

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**OTIMIZAÇÃO DA REPRODUÇÃO DE KINGUIOS,
Carassius auratus, UTILIZANDO-SE SUBSTRATOS
(NATURAL E ARTIFICIAL) PARA A POSTURA DOS OVOS,
EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

Fernanda Queiróz-Silva

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Co-orientador: Hilton Amaral Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo

Agosto – 2009

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**OTIMIZAÇÃO DA REPRODUÇÃO DE KINGUIOS,
Carassius auratus, UTILIZANDO-SE SUBSTRATOS
(NATURAL E ARTIFICIAL) PARA A POSTURA DOS OVOS,
EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

Fernanda Queiróz-Silva

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Co-orientador: Hilton Amaral Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo

Agosto - 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

Q3o

Queiroz-Silva, Fernanda

Otimização da reprodução de kinguios, *Carassius auratus*, utilizando-se subtratos (natural e artificial) para a postura dos ovos, em condições laboratoriais

/ Fernanda Queiroz-Silva. -- São Paulo, 2009.

v, 48f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Elizabeth Romagosa

1. Aguapé. 2. *Carassius auratus*. 3. Desova parcelada. 4. Kakaban. 5. Kinguio. 6. Ovos adesivos. I Romagosa, Elizabeth. II. Título.

CDD 639.34

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Otimização da reprodução de Kinguios, *Carassius auratus* utilizando-se substratos (natural e artificial) para a postura dos ovos em condições laboratoriais

AUTOR: FERNANDA QUEIRÓZ-SILVA

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Elizabeth Romagosa

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof^a. Dra. Elizabeth Romagosa



Prof^a. Dra. Maria Inês Borella



Prof. Dr. Antônio Fernando G. Leonardo

Data da realização: 26 de agosto de 2009

Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. Dra. Elizabeth Romagosa

**Dedico esta dissertação a todas
as pessoas da minha família,
de sangue e de coração,
que são os meus tesouros,
os meus amores!**

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, Santo Antônio e ao meu querido Anjo da Guarda por terem me dado essa oportunidade e força para chegar até o fim... na realidade é só o começo...

Não poderia deixar de agradecer àqueles que me apoiaram durante toda a vida: **meus pais!** Muito obrigada pelo exemplo, amor, carinho, apoio e dedicação!

Aos meus queridos orientadores (co): **“Percebi que não é possível seguir um líder sem admirá-lo. A admiração é mais forte que o poder. O carisma é mais intenso que as pressões. Eu começara a admirar muito o carismático homem que me chamou. Enquanto refletia sobre isso, veio à minha mente a relação com meus alunos. Eu era um depósito de informações. Nunca entendera que o carisma é fundamental para assimilar o conhecimento. Primeiro vem o carisma do mestre, depois o conhecimento que ele detém.”** (Augusto Cury). Muito obrigada, meus mestres!!!

Agradeço à disponibilidade do laboratório do CEPC/EPAGRI. A todo o pessoal do CEPC, em especial ao meu grande amigo e irmão **Leandro Bortoli**, sem o qual não teria sido possível finalizar este experimento, e aos outros colegas e amigos Fernando, Paula, Larissa, Renato, Massinha, Fran, seu Nivam, seu João, Silvano e Jurandir. Ao Elano, por todo conhecimento e pelo incentivo, afinal foi ele o responsável por minha paixão por estes peixinhos! Um grande abraço a todos!

Ao pessoal do Laboratório de Endocrinologia de Peixes, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (USP), em especial a professora Maria Inês Borella e aos colegas Chayrra, Cruz, Vanessa, Renato e Matheus, meu obrigada!

A minha amigona, minha mãe aqui em São Paulo, Geó (os gatinhos também!), muito obrigada pelas estadas, companhia e amizade!

Aos colegas e professores do programa da pós-graduação, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aquicultura.....	1
1.1.1. Piscicultura Ornamental Mundial.....	1
1.1.2. Piscicultura Ornamental Nacional.....	3
1.2. Espécie Estudada.....	4
1.2.1. Biologia Reprodutiva.....	6
Caracterização das Gônadas.....	8
Ovogênese.....	9
Espermatogênese.....	12
Ciclo Reprodutivo.....	13
Tipos de Desova.....	14
Utilização do Substrato Natural.....	14
Utilização do Substrato Artificial.....	15
1.3. Objetivos.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Espécie Estudada.....	16
2.2. Local e Período do Experimento.....	16
2.2.1. Delineamento do Experimento.....	17
2.2.2. Índice Gonado-Somático (IGS).....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1. Desovas.....	23
3.2. Ovários.....	27
3.2.1. Ovogênese.....	28
(I) Ovócito da Fase de Cromatina-nucléolo.....	28
(II) Ovócito da Fase Perinucleolar.....	29
(III) Ovócito na Fase Alvéolo Cortical.....	29
(IV) Ovócito na Fase de Vitelogênese.....	29
(V) Ovócito Maduro.....	31

(VI) Folículo Pós-Ovulatório (FPO).....	31
(VII) Folículo Atrésico.....	32
3.2.2. Quantificação.....	34
3.3. Testículos.....	36
3.4. Índice Gonado-Somático (IGS).....	38
4. CONCLUSÕES.....	40
4.1. Perspectivas Futuras.....	40
5. REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

Exemplares de kinguios, *Carassius auratus*, foram mantidos em caixas plásticas no laboratório do Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú, localizado no município de Camboriú, SC, com o objetivo de verificar qual o substrato mais indicado para a desova dessa espécie, durante o período reprodutivo de setembro de 2007 a março de 2008. Dez grupos, cada um deles constituído por uma fêmea e dois machos, foram divididos em substratos: natural, aguapé (A) e artificial, *kakaban* (K). Para as fêmeas de cada sistema as seguintes posturas foram obtidas: 109 (A) e 70 (K) variando de 18 a 26 (A) e 7 a 20 (K) por fêmea ($P < 0,05$). O número de ovócitos liberados por fêmea por desova variou de 4 a 97 (A) e 8 a 716 (K) ($P < 0,05$) e por fêmea variou de 509 a 815 (A) e 326 a 3.240 (K) durante o experimento ($P < 0,05$). O intervalo de dias entre cada postura variou de 1 a 46 (A) e 1 a 86 (K) ($P < 0,05$), respectivamente. Os ovócitos nas diferentes fases de desenvolvimento (microscopia de luz) foram definidos como: cromatina-nucléolo, perinucleolar, alvéolo cortical, vitelogênese, maduro. A presença de folículos pós-ovulatórios e atresicos também foi verificada. Posteriormente, essas fases foram quantificadas e evidenciaram diferenças significativas, A e K ($P < 0,05$), exceto na fase de atresia ($P > 0,05$), para ambos os substratos. Os valores médios do IGS foram de 7,73% para fêmeas e 4,31% para machos ($P < 0,05$). Apesar do número de desovas ter sido inferior nos *kakabans*, a fecundidade foi superior, indicando-o como o substrato ideal para a desova de kinguios.

Palavras-chave: aguapé, *Carassius auratus*, desova parcelada, *kakaban*, kinguio, ovos adesivos

ABSTRACT

Breeders goldfish, *Carassius auratus*, were kept in plastic boxes in Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú's laboratory, located in Camboriu, SC, with the objective to examine which is the ideal substrate to deposit spawn during the reproductive period September of 2007 until March of 2008. Ten groups, each one constituted of a female and two males, were divided into substrates: natural, aquatic vegetation (A) and artificial, *kakaban* (K). For the females of each system the following bearing attitudes were obtained: 109 (A) and 70 (K) varying from 18 to 26 (A) and 7 to 20 (K) each female ($P < 0.05$). The number of oocytes per female in each spawn varied from 4 to 97 (A) and 8 to 716 (K) ($P < 0.05$). The daily intervals between the deposit of spawns varied from 1 to 46 (A) and 1 to 86 (K) ($P < 0.05$), respectively. The oocytes in different development stages (light microscopy) were defined as: chromatin-nucleolus, perinucleolar, cortical alveoli, vitellogenesis, final maturation. The presence of pos-ovulatory follicles and atresia were verify too; and pos-ovulatory follicles and atresia too. Later, these phases were quantified and presented significant differences, A and K ($P < 0.05$), except in the atresia phase ($P > 0.05$), both substrates. The average GSI values were 7.73% (A) and 4.31% (K) ($P < 0.05$). Although the spawn number was inferior in *kakabans*, the fecundity was higher, indicating that *kakaban* is the ideal substrate for goldfish to deposit spawns.

Key words: adherents eggs, aquatic vegetation, *Carassius auratus*, goldfish, *kakaban*, parcel spawn

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aquicultura

A Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca afirma que o Brasil apresenta um imenso potencial para o desenvolvimento da aquicultura, pois, possui 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de água doce, disponibilizando cerca de 10% dessa água no planeta. Além da infinidade de recursos hídricos, ainda apresenta clima favorável para o desenvolvimento de organismos aquáticos, terras disponíveis, mão-de-obra abundante e a crescente demanda por pescado no mercado interno (BRASIL, 2009).

A região que mais se destaca na aquicultura brasileira é a região sul, sendo o Estado de Santa Catarina o maior produtor nacional de organismos aquáticos onde os criadores possuem, em média, 0,49 hectares de área inundada, formada por pequenos empreendimentos (SILVA, 2006).

1.1.1. Piscicultura Ornamental Mundial

As primeiras atividades ligadas à criação de peixes ornamentais datam de antes da Era Cristã, entre os anos de 384 a 322 a.C., onde o filósofo grego Aristóteles descreveu os peixes do Mar Egeu (LIMA *et al.*, 2001).

A atividade da aquariorfilia foi criada no ano de 1596, quando o chinês Chang Chi'En-Tê escreveu Chu Sha Yu P'u (que significa "Livro do Peixe Vermelho"), no qual ensinava como realizar a manutenção de peixes vermelhos da família Cyprinidade, mantidos em pequenos bujões (LIMA *et al.*, 2001).

Desde então, os peixes ornamentais têm constituído um valioso recurso, sendo considerados como uma atividade em constante crescimento, apesar das lacunas de informações sobre as variedades de peixes (FAO, 2009).

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental,

é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (ROSA *et al.*, 1994). Contudo, para a produção massiva de alevinos ornamentais, ainda não são dominados aspectos reprodutivos, necessitando-se de estudos minuciosos que sejam capazes de aumentar a eficiência desses processos (VIDAL Jr, 2000 e 2002).

Mundialmente são comercializadas mais de 700 variedades de peixes para fins de ornamentação, e a demanda por peixes exóticos e novas variedades é crescente (VIDAL Jr, 2003); destas, cerca de 70% são produzidos em cativeiro (MOJICA, 2007). Deve-se destacar que, os peixes cativos apresentam custos menores quando comparados aos do habitat natural (RIBEIRO, 2008).

Conforme RIBEIRO (2008), entre os maiores produtores e exportadores de peixes ornamentais destaca-se Cingapura, produzindo principalmente, tetras, *guppies*, *catfishes* e kinguios cujos destinos são Estados Unidos da América e Reino Unido. A Malásia exporta 95% de sua produção, sendo que 85% via Cingapura. Dentre os produtores citados, Cingapura, anualmente, desenvolve cerca de 7 a 10 novas variedades de peixes ornamentais por meio do domínio e aperfeiçoamento de técnicas de reprodução e programas de cruzamentos seletivos.

O Japão, considerado o berço da piscicultura ornamental, é atualmente o quinto maior exportador mundial, mas se sobressai devido ao seu grande mercado consumidor, o terceiro maior mercado do mundo. Na China, na província de Hong Kong, destaca-se também, a produção de carpas, kinguios e discos. A Índia possui um grande potencial de crescimento no setor devido principalmente, a sua grande extensão territorial e ao clima favorável (RIBEIRO, 2008).

Dentre os países da Europa, a Espanha se destaca, sendo o segundo maior exportador de peixes ornamentais, entretanto, 96% destes peixes são de água salgada (RIBEIRO, 2008).

Os Estados Unidos são o maior mercado consumidor de peixes ornamentais movimentando cerca US\$ 1 bilhão/ano (VIDAL Jr, 2002), em 2006 importou US\$ 48 milhões, sendo que a espécie predileta é o *guppy* (*Poecilia reticulata*) (RIBEIRO, 2008). Nesse país uma em cada três residências possui aquário, entretanto, no Japão a proporção é ainda maior, uma em cada duas residências têm aquários como objeto de decoração ou ainda, servindo como redutores de ansiedade e estresse (LIMA *et al.*, 2001).

Na América Latina, a Colômbia é a maior exportadora de ornamentais, exportando 25 milhões de peixes por ano (RIBEIRO, 2008).

1.1.2. Piscicultura Ornamental Nacional

No Brasil a atividade de aquariofilia teve início em 1922, trazida pela colônia japonesa ao Rio de Janeiro (LIMA *et al.*, 2001), entretanto, o maior impulso na produção de peixes ornamentais ocorreu na década de 70, onde as exportações alcançaram US\$ 30 milhões por ano, porém, segundo VIDAL Jr (2002), estes peixes eram provenientes de capturas da natureza. A partir desta década as exportações brasileiras iniciaram seu declínio, estagnando na década de 90, onde representavam US\$ 4 milhões anuais, cujo motivo principal dessa queda foi a pressão internacional contra a pesca predatória.

Atualmente nosso país exporta cerca de 20 milhões de peixes ornamentais de água doce por ano, sendo que 95% desses provêm do extrativismo, principalmente, das planícies e florestas inundáveis da região amazônica (VIDAL Jr, 2003). Essas exportações sofreram queda de 1996 a 2003, porém, aumentaram progressivamente, atingindo US\$ 4,1 milhões entre o período de 2003 e 2006 (RIBEIRO, 2008).

O comércio brasileiro de peixes ornamentais movimenta cerca de US\$ 1 bilhão, oriundos tanto da criação como, também, da captura nos rios, lagoas e oceanos. Este setor é considerado um dos mais lucrativos na piscicultura, sendo impulsionado através do crescente aumento da demanda do mercado mundial (LIMA *et al.*, 2001). No Brasil, assim como em outros países, a oferta

de peixes ornamentais é inferior a demanda (VIDAL Jr, 2002). Existem em torno de 1.800 produtores de peixes ornamentais, sendo que, a maioria encontra-se concentrada no estado de Minas Gerais (VIDAL Jr, 2003).

Na Amazônia existem mais de 2.500 espécies de peixes, entretanto, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), através da portaria n. 62-N, de 10 de junho de 1992, permite a exploração de somente 180 espécies consideradas como peixes ornamentais. O Pantanal Mato-grossense é outra região rica em diversidade ictiofaunística para fins de ornamentação (LIMA *et al.*, 2001).

Segundo LIMA *et al.*, (2001), a oferta de peixes, nos mercados locais, obtidos através da produção em fazendas de piscicultura, diminui a pressão de pesca sobre as populações selvagens, proporcionando a manutenção dos estoques naturais. Tornou-se imperativo desenvolver tecnologia para a produção em grande escala de peixes de águas continentais e marinhas em diferentes sistemas de criação (VIDAL Jr, 2006). SOARES *et al.* (2002) afirmam que há poucos estudos sobre peixes ornamentais em regiões tropicais, necessitando de pesquisas que proporcionem subsídios para o desenvolvimento da atividade principalmente, quanto ao manejo da criação, refletindo na expansão do setor produtivo. RIBEIRO (2008) assegura ainda que, um dos grandes desafios para se produzir peixes ornamentais de boa qualidade e, melhorar seu acondicionamento, para que os mesmos cheguem saudáveis em seu destino, é priorizar pesquisas focadas na sobrevivência desses peixes principalmente, se o transporte for de longa duração.

1.2. Espécie estudada

Neste estudo a espécie escolhida, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), pertencente à classe Actinopterygii, ordem Cypriniformes e família Cyprinidae, é denominada popularmente como kinguio, peixe japonês ou dourado (português) e *goldfish* (inglês), *pez rojo* (espanhol) e *poisson rouge* (francês) (FAO, 2009). Esta espécie é oriunda de mutações genéticas de *Carassius*

carassius, assim como as carpas *koi* são de *Cyprinus carpio* (<http://blueridgekoi.com/History-of-koi-c-159.html>).

Segundo antigas crônicas chinesas, estes peixes vem sendo criados desde 950, sendo levados para o Japão por volta de 1600 (PEREIRA, 1979) e, domesticados por mais de mil anos (KOBAYASHI *et al.*, 2002). São originários da China (PEREIRA, 1979; FROESE e PAULY, 2009) e, devido à seleção e melhoramento genético feito no Japão a partir da década de 50, existem mais de 120 variedades, como: *red cap*, “telescópio”, “cauda-de-véu”, “cabeça de dragão”, “pompom”, dentre outras, sendo que, a maioria deriva de sua forma selvagem, que possui coloração marrom-esverdeada (LIMA *et al.*, 2001).

O kinguio é um dos peixes ornamentais mais comercializados e conhecidos do mundo (ROSA *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2001; LIMA, 2003), visto que, além de serem muito resistentes às variações dos parâmetros físico-químicos da água na criação, apresentam altas taxas de prolificidade e variados padrões de coloração e polimorfismo, principalmente, nos olhos e nadadeiras (ROSA *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006).

Segundo informações de FROESE e PAULY (2009), os kinguios atingem, em média 15 cm. A faixa ideal de temperatura da água para que a espécie atinja o bem-estar varia de 15 a 24°C e o pH pode ser neutro ou ligeiramente alcalino. Alimentam-se de plantas, pequenos crustáceos, insetos e até mesmo de detritos. Quando criados em cativeiro, os kinguios apresentaram melhores taxas de conversão alimentar com dietas com níveis de proteína bruta (P.B.) entre 40 e 45% (SILVA *et al.*, 2006). Há registros que a primeira reprodução destes peixes foi obtida no início do século XVIII (ROSA *et al.*, 1994).

Os kinguios são famosos por terem o péssimo hábito de arrancar as plantas e remexer o fundo dos aquários, porém, são bem sociáveis, podendo viver na companhia de outros kinguios, além de outras espécies de peixes (PEREIRA, 1979; LIMA, 2003). Por apresentarem essas características o

kinguio vem sendo utilizado como peixe-modelo, principalmente em experimentos de toxicologia e endocrinologia (SOHN *et al.*, 1998; MARLATT *et al.*, 2008; TSE *et al.*, 2008); além de, amplos estudos em fisiologia (BJERSELIUS *et al.*, 2001; APPELT e SORENSEN, 2007; LISTER *et al.*, 2008) e comportamento reprodutivo (BJERSELIUS *et al.*, 2001; MATSUDA *et al.*, 2008). Além dessas razões, apresentam desova parcelada e a maturação das gônadas ocorre rapidamente (SOHN *et al.*, 1998; LISTER *et al.*, 2008; TSE *et al.*, 2008).

1.2.1. Biologia reprodutiva

O desenvolvimento gonadal dos kinguios é controlado pelo sistema endócrino através de complexas vias metabólicas (LI *et al.*, 2008), sendo mediado ao longo do eixo cérebro – hipotálamo – pituitária ou hipófise – gônadas (RUTAISIRE e BOOTH, 2004). As fêmeas de *goldfish* receptivas à reprodução liberam pelo menos cinco feromônios sexuais, através da urina, no substrato à desova, atraindo desta forma, o macho para o local indicado (APPELT e SORENSEN, 2007). OLSÉN *et al.* (2006) acreditam que ao longo dos anos de domesticação, o sistema de feromônios de *C. auratus* sofreu pequenas modificações.

As fêmeas de *goldfish* iniciam a vitelogênese durante o inverno, apresentando grupos de ovócitos cujo desenvolvimento é sincrônico e desovam várias vezes durante a primavera e verão (KOBAYASHI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2008), podendo ser adiada em função da diminuição da temperatura da água (LI *et al.*, 2008), pois assim como na carpa-comum, *Cyprinus carpio*, o método de reprodução natural dos kinguios é altamente dependente das condições climáticas (BILLARD *et al.*, 1995; MAÑANÓS *et al.*, 2009).

Os kinguios apresentam dimorfismo entre os sexos somente na fase reprodutiva, onde nota-se nos machos a presença de pequenos tubérculos na base do opérculo como característica sexual secundária (PEREIRA, 1979; APPELT e SORENSEN, 2007; NADZIALEK *et al.*, 2008), porém, BJERSELIUS *et al.* (2001) afirmam que tais tubérculos podem, ou não, estar presentes.

A primeira desova dos kinguios ocorre com cerca de um ano de idade (NADZIALEK *et al.*, 2008), com 20 cm de comprimento total (BROMAGE e ROBERTS, 1995).

De acordo com MCEVOY e MCEVOY (1992), por serem uma espécie prolífera, os kinguios, caracterizam-se por apresentar desova parcelada ou múltipla (NADZIALEK *et al.*, 2008), como estratégia adaptativa ao alimento disponível, disseminando o risco de predação dos ovos e larvas durante um longo período, apresentando alta variabilidade de recrutamento, bem como, à instabilidade das condições ambientais. Ainda, sugerem que, este tipo de desova, dentro de uma estação, esteja associado à sazonalidade em áreas mais restritas, ao tamanho reduzido dos peixes e, conseqüentemente, apresentam ovários menores. Uma vez que os ovócitos hidratam-se e aumentam de tamanho, estes são liberados em diferentes intervalos de tempo (lotes) permitindo que mais ovócitos possam se acomodar nos ovários e ao atingirem determinado tamanho na fase final do desenvolvimento (maduros), sendo então liberados (MCEVOY e MCEVOY, 1992).

O sistema de desova dos kinguios é sazonal, típico dos ciprinídeos não territorialistas, sem cuidado parental, assim como outras carpas (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Seus ovos são aderentes e fixam-se em plantas aquáticas de raízes longas como, *Eichhornia crassipes* (VAZZOLER, 1996), ou em substratos quando mantidos em tanques bem povoados (PEREIRA, 1979).

A técnica de reprodução induzida em peixes pode ser realizada através da propagação artificial, utilizando-se extrato bruto de hipófise de carpa comum, visando maximizar a quantidade de ovos, larvas e a produção de alevinos (ROSA *et al.*, 1994; LIMA, 2003). ROSA *et al.* (1994) realizaram experimentos na qual a liberação dos ovócitos ocorreu de duas formas, natural (espontânea, em folhas secas de coqueiros) e artificial (extrusão manual), após aplicação hormonal. Verificou-se que com a extrusão manual a prolificidade

mostrou-se menor, cerca de 0,5 a 5% do peso total das fêmeas, porém, a taxa de fertilização foi maior (65 a 70%).

Geralmente os *goldfishes* liberam seus gametas durante a primavera e o início do verão (BEACH, 1959). Devido ao curto intervalo de tempo entre a ovulação e a desova, o comportamento dos machos e fêmeas, devem ser sincronizados (BJERSELIUS *et al.*, 2001). Segundo KOBAYASHI *et al.* (2002), se os machos têm contato com o feromônio pré-ovulatório das fêmeas estes aumentam a secreção de LH (LI *et al.*, 2008), que estimula a síntese de outros hormônios nos testículos, além de, aumentar o número e a motilidade dos espermatozoides nos ductos espermáticos e a fertilidade durante a desova. Os machos de *goldfish* competem entre si para ter acesso às fêmeas receptivas (APPELT e SORENSEN, 2007).

Os ovos de kinguios apresentam cor amarelo clara (ROSA *et al.*, 1994) e o sêmen é branco leitoso (VAZZOLER, 1996). A eclosão dos ovos de kinguios ocorre 50 horas após a fecundação, com médias de temperatura da água $24,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ (ROSA *et al.*, 1994).

Os alevinos de kinguios possuem a cor marrom-olivácea (cor original), e após três meses de vida adquirem características semelhantes a dos pais, com cerca de 25% da prole mantendo a cor original (PEREIRA, 1979).

Caracterização das gônadas

Para diminuir os erros na determinação dos estádios gonadais em peixes, deve-se aliar às características externas (macroscópicas) às observações histológicas das gônadas, definindo-as com exatidão os aspectos morfológicos durante o processo de gametogênese (ROMAGOSA, 2008). Com isso pode-se estabelecer parâmetros tais como, o comprimento total os quais os peixes atingem à maturação gonadal, duração do ciclo reprodutivo ou ainda, estimar a fecundidade (VAZZOLER, 1996).

Ovogênese

A gametogênese das carpas, ou seja, tanto a ovogênese como a espermatogênese, é regulada através de características ambientais, como a temperatura, duração de horas de luz, dieta e interações sociais (GLASSER *et al.*, 2003), sendo na maioria dos peixes controlada pela gonadotropina FSH (ARUKWE, 2001).

Segundo ROMAGOSA (1998 e 2006), a ovogênese em teleósteos é um processo onde as células germinativas primordiais (CGP) se desenvolvem para dar origem ao ovócito que deverá estar apto para ser fertilizado. De uma maneira geral, durante a ovogênese ocorrem inúmeras modificações a nível nuclear, como o surgimento de organelas citoplasmáticas, acúmulo de inclusões variadas e a formação do envelope folicular (envoltório). Podendo ser divididas em fases: (1) formação da CGP e sua transformação em oogônia (diferenciação sexual); (2) transformação da ovogônia em ovócitos (início da meiose); (3) crescimento do ovócito enquanto a meiose está estagnada; (4) reinício da meiose (maturação); (5) expulsão do ovócito de seu folículo (ovulação), também considerado como crescimento primário e secundário.

No início de cada período reprodutivo, uma fração das ovogônias presentes nos ovários, fase denominada de cromatina-nucleolar (ROMAGOSA, 1998), passa por uma série de divisões mitóticas até entrar em meiose (BEACH, 1959; PATIÑO e SULLIVAN, 2002), permanecendo inativas até o próximo ciclo reprodutivo (fase perinucleolar), com nucléolos associados aos diferentes graus de síntese protéica, transição de RNA ribossômico, portanto, as variações dependem da estratégia reprodutiva adotada pela espécie (ROMAGOSA, 1998).

A seguir os ovócitos são recrutados para a fase de crescimento secundário, onde surgem alvéolos corticais e grânulos de vitelo (SELMAN *et al.*, 1993; ROMAGOSA, 1998), que segundo GURAYA (1982), que têm como

função evitar a polispermia (YAMAMOTO, 1961; ROMAGOSA, 1998), adquirindo grande quantidade de vitelo que servirá de alimento para o embrião e para os primeiros momentos de vida da larva (GODINHO, 2007).

Essa etapa é caracterizada por duas fases em teleósteos: (1) pré-vitelogênese, que independe de hormônios gonadotrópicos para sua evolução, onde o desenvolvimento do ovócito é lento e o volume aumenta lentamente; (2) vitelogênica, caracteriza-se por estreita dependência de hormônios gonadotrópicos, rápido crescimento ovocitário e aumento brusco do seu tamanho. A vitelogênese consiste no sequestro de um precursor plasmático, a vitelogenina (VTg) derivada do fígado, que se acumula no citoplasma do ovócito sob a forma de grânulos de vitelo (WALLACE e SELMAN, 1981, SELMAN *et al.*, 1993; ROMAGOSA, 1998; GANECO *et al.*, 2001). Recentemente, LI *et al.* (2008) observaram que não há relação entre os níveis de VTg no plasma e o índice gonadossomático (IGS) em *goldfish*, em ambos os sexos, e além do que, não foi possível detectar VTg em fêmeas cujos IGS < 0,85. BEACH (1959) utiliza outra nomenclatura, em *goldfish*, menos específico, na qual são divididas em: ovócito imaturo, ovócito em maturação e ovócito maduro.

As mudanças entre as fases de vitelogênese e maturação final não são evidentes em muitas espécies de teleósteos, considerando-se que o crescimento e a maturação ovocitária são processos contínuos (RIZZO e BAZZOLI, 1997).

Ao final do processo de vitelogênese o ovócito atinge seu desenvolvimento máximo, dependendo das condições ambientais adequadas e, sob a ação de apropriado mecanismo hormonal gonadotrópico, o ovócito segue para a etapa de maturação (ROMAGOSA, 1998; GANECO *et al.*, 2001) até ser liberado para o meio externo, aquático, após ter apresentado um grande crescimento devido ao acúmulo de material nutritivo (CHAVES e VAZZOLER, 1984). A seguir, ocorre a ovulação, que é resultado da ruptura da

parede folicular, fase regulada por meio da ação da gonadotropina e hormônios esteróides, principalmente progestinas, que são produzidas pela parede do ovócito (GURAYA, 1986).

Quando o ovócito é eliminado é possível visualizar, por meio da presença das membranas formadas pelas células foliculares (granulosa) e a teca, apresentando estruturas contorcidas e dobradas, restando somente uma camada que será invadida por células fagocitárias do estroma ovariano, sendo em seguida, completamente absorvida (CHAVES e VAZZOLER, 1984), este é caracterizado como folículo pós-ovulatório (FPO) (LEONARDO *et al.*, 2006; ROMAGOSA, 2006).

Durante o ciclo maturacional pode ocorrer um processo relativamente comum em ovários de teleósteos denominado de atresia folicular ou degeneração ovocitária. Pode-se observar este fenômeno antes da liberação dos ovócitos que ainda não alcançaram a maturação e, após a desova, nos ovócitos que deixaram de ser eliminados (ANDRADE, 1992; GANECO *et al.*, 2001); tanto em ambientes naturais ou em confinamento, atingindo principalmente os ovócitos vitelogênicos (ANDRADE, 1992; ROMAGOSA, 2006).

Conforme ANDRADE (1992), a degeneração dos ovócitos é um processo onde ocorre sua involução, caracterizada por alterações morfológicas. A atresia de ovócitos vitelogênicos não segue um padrão determinado, ocorrendo variações de acordo com cada espécie, porém, basicamente há alteração no tamanho do ovócito, forma, hipertrofia das células foliculares, fragmentação da zona radiata e desintegração ou liquefação dos grânulos de vitelo.

A atresia é um importante fator regulador da fecundidade de muitas espécies de peixes (KRAUSS *et al.*, 2008) e, provavelmente, é uma característica típica dos que possuem desova parcelada (CHAVES e VAZZOLER, 1984). Parece existir uma relação inversa entre o índice de

ovócitos atrésicos e a condição nutricional das fêmeas (VOLODIN *et al.*, 1974; MCEVOY e MCEVOY, 1992) e ao estresse quando mantidos em cativeiro (CHAVES e VAZZOLER, 1984).

Segundo TREASURER e HOLLIDAY (1981) parece não existir influência entre a reabsorção de ovócitos e o desenvolvimento de uma nova geração, porém, podem afetar de maneira significativa a fecundidade da população. Todavia, sabe-se que em *Abramis brama*, uma nova geração de ovócitos se inicia somente quando a geração anterior de ovócitos foi totalmente reabsorvida (VOLODIN *et al.*, 1974).

Espermatogênese

De maneira geral, os teleósteos apresentam transição das células germinativas ativas até a formação dos espermatozoides, ocorrendo de maneira sincrônica em um processo denominado de espermatogênese (BATLOUNI *et al.*, 2006). Entretanto, em carpa-comum, esse processo ocorre em um curto período de tempo, pois as células germinativas de um cisto apresentam-se na mesma fase de desenvolvimento (BILLARD *et al.*, 1995). Podem apresentar variações cíclicas na forma, volume, tonalidade e vascularização, em função das diferentes etapas do processo reprodutivo que se encontram (MENEZES *et al.*, 2000).

Os testículos são classificados segundo a distribuição das espermatogônias em: (1) espermatogonial contínuo ou irrestrito ou (2) descontínuo ou restrito, exemplo o grupo Atheriniformes (GRIER *et al.*, 1980; GRIER, 1981; GRIER e PARENTI, 1984). A proliferação de espermatogônias é estimulada através de gonadotropinas (ARUKWE, 2001).

No caso da carpa-comum, em clima temperado, a gametogênese ocorre ao final do verão, portanto, os espermatozoides ficam estocados nos testículos até a próxima desova, que ocorre na primavera seguinte, porém, os espermatozoides com capacidade de fertilização podem ser coletados praticamente todo o ano (BILLARD *et al.*, 1995). Em carpa-capim,

Ctenopharyngodon idella, a maioria dos machos permanece maduro os doze meses do ano nas regiões tropicais (GLASSER *et al.*, 2003).

A produção anual de esperma na carpa-comum é de $1,9 \pm 0,2 \times 10^{12}$ espermatozoides \cdot kg⁻¹ \cdot reprodutor (BILLARD *et al.*, 1995). Os autores afirmam que em *Cyprinus carpio*, o esperma é inativo nos testículos, sendo ativado somente após a liberação da água devido à diminuição da pressão osmótica. Os espermatozoides de carpa-comum movem-se até 30 segundos depois de sua ativação por possuírem espermatozoides primitivos, o mesmo ocorre em outros ciprinídeos. (BILLARD *et al.*, 1995). A velocidade máxima que o espermatozoide de carpa-comum pode atingir é de 15 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (TOTH *et al.*, 1995).

Ciclo reprodutivo

A maioria dos peixes apresenta reprodução cíclica, correspondendo a um período de repouso intercalado por períodos ativos, finalizando com o surgimento de nova prole (ROMAGOSA, 2006). No período de repouso, as gônadas apresentam tamanho reduzido, contendo apenas células gametogênicas em fases iniciais de desenvolvimento, caso do matrinxã, *Brycon cephalus* (ROMAGOSA, 1998). Com o progresso do ciclo, elas acumulam ovócitos vitelogênicos ou espermatozoides até atingirem picos máximos e a seguir, ocorre a liberação dos gametas. Em razão do acúmulo dessas células, as gônadas sofrem mudanças radicais em sua constituição, alterando sua aparência, peso e coloração (GODINHO, 2007). O ciclo reprodutivo dos peixes está vinculado às variações ambientais, como temperatura, regime de chuvas (BAZZOLI, 2003).

De acordo com ROMAGOSA (1998), as alterações morfo-funcionais das gônadas da maioria das espécies de peixes tropicais sul-americanos auxiliam na caracterização dos diferentes estádios, como (1) repouso: apresentam o menor tamanho, sendo delgadas e translúcidas; (2) em

maturação: iniciam o processo de gametogênese e acumulam gradualmente seus gametas, fazendo aumentar seu peso; (3) maturação avançada/maduro: atingem seu maior peso e volume e, (4) esgotado: corresponde ao período que se segue à reprodução e em consequência ocorre a eliminação dos gametas, onde as gônadas tornam-se reduzidas em tamanho, flácidas e sanguinolentas, ocorre intensa reorganização dos tecidos gonadais que, em breve, estarão reiniciando novo ciclo reprodutivo, a fase de repouso.

Tipos de Desova

Dentre as estratégias reprodutivas, os peixes teleósteos apresentam os seguintes tipos de desova: (1) liberam seus gametas uma só vez durante a vida reprodutiva (VAZZOLER, 1996); (2) liberam seus gametas uma vez ao ano durante um curto período geralmente, na primavera-verão – desova total, peixes reofílicos-migradores (ROMAGOSA, 2006); (3) liberam seus gametas em parcelas ou lotes durante um período reprodutivo longo ou podem ainda desovar continuamente – desova parcelada ou múltipla (MCEVOY e MCEVOY, 1992).

Como foi dito anteriormente, os kinguios apresentam desova do tipo parcelada, portanto, os exemplos referem-se a esta categoria de desova. Conforme MCEVOY e MCEVOY (1992), a frequência de desovas e a fecundidade estão intimamente ligadas às condições alimentares, altas taxas de alimento aumentam o percentual de peixes que atingem a maturação, o número, peso e frequência de desovas. De acordo com VAZZOLER (1996) a fecundidade está relacionada diretamente com o tamanho do corpo e com as condições ambientais. Pode-se ainda, estimar a fecundidade de espécies de peixes de desovas múltiplas por meio da frequência de folículos pós-ovulatórios presentes (MCEVOY e MCEVOY, 1992).

Utilização do Substrato Natural

Tanques ou viveiros de desova são cuidadosamente preparados com a utilização de vegetação aquática como substrato para a desova, onde são introduzidas matrizes de carpa ou kinguio (MAÑANÓS *et al.*, 2009).

Utilização substrato artificial

TAMASSIA *et al.* (2004) afirmam que o *kakaban* é ideal para ser utilizado em unidades produtivas mais simples, é uma estrutura com o intuito de coletar ovos que apresentam substância adesiva, como matrizes de carpa-comum. Os autores descrevem que o *kakaban* pode ser fabricado de feixes de capim seco, galhos de *pinus* ou até mesmo de material sintético, cujo benefício e custo é apropriado por possuir maior durabilidade e serem utilizados em vários ciclos reprodutivos.

NATHANAEL e EDIRISINGUE (2001), estudando carpa-comum, *Cyprinus carpio*, em um reservatório no Sri Lanka, utilizaram *kakabans* de 2 m de extensão, feitos de fibras de coco e armação de bambu, 10 cm da superfície da água para a captura de ovos. BILLARD *et al.* (1995) citam que para a reprodução natural de carpa-comum na Indonésia, utilizam-se *kakabans* como substrato artificial. O mesmo ocorre em carpas mantidas em tanques do tipo *dubish* na Europa e de *spanish moss* (ráfia) na Ásia. COLE *et al.* (1999) utilizaram para o tetra-limão, *Hyphessobrycon pulchripinnis*, substrato oriundo de escova, fios de nylon, tiras finas de plástico ou grama artificial.

Em experimento onde acompanhou-se o comportamento reprodutivo de machos de *goldfish* foi utilizado durante a reprodução um apetrecho similar ao *kakaban*, com vegetação artificial flutuante, cobrindo aproximadamente 35% da superfície do aquário, feitos de fios verdes, atuando como substrato para desovas (BJERSELIUS *et al.*, 2001).

1.3. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com kinguios, *Carassius auratus*, em condições laboratoriais, tendo como objetivo verificar qual o substrato mais indicado para a espécie (natural ou artificial) a ser utilizado para a postura dos ovos, quantificando o número de ovócitos liberados (fecundidade). E também, caracterizar histologicamente as alterações morfológicas das gônadas, bem como a análise dos valores individuais do índice gonadossomático ao final do período reprodutivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécie Estudada

Exemplares de kinguios, *Carassius auratus*, foram adquiridos da empresa Acquavita (Sr. Elano Rodrigo Spessatto), localizada no Rancho das Palmeiras, Estrada Geral dos Macacos, no município de Camboriú, Santa Catarina, com doze (12) meses de idade e médias de comprimento padrão e peso total de $81,55 \pm 4,86$ mm e $41,21 \pm 4,43$ g, respectivamente.

2.2. Local e Período da Realização do Experimento

O experimento foi desenvolvido no Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú (CEPC), localizado na sede da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI), município de Camboriú, Santa Catarina (Figura 01), durante o período de setembro de 2007 a março de 2008. Nessa região a altitude é de 9 metros acima do nível do mar e a temperatura média anual do ar é de $19,5^{\circ}$ C.



Figura 01: Imagens de satélite da região sul do Brasil, Estado de Santa Catarina, com destaque no município de Camboriú (A), SC (Fonte: Google Maps)

2.2.1. Delineamento do experimento

Reprodutores de kinguios, *C. auratus*, foram selecionados, observando-se nos machos a presença de líquido espermático e nas fêmeas, o abdômen abaulado no qual algumas vezes podia ocorrer a liberação de ovócitos com uma leve pressão abdominal (ROSA *et al.*, 1994). Para o manejo rotineiro dos kinguios não foi necessário a utilização de anestésicos como preconizado por APPELT e SORENSEN (2007).

Os exemplares de kinguios foram mantidos no laboratório do CEPC, durante 30 dias, agosto de 2007, em tanques circulares (3000 litros), com renovação de água constante, proveniente de poço artesiano. Os peixes não foram manipulados até a implantação do experimento (Figura 02).



Figura 02: Tanques onde os kinguios foram mantidos antes do experimento ser implantado

No laboratório onde foi realizado o experimento foram utilizadas 10 caixas plásticas (70 X 55 X 40 cm), com capacidade máxima de 100 litros cada (Figura 03).



Figura 03: Laboratório onde o experimento foi realizado

Os grupos foram constituídos por uma fêmea e dois machos de kinguios (Figura 4A e B), mantidos em caixas plásticas (100 L) perfazendo um total de dez (10) grupos, individualizados. Os dois grupos serão denominados de (A) para os aguapés e (K) para os *kakabans*, como forma de facilitar a leitura. Inicialmente, os valores médios de comprimento padrão foram $80,00 \pm 11,18$ mm (A) e $82,40 \pm 8,44$ mm (K) e $83,50 \pm 12,03$ mm (A) e $85,50 \pm 13,01$ mm (K) para fêmeas e machos, respectivamente. Os valores médios iniciais do peso total foram $40,11 \pm 7,22$ g (A) e $47,42 \pm 5,15$ g (K) e $34,42 \pm 10,78$ g (A) e $43,05 \pm 14,48$ g (K) para fêmeas e machos, respectivamente. Foram introduzidos dois tipos de substratos para liberação de ovócitos, em cinco caixas, sendo que o substrato (A) natural com aguapés livres e, nas outras cinco, (K) artificial, com *kakabans* na parte central do fundo das caixas (Figura 5A e B). A renovação da água foi constante, de poço artesiano.

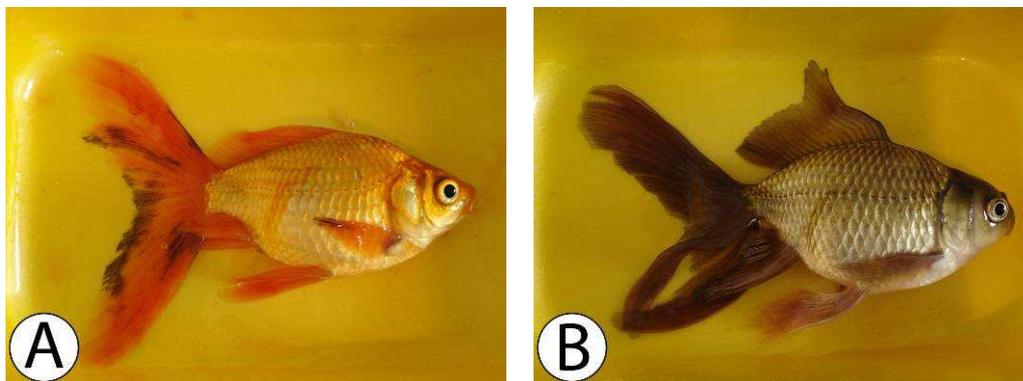


Figura 04: (A) Fêmea e (B) macho de *Carassius auratus*

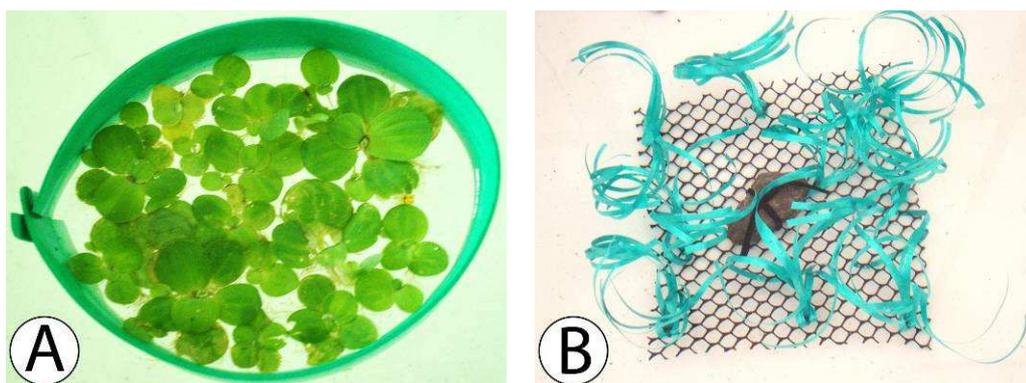


Figura 05: Caixas plásticas com substratos: (A) natural, aguapé e (B) artificial, *kakaban*

Para impedir que o primeiro substrato, aguapé (A), ficasse disperso nas caixas foram feitos pequenos círculos de borracha, com diâmetro de 15 cm, sendo que os mesmos ficaram restritos dentro da circunferência (Figura 5A).

Na tentativa de simular um substrato natural, o segundo substrato, *kakaban* (K), foi confeccionado com o auxílio de uma grade de plástico (20 x 20 cm), com fitilhos verdes de 20 cm de comprimento, em ramos de dez fitas distribuídas igualmente em três fileiras e três colunas (Figura 5B).

Os kinguios foram alimentados com ração comercial triturada, com proteína bruta de 40%, do fabricante Nicoluzzi Rações Ltda., Penha, Santa Catarina, *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 9h e 17h, conforme a metodologia preconizada por SILVA *et al.* (2006).

Duas vezes por semana as caixas plásticas foram limpas, por meio de sifonagem, retirando-se os excrementos e sobras de alimento do fundo. Esporadicamente, houve necessidade da troca dos aguapés uma vez que, os peixes se alimentavam também de suas raízes, restando somente folhas, pois, conforme FROESE e PAULY (2009) as plantas aquáticas fazem parte da dieta desses peixes.

Rotineiramente, pelas manhãs, os peixes foram observados para verificar a ocorrência de desovas. Em caso afirmativo, pôde-se observar que, parte dos ovócitos ficava aderida nos respectivos substratos ou nas paredes das caixas. Assim, a seguir, os dois substratos foram retirados, identificados de acordo com o número da caixa e remanejados para outra caixa, denominada de “caixa de eclosão”. O número de ovos foi estimado 12 a 24h pós-liberação sendo que estes apresentavam-se transparentes, denominados popularmente de “olhados” e, os não fertilizados, opacos (Figura 06).

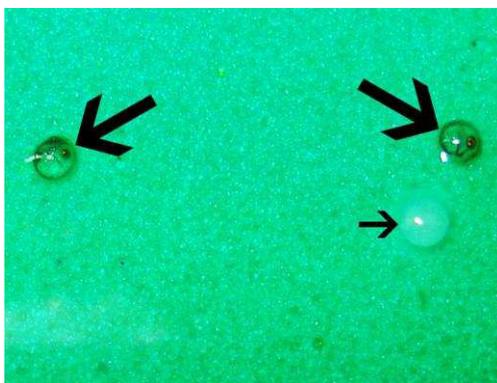


Figura 06: Ovos (seta maior) e ovócito não fertilizado (seta menor)

No mês de novembro de 2007, após observar a diminuição do número de desovas nas caixas na primeira quinzena, os machos foram retirados dos grupos, restando somente uma fêmea em sua respectiva caixa, e assim foram mantidas até o final do mês de novembro (durante 15 dias). Este procedimento é feito rotineiramente por produtores como forma de repouso para as fêmeas (SPESSATTO, *comunicação pessoal*).

No final do experimento (março de 2008), os peixes foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (2 g:150 mL) diluídos em 20 litros de água, sacrificados, pesados e medidos e, suas gônadas foram retiradas e pesadas. Fragmentos da porção mediana dos ovários e testículos foram fixados em formol tamponado (24h), transferidas para álcool 70º G.L. e, em seguida, submetidas às técnicas rotineiras para inclusão em parafina (Figura 07), cortados (5 µm) e corados por Hematoxilina-Eosina (HE).

Posteriormente, o material foi desidratado, diafanizado, montado entre lâmina e lamínula, com auxílio do Bálsamo do Canadá, seguindo as recomendações de ROMAGOSA (1998).



Figura 07: Porção mediana dos ovários de *Carassius auratus*

As diferentes fases de desenvolvimento dos ovócitos foram identificadas, com base nas mudanças estruturais como, surgimento e/ou modificações de estruturas celulares, transformações dos componentes protoplasmáticos e aspectos em geral, ocorridos durante o período reprodutivo, conforme metodologia preconizada por ROMAGOSA (1998). As fases do desenvolvimento dos ovócitos são as seguintes: cromatina-nucleolar, perinucleolar, alvéolo cortical, vitelogênese e maduro. E as fases de desenvolvimento dos folículos estão divididas em: pós-ovulatório e atrésico. No caso dos machos foram observadas as quatro fases: espermatogônia, espermatócito, espermátide e, por fim, espermatozoide (BLAZER, 2002). As lâminas foram visualizadas com o auxílio de microscopia de luz e fotomicrografadas no Laboratório de Endocrinologia de Peixes, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB 1), da Universidade de São Paulo, USP, SP.

Em seguida, para calcular a quantidade das diferentes fases de desenvolvimento dos ovócitos no final do período reprodutivo, foi padronizada uma pequena área circular ($5,12 \text{ mm}^2$) demarcada em uma lamínula, que era ficava sobreposta à lâmina com o corte do ovário. O aumento utilizado para a

contagem foi de 2,5 e as contagens feitas no próprio microscópio. O número total de campos selecionados foi de 40 para cada tipo de substrato, sendo que para cada fêmea foram selecionados dez cortes, aleatoriamente dez pequenas áreas, uma para cada fragmento dos ovários, perfazendo o total de quatro fêmeas por tipo de substrato (número total de campos = 80). Caso o ovócito não estivesse pelo menos 50% dentro do campo era excluído da contagem. Para evitar possíveis erros na quantificação, foi empregado o seguinte critério: ovócitos na fase I + II (cuja diferenciação não foi possível), fase I (cromatina-nucléolo), fase II (perinucleolar), fase III (alvéolo cortical), fase IV (início de vitelogênese), fase V (maduro), fase VII (folículo pós-ovulatório) e fase VII (atrésico). Nas duas primeiras fases (cromatina-nucléolo e perinucleolar), a estrutura visualizada foi o núcleo e a disposição dos nucléolos, entretanto, quando não foi possível observar estas estruturas, considerou-se ovócitos na “fase I + II”.

Para verificar se ocorreram diferenças significativas entre os valores foi utilizado o Teste “t” de *Student* ($\alpha = 0,05$) (ZAR, 2009).

Índice Gonado-Somático (IGS)

O índice gonado-somático foi expresso pela razão entre o peso das gônadas (Pg) e o peso total (Pt) de cada indivíduo, para ambos os sexos.

$$\text{IGS} = (\text{Pg} / \text{Pt}) \times 100$$

A seguir, foi calculado o IGS médio para os sexos separadamente, segundo metodologia de BJERSELIUS *et al.*, (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação dos valores médios do peso total, comparando-se os dados no início e no final do experimento, das fêmeas manteve-se praticamente constante nos aguapés, de $40,11 \pm 7,21$ e $40,48 \pm 6,89$ g (A). Entretanto, nos *kakabans* inicialmente o peso total foi, em média, de $44,82 \pm 10,03$, observando-se uma leve diminuição no término do experimento, $41,26 \pm 10,27$ g.

3.1. Desovas

As primeiras desovas, após a implantação do experimento, ocorreram entre 14 e 30 dias após a formação dos grupos experimentais. SHEI (2008), estudando a reprodução de *Elacatinus figaro* em laboratório, observou que as primeiras desovas ocorreram entre 24 e 31 dias. Este longo período provavelmente deve-se a aclimatação dos peixes no novo ambiente.

Neste estudo foi possível observar o comportamento de corte dos kinguios quando antecede a desova, onde o macho persegue a fêmea, nadando lado a lado, em meio aos substratos, movimentando as nadadeiras caudais em direção à superfície da água. Resultados semelhantes foram descritos por KOBAYASHI *et al.* (2002) com a mesma espécie.

O comportamento reprodutivo dos machos de kinguios foi descrito, minuciosamente, por BJERSELIUS *et al.* (2001) caracterizando-o em sete tipos de ações nos momentos que antecedem, ou mesmo durante a desova. Entre eles, destacam-se, perseguição curta (*short following*), perseguição longa (*long following*), o ato de empurrar (*pushing*), a corte, a desova, dentre outros. Antes da desova, grupos formados por machos “perseguem” as fêmeas, iniciando-se assim o contato físico, principalmente, na cavidade urogenital e região das brânquias, local de onde são liberados os feromônios (KOBAYASHI *et al.*, 2002), de perseguição curta quando o macho nada em direção à fêmea ou muito próximo a ela durante um período de no máximo 5 segundos. Os autores estipulam que quando o período de tempo é superior a 5 segundos ou à distância percorrida ultrapassa 1 metro caracteriza-se como perseguição longa.

Quando o macho nada paralelamente à fêmea e a empurra com seu corpo, forçando-a em direção ao substrato, local de desova, é o movimento conhecido como *pushing*. Conforme KOBAYASHI *et al.* (2002), este comportamento de perseguição é contínuo, até que a fêmea libere os ovócitos, pois, durante a ovulação, os ovócitos estimulam a síntese da prostagladina (PGF2 α), que através da corrente sanguínea atinge o cérebro e induz a receptividade das fêmeas. A desova tem início quando a fêmea movimenta-se até a vegetação subaquática, um ou mais machos entram na vegetação, nadando rapidamente, a fêmea libera os ovócitos e o macho libera o esperma. O comportamento reprodutivo das fêmeas continua até que todos os ovócitos sejam liberados, podendo ser 100 ou mais, com vários parceiros e mesmo durante algumas horas.

As desovas dos kinguios ocorreram durante a madrugada e no início da manhã, até, no máximo às 9h, porém não foi possível determinar a duração das desovas. De acordo com KOBAYASHI *et al.* (2002) o *goldfish* desova no período da madrugada ou no início da manhã como estratégia reprodutiva, pois a luz é mais restrita, minimizando a predação.

Entre as cinco fêmeas de cada substrato foram obtidas 109 posturas (A) e 70 (K), variando entre 18 e 26 (A) e 7 a 20 (K) posturas para cada fêmea (Tabela 01) ($P < 0,05$). ALVES (2007), estudando reprodução em laboratório de *Apistogramma cacatuoides*, verificou 88 desovas, variando de 1 a 12 desovas por fêmea, durante 37 meses de experimento. A figura 08 mostra que desde o início do experimento (setembro de 2007) até o final (março de 2008) houve um aumento do número de desovas, em ambos os tipos de substratos, porém, o número de desovas nos aguapés foi superior ao dos *kakabans*. O mês que ocorreu o maior número de desovas foi em janeiro de 2008, e no mês subsequente houve uma queda evidenciando-se o final do ciclo reprodutivo. Em março o número de desovas mostrou-se praticamente constante, entretanto os ovos apresentavam-se inviáveis (não fertilizáveis), o mesmo foi constatado por BEACH (1959), onde o *goldfish* desovou durante a primavera e o início do verão.

Tabela 01: Número total de desovas e de ovócito liberados durante o experimento

Meses	Número de Desovas		Ovócitos Liberados	
	Aguapé	Kakaban	Aguapé	Kakaban
Setembro	14	6	605	1004
Outubro	16	8	448	1572
Novembro	2	1	67	44
Dezembro	21	10	685	749
Janeiro	29	21	837	2590
Fevereiro	13	12	386	904
Março	14	12	270	509
TOTAL	109	70	3298	7372

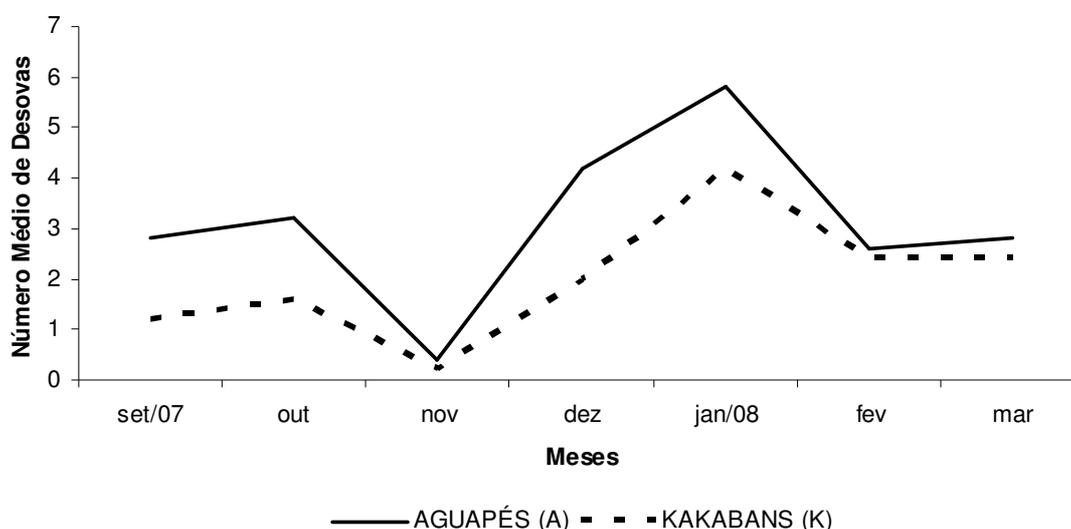


Figura 08: Número de desovas durante o experimento

O total de ovócitos liberados por fêmea por postura variou de 4 a 97 (A) e 8 a 716 (K). Ao longo dos sete meses de experimento o número total de ovócitos liberados por cada fêmea foi de 509 a 815 (A) e 326 a 3.240 (K) ($P < 0,05$). ALVES (2007) observou, em *A. cacatuoides*, o número de ovócitos liberados por fêmea em cada desova de 45 a 306, e a fecundidade total, nos 37 meses de experimento variou de 95 a 1.410 ovócitos. A fecundidade da carpa-comum variou de 100.000 a 300.00 ovos·kg⁻¹ em um ciclo por ano, podendo ocorrer até cinco desovas por ano, entretanto, a fecundidade diminuiu, cerca de 50.000 ovos·kg⁻¹ (LINHART *et al.*, 1995). No mês de janeiro de 2008 foram registrados os maiores valores de fecundidade nos aguapés (Figura 09), entretanto, a fecundidade nos *kakabans* apresentou duas modas bem definidas, em outubro e janeiro de 2008, mês onde mostrou-se mais elevada.

Pode-se observar um aumento da fecundidade dos meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008, provavelmente isto atribui-se à recuperação das fêmeas no mês anterior.

É importante salientar que os peixes das caixas com os aguapés se alimentavam das raízes dos aguapés, podendo ocasionalmente terem se alimentado também dos ovos, mascarando assim a contagem, pois conforme FROESE e PAULY (2009) as plantas aquáticas fazem parte da dieta dos kinguios.

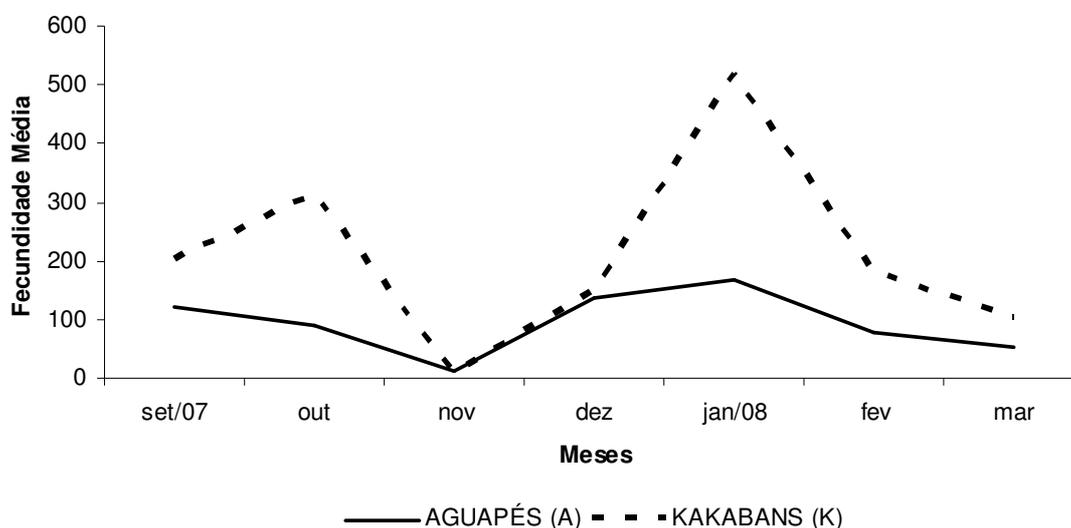


Figura 09: Fecundidade dos kinguios, *C. auratus*, durante o experimento

O intervalo entre as desovas variou de 1 a 46 dias (A) e 1 a 86 dias (K). O intervalo entre as desovas dos kinguios mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os substratos, as fêmeas que foram mantidas nas caixas com aguapés desovaram, em média, em um intervalo de 8 dias e, as dos *kakabans* de 13 dias. O intervalo entre as desovas de *A. cacatuoides* foi de 27 a 207 dias (ALVES, 2007). Segundo MCEVOY e MCEVOY (1992) pouco se sabe sobre a regulação do intervalo entre as desovas, mas parece que estão relacionadas à temperatura da água e, também, ao comportamento de corte dos machos. Os machos das caixas plásticas com os aguapés mostravam-se mais agressivos e com o comportamento reprodutivo de perguição mais evidente. Mudanças no

meio, como o tipo de substrato, por exemplo, tendem a aumentar a competição entre os machos de *Pimephales promelas* (Cyprinidae) (BESSERT *et al.*, 2007). BIENIARZ *et al.* (1979) afirmam que não existe relação entre a temperatura da água e o momento das ovulações de carpas. Neste experimento parece não ter havido relação entre o número de desovas e a temperatura da água, bem como entre os intervalos das desovas que mostraram-se distintos, pois a temperatura da água que abastecia as caixas do laboratório, em ambos sistemas, foi $T = 23 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

Neste estudo provavelmente o tipo de substrato parece ter influenciado nas desovas dos kinguios, porém não pode-se afirmar ao certo por qual razão, as mesmas dúvidas foram salientadas por BESSERT *et al.* (2007).

3.2. Ovários

Os ovários de *Carassius auratus* são órgãos bilaterais, alongados, localizados na cavidade peritoneal, dorsalmente ao intestino e ventralmente à bexiga natatória. Em uma das extremidades possui um oviduto, formando um único ducto que desemboca no orifício urogenital. Quando no início do ciclo reprodutivo os ovários possuem aspecto levemente laminar e ao aproximar-se da época reprodutiva tornam-se cilíndricos. São praticamente do mesmo tamanho, de consistência flácida, superfície irregular, sendo os ovócitos de coloração rósea-translúcida à amarelada, gradualmente com a evolução do desenvolvimento maturacional (Figura 10), semelhante a outros ciprinídeos (SELMAN *et al.*, 1993).



Figura 10: Ovários de *Carassius auratus* (fase madura)

Histologicamente, esses ovários encontram-se envoltos por uma fina camada de tecido conjuntivo, que constitui a túnica ovariana ou albugínea, emitindo projeções para o interior do órgão, formando septos ou lamelas. As lamelas ovulíferas contêm células germinativas nas diferentes fases de maturação, organizadas de maneira aleatória. Observam-se também, folículos pós-ovulatórios (FPO), indicando a ocorrência de desova anterior e folículos atrésicos (degeneração ovocitária).

3.2.1. Ovogênese

A ovogênese dos kinguios ocorre de uma forma semelhante a de outros teleósteos, sendo um processo bastante complexo (BEACH, 1959) que além dos eventos relacionados com a mitose e meiose, uma série de modificações ao nível nuclear, o surgimento de organelas citoplasmáticas e acúmulo de inclusões e a formação do envoltório ou envelope folicular.

Neste trabalho o desenvolvimento ovocitário dos kinguios ocorreu com o crescimento dos ovócitos em duas etapas, primário e secundário. O crescimento primário inclui duas fases, denominadas cromatina-nucleolar e perinucleolar, e o crescimento secundário, em outras três fases, alvéolo cortical, vitelogênese e madura. A seguir, a ovulação envolve uma série de etapas como, ovócito liberado, folículo pós-ovulatório e atrésico (Figura 11A), segundo classificação utilizada por ROMAGOSA (1998).

(I) Ovócito na Fase de Cromatina-nucléolo

O núcleo ou vesícula germinativa possui formato arredondado e localiza-se na região central do citoplasma. Os nucléolos (geralmente um ou dois) estão no centro do núcleo. O citoplasma possui grande afinidade com o corante, basófilo. A célula possui formato poligonal, suas membranas são visíveis, no entanto, bem delgadas (Figura 11B). Esta fase ocorre de maneira similar à descrita por BEACH (1959) com a mesma espécie de peixe.

(II) Ovócito na Fase Perinucleolar

É caracterizada pelo final da fase de crescimento primário, onde os ovócitos permanecem inativos até o próximo ciclo reprodutivo, quando são recrutados para a fase de crescimento secundário, surgindo os alvéolos corticais e os grânulos de vitelo (BEACH, 1959; ROMAGOSA, 1998). Nesta fase o núcleo é redondo e central, grande em relação ao citoplasma, com abundância de nucléolos (cinco a quatorze) que se localizam na região periférica do núcleo. Essas mesmas características foram encontradas por BEACH (1959). Segundo ROMAGOSA (1998), o tamanho e número de nucléolos variam de acordo com a estratégia reprodutiva adotada pela espécie, pois seu papel está associado na síntese protéica e transição de RNA. O citoplasma possui coloração menos intensa que na fase anterior (fase I). Apresenta fina membrana externa envolvendo o ovócito (Figura 11C).

(III) Ovócito na Fase de Alvéolo Cortical

O início do crescimento secundário é característica desta fase, onde o núcleo perde a forma circular, ocorre a formação de estruturas denominadas de alvéolos corticais na periferia da célula, de aspecto vacuolado, esféricas, não coradas. Os ovócitos são de maior tamanho se comparados aos da fase anterior. São visíveis também células foliculares externamente ao ovócito (Figura 11D e E). A ocorrência de ovócitos nesta fase também foi descrita por BEACH (1959).

(IV) Ovócito na Fase de Vitelogênese

Esta fase diferencia-se pelo início do processo de vitelogênese, onde as células apresentam formato arredondado, de maior tamanho e possuem início da formação de grânulos de vitelo no citoplasma e presença da zona radiata (fina). A zona radiata de carpa-comum, *C. carpio*, é sintetizada nos ovários, diferindo da maioria dos teleósteos que a sintetizam no fígado, porém este mecanismo durante a maturação dos ovócitos em teleósteos ainda não é claro (MODIG *et al.*, 2007). Os grânulos de vitelo apresentam formato arredondado, o núcleo apresenta-se central (Figura 11F). Essas descrições são semelhantes às de BEACH (1959). GLASSER *et al.* (2003), com carpa-capim,

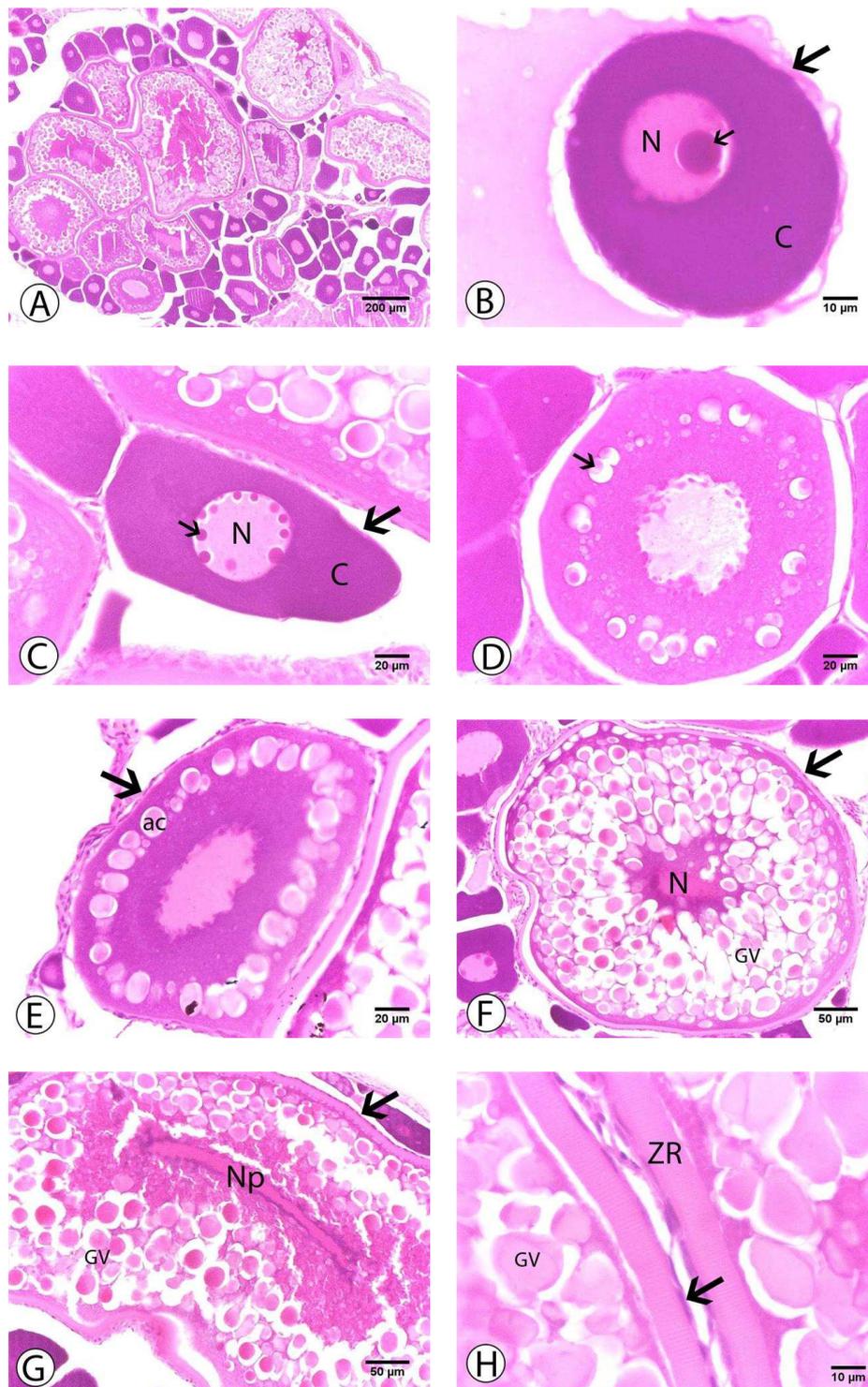


Figura 11: Ovócitos de *C. auratus*. A. Vista geral; B. Cromatina-núcleo (núcleo = N; citoplasma = C, membranas = seta maior); C. Perinucleolar (núcleo = N; citoplasma = C; membranas = seta maior); D. Alvéolo cortical (seta); E. Alvéolo cortical (= ac; membranas = seta); F. Vitelogênese (núcleo = N; grânulos de vitelo = GV; membranas = seta); G. Maduro (núcleo periférico = Np; grânulos de vitelo = GV; membranas = seta); H. Envoltório folicular (grânulos de vitelo = GV; zona radiata = ZR; camada folicular = seta)

Ctenopharyngodon idella, constatam que na maioria dos casos a vitelogênese durou cerca de 20 dias, porém, algumas fêmeas permaneceram na fase de início de vitelogênese durante várias semanas.

(V) Ovócito Maduro

São as maiores células nos ovários, o seu núcleo se posiciona, geralmente na parte central do citoplasma, porém, quando em estágio mais avançado de desenvolvimento a membrana nuclear desaparece e o material nuclear se dispersa pelo citoplasma, raramente encontra-se fragmentos de nucléolos, semelhante às características descritas por BEACH (1959). Conforme BEACH (1959) e YARON (1995), nas carpas a maturação final dos ovócitos ocorrem pouco tempo antes da ovulação, quando a vesícula germinativa migra para o polo animal e o mesmo foi observado para kinguios (Figura 11G). Pode-se visualizar grânulos de vitelo de diferentes formas, arredondados, elípticos, semelhantes a relatados por SELMAN *et al.* (1993) para ciprinídeos. A zona radiata torna-se mais espessa do que na fase anterior (Figura 11H).

Ovócitos maduros são abundantes no período da reprodução dos kinguios, sendo evidentemente absorvidos no outono (BEACH, 1959). Em carpa-capim, *Ctenopharyngodon idella*, o período do estágio final de vitelogênese varia bastante, podendo durar algumas semanas ou poucos dias, em seguida evoluindo para estágio de ovócito atrésico (GLASSER *et al.*, 2003).

(VI) Folículo Pós-Ovulatório (FPO)

O FPO é identificado através da presença das membranas formadas pelas células foliculares (granulosa) e teca, que se apresentam dobradas e contorcidas (Figura 12A). Quando é eliminado, o ovócito leva consigo a zona radiata, restando somente camadas de células foliculares e pode-se observar o lume (Figuras 12A – D). Esta camada se contrai e, segundo ROMAGOSA (1998) será invadida por células fagocitárias do estroma ovariano, sendo então absorvida.

(VII) Folículo Atrésico

Os ovócitos em processo de degeneração dos kinguios possuem contorno celular irregular, apresentando invaginações do citoplasma, há, portanto, uma desorganização citoplasmática causada pela liquefação do mesmo. Os grânulos de vitelo se tornam maiores e alongados e se fundem. São visíveis a zona radiata e as células foliculares. Características muito similares às descritas por ANDRADE (1992).

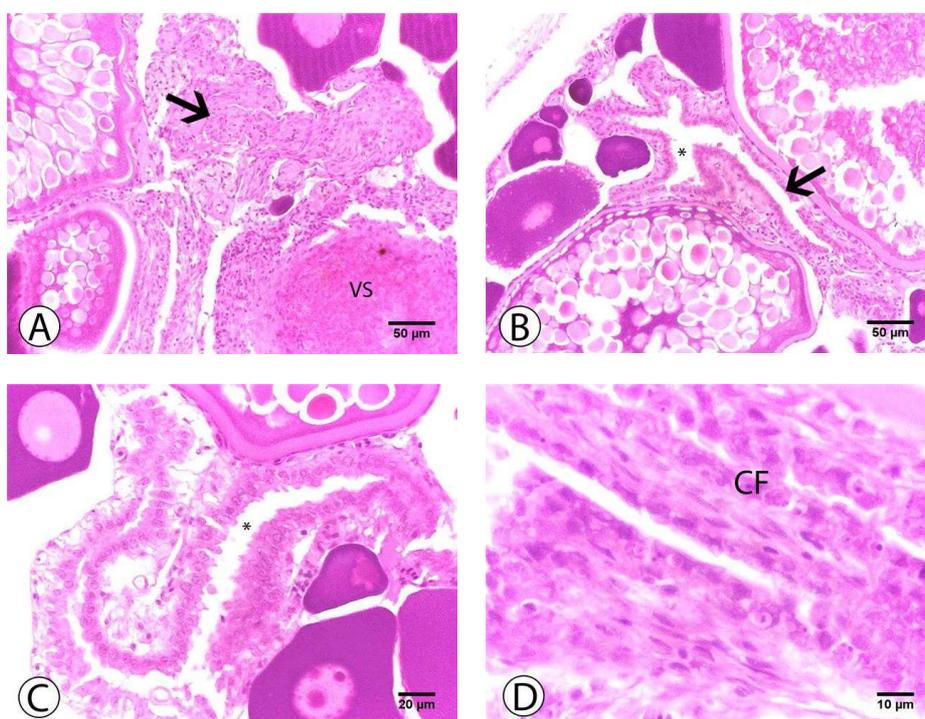


Figura 12: Folículos pós-ovulatórios (FPO) de *C. auratus*. A. enovelados (setas; vaso sanguíneo = VS); B. cordão irregular de células foliculares (seta) e lume vazio (*); C. reentrâncias e redução do lume (lume = *); D. camadas foliculares (= CF)

No caso dos kinguios pode-se observar ovócitos em três fases: inicial, intermediária e final, descritas por VOLODIN *et al.* (1974), ANDRADE (1992); ROMAGOSA *et al.* (1993), BLAZER (2002) e LEONARDO *et al.* (2006). ANDRADE (1992) divide a atresia folicular em três fases: (a) inicial, o ovócito perde o formato arredondado, tornando-se levemente ondulado e os grânulos de vitelo tornam-se heterogêneos; (b) intermediária, células foliculares atrofiadas, zona radiata fragmentada e ausência de estriações radiais; (c) final, células foliculares e as da teca desaparecem, restando um aglomerado de

grânulos com pigmentos castanho-amarelados, e entre eles, núcleos picnóticos. Estas características foram também observadas nos ovócitos atresícos dos kinguios deste experimento adotando-se a mesma escala (Figuras 13A – D).

Pode ocorrer também o processo de reabsorção em folículos imaturos, sendo geralmente rápido, apresentando como característica a hipertrofia da zona granulosa, sendo bastante comum nos kinguios durante todo o ano, porém, mostrando-se mais evidente ao final do verão (BEACH, 1959).

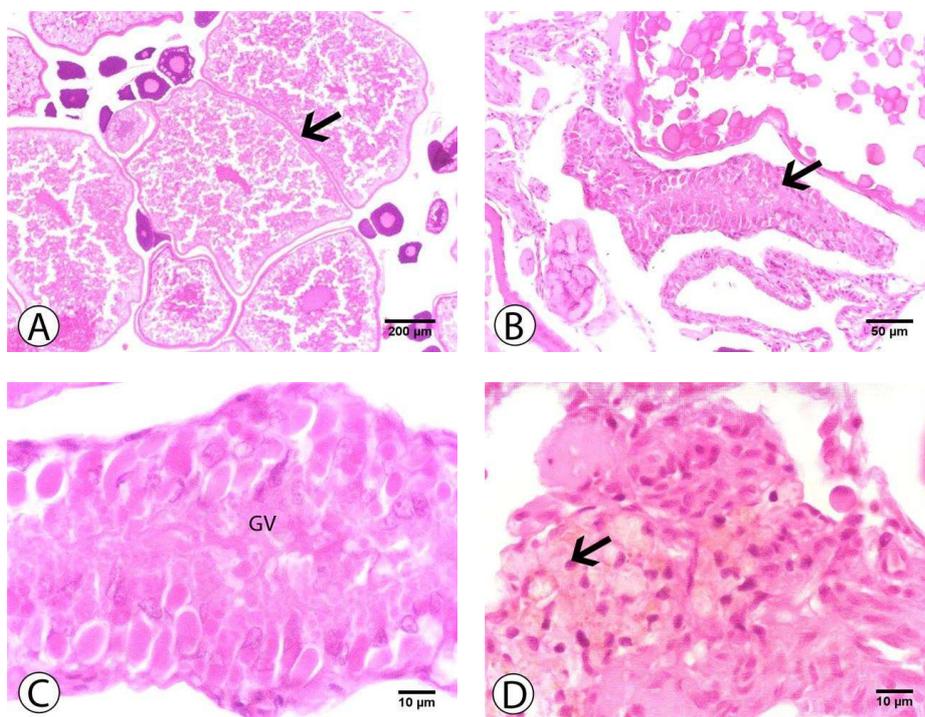


Figura 13: Ovócitos atresícos de *C. auratus*. A. Inicial (seta); B. Intermediária (seta); C. Detalhe da figura anterior; D. Final, presença de núcleos picnóticos (seta)

A reabsorção dos folículos atresícos varia de acordo com a espécie de peixe, VOLODIN *et al.* (1974), em estudos realizados com uma espécie semelhante à carpa, da família Cyprinidae, mostraram que ocorreu em 1,5 a 2 meses, à temperatura de 15°C. A reabsorção está praticamente completa até a metade do verão. BIERNIARZ *et al.* (1979), estudando carpas, observaram que após um período de quatro semanas pós-desova a reabsorção dos ovócitos vitelogênicos está completa, refletida na diminuição da porcentagem de ovócitos maduros e no aumento da porcentagem dos ovócitos imaturos.

3.2.2. Quantificação

Os ovócitos das “fases I + II”, em que a diferenciação não foi possível, entretanto, apresentou valores médios de $14,62 \pm 7,57$ (A) e $9,92 \pm 5,87$ (K) ($P < 0,05$). Estas duas primeiras fases representam valores superiores a 50% dos ovócitos estimados, 64% (A) e 58% (K) (Figura 14). Na fase cromatina-nucléolo o número de ovócitos foi superior nas fêmeas dos aguapés, $3,15 \pm 2,59$ (A) e $2,0 \pm 0,8$ (K), mostrando diferenças significativas ($P < 0,05$) (Figura 14). Comparando-se quantitativamente o número de ovócitos da fase II, perinucleolar, em relação aos dois substratos pode-se verificar que ocorreram diferenças significativas ($P < 0,05$), $9,87 \pm 4,97$ (A) e $5,98 \pm 4,57$ (K) (Figura 14). Este grande número de ovócitos, de acordo com BIENIARZ *et al.* (1979), em carpas, está relacionado a um desenvolvimento gradual durante o processo de reabsorção dos ovócitos no final da vitelogênese, no qual o estoque de ovócitos vai sendo progressivamente substituído por ovócitos nos estádios menos avançados de desenvolvimento.

Diferenças significativas foram verificadas quanto ao número de ovócitos da fase alvéolo cortical ($P < 0,05$) em ambos os substratos, $3,92 \pm 1,96$ (A) e $2,28 \pm 1,86$ (K) (Figura 14).

A fase de vitelogênese mostrou diferenças significativas entre a quantidade de ovócitos nos diferentes substratos ($P < 0,05$), $3,62 \pm 2,03$ (A) e $2,4 \pm 1,57$ (K) (Figura 14).

Estatisticamente, diferenças significativas foram encontradas na quantidade de ovócitos maduros presentes nos aguapés ou *kakabans* ($P < 0,05$), $2,2 \pm 1,39$ (A) e $3,04 \pm 1,09$ (K), única fase em que o número de ovócitos foi superior no substrato do tipo *kakaban* (Figura 14)

Também apresentaram diferenças significativas entre o número de FPO nos diferentes sistemas ($P < 0,05$), sendo mais numerosos nos aguapés, $4,67 \pm 3,06$ (A) e $1,78 \pm 1,42$ (K). Esperava-se essa diferença, pois, durante o

experimento, as fêmeas que estavam com o substrato natural (A) desovaram com maior frequência do que a dos *kakabans*, em menor intervalo de tempo (Figura 14).

A quantidade de ovócitos atrésicos nos dois substratos não apresentou diferenças significativas $1,17 \pm 0,93$ (A) e $1,28 \pm 1,11$ (K) ($P > 0,05$), pois, conforme BEACH (1959) o processo de reabsorção dos folículos é evidente no final do verão em *Carassius auratus*. Segundo GLASSER *et al.* (2003), em experimentos realizados com carpa-capim, *Ctenopharyngodon idella*, os ovários no estágio final de vitelogênese apresentaram constantemente ovócitos atrésicos (Figura 14).

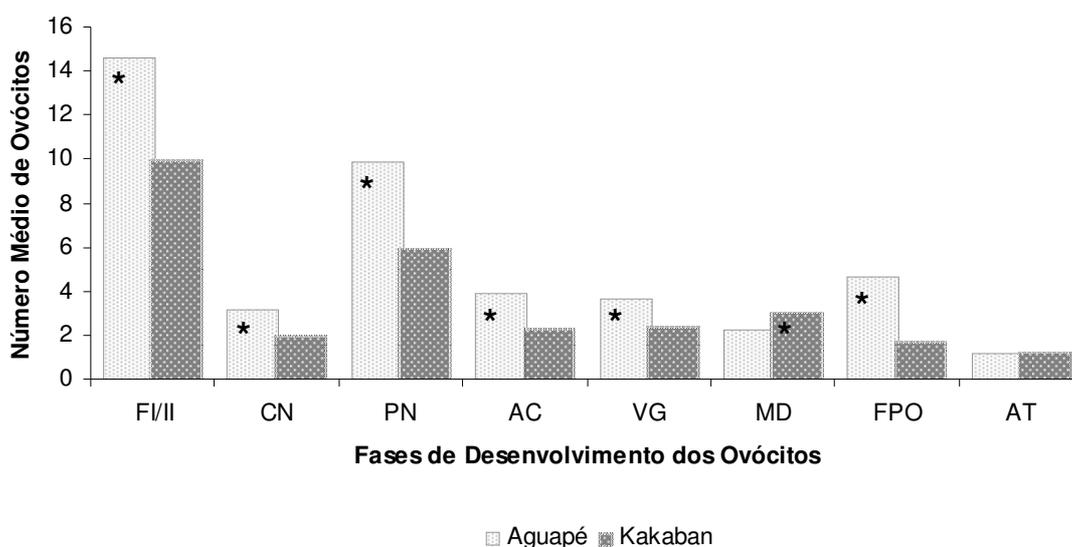


Figura 14: Quantificação das diferentes fases de ovócitos nos diferentes substratos, aguapés e *kakabans*, durante o experimento (F/II = ovócitos na fase de cromatina-nucléolo ou fase perinucleolar cuja diferenciação não foi possível, CN = cromatina-nucléolo, PN = perinucleolar, AC = alvéolo cortical, VG = vitelogênese, MD = maduro, FPO = folículo pós-ovulatório e AT = atrésico) * $P < 0,05$

No final deste experimento, as taxas de fertilização diminuíram abruptamente pelo fato de que as fêmeas já se encontravam no início do processo de regressão ovariana. Pode-se também observar que não ocorria mais a fertilização dos ovócitos, o que a princípio nos parecia que a produção de espermatozoides havia cessado. Porém, a análise histológica mostrou que os testículos apresentavam-se ainda repletos de espermatozoides ao final do

experimento (março de 2008), confirmando que os ovócitos se encontravam em fase de atresia, sendo portanto, inviáveis, impossíveis de serem fecundados (Figura 14). Segundo COLE *et al.* (1999), os machos de *goldfish* estão aptos à fertilização uma vez que as fêmeas estejam receptivas e MAÑANÓS *et al.* (2009) acreditam que a espermição em carpas foi observada o ano inteiro.

3.3. Testículos

Os testículos de *Carassius auratus* são órgãos pares, do mesmo tamanho, alongados com pequenas ondulações nas bordas e situados na cavidade peritoneal no sentido látero-ventralmente à bexiga natatória, convergem na extremidade caudal, os seus ductos espermáticos se unem no orifício urogenital (Figura 15), semelhante aos testículos de carpa-comum (YARON, 1995). Sua tonalidade durante a época de reprodução é branco-leitosa (ROSA *et al.*, 1994).



Figura 15: Macho de *Carassius auratus* (testículos na fase madura)

Histologicamente, os testículos desta espécie apresentam inúmeros túbulos seminíferos com cistos espermáticos em seu interior. Os túbulos são enovelados e revestidos na parte interna por células císticas (Sertoli) que, por sua vez, envolvem as células espermatozóides, formando um cisto. O diâmetro, assim como o lume dos túbulos seminíferos é variado, características descritas por YARON (1995) em carpas.

O processo de espermatogênese pode ser dividido em três fases: (1) proliferação mitótica das espermatogônias; (2) divisão meiótica dos espermatócitos, e (3) a transferência de espermátides haplóides com flagelo (espermiogênese) (MAÑANÓS *et al.*, 2009). Assim o desenvolvimento das células germinativas masculinas diferenciam-se em: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e, por fim, espermatozoides (BLAZER, 2002), fases estas que também foram observadas nos machos deste experimento.

As espermatogônias (fase I) são as células de maior tamanho dentro dos testículos e ocorrem ao longo dos túbulos seminíferos, possuem núcleo central, citoplasma abundante e pouca afinidade com o corante. São circundadas pelo citoplasma das células císticas (Sertoli), que conforme BLAZER (2002), sua função, assim como, nos mamíferos, é de fagocitar corpos residuais e fragmentos celulares. Quando presentes, as espermatogônias estão próximas às bordas dos túbulos seminíferos.

Os espermatócitos originam-se das espermatogônias por mitose, são células esféricas, menores que as espermatogônias, possuem grande núcleo se comparado ao tamanho do citoplasma, a cromatina está sob a forma de grânulos, ocorrem em cistos e possuem pouca afinidade com o corante. Estas células estão presentes nos testículos de kinguios e em grandes quantidades.

As espermátides de kinguios são relativamente menores que os espermatócitos, e pelo processo de espermiogênese estas células se transformam em espermatozoides. Estas células não se encontravam em grandes quantidades.

Os espermatozoides são as menores células dos testículos, se coram fortemente e podem ser vistas no lume dos túbulos seminíferos. Os espermatozoides encontram-se presentes em grande quantidade (Figura 16), assim como BLAZER (2002) determina, que em fase de espermatogênese avançada há o predomínio de espermatozoides. Além do que sabe-se que, a espermiogênese e a produção de líquido espermático aumentam com a

presença de fêmeas de carpas em maturação, quando confinados, isto devido à produção feromônios (BROMAGE e ROBERTS, 1995).

Estruturalmente, os testículos de kinguios podem ser classificados como tubulares, comum na maioria dos teleósteos (MAÑANÓS *et al.*, 2009). Neste tipo, os espermatócitos estão distribuídos ao longo dos testículos, sendo irrestritos (ROMAGOSA, 1998).

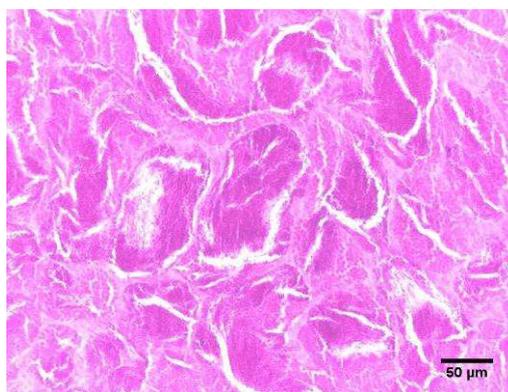


Figura 16: Vista geral dos testículos de kinguios, *Carassius auratus*, repleto de espermatozóides

3.4. Índice Gonado-Somático (IGS)

Segundo ROMAGOSA (1998), o IGS é uma ferramenta bastante útil que auxilia na definição da escala de maturação gonadal e, que mede o grau de desenvolvimento das gônadas, onde os maiores valores do IGS indicam a máxima atividade reprodutiva.

Comparando-se os valores médios do IGS das fêmeas ($7,73\% \pm 2,06$) e machos ($4,31\% \pm 1,03$) mostraram diferenças estatísticas significativas entre os sexos ($P > 0,05$). BJERSELIUS *et al.*, (2001) evidenciaram no final da época reprodutiva, valores do IGS de matrizes de kinguios com 24 meses de idade, fêmeas ($6,03 \pm 1,05$) e machos ($3,64 \pm 0,35$), valores inferiores quando comparados aos deste estudo. Deve-se salientar que, os kinguios deste experimento encontravam-se com 18 meses de idade.

Considerando-se os dois substratos utilizados as fêmeas apresentaram valores médios do IGS de $7,07 \pm 1,73\%$ (A) e $8,26 \pm 2,34\%$ (K), respectivamente. Constatou-se que os valores de IGS das fêmeas (K) foi ligeiramente superior aos das fêmeas (A), podendo estar relacionada com o maior número de ovócitos maduros (K) ($P > 0,05$), acredita-se estar aliada também à frequência de desovas ocorridas, assim como OLSÉN *et al.* (2006) sugerem em carpa (*Carassius carassius*).

No caso dos machos de kinguios os valores médios de IGS foram $4,48 \pm 1,34$ (A) e $4,14 \pm 0,62$ (K) em ambos os sistemas, não apresentando diferenças significativas ($P > 0,05$). Resultados semelhantes para os dois substratos atribui-se a produção contínua de células germinativas masculinas durante o período reprodutivo. Na figura 16 observam-se espermatozoides corados e livres no lume dos túbulos seminíferos. Conforme FRASER e STACEY (2002) não há correlação entre o peso do indivíduo e o volume de sêmen produzido, e ainda, que a produção de sêmen em *goldfish* não é simplesmente a consequência da maturação dos testículos, porém, também, é um fator regulado pela interação social entre os peixes.

4. CONCLUSÕES

Para os kinguios, *Carassius auratus*, mantidos em condições laboratoriais, foi possível formular que:

- O substrato artificial do tipo *kakaban* mostrou-se mais eficiente do que o natural, aguapé, pois os valores de fecundidade média foram superiores, refletindo em um maior lucro para o produtor;
- As análises dos valores médios do IGS, para fêmeas e machos, aliadas à quantificação dos ovócitos nas diferentes fases de desenvolvimento no final do período reprodutivo indicou que estão aptos à reprodução de setembro a fevereiro.

4.1. Perspectivas Futuras

- Repetir o experimento com n amostral maior;
- Calcular o Fator de Condição k , como ferramenta de investigação do bem-estar dos animais entre os dois substratos;
- Uma vez que o *kakaban* se mostrou mais eficiente, repetir o mesmo experimento, porém, utilizá-lo em posições diferenciadas (superfície e submerso);
- Calcular as taxas de fertilização, eclosão, número de larvas e sua sobrevivência;
- Testar os parâmetros acima citados em outras variedades de kinguios.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, F. 2007 *Reprodução e desenvolvimento larval do “ciclídeo-anão amazônico”, **Apistogramma cacatuoides**, Hoedeman, 1951 (Perciformes: Cichlidae) em laboratório*. São Paulo. 81p. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Instituto de Pesca, IP.

ANDRADE, E.F. 1992 *Fases de degeneração ovocitária e absoeção dos folículos pós-ovulatórios de curimatá **Prochilodus scrofa** (Steindachner, 1881), mantido em confinamento*. Maringá. 49p. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Fundação Universidade Estadual de Maringá, UEM.

APPELT, C.W. e SORENSEN, P.W. 2007 Female goldfish signal spawning readiness by altering when and where they release a urinary pheromone. *Animal Behavior*, 74: 1329-1338.

ARUKWE, A. 2001 Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8): 643-655.

BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E; BORELLA, M.I. 2006 The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium: na approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* 96: 116-132

BAZZOLI, N. 2003 Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho HP, Godinho AL (Org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.291-306.

BEACH, A.W. 1959 Seasonal changes in the cytology of the ovary and of the pituitary gland of the goldfish. *Canadian Journal of Zoology*, 37: 615 – 625.

BESSERT, M. L.; BROZEK, J.; ORTÍ, G. 2007 Impact of nest substrate limitations on patterns of illegitimacy in the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Journal of Heredity*, 98 (7): 716 – 722.

BIENIARZ, K.; EPLER, P.; THUY, L.; KOGUT, E. 1979 Changes in ovaries of adult carp. *Aquaculture*, Amsterdam, 17: 45-68.

BJERSELIUS, R.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; OLSÉN, H.; MAYER, I.; DIMBERG, K. 2001 Male goldfish reproductive behavior and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. *Aquatic Toxicology*, 53: 139-152.

BLAZER, V.S. 2002 Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 85-101.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. 1995 Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, Amsterdam, 129: 95-112.

BRASIL. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. 2009 Disponível em: <<http://tuna.seap.gov.br/seap/html/aquicultura/indez.htm/>>, acessado em 8 de abril de 2009.

BROMAGE, N.R. e ROBERTS, R.J. 1995 *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge: Blackweel Science. 424p.

CHAVES, P.T.C. e VAZZOLER, A.E.A.M. 1984 Aspectos biológicos de peixes amazônicos. II Anatomia microscópica de ovários, escala de maturidade e tipo de desova das espécies do gênero *Semaprochilodus*. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 44 (3): 347 – 359.

COLE, B.; KOTOL, P.; HARING, 1999 M. Spawning and production of the lemon tetra *Hyphessobrycon pulchripinnis*. *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture*.

COLE, B. e HARING, M. 1999 Spawning and production of the serpae tetra, *Hyphessobrycon serpae*. *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication*, 138.

FAO 2009 (Organización de las Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación). **El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura**. Roma, 2009.

FRASER, E.J. e STACEY, N. 2002 Isolation increases milt production in goldfish. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 511 – 524.

FROESE, R. e PAULY, D. 2009 FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (04/2009). Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=271&genusname=Carassius&speciesname=auratus+auratus/>>, acessado em 26 de março de 2009.

GANECO, L.N.; NAKAGHI, L.S.O.; URBINATI, E.C.; DUMONT NETO, R.; VASQUES, L.H. 2001 Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27 (2): 131 – 138.

GLASSER, F.; CAUTY, C.; MOUROT, B.; BRETON, B. 2003 Disrupted sexual cycles in female grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) raised in tropical conditions. *Aquaculture*, Amsterdam, 220: 857-868.

- GODINHO, H.P. 2007 Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 31(3): 351-360.
- GRIER, H.J. 1981 Cellular organization of testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-357.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.F.; LEATHERLAND, J.F; de VLAMING, V.L. 1980 Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.*, Philadelphia, 159: 331-345.
- GRIER, H.J e PARENTI, L.R. 1994 Reproductive biology and systematics of phallostethid fishes as revealed by gonad structure. *Environ. Biol. Fishes*, 41: 287-299.
- GURAYA, S.S. 1986 *The cell and molecular biology of fish oogenesis*. Monographs in Development Biology H. W. SAUER (ed.) Karger, Basel, 223p.
- KRAUSS, G.; TOMKIEWICZ, J.; DIELMANN, R.; KÖSTER, F.W. 2008 Seasonal prevalence and intensity of follicular atresia in Baltic cod *Gadus morhua callarias* L. *Journal of Fish Biology*, 72: 831-847.
- KOBAYASHI, M.; SORENSEN, P.W.; STACEY, N.E. 2002 Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 71-84.
- LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. 2006 Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arquivos da Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(5):831-840.
- LI, C.; LEE, S.; KIM, S.; KIM, A.; LEE, K.W.; LU, M.; KIM, H.; KWAK, I.; LEE, Y.; KIM, D.; LEE, J.; KANG, S.; HUH, M.; CHUNG, K.; PARK, J. 2008 Environmental estrogenic effects and gonadal development in wild fish goldfish (*Carassius auratus*). *Environ Monit Assess*.
- LIMA, A.O. 2003 Aquicultura Ornamental: o potencial de mercado para algumas espécies de peixes ornamentais: formas alternativas de diversificação da produção na aquicultura brasileira. *Panorama da Aquicultura*, 78.
- LIMA, A.O., BERNARDINO, G., PROENÇA, C.E. 2001 Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. *Panorama da Aquicultura*, 65.
- LINHART, O.; KUDOB, S.; BILLARD, R.; SLECHTAD, V.; MIKODINA, E.V. 1995 Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture*, 129: 75 – 93pp.

LISTER, A.; NERO, V.; FARWELL, A.; DIXON, D.G.; VEN DER KRAAK, G. 2008 Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Aquatic Toxicology*, 87: 170-177.

MAÑANÓS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRAEZ, P. (Ed.) *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. Espanha, 2009. p.3-80.

MARLATT, V.L.; MARTYNIUK, C.J.; ZHANG, D.; XIONG, H.; WATT, J.; XIA, X.; MOON, T.; TRUDEAU, V.L. 2008 Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17 β -estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 238: 38-48.

MATSUDA, K.; NAKAMURA, K.; SHIMAKURA, S.; MIURA, T.; KAGEYAMA, H.; UCHIYAMA, M.; SHIODA, S.; ANDO, H. 2008 Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and Behavior*.

MCEVOY, L.A. e MCEVOY, J. 1992 Multiple spawning in several commercial fish species and its consequences for fisheries Management, cultivation and experimentation. *Journal of Fish Biology*, 41: 125-136.

MENEZES, M.S.; TAKEUTI, D.F.; ARANHA, J.M.; VERANI, J.R. 2000 Desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas de *Pseudotothyris obtusa* (Ribeiro, 1911) (Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 29: 89-100.

MODIG, C.; WESTERLUND, L.; OLSSON, P.E. 2007 Oocyte zona pellucida proteins (113 – 140pp) Editors BABIN, P. J.; CERDÁ, J.; LUKZENS, E. 2007 The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications. Springer, Holanda, 483pp.

MOJICA, C.A.P. 2007 *Morfologia Testicular e Estrutura da Espermatogênese em Peixes Ornamentais Tetra Negro, **Gymnocorymbus ternetzi**; Tetra Amarelo, **Hyphessobrycon bifasciatus** e Mato Grosso, **Hyphessobrycon eques** (teleostei, Characiformes)*. Jaboticabal. 76p. (Tese de Doutorado em Aqüicultura, UNESP).

NADZIALEK, S.; SPANÒ, L.; MANDIKI, S.N.M.; KESTEMONT, P. 2008 High doses of atrazine do not disrupt activity and expression of aromatase in females gonads of juvenile goldfish (*Carassius auratus* L.). *Ecotoxicology*.

NATHANAEL, S. e EDIRISINGHE, U. 2001 Abundance and aspects of the reproductive biology of common carp *Cyprinus carpio* in a upland reservoir in Sri Lanka. *Asian Fisheries Science*, Philippines, 14: 343-351.

OLSÉN, K.H.; SAWISKY, G.R.; STACEY, N.E. 2006 Endocrine and milt responses of male crucian carp (*Carassius carassius* L.) to periovulatory

females under field conditions. *General and Comparative Endocrinology*, 149: 294-302.

PATIÑO, R. e SULLIVAN, C.V. 2002 Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. *Fish. Physiol. Bioch.*, 26: 57-70.

PEREIRA, R. 1979 *Como cuidar de seu aquário*. Rio de Janeiro: Editora Tecnoprint. 158p.

RIBEIRO, F.A.S. 2008 Panorama mundial do mercado de peixes ornamentais. *Panorama da Aqüicultura*. V. 108.

RIZZO, E. e BAZZOLI, N. 1997 Atresia folicular em surubim *Pseudoplatystoma coruscans* submetidos à hipofiseção. In: MIRANDA. M.O.T (Org.). Surubim. Belo Horizonte: IBAMA: 91-100 (Coleção Meio Ambiente. Série Estudos Pesca. 19).

ROMAGOSA, E. 1998 *Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, **Brycon cephalus** (Günther, 1869) em cativeiro Vale do Ribeira, São Paulo*. São Carlos. 212p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar).

ROMAGOSA, E. 2006 Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. AquaCiência 2004, Vitória. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura: Palestras. Ed. CYRINO, J.P e URBINATI, E.C. Jaboticabal, SP.

ROMAGOSA, E. 2008 Avanços nas técnicas de reprodução de peixes migradores. AquaCiência 2008, Maringá. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura: Palestras. Ed. CYRINO, J.P e URBINATI, E.C. Jaboticabal, SP.

ROMAGOSA, E.; NAGAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M.; PAIVA, P.; BRAGA, F.M.S. 2003 Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 20: 67 - 80.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M Y.; BORELLA, M^al.; VERANI-FENERICH, N. 2001 Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27(2): 139-147.

ROSA, J.C.S.; SILVA, J.W.B.; OLIVEIRA, J.W.B. 1994 Propagação Artificial do Peixe Japonês, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) Gunther, 1870, com Extrato de Hipófise. *Ciên. Agron. Fortaleza*, 25: 44-52.

RUTAISIRE, J. e BOOTH, A.J. 2004 Induced ovulation, spawning, egg incubation, and hatching of the cyprinid fish *Labeo victorianus* in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(3): 383-391.

SELMAN, K.; WALLACE, R.A.; SARKA, A.; QI, X. 1993 Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218: 203-224.

SHEI, M.R.P. 2008 *Reprodução, desenvolvimento embrionário e larvicultura do "neon goby" Elacatinus figaro em laboratório*. Rio Grande. 21p. (Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, FURG).

SILVA, A.S.T. e SCHULZ, U.H. 2006 Crescimento de *Carassius auratus* (Actinopterygii: Cypriniformes) em Tanques com e sem Abrigo. *Acta Biológica Leopoldendia*, 28(1): 42-45.

SOARES, C.M.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; SCHAMBER, C.R. 2002 Efeito da Densidade de Estocagem do Quinguio, *Carassius auratus* L. 1758 (Osteichthyes, Cyprinidae), em suas Fases Iniciais de Desenvolvimento. *Acta Scientiarum*, Maringá, 24(2): 527-532.

SOHN, Y.C.; SUETAKE, H.; YOSHIURA, Y.; KOBAYASHI, M.; AIDA, K. 1998 Structural and expression analyses of gonadotropin β subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene*, 222: 257-267.

TAMASSIA, S.T.J.; GRAEFF, A.; SCHAPPO, C.L.; APPEL, H.B.; AMARAL Jr., H.; CASACA, J.M.; KNISS, V.; TOMAZELLI Jr, O. 2004 Cíprinicultura – o modelo de Santa Catarina (Ed. CYRINO *et al.* *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*, São Paulo: TecArt. 267 – 308p.

TOTH, G.P.; CHRIST, S.A.; MCCARTHY, H.W.; TORSELLA, J.A.; SMITH, M.K. 1995 Computer-assisted motion analysis of sperm form the common carp. *Journal or Fish Biology*, 47: 986 – 1003.

TREASURER, J.W. e HOLLIDAY, G.T. 1981 Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. A histological description of the reproductive cycle. *Journal Fish Biology*, 18(3): 359-379.

TSE, M.C.L.; WONG, G.K.P.; XIAO, P.; CHENG C.H.K.; CHAN, K.M. 2008 Down-regulation or goldfish (*Carassius auratus*) prolactin gene expression by dopamine and thyrotropin releasing hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 155: 729-741.

VAZZOLER, A.E.A.M. 1996 *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM. 169p.

VIDAL Jr, M.V. e COSTA, S.M. 2000 A produção de peixes ornamentais em Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, 203: 1-2.

VIDAL Jr, M.V. 2002 As boas perspectivas para a piscicultura ornamental. *Panorama da Aqüicultura*, 71.

VIDAL Jr, M.V. 2003 *Produção de Peixes Ornamentais*. Viçosa: CPT. 234p.

VIDAL Jr, M.V. 2006 Sistemas de Reprodução de peixes ornamentais. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, 1: 62-74.

VOLODIN, V.M.; MEZHININ, F.I.; KUZ'MINA, V.V. 1974 An experimental study of egg resorption in the bream (*Abramis brama*). *Journal of Ichthyology*, 14(2): 219-229.

WALLACE, R.A. e SELMAN, K. 1981 Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* 21: 325-343.

YAMAMOTO, T. 1961 Physiology of fertilization in fish eggs. *International Review of Cytology*, 12: 361-405. In: G.B. BOURNE; J.F. DANELLI (Ed.) Academic Press, New York and London. 420 p.

YARON, Z. 1995 Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, Amsterdam, 129: 49-73.

ZAR, J.H. 2009 *Biostatistical analysis*. 5. ed. New Jersey: Prentice – Hall. 944p.