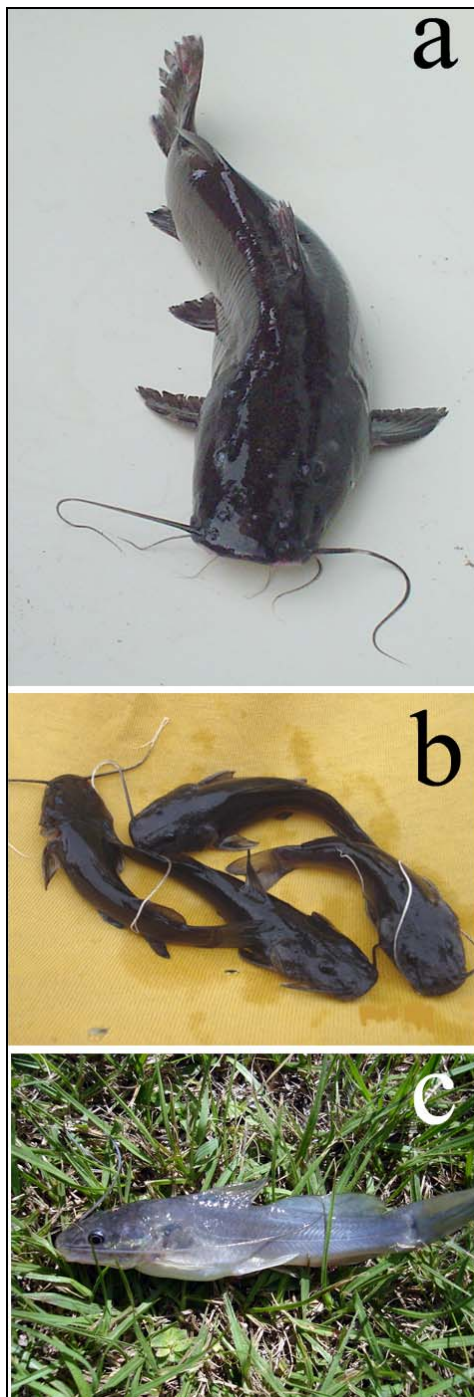


Figura 2. Bagres pimelodídeos da bacia do rio Iguaçu. a) Exemplar adulto de *Steindachneridion melanodermatum*; b) Exemplos jovens de surubim do Iguaçu, da estação de piscicultura da COPEL. c) Exemplar jovem de jundiá, *Rhamdia quelen*.



Figura 3. Fotografias do local de pesquisa. a) Tanques de engorda de peixes nativos do rio Iguaçu – Estação de piscicultura da COPEL; b) Despesca de exemplares de surubim do Iguaçu, alojados nos tanques da estação.

3.2 Metodologias

3.2.1 Reprodução induzida

Depois de capturados e selecionados (Figura 3b), os reprodutores foram transferidos para tanques internos (Figura 4a), e mantidos com aeração artificial e renovação de água constante. Os animais foram analisados, pesados e submetidos ao tratamento de hipofisacção (Figura 4b). As fêmeas receberam através de injeção intramuscular, uma dose prévia de 0,25 mg de extrato de pituitária de carpa (EPC)/kg, 24 horas antes da principal aplicação, conforme proposto por ZANIBONI FILHO e BARBOSA (1991) e adaptado para *Steindachneridon melanodermatum* por LUDWIG et al. (2005). O tratamento hormonal foi composto por duas aplicações intramusculares, com intervalo de 12 horas, nas concentrações de 0,4 e 4 mg EPC/kg para fêmeas. Os machos receberam apenas uma dose durante a segunda aplicação nas fêmeas, tendo o valor próximo à 25% valor total para as fêmeas. Este procedimento foi realizado para surubim do Iguaçu e jundiá.



Figura 4. Fotografias do local de pesquisa. a) Tanques internos para acondicionamento dos animais selecionados; b) Análise morfológica do grau de maturação dos animais selecionados para hipofiseação.

3.2.2 Variáveis quantitativas de células espermáticas

Após 180 horas-grau da segunda dose, deu-se início à coleta de sêmen. Os machos foram retirados dos tanques e secos na região da papila urogenital (Figura 5a), sendo posteriormente realizada massagem ventral no sentido ântero-posterior. Todo o sêmen liberado de cada reprodutor foi coletado em tubo tipo Falcon graduado, para a conservação das amostras. Foram utilizadas micro-pipetas (100 μ L) para a determinação de volume na coleta para as análises. A avaliação do tempo de motilidade do sêmen foi realizada com a utilização de duas soluções ativadoras: água do tanque e água destilada. Para isso, 300 μ L de sêmen foram misturados a 300 μ L de solução ativadora, observando-se sob microscopia óptica de campo claro a formação de nuvens de espermatozóides. A determinação do tempo de motilidade, foi observado o momento (tempo em segundos) em que as nuvens de espermatozóides cessaram os movimentos. Este procedimento foi repetido cinco vezes para cada amostra segundo LUZ et al. (2001) com modificações em relação aos diluentes. O valor médio obtido representou a motilidade do sêmen nos distintos ativadores.

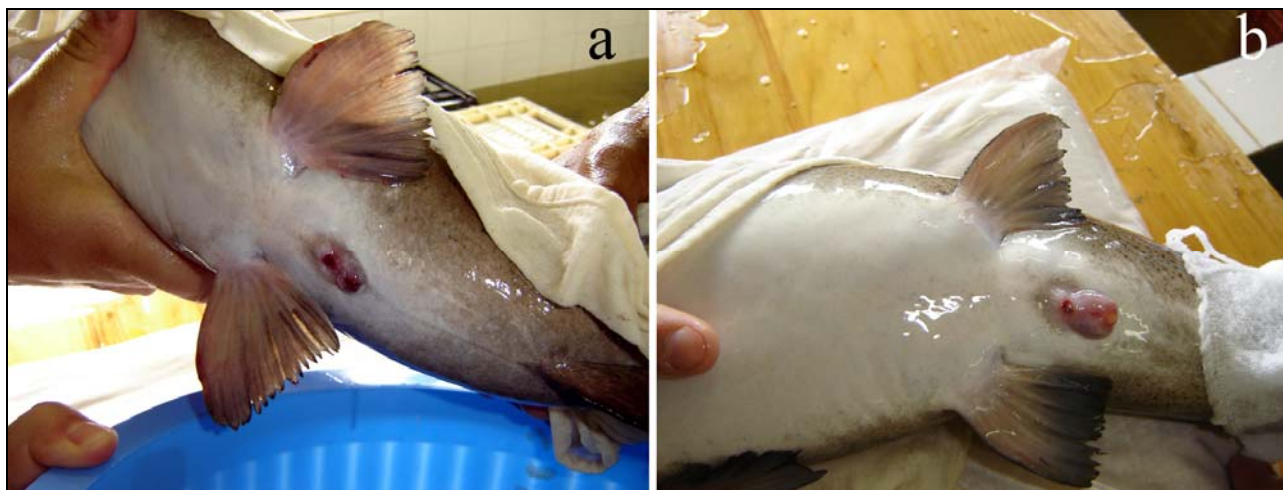


Figura 5. Fotografia ventral parcial de um macho em a) e de uma fêmea em b) de *S. melanodermatum*. Destaque para a papila urogenital desenvolvida, demonstrando que o animal está em elevado grau de maturação e pronto para a desova e coleta do sêmen.

Para a determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído na proporção de 1:7000 em solução formol-salina 9% (BEDORE, 1999) e realizada a contagem em câmara hematómica de Neubauer.

3.2.3 Variáveis qualitativas de células espermáticas

Para a análise das células espermáticas, seguiu-se método de coloração de espermatozoides humanos, mediante protocolo fornecido pelo Laboratório de Análises Clínicas de Ponta Grossa (CLINIPON), onde primeiramente se fez a fixação do sêmen diluído em uma lâmina em temperatura ambiente, e após a amostra encontrar-se seca, utilizou-se coloração com solução verde-malaquita 10%. Por cerca de 2 minutos a amostra permaneceu em contato com a solução corante, e posteriormente a lâmina foi lavada com água corrente.

Este método possibilitou a avaliação da forma dos espermatozoides, juntamente com a análise qualitativa das amostras de sêmen em microscópio óptico (Figura 6).



Figura 6. Fotomicrografia dos espermatozóides de surubim do Iguaçu, (*S. melanoderdatum*), após o tratamento de coloração por verde-malaquita 10%. Avaliação qualitativa (forma e padrão) dos espermatozóides.

3.2.4 Caracterização de fases do desenvolvimento ontogenético

Os ovos foram coletados através de extrusão com massagem ventre-genital, após o tratamento com hipófise, e foram mantidos em bacias para receberem a dose de sêmen extraída do macho, também extraído por massagem ventre-genital. Após a mistura e ativação dos gametas usando água do tanque com temperatura $25 \pm 1^\circ \text{C}$, os ovócitos em desenvolvimento foram transferidos para incubadoras de 120 L com fluxo constante e temperatura média de $27 \pm 0,5^\circ \text{C}$ (Figura 7).



Figura 7. Bacia com ovos coletados de fêmea de surubim do Iguçu, *S. melanodermatum*, após o mistura com sêmen coletado do macho. Incubadora de 120 L utilizada para a fecundação e desenvolvimento dos ovos e larvas.

Posteriormente, duas horas após a fertilização, iniciou-se o processo de coleta de amostras de ovos e larvas. Em intervalos de duas horas, foram coletadas amostras entre 0 a 74 horas após fertilização, resultando em 37 coletas. Em cada intervalo de tempo foram coletados 5 exemplares imediatamente fixados em solução de formaldeído 10% tamponado (pH 7.4). Após 24 horas, as amostras foram lavadas e preservadas em solução alcoólica (70%).

A eclosão da maioria das larvas (90%) ocorreu às 32 h pós-fertilização e foram transferidas para um sistema de tanque com condições controladas (temperatura $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, pH 7 ± 0.25 , oxigênio dissolvido $> 6 \text{ mg/L}$, amônia $< 0.1 \text{ mg/L}$).

Os ovos e larvas fixados foram analisados em um microscópio Olympus modelo BX-41 e microscópio estereoscópico Leica com captura digital de imagem com câmera CCD 13mp e fotográfica digital 5.1mp, respectivamente.

4. Resultados

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

4.1 Capítulo I

Variáveis quantitativas e qualitativas do sêmen do surubim do Iguaçu, (*Steindachneridion melanoderdatum* Garavello, 2005).

4.2 Capítulo II

Biologia comparada do desenvolvimento ontogenético do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum* Garavello, 2005) e do jundiá (*Rhamdia quelen*).

4.1 Capítulo I

Variáveis quantitativas e qualitativas do sêmen do surubim do Iguaçu, (*Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005).

Resumo

O experimento foi realizado em tanques de piscicultura da Estação de Estudos Ictiológicos da Usina Ney Braga, localizada na represa de Salto Segredo, PR, com o objetivo de avaliar características qualitativas e quantitativas do sêmen de surubim (*Steindachneridion melanodermatum*). Para as análises, utilizaram-se onze machos com peso entre 1,1 e 2,4 kg, submetidos ao tratamento de hipofisacção. O volume de sêmen coletado variou de 0,4 a 2,5 ml. A motilidade dos espermatozóides após a coleta manteve-se entre 85 a 292 segundos, na ativação com água do tanque, e de 66 e 268 segundos, na ativação com água destilada. Para a concentração espermática, os valores oscilaram entre 28 e 88 x 10⁶ espermatozóides/mm³. O surubim do Iguaçu é um peixe que pode ser considerado de fácil liberação de sêmen mediante estímulo hormonal, desta forma apresentando vantagens para a piscicultura comercial.

Palavras-chave: reprodução, sêmen, motilidade espermática, concentração espermática, rio Iguaçu.

Introdução

O Rio Iguaçu, um dos grandes tributários da margem esquerda do Rio Paraná (JULIO Jr. et al., 1997), é caracterizado pelo seu elevado grau de endemismo, estimado em 75% (ZAWADZKI et al., 1999) e por possuir um pequeno número de espécies de peixes quando comparada a outros rios da Bacia do Rio Paraná (JULIO Jr. et al., 1997).

Nesta bacia são encontradas espécies de grande porte e valor comercial agregado, tendo como destaques, representantes da ordem Siluriforme com elevado potencial para a piscicultura.

O gênero *Steindachneridion* pertence à ordem dos Siluriformes e possui distribuição restrita aos rios de algumas bacias da América do Sul. Em registro, existem cinco espécies que compreendem este gênero, sendo uma característica comum o endemismo regional. Podemos destacar assim, *Steindachneridion scriptum* e *Steindachneridion punctatum* dos rios Paraná e Uruguai; *Steindachneridion doceanum*, do rio Doce; *Steindachneridion parahybae* do rio Paraíba; *Steindachneridion amblyurum* do rio Jequitinhonha; e *Steindachneridion melanoderdatum* do rio Iguaçu (BURGUESS, 1989; LUNDBERG e LITTMANN, 2003).

O surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*), espécie descrita originalmente por GARAVELLO (1991) como *Steindachneridion* sp., confirmada por SEVERI e CORDEIRO (1994) e recentemente nomeada por GARAVELLO (2005), assim como outros siluriformes, apresenta características que vêm despertando grande interesse ao cultivo, dentre elas: ótima qualidade de carne, ausência de espinhos intramusculares, bom rendimento de carcaça e ótima adaptação ao cativeiro e boa aceitação a dietas artificiais. Porém, a

região de ocorrência desta espécie na bacia do Rio Iguaçu, encontra-se muito impactada pelos barramentos e pela intensa ocupação antrópica da região, o que coloca a espécie em risco de extinção (ROSA e LIMA, 2008). AGOSTINHO E ZALEWSKI (1996) afirmam que os represamentos e a destruição de ambientes utilizados na reprodução e no desenvolvimento de juvenis contribuem para a depleção dos estoques naturais.

A busca do conhecimento das particularidades reprodutivas para a produção de espécies nativas se faz importante, tanto para atenuar a redução dos estoques naturais, através de programas de repovoamento, como para viabilização da produção em cativeiro, buscando produzir alimento de alta qualidade.

Para uma fertilização eficiente, a qualidade do sêmen, além de outros fatores, como a água utilizada no processo de fertilização, é de vital importância. Estudos que avaliam as características seminais de espécies de peixes sul-americanos, como *Piaractus mesopotamicus* (SILVEIRA et al., 1990), *Prochilodus lineatus* (KAVAMOTO et al., 1997), *Steindachneridion scripta* (LUZ et al., 2001), *Brycon opalinus* (NARAHARA et al., 2002), *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2002) e *Brycon siebenthalae* (CRUZ-CASALLAS et al., 2005), têm sido conduzidos nos últimos anos, afim de se conhecer o real potencial de cada espécie para a piscicultura.

Os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes, frequentemente, tomam por base exames de motilidade, concentração espermática e percentagem de espermatozóides vivos e mortos (KAVAMOTO et al., 1985). Poucas são as iniciativas em se determinar aspectos da sanidade

morfológica de células espermáticas em peixes, especialmente em peixes neotropicais.

Para SALISBURY e VANDEMARK (1964), o estudo do sêmen através da determinação do volume coletado, da motilidade e concentração de espermatozóides, servem de base para a diluição do material fecundante e medem a capacidade de produção do sêmen de cada reprodutor.

Com isso, o estudo das características espermáticas, qualitativas e quantitativas, é importante e constitui o foco principal deste trabalho na busca de descrever variáveis reprodutivas para o *S. melanodermatum* com vistas à conservação biológica e aproveitamento para criação comercial desta espécie.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos (EEEI) da Usina Ney Braga, Companhia Paranaense de Energia Elétrica (COPEL), localizada na represa de Salto Segredo, Paraná. Em janeiro de 2008, foram selecionados 11 reprodutores de surubim do Iguaçu (*S. melanodermatum*) com peso médio de 2,345 kg, pertencentes ao plantel de reprodutores provenientes do rio Iguaçu (Salto Caxias), com idade entre 1 à 3 anos. Os animais permanecem em tanques da Estação para fins de reprodução induzida segundo LUDWIG et al. (2005) e repovoamento na mesma bacia hidrográfica.

Depois de capturados e selecionados, os reprodutores foram transferidos para tanques em condição de laboratório, e mantidos com aeração artificial e renovação de água constante. Os animais foram analisados com relação as papilas urogenitais estarem desenvolvidas. Posteriormente foram

pesados e submetidos ao tratamento de hipofiseção. Receberam através de injeção intramuscular, uma dose prévia de 0,25 mg de extrato de pituitária de carpa (EPC)/kg, 24 horas antes da principal aplicação, conforme proposto por ZANIBONI FILHO e BARBOSA (1991) e adaptado para *Steindachneridon melanodermatum* por LUDWIG et al. (2005). O tratamento hormonal foi composto por duas aplicações intramusculares, com intervalo de 12 horas, nas concentrações de 0,4 e 4 mg EPC/kg para fêmeas. Os machos receberam apenas uma dose durante a segunda aplicação nas fêmeas, tendo o valor próximo à 25% valor total para as fêmeas.

Decorridas 180 horas-grau após a segunda dose, deu-se início à coleta de sêmen. Os machos foram retirados dos tanques e secos na região da papila urogenital, sendo posteriormente realizada massagem ventral no sentido ântero-posterior. Todo o sêmen liberado de cada reprodutor foi coletado em tubo tipo Falcon graduado, para a conservação das amostras. Foram utilizadas micro-pipetas (100 µL) para a determinação de volume na coleta para as análises.

A avaliação do tempo de motilidade do sêmen foi feita com a utilização de duas soluções ativadoras: água do tanque e água destilada. Para isso, 300 µL de sêmen foi misturado a 300 µL de solução ativadora, observando-se sob microscopia óptica de campo claro a formação de nuvens de espermatozóides. Para o tempo de motilidade foi observado o momento (tempo em segundos) em que as nuvens de espermatozóides cessaram os movimentos. Este procedimento foi repetido cinco vezes para cada amostra segundo LUZ et al. (2001) com modificações em relação aos diluentes. O valor médio obtido representou a motilidade do sêmen com os distintos ativadores.

Para a determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído na proporção de 1:7000 em solução formol-salina 9% (BEDORE, 1999) e realizada a contagem em câmara hematómica de Neubauer.

Após a colheita do sêmen de cada animal, diluiu-se uma amostra em solução formol-salina tamponada (CBRA, 1998), na proporção de 0,001 mL de sêmen em 1 mL de formol-salina (sêmen/solução, respectivamente). Para confecção das lâminas e coloração com verde malaquita, foi realizado o esfregaço à temperatura ambiente do sêmen/solução, e utilizou-se solução à 10% de verde-malaquita, que permaneceu em contato por 2 minutos. Posteriormente a lâmina foi lavada com água corrente.

Resultados e Discussão

O trabalho evidenciou que machos de surubim do Iguaçu apresentam boa resposta à indução hormonal e fácil liberação de sêmen quando massageados ventralmente, após a indução à desova. Os animais sendo mantidos em cativeiro em boas condições alimentares e de qualidade de água, proporcionam bons resultados (tabela 1).

O volume de sêmen de *S. melanodermatum* coletado foi de 0,4 a 2,5 mL/animal, e não apresentou relação com o peso dos animais. Esse volume não pode ser considerado o volume total do sêmen liberado pelos espécimes, uma vez que o método da extrusão não garante a liberação total do sêmen presente.

Para a extrusão do sêmen devem-se considerar fatores como a idade dos animais, condições ambientais e época de coletas, pois no final do ciclo anual reprodutivo, questões qualitativas e quantitativas do sêmen, diminuem na

comparação ao início do ciclo, relacionado com a possibilidade de reproduções dos animais em outros momentos, antes da pesquisa. De acordo com GODINHO (2000), o volume de sêmen produzido pelos peixes é muito variável, dependendo do tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta.

O volume de sêmen do surubim do Iguaçu foi inferior aos obtidos por LUZ et al. (2001), trabalhando com *Steindachneridion scripta*, onde coletaram entre 4 e 20 mL/animal. KAVAMOTO e FOGLI DA SILVEIRA (1986), estudando machos de *Rhamdia hilarii*, com comprimento médio de 22,9 cm, em condições de campo, encontraram valores de volume de sêmen variando de 0,57 a 1,03 mL. FERREIRA (2000), coletando sêmen de *Rhamdia quelen*, sem indução hormonal, obtiveram volumes entre 0,11 e 1,10 mL/animal. KAVAMATO et al. (1985), trabalhando com truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* coletaram volumes de sêmen que variaram entre de 5,01 e 12,36 mL.

Com relação ao tempo de motilidade dos espermatozóides de surubim do Iguaçu, as análises mostraram-se semelhantes para as ativações com água do tanque, 85 a 292 segundos, e água destilada, 66 e 268 segundos. Foi observado que a presença de sangue não afetou a motilidade do sêmen nas diferentes amostras. Pode-se inferir que os reprodutores se encontravam em diferentes estágios de maturação, devido à ocorrência de sêmen denso, líquido mais homogêneo e pastoso, e sêmen semi-denso, líquido mais heterogêneo e menos pastoso (Tabela 1).

Embora valores de tempo de motilidade possam variar entre as espécies, neste estudo não ocorreu uma tendência de diferença na utilização de água do tanque ou água destilada como ativadores do sêmen de *S. melanoderdatum*.

Os valores de motilidade dos espermatozóides (Tabela 1) foram superiores aos descritos por LUZ *et al.* (2001), com tempo da motilidade do sêmen de *S. scriptum* da bacia do rio Uruguai variou de 46 a 75 segundos em água e de 37 a 56 segundos em solução de bicarbonato de sódio 1%.

Maiores tempos de motilidade podem favorecer a fecundação, pois disponibilizam por maior tempo os espermatozóides ativos, podendo fertilizar uma maior quantidade de ovos. KAVAMATO e FOGLI DA SILVEIRA (1986), trabalhando com jundiá (*Rhamdia hilarii*), encontraram valores de 69 a 180 segundos para motilidade, enquanto (MURGAS *et al.*, 1999), trabalhando com piapara (*Leporinus obtusidens*), encontraram valores de 87 a 480 segundos de motilidade espermática.

Algumas espécies migradoras como o dourado (*Salminus brasiliensis*) podem ter baixa fecundidade. ZANIBONI FILHO *et al.* (1991) observaram valores de motilidade de 35 segundos para o dourado, sugerindo que baixas taxas de fertilização encontradas para esta espécie, podem estar relacionadas a esse baixo tempo de motilidade espermática.

Nas análises de concentração espermática para *S. melanoderdatum* foram encontrados valores que variaram de 28 a 88×10^6 espermatozóides/mm³ (Tabela 1), podendo estes valores ser relacionados ao aspecto visual do sêmen.

O animal 10 (Tabela 1), com concentração de 88×10^6 espermatozóides/mm³, apresentou após a coleta, o sêmen com aspecto aquoso. Este animal merece destaque, pois o tempo de motilidade foi o menor entre as análises (22 e 18 segundos), mas a concentração foi a maior. Podemos relacionar este fato pelo possível contato que o sêmen teve com

urina ou água no momento da coleta. Esta condição provavelmente ativou os espermatozóides já na coleta, diminuindo o tempo restante quando realizada a análise no microscópio para determinação da motilidade.

Além disso, alguns fatores, como: idade, época do ano, condições de cultivo, podem ter influenciado os resultados, segundo GODINHO (2000).

KAVAMATO e FOGLI DA SILVEIRA (1986), trabalhando em condições de campo com *Rhamdia hilarii*, observaram valores médios de $66,53 \times 10^6$ espermatozóides/mm³, enquanto MURGAS et al. (1999), trabalhando com piapara, obtiveram valores de concentração espermática de $6,63$ a $52,25 \times 10^6$ espermatozóides/mm³. LUZ et al. (2001) encontraram concentrações espermáticas entre $19,5$ e $120,15 \times 10^6$ espermatozóides/mm³ para *S. scriptum*. FERREIRA et al. (2001), trabalhando com *Rhamdia quelen*, obtiveram resultados de concentração espermática variando de $24,6 \times 10^6$ a $138,9 \times 10^6$ espermatozóides/mm³.

Estes dados mostram que a concentração espermática apresenta grande variação, tanto dentro da mesma espécie quanto entre espécies diferentes. Desta forma, manter animais em boas condições nutricionais e ambientais, e realizar as coletas em épocas iniciais do período reprodutivo, entre novembro/dezembro, pode garantir bons resultados na coleta de sêmen tanto em questões qualitativas como quantitativas.

Para a análise de variáveis morfológicas dos espermatozóides que interferem na fertilidade tais como: cauda curta, cauda longa, cabeça oval, dupla cauda e cabeça pequena, são primordiais a qualidade da coloração dos espermatozóides e do *back ground* na lâmina.

No presente trabalho, a utilização de verde malaquita para a visualização das células espermáticas, demonstrou ser um excelente corante com capacidade de evidenciar as principais estruturas celulares (cabeça, peça intermediária e cauda). Na Figura 1 pode-se observar a eficiência do corante comparativamente com a fucsina ácida, que é um corante bastante empregado em análises morfológicas de espermatozóides de peixes.

Este novo método facilitou a determinação do padrão morfológico dos espermatozóides de *S. melanoderdatum* e de formas anômalas (figura 1).

A análise da morfologia de células espermáticas ganhou destaque a partir de trabalhos com bovinos com vistas a controlar a incidência de doenças que diminuem a fertilidade frente ao manejo reprodutivo por inseminação artificial (BLOM, 1973).

Em peixes esta forma de abordagem a cerca da fertilidade é bastante restrita. Em peixes neotropicais, KAVAMOTO et al. (1999) evidenciaram uma correlação positiva entre o emprego de gonadotropina coriônica humana em machos de *Prochilodus lineatus* (citado como *P. scrofa*), para a indução a espermição e a frequência de anormalidades morfológicas observadas. Porém neste trabalho não relacionamos o uso de hipófise de carpa com a possibilidade de diminuição da fertilidade por manejo com inseminação artificial, e sim, com as condições de manejo dos animais.

Conclusões

Nas condições deste estudo, observou-se que os machos de surubim do Iguaçu, na época de reprodução, apresentaram fácil liberação de sêmen. Consideram-se as boas condições de manejo utilizadas com os animais

durante o trabalho, como primordiais para o sucesso reprodutivo. Os animais em diferentes estágios de vida e maturação sexual podem proporcionar diferentes resultados na coleta do sêmen. Deve-se ter atenção durante a coleta para evitar contaminação e contato com outros líquidos, evitando a ativação dos espermatozoides. A utilização de água do tanque ou água destilada, como ativadoras espermáticas, não apresentaram diferenças entre si. A motilidade e a morfologia de células espermáticas de surubim do Iguaçu, são importantes ferramentas para o manejo reprodutivo e para a conservação *ex situ*.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-(CNPq) e Fundação Araucária para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 1. Características do sêmen de surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum*, em tanques de piscicultura da Estação Experimental de Estudos Ictiológicos, Usina Ney Braga, Salto Segredo, Paraná.

Peixe	Peso (Kg)	Aspecto do sêmen	Vol. (ml)	Tempo de motilidade (segundos)		Concentração ($\times 10^6$ cél./mm ³)
				Água do tanque	Água destilada	
1	1,8	Denso	0,8	-	-	74,5
2	1,3	Semi-denso	1,2	143	136	28,0
3	1,1	Semi-denso ¹	2,3	85	66	34,7
4	2,3	Semi-denso	0,6	175	142	31,5
5	1,2	Semi-denso	1,0	132	121	39,7
6	1,4	Denso ¹	0,8	211	182	75,5
7	1,7	Semi-denso ¹	1,4	129	127	54,2
8	2,3	Semi-denso	2,5	186	167	44,5
9	1,7	Denso	2,3	292	268	80,2
10	2,2	Aquoso ²	1,4	22	18	88,0
11	2,4	Semi-denso	0,4	169	163	45,7

¹ Amostra contaminada com sangue.

² Amostra possivelmente contaminada com urina e/ou água.

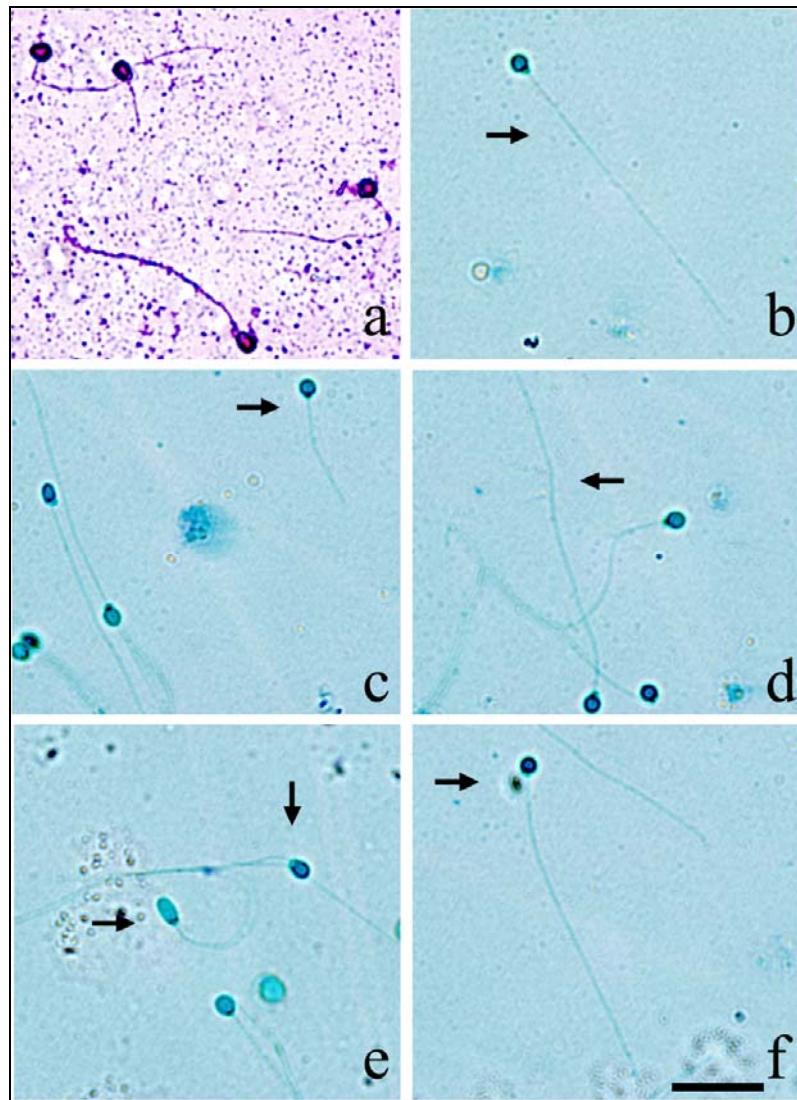


Figura 1. Fotomicrografia de espermatozóides de surubim, *Steindachneridion melanoderdatum* ao aumento de 1000x e microscopia de campo claro. (a) coloração com fucsina ácida. (b), (c), (d) e (f) coloração com verde malaquita. As setas indicam espermatozóide padrão em (b), cauda curta em (c), cauda longa em (d) dupla cauda e cabeça ovalada em (e) e cabeça pequena e ausência de peça intermediária em (f). A barra corresponde a 50µm.

4.2 Capítulo II

Biologia comparada do desenvolvimento ontogenético do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005) e do jundiá (*Rhamdia quelen*).

Resumo

O conhecimento dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de peixes é de extrema importância para o estudo de espécies nativas com potencial para a piscicultura. Este trabalho foi realizado com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento embrionário e conhecer os estágios larvais iniciais do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) comparando com o jundiá (*Rhamdia quelen*). A temperatura média da água do tanque foi $25,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$ para ambas espécies. Para surubim, aproximadamente 12 horas após a fertilização, pode-se perceber a formação do embrião, pólo animal e vitelo, pólo vegetal. A eclosão ocorreu 32 horas pós-fertilização. As larvas recém-eclodidas apresentaram comprimento total médio de $4,56 \pm 0,13$ mm. Os barbilhões começaram a desenvolver com 40 horas pós-fertilização. Decorridas 44 horas pós-fertilização, as larvas apresentaram, sinais de circulação sanguínea, abertura de boca e ânus, e movimentos natatórios horizontais. Com 60 horas pós-fertilização, sinais de alimentação foram visíveis no trato digestório, e o canibalismo foi observado entre as larvas com 70 horas pós-fertilização. Posteriormente comparamos e discutimos no trabalho a relação entre as duas espécies quanto ao desenvolvimento ontogênico.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, estágios larvais, rio Iguaçu.

Introdução

O Brasil possui um grande potencial hídrico, sendo privilegiado pelas muitas espécies de peixes ainda pouco exploradas e com potencial zootécnico não conhecido. Segundo PEZZATO (1997), o sucesso da aquicultura nacional está associado ao conhecimento das características morfo-fisiológicas e comportamentais das espécies. PINTO e CASTAGNOLLI (1984) afirmaram que o estudo dos primeiros dias de vida dos peixes é muito importante, especialmente de espécies selvagens, potencialmente viáveis para a piscicultura.

Com relação ao grande número de espécies nativas brasileiras, pouco se conhece sobre o desenvolvimento embrionário. 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 relacionadas aos fatores ambientais nas incubadoras, as quais poderão acarretar má-formações larvais e baixas produtividades (ALVES e MOURA, 1992).

O estudo do desenvolvimento inicial em peixes é, da mesma maneira, uma ferramenta fundamental nos sistemas de produção de jovens para cultivo, tanto de espécies de consumo quanto nas do tipo ornamental, pois fornecem informações definitivas para os processos de incubação, larvicultura e produção de juvenis. Além de dar condições para viabilizar estudos de conservação e reposição dos estoques naturais.

O surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*), espécie descrita originalmente por GARAVELLO (1991) como *Steindachneridion* sp., confirmada por SEVERI e CORDEIRO (1994) e recentemente nomeada por GARAVELLO (2005), assim como outros siluriformes, apresenta características que vêm despertando grande interesse ao cultivo, dentre elas: ótima qualidade de carne, ausência de espinhos intramusculares, bom rendimento de carcaça e ótima adaptação ao cativeiro e boa aceitação a dietas artificiais.

O surubim (*S. melanodermatum*) é um peixe reofílico (migrador) em pelo menos uma das fases da vida (AGOSTINHO et al., 1997). Os surubins do gênero *Steindachneridion* são grandes bagres pimelodídeos de hábito carnívoro de interesse para a pesca e para a piscicultura (ZANIBONI-FILHO et al., 2004).

Assim, este trabalho tem como objetivo descrever o desenvolvimento embrionário e larval do surubim do Iguaçu comparado ao jundiá, peixe este que pertence à piscicultura comercial. Relacionar variáveis de criação entre as duas espécies de peixes de couro, pode favorecer a introdução do surubim do Iguaçu na piscicultura comercial.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos (EEEI) da Usina Ney Braga, Companhia Paranaense de Energia Elétrica (COPEL), localizada na represa de Salto Segredo, Paraná. Em novembro de 2008, foram selecionados 10 casais reprodutores de surubim do Iguaçu (*S. melanodermatum*), pertencentes ao plantel de reprodutores provenientes do rio Iguaçu (Salto Caxias), alocados em viveiros da Estação para fins de

reprodução induzida segundo LUDWIG et al. (2005) e repovoamento na mesma bacia hidrográfica.

Depois de capturados e selecionados, um casal de reprodutores foi transferido para tanque interno, e mantido com aeração artificial e renovação de água constante. Os animais foram analisados, pesados e submetidos ao tratamento de hipofisacção.

Foi escolhida uma fêmea de 3.150 gramas que apresentava ventre abaulado e papila genital intumescida, e selecionado um macho de 1.950 gramas, por apresentar papila genital intumescida. Os exemplares receberam por injeção intramuscular, uma dose prévia de 0,25 mg de extrato de pituitária de carpa/kg, 24 horas antes da principal aplicação, conforme proposto por ZANIBONI FILHO e BARBOSA (1991) e adaptado para *Steindachneridon melanodermatum* por LUDWIG et al. (2005). Posteriormente, o tratamento hormonal da fêmea foi composto por duas aplicações intramusculares, com intervalo de 12 horas, nas concentrações de 0,4 e 4 mg de extrato pituitário de carpas (EPC)/kg. O macho recebeu no momento da segunda aplicação da fêmea 0,9 mg EPC/kg, recebendo 25% da dosagem da fêmea, devido ao tamanho e protocolo sugerido por LUDWIG et al. (2005).

Oito horas após a segunda dose (200 horas/grau), os ovócitos da fêmea foram coletados por extrusão com massagem ventre-genital e mantidos em bacias para receberem a dose de sêmen extraída do macho, também extraído através de massagem ventre-genital. Após a mistura e ativação dos gametas usando água do tanque com temperatura $25 \pm 1^\circ \text{C}$, os ovócitos em desenvolvimento foram transferidos para incubadoras de 120 L com fluxo constante e temperatura média de $27 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Na entrada de água da incubadora foi montado um sistema de aeração artificial com pedra porosa, protegido com uma tela de 0,5 mm para evitar a perda de ovos e o contato da pedra porosa com os mesmos. O fluxo de ar foi regulado de modo a garantir a movimentação constante dos ovos, evitando que estes se depositassem no fundo da incubadora, podendo provocar a queda da taxa de fecundação.

Posteriormente, duas horas após a fertilização, iniciou-se o processo de coleta de amostras de ovos e larvas. Em intervalos de duas horas, foram coletadas amostras no espaço entre 0 a 74 horas pós fertilização, resultando em 37 coletas. Em cada intervalo de tempo foram coletados 5 exemplares imediatamente fixados em solução de formaldeído 10% tamponado (pH 7.4). Após 24 h, as amostras foram lavadas e preservadas em solução alcoólica (70%).

A determinação da taxa de fertilização foi feita nove horas após a fertilização, segundo ZANIBONI FILHO e BARBOSA (1992), através da amostragem de 260 ovos da incubadora e contagem direta dos ovos fertilizados com o auxílio de estereomicroscópio (10x).

Para a descrição do desenvolvimento embrionário e dos estágios larvais iniciais, foi adotada a terminologia descrita por WOYNAROVICH e HORVÁTH (1983), que consideram:

- “ovo” o período decorrente do momento da fertilização até a eclosão;
- “larva” o período seguinte à eclosão até o início da alimentação exógena e
- “pós-larva” o período em se que inicia alimentação exógena, até cerca de dez dias após o início da alimentação (pós-larva avançada).

Os ovos e larvas fixados foram analisados em um microscópio Olympus modelo BX-41 e microscópio-estereoscópico Leica com captura digital de imagem via câmera CCD 13mp e fotográfica digital 5.1mp, respectivamente.

Resultados e Discussão

A concentração de oxigênio dissolvido na água de incubação foi de $6 \pm 0,2$ mg/L, com o pH de $7 \pm 0,25$. Os valores de nitrito não ultrapassaram níveis de 0,01 mg/L. A amônia atingiu o valor máximo de 0,1 mg/L. A alcalinidade e a dureza da água na fase de incubação foram de 30 mg/L e 40 mg/L, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos da água demonstraram-se ideais para se obter boas condições de criação de peixes neotropicais.

No momento da desova, os ovócitos mostraram coloração amarela clara. A taxa de fertilização dos ovos de surubim do Iguaçu utilizados neste trabalho foi de 90%.

Segundo HUET (1978), as transformações ocorridas no desenvolvimento inicial das larvas variam de acordo com a espécie, sendo este desenvolvimento influenciado por vários fatores, dentre eles, principalmente a temperatura e a disponibilidade de alimento. Nos primeiros dias de vida, as larvas alimentam-se das reservas nutritivas contidas no saco vitelino, sendo que o tempo para a reabsorção deste está diretamente relacionado com o tamanho e a temperatura. Portanto, a temperatura é de grande importância para o desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento embrionário e os estágios larvais do surubim do Iguaçu apresentaram a seguinte seqüência de eventos, quando incubados à temperatura de $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$:

- a) As fases de morfogênese e organogênese foram verificadas já na primeira coleta pós-fertilização (Figura 1a);
- b) Após 12 horas pós-fertilização, observou-se a segmentação do pólo animal, e a diferenciação do embrião, ou chamada de fase da larva saco vitelina (Figura 1b);
- c) Com 22 horas pós-fertilização a cauda do embrião é observada totalmente livre do saco vitelino (em flexão), porém ainda coberto por uma membrana (Figura 1c);
- d) Com 36 horas pós-fertilização e recém eclosão da larva, foi visualizada notocorda e somitos. Também é possível perceber pigmentação dos olhos. Esta fase é nomeada de pós-flexão (Figura 1d);
- e) Seguidas 44 horas pós-fertilização notou-se formação do trato digestório, formação de barbilhões, diminuição do saco vitelino, juntamente com abertura da boca. Nesta mesma fase, pode-se destacar sinais de circulação sanguínea e movimentos natatórios horizontais (Figura 1e);
- f) Com 56 horas pós-fertilização pode-se perceber o trato digestório completo, com ânus e boca abertos (Figura 1f);
- g) Com 64 horas pós-fertilização pode-se perceber o coração já bem formado, evidenciando a circulação sanguínea no embrião (Figura 1g);
- h) No mesmo momento, 64 horas pós-fertilização, destaca-se os barbilhões bem formados, estruturas sensoriais usadas para identificação mecânico-química, usadas para busca de alimento, já que bagres possuem hábito noturno (Figura 1h);

i) Transcorridas 74 horas pós-fertilização, a larva já demonstra sinais de alimentação exógena, ou seja, externa, dentro do trato digestório (Figura 1i);

j) Finalizando as 74 horas pós-fertilização, podemos destacar também sinais de pigmentação por todo o corpo (Figura 1j);

Entre 70 horas pós-fertilização foram observados sinais de canibalismo (Figuras 1k / 1l). Porém como a abertura de boca foi destacada por volta da 60 horas pós-fertilização, sabe-se que a alimentação exógena existe a partir desta fase.

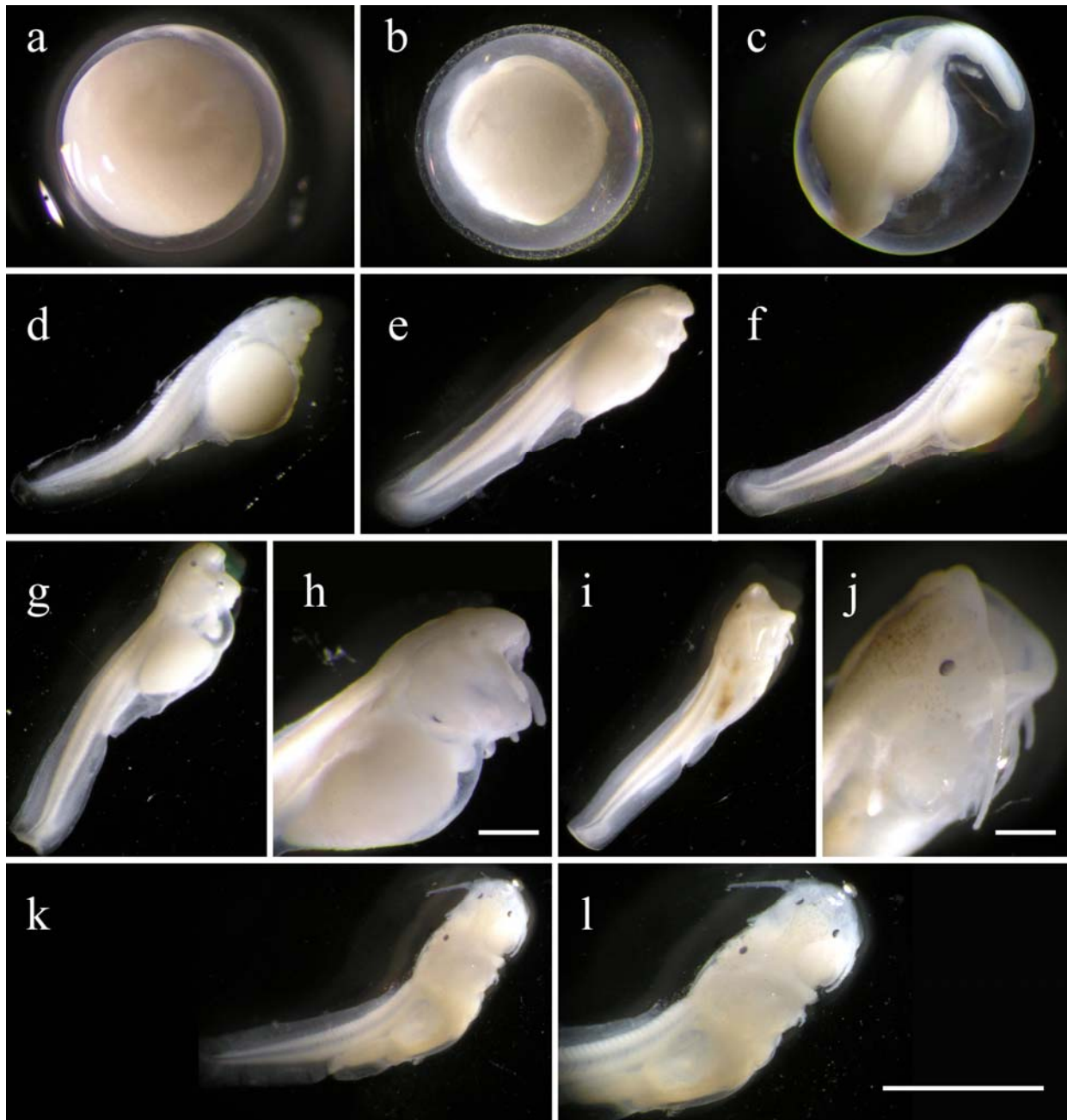


Figura 1. Seqüência de fotomicrografias destacando os principais eventos do desenvolvimento ontogênico de *Steindachneridion melanoderdatum*, surubim do Iguaçu. Aumento de 400x. (a) 0 hpf. (horas pós-fertilização); (b) 12 hpf.; (c) 22 hpf; (d) 36 hpf; (e) 44 hpf; (f) 56 hpf; (g) 64 hpf; (h) 64 hpf; (i) 74 hpf; (j) 74 hpf; (k) 70 hpf; e (l) 70 hpf – canibalismo. Barra fig. J = 0,2 cm. Barra fig. L = 1 cm.

A aeração foi regulada de modo a manter os ovos em constante circulação, evitando que se depositassem no fundo. Esse sistema permitiu que a concentração média de oxigênio dissolvido fosse de $6 \pm 0,2$ mg/L. Segundo

dados do DNOCS (1990), a concentração de oxigênio dissolvido durante a incubação deve permanecer entre 6 e 7 mg/L. ZANIBONI FILHO (1992) observou para o tambaqui, que valores de oxigênio dissolvido acima de 6,2 mg/L garantem elevada sobrevivência de ovos e larvas.

Decorridas 12 horas da fertilização, evidenciou-se a diferenciação do embrião de surubim do Iguaçu. Para *Rhamdia hilarii*, a diferenciação do embrião deu-se após 7 horas e 30 minutos, quando a temperatura de incubação foi de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (GODINHO; FENERICH; NARAHARA, 1977).

Os olhos formados e o esboço da boca do *Steindachneridion melanoderdatum* são observados 36 horas pós-fertilização, ou seja, 4 horas pós-eclosão. Com temperatura da água variando entre 25 e 26°C, *Pseudoplatystoma coruscans* apresenta olhos pigmentados decorridas 4 horas e 30 minutos da eclosão (CARDOSO; FERREIRA; ALVES, 1988).

O início da formação dos pares de barbilhões do surubim do Iguaçu foi observado 44 horas pós-fertilização, ou, 12 horas pós-eclosão. O esboço dos barbilhões em *Rhamdia hilarii* foi observado 24 horas após a eclosão, quando as larvas foram mantidas a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (GODINHO; FENERICH; NARAHARA, 1978), enquanto a presença de barbilhões em *Pseudoplatystoma coruscans* foi observada após 27 horas da eclosão, com a temperatura variando de 25 a 26°C (CARDOSO; FERREIRA; ALVES, 1988).

Movimentos natatórios horizontais e abertura da boca do surubim do Iguaçu foram observados 24 horas após a eclosão. Quando a temperatura da água de cultivo foi de $27,6 \pm 1,4^\circ\text{C}$, os movimentos natatórios horizontais das larvas de *Pimelodus maculatus* foram observados 21 horas após a eclosão.

(LUZ e ZANIBONI FILHO, 2000). Neste momento, foi observada a ocorrência de canibalismo.

O ataque frontal foi notado, fazendo com que as pós-larvas ficassem presas por alguns instantes. Porém, o movimento da água provocado pela aeração, aparentemente facilitava o desprendimento destas. Ataques promovidos diretamente sobre a região ventral do vitelo ou pela cauda também foram registrados.

A existência de canibalismo também é registrada na larvicultura de outros bagres, como *Pseudoplatystoma coruscans*, que se inicia dois dias após a eclosão (CARDOSO; FERREIRA; ALVES, 1988).

Este trabalho além de ter investigado os parâmetros de desenvolvimento embrio-larval de surubim do Iguaçu, também teve foco em analisar as transformações ocorridas no desenvolvimento de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Figura 2).

Decorridas 8 horas da fertilização (Figura 2b), evidenciou-se a diferenciação do embrião de jundiá, *Rhamdia quelen*. Para *Rhamdia hilarii*, a diferenciação do embrião deu-se após 7 horas e 30 minutos, quando a temperatura de incubação foi de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (GODINHO; FENERICH; NARAHARA, 1977).

A eclosão ocorreu aproximadamente 14 horas pós-fertilização (Figura 2c). Os olhos formados e o esboço da boca do *Rhamdia quelen* são observados 24 horas pós-fertilização, ou seja, 10 horas pós-eclosão (Figura 2d). Com temperatura da água variando entre 25 e 26°C, *Pseudoplatystoma coruscans* apresenta olhos pigmentados decorridas 4 horas e 30 minutos da eclosão (CARDOSO; FERREIRA; ALVES, 1988).

O início da formação dos pares de barbilhões do jundiá foi observado 36 horas pós-fertilização, ou, 22 horas pós-eclosão (Figura 2e). O esboço dos barbilhões em *Rhamdia hilarii* foi observado 24 horas após a eclosão, quando as larvas foram mantidas a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (GODINHO; FENERICH; NARAHARA, 1978), enquanto a presença de barbilhões em *Pseudoplatystoma coruscans* foi observada após 27 horas da eclosão, com a temperatura variando de 25 a 26°C (CARDOSO; FERREIRA; ALVES, 1988)

Movimentos natatórios horizontais e abertura da boca do jundiá foram observados 34 horas após a eclosão. Quando a temperatura da água de cultivo foi de $27,6 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, os movimentos natatórios horizontais das larvas de *Pimelodus maculatus* foram observados 21 horas após a eclosão (LUZ e ZANIBONI FILHO, 2000). Neste momento, foi observada a ocorrência de canibalismo.

O desenvolvimento ontogênico de *Rhamdia quelen* pode ser comparado com estudos realizados para outros Pimelodídeos, inclusive para o surubim do Iguaçu.

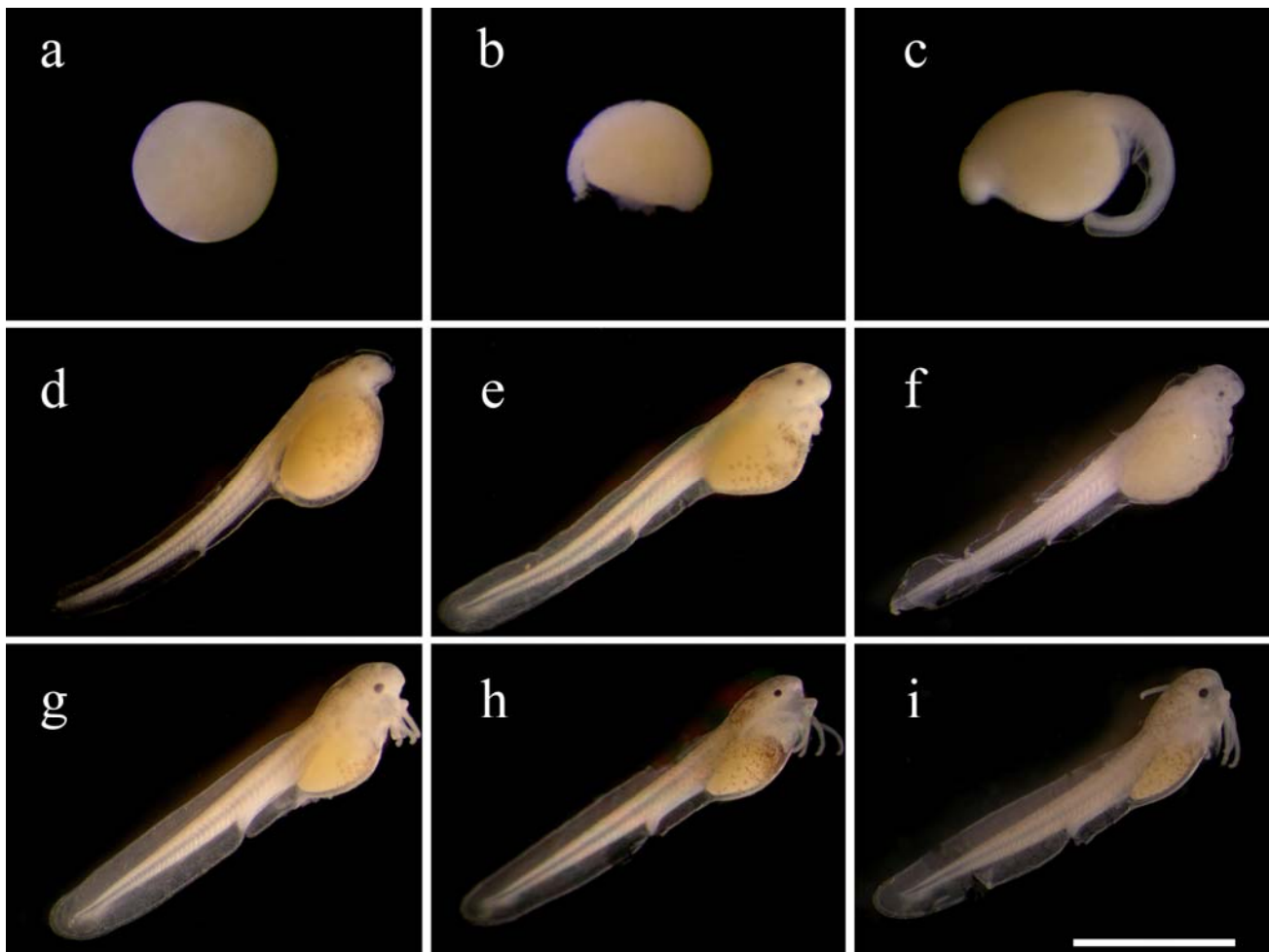


Figura 2. Seqüência de fotomicrografias destacando os principais eventos do desenvolvimento ontogênico de jundiá, *Rhamdia quelen*. Aumento de 400x. (a) 0 hpf (horas pós-fecundação); (b) 8 hpf; (c) 14 hpf; (d) 24 hpf; (e) 36 hpf; (f) 40 hpf; (g) 48 hpf; (h) 58 hpf; (i) 74 hpf;. Barra corresponde à 0,5 cm.

Conclusões

Este trabalho apresenta novas informações sobre o desenvolvimento inicial de larvas de surubim do Iguaçu, as quais podem auxiliar na tarefa de identificação de material obtido em ambientes naturais.

O desenvolvimento embrionário e os estágios larvais iniciais do *Steindachneridion melanodermatum* apresentam semelhanças com o registrado para outras espécies da família Pimelodidae, como o jundiá, destacado neste trabalho. Os resultados permitem definir parte do manejo na larvicultura, que pode ser empregado em larga escala, para aplicação comercial e na reposição dos estoques naturais.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-(CNPq) e Fundação Araucária para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

5. Considerações finais

A preservação de gametas é considerada uma importante ferramenta para laboratórios de produção de alevinos, pois haverá economia na manutenção dos reprodutores e prevenção de perdas de linhagens geneticamente melhoradas. Permitirá ainda, facilidade no transporte de material genético entre laboratórios, dentro e fora do país e maior cuidado na prevenção de transmissão de doenças, permitindo a introdução de novas linhagens com risco mínimo de patógenos, nos peixes cultivados (TIERSCH,1995).

Machos de surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) apresentam boa resposta à indução hormonal e fácil liberação de sêmen quando massageados ventralmente, após a indução à desova. Boas condições de bem estar em cativeiro como condições alimentares balanceadas e qualidade de água, demonstraram-se fundamentais para o sucesso reprodutivo das matrizes.

Os estudos realizados sobre a qualidade do sêmen em peixes, têm demonstrado variações individuais nos parâmetros avaliados, tais como: concentração espermática, motilidade, composição do plasma seminal, capacidade para fertilizar e ser armazenado. Segundo RANA (1995), estas variações podem ser ocasionadas, devido à variabilidade genética, envelhecimento dos espermatozóides, sazonalidade ou ainda, pelo tipo de técnica utilizada para se coletar o sêmen.

Em algumas espécies, como Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (RANA, 1995), ou na Carpa (*Cyprinus carpio*) (BILLARD et al., 1995a) a contaminação com urina aumentou a variabilidade da composição do plasma seminal, além

de reduzir a osmolaridade e aumentar a concentração do íon potássio. Em alguns casos como no Catfish, a urina de baixa osmolaridade (<100 mOsm/Kg), se adicionada ao sêmen, provoca um choque hiposmótico nos espermatozóides, iniciando assim sua motilidade precoce e diminuindo sua capacidade para fertilizar os ovos (SAAD e BILLARD, 1995). Esta situação pode estar relacionada com o animal 10 do lote estudado, que demonstrou baixa motilidade, porém elevada quantidade de sêmen coletado, junto à maior concentração de espermatozóides entre todos os animais analisados.

Este fato pode ser confirmado por KAVAMOTO (1993), considerando que o volume de sêmen após tratamento hormonal, superou a quantidade de sêmen obtida antes da aplicação hormonal.

Em peixes teleósteos, a concentração espermática pode variar de 2×10^6 a $6,5 \times 10^{10}$ espermatozóides por mL de sêmen, segundo dados obtidos por LEUNG e JAMIESON (1991), assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho estão dentro do relatado por esses autores.

Analisando os dados obtidos por FERREIRA et al. (2001) em jundiá, *Rhamdia quelen* ($6,99 \times 10^7 \pm 3,77 \times 10^7$ sp/mL), podemos observar que estes foram superiores aos encontrados no presente estudo para o surubim do Iguaçu (28×10^6 à 88×10^6 sp/mL), e que também diferem aos encontrados por FOGLI DA SILVEIRA et al. (1985) e KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) em bagre, *Rhamdia hilarii* ($5,58 \times 10^{10}$ sp/mL e $6,35 \times 10^{10}$ sp/mL, respectivamente).

Conforme destacado por SUQUET et al. (1993), a descrição das características físicas e químicas do plasma seminal é um pré-requisito

importante no desenvolvimento de diluidores para inseminação ou armazenamento dos espermatozóides.

Em peixes, os fatores mais importantes na determinação da ativação espermática e duração da motilidade são a osmolaridade, a composição iônica e o pH do plasma seminal (HAMAMAH e GATTI, 1998; MORISAWA e SUZUKI, 1980). Entretanto, a mudança da osmolaridade é o fator que mais influencia na ativação dos espermatozóides (BILLARD et al, 1995a, GWO, 1995). O início da motilidade pode se dar por perturbações drásticas na homeostase das células espermáticas, modificando as propriedades mecânico-químicas do aparelho móvel no axonema flagelar, conduzindo ao início da motilidade espermática (MORISAWA, 1994). Possivelmente o animal 10 (Tabela 1), passou por este processo, o que provocou o início da motilidade, afetando a análise posterior em microscópio.

Referente às características estruturais dos espermatozóides de surubim do Iguaçu, e comparando-os com espermatozóides de outras espécies neotropicais, observamos que estes apresentam o padrão ancestral, característico das espécies com fecundação externa, sendo muito semelhantes aos espermatozóides descritos nas demais espécies da Ordem Characiformes.

Eles estão constituídos por cabeça arredondada, peça intermediária e flagelo longo, semelhante ao descrito para outros peixes teleósteos (GRIER, 1981; CRUZ LANDIM e CRUZ HÖFLING, 1986,1987; MATTEI, 1988; ROMAGOSA, 1991; AIRES, 1998; ROMAGOSA et al., 1999; ZAIDEN, 2000; VICENTINI, 2002; AMARAL, 2003; POMPIANI, 2003).

A morfologia do espermatozóide reflete o modo de fertilização de cada espécie. O espermatozóide ancestral, com núcleo arredondado, foi retido pelas

espécies com fecundação externa, enquanto as espécies que praticam a fecundação interna sofreram modificações na morfologia do espermatozóide, que apresenta núcleo alongado e peça intermediária bem desenvolvida (GRIER, 1981).

Segundo JAMIESON (1991), o espermatozóide dos teleósteos com fecundação externa chama-se “aquasperm” ou espermatozóide aquático, que é classificado em Tipo I e Tipo II. O Tipo I caracteriza-se por apresentar o eixo do flagelo perpendicular à base do núcleo, devido à rotação sofrida pelo núcleo, no processo da espermiogênese. O Tipo II caracteriza-se por apresentar o eixo do flagelo paralelo à base do núcleo, visto que este não sofre rotação, no decorrer da espermiogênese. Assim sendo, os espermatozoides de surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum*, são classificados como “espermatozoides aquáticos do Tipo I”, pois o eixo do seu flagelo é perpendicular à base do núcleo. Por ser desprovidos de acrossoma e possuir apenas um flagelo, eles são denominados “espermatozoides aquáticos uniflagelados anacrossomais”. A ausência do acrossoma é uma característica comum aos espermatozoides de todos os teleósteos (MATTEI, 1970; NICANDER, 1970), e pode ser compensada pela presença da micrópila nos óvulos, facilitando sua penetração pelos espermatozoides (NAGAHAMA, 1983; RICARDO et al., 1996).

A caracterização de células espermáticas é de grande relevância, portanto para o manejo reprodutivo e para a conservação das espécies, contudo, dada a variabilidade interindividual e sazonal em algumas espécies, destaca-se a importância em se obter parâmetros quantitativos e qualitativos para uma melhor caracterização em relação a fertilidade e sanidade.

Em algumas espécies de peixes, o desenvolvimento embrionário e/ou larval é muito prolongado, e em outras, o período larval é praticamente ausente. Mas é também claro que deve se utilizar a terminologia mais apropriada, para ter a certeza sobre o que se está analisando, descrevendo, comparando ou discutindo.

Nesta ordem de idéias, a vida dos peixes pode se classificar, desde o seu desenvolvimento inicial até a sua morte, em cinco períodos de desenvolvimento ontogênico: embrionário, larval, juvenil, adulto e senescente. Cada período é dividido em fases, identificadas pelos distintos níveis de desenvolvimento morfológico e fisiológico.

Assim, no período larval, identificam-se as fases de larva saco vitelina, larva pré-flexionada, larva em flexão, larva pós-flexionada e fase de larva em transformação ou larva em metamorfose.

O estudo do desenvolvimento inicial em peixes é, da mesma maneira, uma ferramenta fundamental nos sistemas de produção de juvenis para cultivo, fornecendo informações definitivas para os processos de incubação, larvicultura e produção de jovens.

6. Referências Bibliográficas

- AIRES, E.D. **Características morfológicas e histofisiológicas da via espermática da Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Pisces: Teleostei)**. Tese (Doutorado em Anatomia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências – Botucatu - SP. 69p., 1998.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALESWSKI, A planície alagável do alto rio Paraná: importância e preservação. Maringá: **Eduem**, 1996. 100p.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JÚNIOR, H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A. de M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Eds). **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá, 1997. p. 179-208.
- AGOSTINHO, A. A. et al. *Reservatório de Salto Caxias*: questionamentos feitos pelo PROCAXIAS em relação ao contido no Plano Diretor de Caxias e outros posicionamentos. Parecer Técnico. Maringá: UEM/Nupelia, 2002b. 25p. Mimeo.
- AMARAL, A.A. **Aspectos ultra-estruturais da espermatogênese do piaçu *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Teleostei, Characiformes, Anostomidae)** Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 77p., 2003.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y. et al. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis*, (Steindachner, 1876) (Characiformes, Bryconinae), mantida em confinamento. **Rev. Bras. Zootec.**, v.31, p.803-811, 2002.
- BACCETTI, B. Comparative spermatology. Academic Press, New York, p.169-182, 1970.
- BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. Belo Horizonte, MG. 53p. Dissertação (Mestrado Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG). 1999.
- BILLARD, R. e M.P. COSSON. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fishes. **Journal of Experimental Zoology** 261:122-131, 1992.
- BILLARD, R., COSSON, M.P., PERCHEC, G., LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture** 129:95-112, 1995a.
- BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle spermiedefekter of for slag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermogram. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, 25(7-8):383- 91. 1973.

BURGESS, W. An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. T.F.H. Publications, New Jersey. 784 p. 1989.

CARDOSO, E.L.; FERREIRA, R.M.A.; ALVES, M.S.D. Desenvolvimento embrionário e estádios larvários iniciais em surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829). In: VI ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA - ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA, Belo Horizonte, 1988. *Resumos...* Belo Horizonte – MG. p.22. 1988.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 1998. 49p.

CRUZ-CASALLAS, P.E., LOMBO-RODRIGUEZ, D.A.; VELASCO-SANTAMARIA, Y.A. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research*, Oxford, 36: 682-686. 2005.

CRUZ-LANDIM, C. e CRUZ-HOFLING, M.A. Aspectos da espermatogênese de tucunaré, *Cichla ocellaris* Schneider, 1801 (Teleostei, Cichlidae). **Acta Amazônica**. v.16/17, p. 65-72, 1986/1987.

DE CARVALHO GOMES, L., INEU GOLOMBIESKI, J., CHIPPARI GOMES, A. R., BALDISSEROTO, B. Biologia do Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) **Ciência Rural** 30:1, 179-185, 2000.

DNOCS. Diretoria de Pesca e Piscicultura. **Normas Técnicas para operação de peixamento**. Fortaleza – CE, 18p. 1990.

ERDAHL, A. e GRAHAM, E. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma – mimicking medium. **Aquaculture**, v. 60, p. 311-321, 1987.

FEIDEN, A.; et al. Proporções corporais do surubim do Iguaçu *Steindachneridion* sp (Pisces:Pimelodidae) em três diferentes idades. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 12., 2001, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: AEP/Sul, 2001a. CD-Rom.

FEIDEN, A. et al., Desenvolvimento do surubim *Steindachneridion* sp em tanques-rede, no reservatório da Hidrelétrica de Salto Caxias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOLOGIA, 5., 2001, Porto Alegre. *Resumos...* Porto Alegre: SBE, 2001b. p.22.

FERREIRA, A.A. **Influência de diferentes níveis de pH no desempenho de ovos, larvas e pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Florianópolis, SC. 21p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC). 2000.

FERREIRA, A.A., NUÑER, A.P de O., LUZ, R.K., TATAJE, D.A.R., ESQUIVEL, J.R., RESTREPO, J.B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. **B. Inst. Pesca** 27(1):57-60, 2001.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y. Avaliação quali-quantitativa e crio-preservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA., Salvador, 1981. **Resumos...** Salvador, SPBC, p.620. 1981.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO E.T., NARAHARA, M.Y. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **B. Inst. Pesca**, v.12, n.4, p.7-11, 1985.

GARAVELLO, J.C. Revisão do gênero *Steindachneridion* Eigenmann & Eigenmann 1919 (Pisces, Ostariophysi, Pimelodidae). **XVIII Congresso Brasileiro de Zoologia**, Salvador, 24 fev.-01 marc., (Livro de resumos). 1991.

GARAVELLO, J.C. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, 3(4):607-623, 2005.

GODINHO, H.M.; BASILE-MARTINS, M.A.; FENERICH, N.A DE; NARAHARA, M.Y. Fecundidade e tipo de desova do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluroidei). **Rev. Bras. Biol.**, 37(4):737-744. 1977.

GODINHO, H.P. Criopreservação de sêmen de peixes. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 21, (203), 16-20. 2000.

GODOY, M.P. Peixes do Estado de Santa Catarina. Florianópolis. Editora da UFSC, Co-Edição ELETROSUL/FURB, 572p. 1987.

GRIER, H.J. Celular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Amer. Zool.**, v. 21, p. 345-357, 1981.

GUSMÃO, P., FORESTI, F., QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultraestrutura of spermiogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **Tiss. Cell**, v.31 (6), p. 627-633, 1999.

GWO, J-C. Ultrastructural study of osmolality effect on sperm of three marine teleosts. in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas. 1995.

HAMAMAH, S. and GATTI, J-L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Hum. Rep.** v.13, Supl. 4, p. 20-30, 1998.

HUET, M. **Tratado de Piscicultura**, 2o. Ed. Revisada , Ediciones Madri, Mundi-Prensa, 745p. 1978.

INGENITO, L. F. S., L. F. DUBOC, e V. ABILHOA. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 7(1): 23-36.2004.

JAMIESON, B.G.M. Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa. **Cambridge University Press**. 317 p., 1991.

JÚLIO JR., H.F., BONECKER, C.C. & AGOSTINHO, A.A.. Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu. In Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo (A.A. Agostinho & L.C. Gomes, eds.) **EDUEM**, Maringá, p.01-17.1997.

KAVAMOTO, E.T., FOGLI DA SILVEIRA, W., RIGOLINO, M.G., CARVALHO FILHO, A.C. Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **B. Inst. Pesca** 12(3):73-81, 1985.

KAVAMOTO, E.T. e FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas de sêmen do Bagre, *Rhamdia hilarii* (VALENCIENNES, 1840) em condições de campo. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 13 (1): 95-100. 1986.

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

KAVAMOTO, E.T., MAINARDES-PINTO, C.S.R., ANDRADE-TALMELLI, E.F., CAMPOS, D.E.S. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. **B. Inst. Pesca** 24 (único):73-78, 1997.

KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25 (único), p.61-66, 1999.

LAHNSTEINER, F., PATZNER R., WEISMANN, T. The testicular main duct and the spermatic duct in some cyprinid fishes II. Composition of the seminal fluid. **Journal of Fish Biology** 44:459-467, 1994.

LAHNSTEINER, F. Introduction to the special issue on 'cryopreservation of gametes in aquatic species'. **Aquacul. Res.**, v.31, p.229, 2000.

LEUNG, L.K.P. e JAMIESON, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa, (ed. B.G.M. Jamieson). **Cambridge University Press**, pp. 245-95, 1991.

LOWE-McCONNELL, R. H. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. São Paulo, Edusp. 1999.

LUDWIG, L. A. M., GOMES, E., ARTONI, R. F., Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanoderdatum* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Iguaçu. **Publicatio. UEPG** Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa, 11 (3/4): 23-27, set./dez. 2005.

LUNDBERG, J. G. and M. W. LITTMANN. Family Pimelodidae. Pp. 432-446 In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre. 729p. 2003.

LUZ, R.K., FERREIRA, A.A., REYNALTE, D.A.T., ZANIBONI-FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). **B. Inst. Pesca** 27(1):39-42, 2001.

LUZ, R.K. e ZANIBONI FILHO, E. Influência da temperatura no tempo de eclosão e desenvolvimento inicial do mandi-amarelo. In: **II ELAPOA/VI ENBRAPOA**, Florianópolis, 2000. *Resumos...* Florianópolis. p.188. 2000.

MATOS, E., MATOS, P., OLIVEIRA, E. Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. **Rev. Bras. Ciênc. Morfol.**, v.10, p.7-10, 1993.

MATTEI, X. Spermiogénese compare dès Poisson. In: Baccetti, B. (Ed.) **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, p. 57-72, 1970

MATTEI, X. The flagella apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biol. Cell.**, v. 63, p. 151-158, 1988.

MATTHEWS, W. J. Patterns in Freshwater Fish Ecology. New York, Chapman & Hall. MATTHEWS, W. J., BEK, J. R. & SURAT, E. 1982. Comparative ecology of the Darters *Etheostoma postemone*, *E. flabellare* and *Percina roanoka* in the Upper Roanoke River Drainage, Virginia. *COPEIA* 1982(4): 805-814. 1998.

MEES, G.F. Auchenipteridae and Pimelodidae. *Zool. Verh.* 132: 115 246. 1974.

MORISAWA, M. & SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science** v. 210, p. 1145-1147, 1980.

MORISAWA, M. Cell signalling mechanism for sperm motility. **Zool. Sci.** v.11, p. 647-662, 1994.

MURGAS, L.D.S.; SILVA, M.O.B.; MELLO, C.B.M.; KABEYA, D.M.; SANTANA, G.M. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen da piapara (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 23 (3): 246-248. 1999.

NAKATANI K, AGOSTINHO AA, BAUMGARTNER, G, BIALETZKI A, SANCHES PV, MAKRAKIS MC ET AL. **Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In HOAR, W.S., RANDALL, D.J., DONALDSON, E.M. (ed.) **Fish Physiology**. New York, Academic Press, 1983.

NARAHARA, MY., ANDRADE-TALMELLI, EF., KAVAMOTO, ET. and GODINHO, HM. Reprodução induzida da pirapitinga do sul, *Brycon opalinus*, mantida em condições de confinamento. **Rev. Bras. Zootec.**, vol. 31, no. 3, p. 1070-1075. 2002.

NICANDER, L. Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In BACETTI, B. **Comparative Spermatology**, p.47-55, Academic Press, N. York. 1970.

OSSE JWM, VAN DEN BOOGART JGM, VAN SNIK GMJ, VAN DER SLUYS L. Priorities during early growth of fish larvae. **Aquaculture**. 1997; 155:249-58

PATZNER, R.A. Morphology of the male reproductive system of *Coralliozetus angelica* (Pisces, Blennioidei, Chaenopsidae). **J. of Fish Biology** 39:867-872, 1991.

POMPIANI, P.G. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da ordem Characiformes, família Characidae (Teleostei, Ostariophysi) : uma abordagem fiologenética**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia) – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências - Botucatu – SP 86p., 2003.

RANA, K. Preservation of Gametes in: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. **Blackwell Science**. 424 p., 1995.

RICARDO, M.C.P., AGUIAR, C.A., RIZZO, E., BAZZOLI, N. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotrópicos de água doce. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 48, p. 17-24, 1996.

ROSA, S. R. e F. C. T. LIMA. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Machado, A. B., G. M. Drumond & A. P. Paglia (Orgs). 2008. Brasília, D.F.: **Ministério do Meio Ambiente**, 9-275pp. 2008.

ROMAGOSA, E. **Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento**. Tese – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Rio Claro – SP 177p., 1991.

ROMAGOSA, E., NARAHARA, M.Y., BORELLA, M.I., PARREIRA, S.F., FENERICH-VERANI, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Tiss. Cell.**, v.31 (6), p.540-544, 1999.

SAAD, A., BILLARD, R. Production et gestion des espermatozoides chez le poisson chat européen *Silurus glanis*. **Aquat. Living Res.** 8:323-328, 1995.

SALISBURY, Y.G.W e VANDEMARK, N.L. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, **ACRIBIA**. 707p. 1964.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds.). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre, **Edipucrs**, 1998. p. 375-400.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A.A.M. Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçu. Curitiba: **IAP/GTZ**, 1994. 128p.

SILVEIRA, W. F. da; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-13, 1990.

SUDERHSA. Qualidade das Águas Interiores do Estado do Paraná: 1987-1995. Superintendência de Desenvolvimento de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Curitiba. 1995.

SUQUET, M., DORANGE, G., OMNES, M.H., NORMANT, Y., LE ROUX, A., FAUVEL, C. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*scophthalmus maximus*) **Journal of Fish Biology** 42:509-516, 1993.

TIERSCH, T. Cryopreservation of fish sperm: Laboratory, hatchery and field studies of twenty species. in July GOETZ, F.W. and THOMAS, P. Eds. Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas At Austin – Austin, Texas 2-8, 1995.

TOTH, G.P., CIERESZKO, A., CHRIST, S.A., DABROWSKI, K. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. **Aquaculture** 154:337-348, 1997.

VICENTINI, C.A. **Estrutura comparativa da espermatogênese em peixes neotropicais: *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei)** Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências – Bauru - SP. 102p., 2002.

WOYNAROVICH, E. e HORVÁTH, L. A Propagação artificial de peixes de águas tropicais. Manual de Extensão. Brasília-DF: **FAO/ CODEVASF/ CNPq**, 220p. 1983.

ZAIDEN, S.F. **Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849)(Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura – Jaboticabal - SP. 152p., 2000.

ZANIBONI FILHO, E. e BARBOSA, N.D. de C. Importância de uma aplicação prévia de hormônio na indução à desova de peixes reofílicos. In: IX

ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, 1991. Resumos. Belo Horizonte - MG. p.36. 1991.

ZANIBONI FILHO, E. 1992 **Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818)**. São Carlos: UFSCar, 202p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos).

ZANIBONI FILHO, E. e BARBOSA, N.D. de C. Número amostral para determinação da taxa de fertilização durante a incubação dos ovos de peixes reofílicos. In: I REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA, São Paulo, 1992. **Resumo...** São Paulo, SP, p.65.

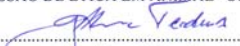
ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S.; SHIBATTA, O.A.; NUÑER, A.P. de O. **Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai**. Florianópolis: Ed. Da UFSC: Tractebel Energia, 2004. 128p.

ZAWADZKI, C. H., E. RENESTO e L. M. BINI.. Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). **Revue suisse de Zoologie**, 106: 91-105. 1999.

7. Anexos

7.1 Anexo I

Parecer 02/2008 (protocolo 04509/08) da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	 PROPESP Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 SCEEA SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAIS	
PARECER Nº 02/2008 Protocolo: 04509/08	
Em reunião ordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, <u>APROVOU</u> o protocolo de pesquisa intitulado "Biodiversidade, Citogenética e Preservação dos Peixes dos Campos Gerais II" de responsabilidade do Pesquisador Roberto Ferreira Artoni.	
Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.	
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAL - SCEEA  Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus Coordenador substituto da SCEEA	
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 - Ponta Grossa - PR - BRASIL Bloco M Sala 12 - Campus Universitário em Uvaranas Fone (42) 3220-3108 - Fax: (42) 3220-3102 e-mail: seccoep@uepg.br Home page: www.uepg.br	

7.2 Anexo II

Licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc. no. 15115-1).



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1	Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
------------------------	--

Dados do titular

Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Antoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome e local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Antoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



Página 2/2