

Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários

Marcos S. Simões-Costa ^{1,3}, Cristiane Pacheco ², Evelise M. Nazari ¹, Yara M. R. Müller ¹ & Dib Ammar ¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina. Caixa Postal 476, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. E-mail: evelise@ccb.ufsc.br; yararm@ccb.ufsc.br

² Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Planalto Catarinense. Caixa Postal 525, 88509-900 Lages, Santa Catarina, Brasil.

³ Bolsista CNPq/PIBIC.

ABSTRACT. *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) embryo staging through morphological landmarks identified in each embryonic day. Morphological landmarks of *Macrobrachium olfersi* embryos were examined and their appearance times were related to each embryonic day. Males and females of *M. olfersi* (Wiegman, 1836) were captured in Santa Catarina Island and kept in freshwater small tanks at 26°C and 10:14 dark: light cycle. Ovigerous females were monitored daily to remove samples of 20 eggs from brood pouch. The embryonic development was characterized through daily staging system. Living and fixed embryos were analyzed (48x) in intervals of 24 hours (embryonic day). The eye index was calculated in each embryonic day from the appearance of the eye pigmentation. The development of *M. olfersi* was described in 14 embryonic days (E), where the cleavage, gastrulation, germinal disk and egg nauplius are developed from E1 to E4. The subsequent days were characterized by the growth of the egg nauplius, as well by the formation and the bent of the post-nauplius. At E7, the eye pigmentation appeared and was followed by the beginning of heartbeats at E8. From E9 to E14, more intensive organogenesis processes occurred, mainly on the nervous, cardiac and digestive systems. The daily staging of development of *M. olfersi* development enabled the recognition of different embryonic forms, as well as growth and differentiation rhythms of embryo, which were fundamental to the gradual formation of the body plan.

KEY WORDS. Decapoda, developmental rhythms, embryogenesis, embryonic structures, Perkins index.

RESUMO. Em embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman, 1836) foram analisadas as características morfológicas bem como o dia do desenvolvimento em que estas características surgiram. Machos e fêmeas de *M. olfersi* foram coletados na Ilha de Santa Catarina e colocados em aquários de água doce, na temperatura de 26°C e ciclo escuro e claro de 10:14 horas. Fêmeas ovígeras foram monitoradas diariamente para retirada de uma amostra de 20 ovos da câmara incubadora. O desenvolvimento embrionário foi caracterizado através do sistema de estagiamento diário. Embriões vivos e fixados foram analisados (48x) em intervalos de 24 horas (dia embrionário). O índice do olho foi calculado em cada dia embrionário, a partir do aparecimento da pigmentação no olho. O desenvolvimento de *M. olfersi* foi caracterizado em 14 dias embrionários (E), onde entre E1 a E4 ocorreu a clivagem, gastrulação, disco germinativo e organização do nauplius embrionizado. Nos dias subseqüentes foi caracterizado o crescimento do nauplius embrionizado bem como a formação e encurvamento do pós-nauplius. Em E7 observou-se a pigmentação no olho, seguida do início dos batimentos cardíacos em E8. Entre E9 e E14, ocorreu de forma mais intensa o processo de organogênese, principalmente dos sistemas nervoso, cardiovascular e digestivo. O estagiamento diário do desenvolvimento de *M. olfersi* permitiu o reconhecimento de diferentes formas embrionárias, bem como de ritmos de crescimento e diferenciação do embrião, os quais são essenciais à formação gradual do plano do corpo. **PALAVRAS CHAVE.** Decapoda, ritmos do desenvolvimento, embriogênese, estruturas embrionárias, índice de Perkins.

Os crustáceos apresentam uma grande diversidade de padrões de desenvolvimento, que estão principalmente relacionados à quantidade e distribuição de vitelo presente nos ovos. Nos malacostracos, os Euphausiacea e os Dendrobranchiata apresentam ovos pequenos e com pouca quantidade de vitelo, cuja clivagem

é total e a eclosão ocorre na forma da larva nauplius. Contudo, a maioria dos malacostracos apresenta ovos volumosos e ricos em vitelo, em que apenas parte do ovo originará o embrião, caracterizando a clivagem parcial (SCHOLTZ 2000, HERTZLER 2002).

As principais características do desenvolvimento subse-

qüentes a clivagem parcial em crustáceos são a organização de um blastoderma sincicial e a retenção no ovo dos estágios naupliar e pós-naupliar (TALBOT & HELLUY 1995). O tempo de desenvolvimento embrionário apresenta-se variável nas diferentes espécies, desde 13 dias em *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) (NAZARI *et al.* 2000) até 159 dias em *Homarus americanus* (Milne-Edwards, 1837) (HELLUY & BELTZ 1991).

O estudo da embriogênese das espécies que apresentam ovos ricos em vitelo foi impulsionado pela aplicação de diversas metodologias de estagiamento, nas quais são utilizados diferentes critérios de análise, como a morfologia externa e interna dos embriões, o grau de desenvolvimento das estruturas embrionárias, dados biométricos dos ovos e dos embriões, bem como o tempo total e relativo do desenvolvimento.

Estudos realizados por WEYGOLDT (1961) com *Palaemonetes varians* (Leach, 1814) e MÜLLER (1984) com *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) descreveram os estágios embrionários nestas espécies, com ênfase na diferenciação dos folhetos embrionários. PINHEIRO & HATTORI (2002) descreveram oito estágios do desenvolvimento embrionário de *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) com base na morfologia interna dos embriões e na biometria dos ovos. O trabalho realizado com *Homarus americanus* por PERKINS (1972), usava o índice do olho pigmentado como parâmetro de avaliação do grau de desenvolvimento para outras estruturas embrionárias. HELLUY & BELTZ (1990) relacionaram nesta mesma espécie os dias embrionários com o tempo relativo de desenvolvimento do olho e do sistema nervoso. SANDEMAN & SANDEMAN (1991) quantificaram os diferentes estágios do desenvolvimento de *Cherax destructor* (Clark, 1936) em porcentagem, o que pode ser usado como um referencial para estudos comparativos de desenvolvimento com outras espécies de crustáceos.

Ao longo da embriogênese, o aumento da complexidade das estruturas embrionárias é acompanhado da reorganização dos componentes energéticos e estruturais dos ovos (GREEN 1965). A gradativa incorporação do vitelo pelas células embrionárias disponibiliza espaço no ovo, para o desenvolvimento dos apêndices corporais, crescimento do abdome e organização dos órgãos no cefalotórax (MÜLLER *et al.* 2003).

Este estudo visa caracterizar o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836), enfocando a dinâmica dos principais eventos que caracterizam cada dia embrionário. Estudos realizados com esta espécie na Ilha de Santa Catarina (MÜLLER *et al.* 2004) mostraram que a fecundidade média é de 1557 ovos, sendo que os ovos, nos estágios inicial e final do desenvolvimento, mediam 0,488 e 0,361 mm e 0,672 e 0,458 mm no maior e menor eixos respectivamente. Diferentes abordagens relativas à embriogênese de *M. olfersi* tem sido apresentadas em trabalhos onde são enfocadas a coloração do vitelo, a presença e a forma do olho por MOSSOLIN & BUENO (2002), o estagiamento percentual do desenvolvimento por MULLER *et al.* (2003) e as características morfológicas dos embriões organizadas em estágios naupliar, pré-naupliar e pós-

naupliar por MÜLLER *et al.* (2004). Contudo, o presente estudo contribui essencialmente com novos conhecimentos acerca do desenvolvimento de *M. olfersi*, caracterizando a cada intervalo de 24 horas tanto a morfologia, como a mobilidade das estruturas embrionárias, relacionando-as diretamente ao índice do olho, considerado um critério morfológico e biométrico do desenvolvimento (HELLUY & BELTZ 1990, BELTZ *et al.* 1992). O índice do olho estabelecido neste trabalho poderá então ser adotado como um critério externo de avaliação do grau de desenvolvimento das estruturas embrionárias internas e externas, sem a necessidade de fixação e corte dos embriões. Este índice poderá ainda ser utilizado em estudos comparativos do desenvolvimento de embriões da mesma espécie em condições ambientais diferenciadas ou do desenvolvimento de embriões de crustáceos que se desenvolvem a partir de ovos centrolécitos.

Macrobrachium olfersi é a espécie mais representativa dentre os palemonídeos coletados na Ilha de Santa Catarina, cujas fêmeas alojam seus numerosos ovos em uma câmara incubadora, por um período relativamente curto de tempo (AMMAR *et al.* 2001, NAZARI *et al.* 2003). Tais características, típicas da maioria dos malacostracos, associadas à adaptabilidade da espécie às condições experimentais permitem o acompanhamento e a retirada diária de amostras de ovos viáveis ao longo de todo período de incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

Machos e fêmeas do camarão *M. olfersi* foram obtidos em córregos de água doce da Ilha de Santa Catarina e mantidos em aquários com água de clorada, temperatura de 26°C, fotoperíodo de claro-escuro (10:14 horas) e salinidade 0‰. Fêmeas ovígeras (n = 5) obtidas em laboratório foram examinadas diariamente, retirando-se amostras de aproximadamente 20 ovos.

A caracterização da embriogênese foi realizada de acordo com o sistema de estagiamento diário, no qual cada período de 24 horas é considerado como um dia embrionário (E) (NAZARI *et al.* 2000). Os ovos foram analisados *in vivo* para a visualização de características do embrião, tais como o surgimento de cromatóforos, movimentos dos apêndices corporais e, devido à transparência dos tecidos embrionários, a formação do coração, dos intestinos e do sistema nervoso. Posteriormente, os ovos foram fixados em Bouin alcoólico (24 horas) e conservados em álcool 70% para melhor visualização ao estereomicroscópio (48x) das características embrionárias, como: o número dos blastômeros, a formação do disco germinal, dos apêndices naupliares e pós-naupliares, dos lobos ópticos e da papila caudal, a pigmentação dos olhos, a curvatura do embrião, presença de cerdas e apêndices torácicos (MÜLLER *et al.* 2003). Embriões fixados e não fixados foram fotografados (48x) sendo priorizada a visualização das características gerais do embrião em cada dia embrionário.

Para o cálculo do índice do olho ou índice de Perkins (PERKINS 1972) foram obtidas medidas, com ocular micrométrica

acoplada ao microscópio óptico (400x), do maior (L) e menor (T) eixo do olho, as quais foram aplicadas na fórmula: Índice Olho = $(L+T)/2$. Para cálculo do número de ovos a serem medidos foi aplicada a fórmula $n = 1.96.s/l$, onde s = desvio padrão da amostra inicial ($n = 5$) e $l = 10\%$ da média da amostra inicial (NAZARI *et al.* 2003), a partir da qual se obteve o n amostral de 10 ovos por dia embrionário.

Os ritmos do desenvolvimento foram caracterizados de acordo com as intensidades de crescimento e grau de desenvolvimento das estruturas embrionárias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Logo após a postura, os ovos de *M. olfersi* apresentam cório bastante espesso, aderido ao ovo. A massa de vitelo possui tonalidade esverdeada, estando organizada em grânulos distribuídos uniformemente por todo o ovo. Ao longo do desenvolvimento, o cório torna-se mais delgado e a massa de vitelo adquire uma textura mais fina e uma coloração castanho-clara. Próximo à eclosão, o cório torna-se destacado da superfície do ovo e o restante do vitelo, de coloração amarelo-pálido, resringe-se a grânulos no interior do intestino médio.

O acompanhamento dos ovos de *M. olfersi* desde a sua postura na câmara incubadora (Fig. 1) até a eclosão, nas condições experimentais estabelecidas neste estudo, permitiu a caracterização do desenvolvimento desta espécie, descrito a seguir:

E1: no decorrer deste dia ocorre a clivagem, sendo visualizados os primeiros planos de segmentação na superfície do ovo, delimitando os blastômeros. A visualização dos núcleos dos blastômeros é possível devido ao seu tamanho e sua localização superficial. À medida que a clivagem prossegue, há aumento no número de blastômeros e conseqüente redução no tamanho dos mesmos. No final deste dia, a superfície do ovo está recoberta por aproximadamente 32 blastômeros, constituindo o blastoderma inicial (Fig. 2). Por transparência do blastoderma, é visualizada a massa de vitelo central que não foi incorporada aos blastômeros.

Neste padrão de clivagem tem-se a organização da periblastula, típica dos crustáceos que apresentam ovos com grande quantidade de vitelo (ANDERSON 1982).

E2: na superfície do ovo são observados cerca de 128 blastômeros, constituindo o blastoderma definitivo. Um conjunto destes blastômeros migra para uma determinada região do ovo, organizando a área blastoporal (Fig. 3), uma pequena depressão delimitada por um anel composto por aproximadamente 13 blastômeros, cujo formato alongado difere das demais células do blastoderma.

E3: na área blastoporal ocorre grande proliferação celular, seguida da interiorização dos blastômeros durante a fase de gastrulação, organizando o disco germinativo que adquire a forma de "V" (Fig. 4). Ao longo deste dia, o disco germinativo torna-se mais espesso, e suas extremidades superior e inferior passam a ser compostas por várias camadas celulares. Na superfície do ovo ainda são observados alguns blastômeros dispersos,

que irão originar o ectoderma extra-embrionário.

O disco germinativo, constituído pelos três folhetos embrionários, corresponde a primeira forma embrionária observada nos ovos centrolécitos (WEYGOLDT 1979). Em decorrência do padrão de migração das células embrionárias, o disco germinativo organiza-se superficialmente e apresenta a forma característica de V, como observado também em *P. argentinus* por NAZARI *et al.* (2000) ou na forma de U, como apresentado por BRESSAN & MÜLLER (1997) para *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman, 1836) e por MÜLLER *et al.* (1999) para *Palaemon panda-liformis* (Stimpson, 1871). Nesta forma embrionária se reconhece o eixo antero-posterior do embrião, que coincide com as extremidades superior e inferior do disco germinativo (SCHOLTZ 1992).

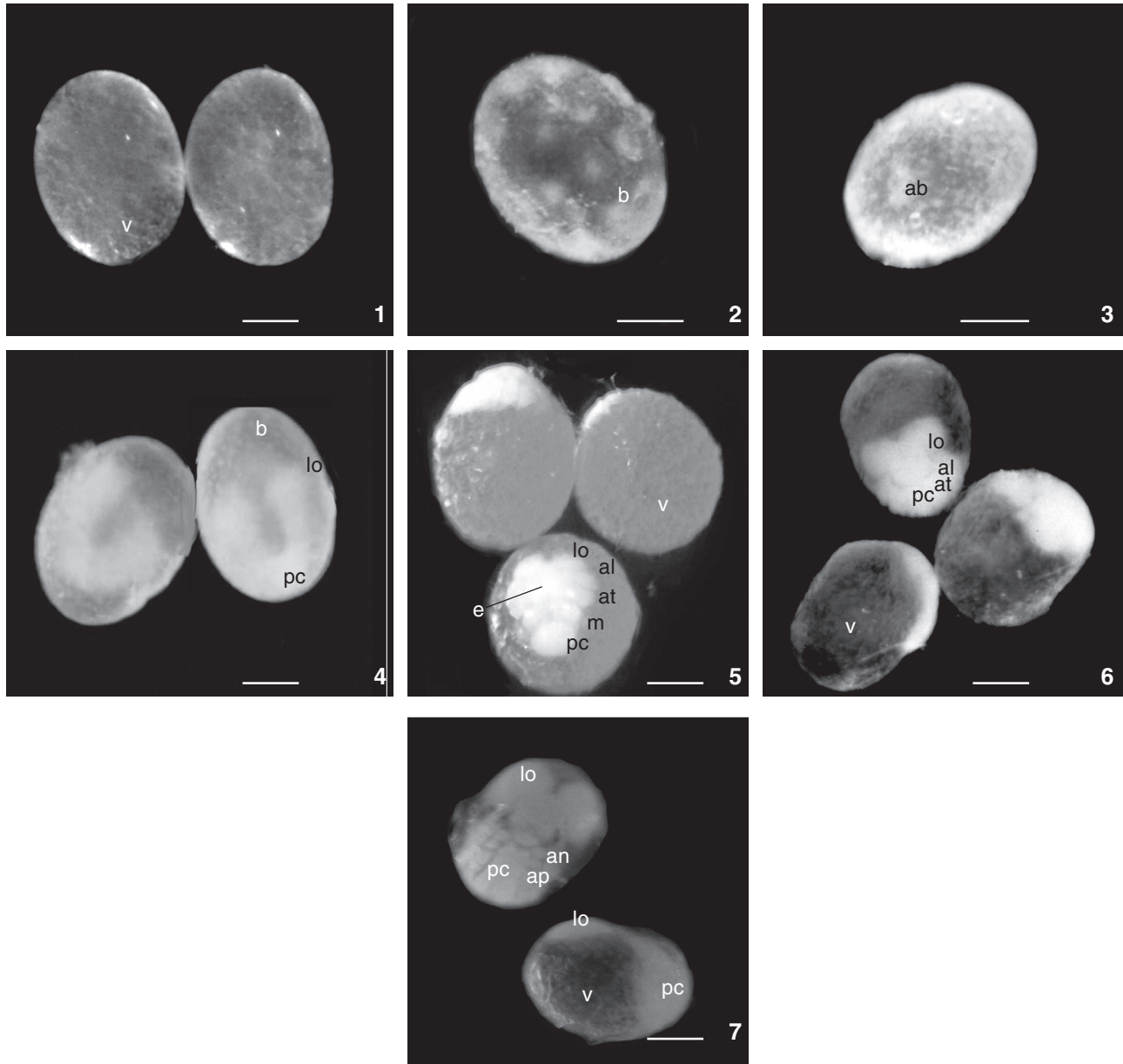
E4: este estágio é caracterizado pela organização do nauplius embrionizado, a partir da proliferação diferenciada das regiões do disco germinal. Assim, organiza-se nas extremidades superiores o esboço dos lobos ópticos; nas laterais surgem os três pares de apêndices naupliares, denominados antênulas, antenas e mandíbulas. Na região central do nauplius observa-se uma pequena depressão que corresponde ao estomodeu. A região inferior corresponde ao primórdio da papila caudal (Fig. 5).

E5: o nauplius organiza-se superficialmente, sendo observado o crescimento dos lobos ópticos e da papila caudal em direção às regiões superior e inferior do ovo, respectivamente. Os apêndices naupliares alongam-se lateralmente e as antenas iniciam a sua bifurcação. No final deste dia, a papila caudal atingiu a extremidade inferior do ovo, o que caracteriza a organização inicial do pós-nauplius embrionizado (Fig. 6), sendo a maior parte do ovo, ainda ocupada pela massa de vitelo.

O nauplius embrionizado é igualmente formado por apêndices naupliares, porém rudimentares, quando comparados aos observados na larva nauplius (DAHMS 1996). A presença destes apêndices naupliares é utilizada como um critério morfológico para a caracterização e o monitoramento do desenvolvimento de crustáceos (SCHOLTZ 2000, MÜLLER *et al.* 2004). Segundo TALBOT & HELLUY (1995) o nauplius é um estágio sempre presente na ontogenia dos crustáceos e a organização dos apêndices naupliares indica a orientação do eixo corporal ântero-posterior, conforme o descrito por MINELLI (2001).

E6: verifica-se um grande crescimento do pós-nauplius no sentido antero-posterior, sendo que este adquire o formato característico em "C". Os lobos ópticos expandem-se cefálica e lateralmente, tornando-se mais arredondados. A papila caudal encurva-se acompanhando superficialmente o formato do ovo, passando a apresentar também um crescimento no sentido anterior, em direção aos lobos ópticos (Fig. 7). Desta forma, tem início a formação e organização do abdome.

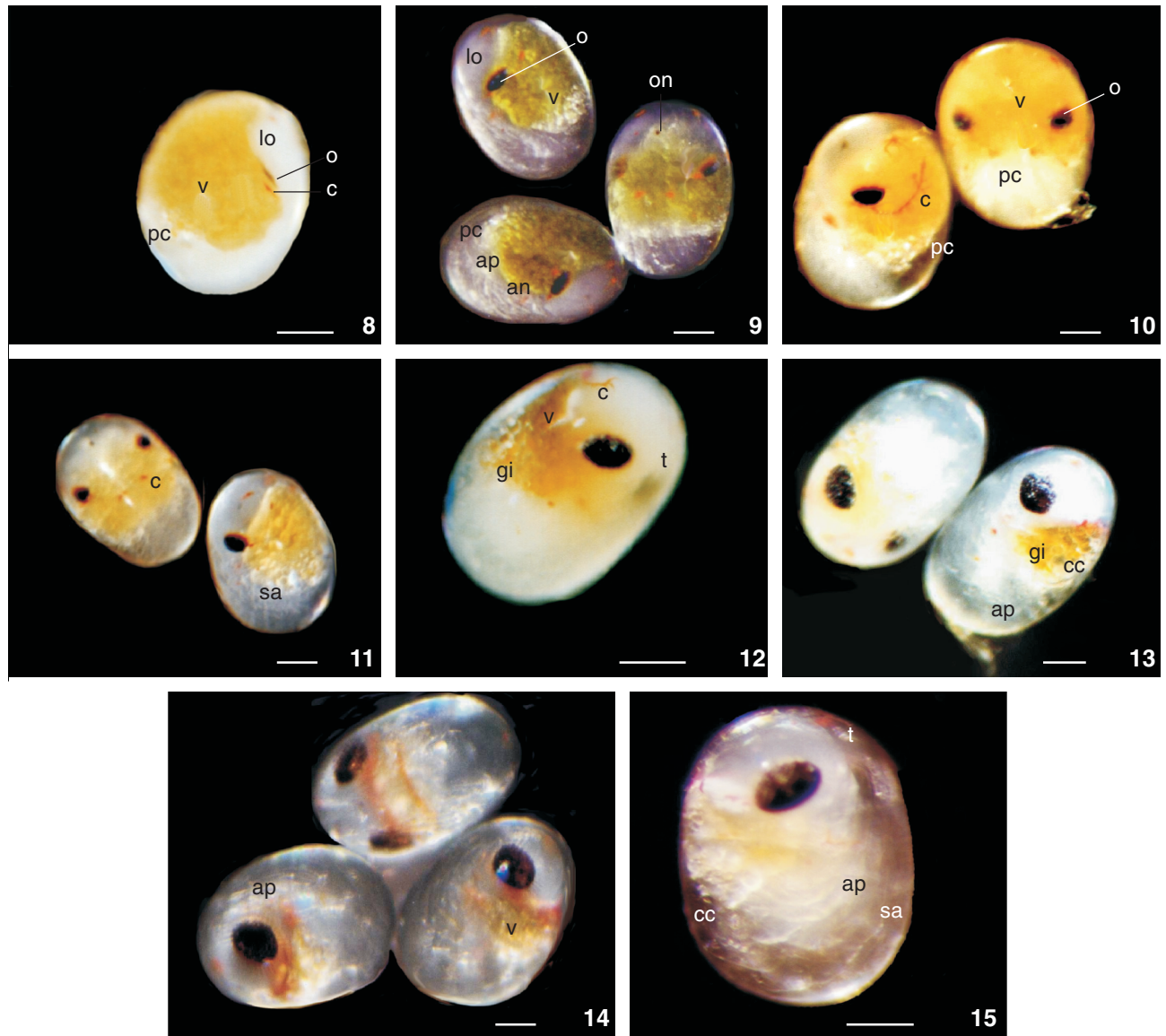
Os apêndices naupliares crescem em direção à região posterior do pós-nauplius. As antênulas apresentam dois segmentos, um proximal bastante pequeno e outro distal mais alongado. As antenas se sobrepõem aos três rudimentos dos maxilípedes, visíveis na lateral do pós-nauplius.



Figuras 1-7. Ovos de *M. offersi* em diferentes dias embrionários: (1) ovo logo após a postura na câmara incubadora; (2) E1 clivagem; (3) E2 formação da área blastoporal; (4) E3 organização do disco germinativo; (5) E4 nauplius embrionizado; (6) E5 pós-nauplius embrionizado; (7) E6 pós-nauplius encurvado. (ab) área blastoporal, (al) antênulas, (an) apêndices naupliares, (ap) apêndices pós-naupliares, (at) antenas, (b) blastômeros, (e) estomodeu, (lo) lobo óptico, (m) mandíbula, (pc) papila caudal, (v) vitelo. Barra de escala: 0,1 mm.

E7: neste dia embrionário, evidencia-se, principalmente, o crescimento dorso-ventral do pós-nauplius. Na porção distal dos lobos ópticos observa-se uma estreita área pigmentada em tom marrom-avermelhado, demarcando o início da formação do olho lateral (Fig. 8). São visualizados cromatóforos

avermelhados próximo à área pigmentada do olho. Devido ao seu pronunciado encurvamento, a papila caudal aproxima-se da região equatorial do ovo. As antênulas e antenas tornam-se mais delgadas e sobrepõem-se aos apêndices pós-naupliares. Observa-se a bifurcação das antênulas e dos maxilípedes.



Figuras 8-15. Ovos de *M. olfersi* nos dias embrionários a partir do surgimento da pigmentação do olho: (8) E7 pigmentação inicial do olho; (9) E8 olho elíptico; (10) E9 omatídeos; (11) E10 segmentação da papila caudal; (12) E11 formação do telso; (13) E12 carapaça do cefalotórax em formação; (14) apêndices segmentados e funcionais; (15) E14 pré-eclosão. (an) apêndices naupliares, (ap) apêndices pós-naupliares, (cc) carapaça cefalotórax, (c) cromatóforos, (gi) grânulos intestinais, (lo) lobo óptico, (o) olho, (on) olho naupliar, (pc) papila caudal, (sa) segmentos abdominais, (t) telso, (v) vitelo. Barra de escala: 0,1 mm.

O espaço disponibilizado pela incorporação do vitelo viabiliza o espessamento das estruturas embrionárias em direção à porção mais interna do ovo. A massa de vitelo, ainda presente na porção central do ovo, determina que o crescimento do embrião continue superficialmente no sentido cefalo-caudal (BRESSAN & MÜLLER 1999). Simultaneamente, as camadas celulares se diferenciam durante o processo inicial de organogênese,

quando os sistemas orgânicos se esboçam. Contudo, neste momento do desenvolvimento, para que haja compreensão dos processos iniciais da organogênese, faz-se necessário a utilização de metodologias de cortes seriados como realizado em *Macrobrachium carcinus* por MÜLLER (1984).

A visualização dos pigmentos no embrião durante o desenvolvimento é resultante do metabolismo do vitelo, uma vez

que não ocorre incorporação de pigmentos exógenos durante a embriogênese (LIÑAN-CABELLO *et al.* 2002). Nossos resultados mostram que a formação dos cromatóforos ocorre simultaneamente ao surgimento da pigmentação do olho, assim como o relatado por MANTIRI *et al.* (1996) em *Homarus gammarus* (Linnaeus, 1758). McNAMARA (1989) destaca em embriões de *M. olfersi* o desenvolvimento simultâneo de pigmentos vermelhos nas antenas, lobos ópticos e no terceiro segmento abdominal, sugerindo a formação das células pigmentares em locais dispersos no embrião.

E8: os lobos ópticos são as estruturas mais evidentes na região anterior do pós-nauplius, sendo que há um aumento da área pigmentada do olho, que assume forma elíptica (Fig. 9). Entre os lobos ópticos, evidencia-se a região pigmentada do olho naupliar. Observa-se em torno do estomodeu, a organização de três pares de espessamentos celulares, que correspondem aos gânglios cerebrais. A papila caudal alcança a região equatorial do ovo, sendo que no seu interior observam-se pequenas vesículas. O embrião apresenta movimentos isolados e aleatórios, bem como batimentos cardíacos irregulares, intercalados por longos períodos de repouso. Estão presentes 3 maxilípedes e 2 apêndices torácicos segmentados, sendo o segmento proximal pequeno e arredondado e o distal alongado.

O olho se destaca como uma das estruturas mais evidentes na região anterior do embrião indicando primordialmente o desenvolvimento dos gânglios cerebrais. O estudo realizado por PERKINS (1972) avalia o grau de desenvolvimento do olho, correlacionando-o ao surgimento e desenvolvimento das demais estruturas do embrião, sendo utilizado como um critério morfológico de acompanhamento do desenvolvimento embrionário (BELTZ *et al.* 1992).

E9: O olho apresenta um grande aumento no seu eixo transversal, sendo possível a identificação de omatídeos (Fig. 10). A extremidade distal da papila caudal aproxima-se da região anterior do embrião, dispondo-se sobre os lobos ópticos. A massa de vitelo mostra-se bastante granular estando disposta principalmente na região do cefalotórax. Movimentos internos na região do cefalotórax do embrião são observados em áreas próximas ao vitelo. Os batimentos do coração permanecem irregulares, porém a duração dos intervalos diminui, enquanto poucos espasmos do embrião são observados.

E10: Neste dia, verifica-se que os lobos ópticos apresentam contorno bem definido, destacando-se das estruturas adjacentes. Os olhos laterais apresentam nítida delimitação, assumindo a forma mais arredondada. Observa-se o início da segmentação da papila (Fig. 11), que resultará na organização do abdome. Há um aumento no número de cromatóforos, com maior concentração na região anterior do embrião. Observa-se alternância de batimentos irregulares e regulares do coração, bem como movimentos dos apêndices torácicos e da papila caudal.

E11: O olho cresce significativamente e ocupa grande parte do lobo óptico. Na extremidade posterior do embrião evidencia-se o telso com poucas cerdas na sua margem (Fig. 12). O coração apresenta batimentos rítmicos e intensos, enquanto que a mus-

culatura corporal apresenta movimentos esporádicos. Na região dorsal do embrião, próxima aos lobos ópticos, está localizada a massa compacta de vitelo. São visualizados grânulos intestinais que apresentam grande mobilidade e se dispõem entre a massa de vitelo e o coração. No abdome observa-se a presença do cordão nervoso ventral e de vesículas seqüenciadas que indicam a formação do intestino posterior.

Entre os dias E9 e E11, é possível acompanhar com bastante nitidez o desenvolvimento dos lobos ópticos, dos olhos e dos omatídeos, devido ao intenso processo de proliferação e diferenciação das células que compõem a região anterior do embrião. Simultaneamente a estes processos é possível visualizar, através de análise estereoscópica, estágios mais avançados da organogênese, principalmente dos sistemas nervoso, cardiovascular e digestório.

E12: O embrião apresenta uma maior expansão lateral do corpo, o que possibilita a acomodação dos apêndices locomotores sob o abdome. Os apêndices naupliares e pós-naupliares exibem movimentos e apresentam-se segmentados e com cerdas. O telso possui várias cerdas na sua extremidade. Observa-se o início da organização da carapaça dorsal sobre o cefalotórax (Fig. 13). A quantidade de vitelo diminuiu e os grânulos intestinais apresentam intensa mobilidade. O intestino posterior é observado como uma estrutura tubular, adjacente ao cordão nervoso ventral. Os cromatóforos concentram-se principalmente na região próxima aos lobos ópticos.

E13: O embrião está com seu desenvolvimento praticamente completo, apresentando carapaça dorsal formada e apêndices naupliares e pós-naupliares nitidamente segmentados (Fig. 14). Pequenos tufo de cerdas podem ser visualizados nas extremidades dos apêndices, longas e numerosas cerdas dispõem-se na margem do telso. Os cromatóforos tornam-se menos evidentes. A massa de vitelo diminui significativamente e os grânulos intestinais apresentam menor mobilidade, estando mais coesos, indicando a organização do intestino médio. Os batimentos cardíacos apresentam-se mais compassados e, ao final deste dia, o embrião apresenta movimentos corporais frequentes.

E14: As mudanças mais significativas deste dia estão relacionadas ao desenvolvimento final dos sistemas orgânicos, viabilizando a sua funcionalidade após a eclosão. Os olhos apresentam formato arredondado e ocupam praticamente toda a área dos lobos ópticos. A carapaça dorsal está formada e os grânulos intestinais apresentam mobilidade bastante reduzida (Fig. 15). Os batimentos cardíacos permanecem compassados, sendo que a visualização do coração está dificultada pela presença da carapaça do cefalotórax. Observam-se movimentos coordenados dos apêndices, acompanhados de fortes espasmos do embrião, que contribuem para o rompimento do cório.

Durante os dias E8 a E14 foi observado um gradual aumento da área pigmentada do olho, que foi relacionado na tabela I ao desenvolvimento de algumas características embrionárias, principalmente à organização do coração, intestino primi-

Tabela I. Relação entre o índice do olho e o grau de desenvolvimento de estruturas embrionárias de *Macrobrachium olfersi*.

Dia embrionário	Índice do olho (µm)	(±DP)	Graus e ritmos de desenvolvimento das estruturas embrionárias	
			Superficiais	Internas
E7	–		Acentuado encurvamento da papila caudal, que se aproxima da região equatorial do ovo ** Presença de cromatóforos ao redor dos olhos*	Início da pigmentação do olho lateral*
E8	54,9	(±10,0)	Início dos espasmos do corpo do embrião*	Organização inicial dos gânglios cerebrais*/** Batimentos cardíacos irregulares*
E9	59,4	(±4,8)	Espasmos do embrião mais freqüentes e intensos*	Identificação dos omatídeos*
E10	59,7	(±12,5)	Início da formação do abdome**	Alternância de batimentos cardíacos regulares e irregulares*
E11	77,4	(±19,4)	Aumento significativo dos olhos e dos lobos ópticos** Delimitação do télso**	Visualização do cordão nervoso ventral* Início da formação do intestino posterior*
E12	90,2	(±14,1)	Início da organização da carapaça do cefalotórax* Grande concentração de cromatóforos próximo aos lobos ópticos* Expansão lateral do corpo do embrião**	Presença de grânulos intestinais que apresentam grande mobilidade* Organização tubular do intestino posterior*
E13	112,1	(±10,9)	Apêndices naupliares e pós-naupliares segmentados** Movimentos corporais freqüentes*	Menor mobilidade dos grânulos intestinais durante a formação do intestino médio* Batimentos cardíacos mais compassados*
E14	108,7	(±16,8)	Movimentos coordenados dos apêndices, acompanhados de fortes espasmos do embrião*	Intestino médio formado contendo poucos grânulos* Batimentos cardíacos compassados*

* Característica observada em embriões vivos, ** característica observada em embriões fixados.

tivo, gânglios cerebrais e dos apêndices corporais.

Em *M. olfersi*, o desenvolvimento embrionário caracteriza-se por um gradual aumento na complexidade das estruturas, onde durante o período de E1 a E7, as estruturas são de fácil reconhecimento e visualização, pois o embrião localiza-se superficialmente no ovo. Nos dias subseqüentes, as mudanças na morfologia externa do embrião são menos expressivas, sendo que o desenvolvimento das estruturas internas mostra-se mais complexo. Segundo MÜLLER *et al.* (1999), a crescente complexidade das estruturas embrionárias está relacionada aos processos de formação e maturação dos sistemas, viabilizando assim a sobrevivência da larva.

Em outros decápodes com ovos centrolécitos, a seqüência de desenvolvimento da clivagem ao o início da formação do olho corresponde a até 50% do tempo total de incubação, como observado em *Cherax destructor* (SANDEMAN & SANDEMAN 1991), *Homarus americanus* (HELLUY & BELTZ 1991) e *Palaemonetes argentinus* (NAZARI *et al.* 2000).

A maturação e aquisição da funcionalidade dos sistemas orgânicos podem ser avaliadas por algumas características do desenvolvimento, como a movimentação corporal, variação da granulação do vitelo e pelos batimentos ritmados do coração. Tais características podem ser associadas ao Índice de Perkins (índice do olho), que se constitui numa ferramenta precisa em estudos de estagiamento do desenvolvimento embrionário (HELLUY & BELTZ 1990).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMAR, D.; Y.M.R. MÜLLER & E.M. NAZARI. 2001. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, **18** (2): 529-537.
- ANDERSON, D.T. 1982. Embryology, p. 1- 44. In: L.G. ABELE (Ed.). **Embryology, morphology and genetics**. New York, Academic Press, XIX+439p.
- BELTZ, B.S.; S.M. HELLUY; M. L. RUCHHOEFT & L.S. GAMMILL. 1992. Aspects of the Embryology and Neural Development of the *American Lobster*. *The Journal of Experimental Zoology*, New York, **261**: 288-297.
- BRESSAN, C.M. & Y.M.R. MÜLLER. 1997. Characterization of embryonized nauplius development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, São Paulo, **14** (2): 243-246.
- BRESSAN, C.M. & Y.M.R. MÜLLER. 1999. Postnaupliar embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea Decapoda). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, São Paulo, **16** (2): 155-160.
- DAHMS, H.U. 1996. Biologie der Crustaceen-nauplien. *Publikationen Zu Wissenschaftlichen Filmen*, Göttingen, **22**: 281-304.
- GREEN, J. 1965. Chemical embryology of the Crustacea. *Biological Review*, Cambridge, **40**: 580-600.

- HELLUY, S.M. & B.S. BELTZ. 1990. Stages in the embryonic development of the american lobster with special emphasis on its nervous system, p. 530-536. *In*: K. WIESE *et al.* (Ed.). **Frontiers in Crustacean Neurobiology**. Basel, Birkhäuser Verlag, XIV+561p.
- HELLUY, S.M. & B.S. BELTZ. 1991. Embryonic development of the american lobster (*Homarus americanus*): quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. **Biological Bulletin**, Woods Hole, **180**: 355-371.
- HERTZLER, P.L. 2002. Development of the mesendoderm in the dendrobranchiate shrimp *Sicyonia ingentis*. **Arthropod Structure and Development**, Oxford, **31**: 33-49.
- LIÑÁN-CABELLO, M.A.; J. PANIAGUA-MICHEL; & HOPKINS, P.M. 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, **8**: 299-309.
- MANTIRI, D.M.H.; G. NÈGRE-SADDARGUES; S. CHARMANTIER; J.P. TRILLES, J.C. MILICUA, R. CASTILLO. 1996. Nature and metabolism of carotenoids pigments during the embryogenesis of the European lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Great Britain, **115A**: 237-241.
- McNAMARA, J.C. 1989. Ultrastructure and development of pigmentary effectores in embryos of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Crustaceana**, Leiden, **57** (1): 37-50.
- MINELLI, A. 2001. A three-phase model of Arthropod segmentation. **Development Genes and Evolution**, Berlin, **211**: 509-521.
- MOSSOLIN, E.C. & BUENO, S.L.S. 2002. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **22** (2): 367-376.
- MÜLLER, Y.M.R. 1984. Die Embryonalentwicklung von *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia). **Zoological Jahrbücher Anatomie**, Jena, **112**: 51-78.
- MÜLLER, Y.M.R.; E.M. NAZARI; & D. AMMAR. 1999. The characterization of embryonic phases of prawn *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea, Decapoda). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, **16** (2): 161-166.
- MÜLLER, Y.M.R.; E.M. NAZARI & M.S. SIMÕES-COSTA. 2003. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **23** (4): 869-875.
- MÜLLER, Y.M.R.; D. AMMAR; E.M. NAZARI. 2004. Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **21** (1): 27-32.
- NAZARI, E.M.; Y.M.R. MÜLLER & D. AMMAR. 2000. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* Nobili, 1901 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. **Crustaceana**, Leiden, **73** (2): 143-152.
- NAZARI, E.M.; M.S. SIMÕES-COSTA; Y.M.R. MÜLLER; D. AMMAR & M. DIAS. 2003. Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuma* and *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **23** (4): 862-868.
- PERKINS, H.C. 1972. Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne – Edwards). **Fishery Bulletin**, London, **70** (1): 95-99.
- PINHEIRO, M.A.A. & G.Y. HATTORI. 2002. Embriologia do siri *Arenaeus cribrarius* (Lamarck) (Crustacea, Brachyura, Portunidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **19**: 571-583.
- SANDEMAN, R. & D. SANDEMAN. 1991. Stages in the development of the embryo of the fresh-water crayfish *Cherax destructor*. **Roux's Archives of Developmental Biology**, Berlin, **200**: 27-37.
- SCHOLTZ, G. 1992. Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): germ band formation, segmentation, and early neurogenesis. **Roux's Archives of Developmental Biology**, Berlin, **202**: 36-48.
- SCHOLTZ, G. 2000. Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, **38**: 175-187.
- TALBOT, P. & S. HELLUY. 1995. Reproductive and embryonic development, p. 177-216. *In*: J.R. FACTOR (Ed.). **Biology of the lobster *Homarus americanus***. New York, Academic Press, XIV+561p.
- WEYGOLDT, P. 1961. Beitrag zur kenntnis der ontogenie der Dekapoden: embryologische untersuchungen an *Palaemonetes varians* (Leach). **Zoologische Jahrbücher Anatomie**, Jena, **79**: 223-270.
- WEYGOLDT, P. 1979. Significance of later embryonic stages and head development in Arthropod phylogeny, p. 107-135. *In*: A.P. GUPTA (Ed.). **Arthropod Phylogeny**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, XX+762p.

Recebido em 05.VIII.2004; aceito em 13.V.2005.