

UFRRJ

**INSTITUTO DE ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

DISSERTAÇÃO

**Inversão Sexual de Larvas de Betta *Betta splendens* por Meio de
Manipulação Térmica**

Igor de Fiuza França

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**INVERSÃO SEXUAL DE LARVAS DE BETTA *Betta splendens* POR
MEIO DE MANIPULAÇÃO TÉRMICA**

IGOR DE FIUZA FRANÇA

Sob a orientação do professor

Leonardo Rocha Vidal Ramos

e coorientação do professor

Marcelo Maia Pereira

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F815i França, Igor de Fiuza, 05/05/1990-
Inversão sexual de larvas de betta Betta splendens
por meio de manipulação térmica. / Igor de Fiuza
França. - Seropédica, 2020.
21 f.

Orientador: Leonardo Rocha Vidal Ramos.
Coorientador: Marcelo Maia Pereira.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, 2020.

1. Inversão sexual. 2. Betta splendens. 3.
Masculinização. 4. Larvicultura. 5. Manipulação
térmica. I. Ramos, Leonardo Rocha Vidal, 1985-,
orient. II. Pereira, Marcelo Maia, -, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 13320 / 2020 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.069387/2020-01

Seropédica-RJ, 21 de dezembro de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
IGOR DE FIUZA FRANÇA**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre**, no Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/12/2020.

Conforme **deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020**, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Banca Examinadora:

Leonardo Rocha Vidal Ramos, Dr. UFRRJ - (Presidente)

Matheus Pereira dos Santos, Dr. UFRRJ

Thiago Mendes de Freitas, Dr. FIPERJ

(Assinado digitalmente em 22/12/2020 15:51)
LEONARDO ROCHA VIDAL RAMOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)
Matrícula: 2376201

(Assinado digitalmente em 26/12/2020 15:45)
MATHEUS PEREIRA DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DPA (12.28.01.00.00.00.63)
Matrícula: 3067308

(Assinado digitalmente em 22/12/2020 16:43)
THIAGO MENDES DE FREITAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 342.014.138-61

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **13320**, ano:

04/01/2021

https://sipac.ufrj.br/sipac/protocolo/documento/documento_visualizacao.jsf?imprimir=true&idDoc=675928

2020, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **21/12/2020** e o código de verificação: **ad04784796**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elson e Ana, que sempre me apoiaram e contribuíram de forma ativa para meu crescimento pessoal e profissional, me estimulando em todas as minhas decisões.

A minha namorada, Giselle, companheira para todas as horas, linda por fora e por dentro, sem ela nada disso seria possível.

A minha irmã, Érica, que, apesar da distância atual, sempre esteve presente na minha vida.

A minha prima, Fernanda, sempre muito alegre e divertida, compartilhando histórias desde criança até os dias atuais.

Aos meus amigos, em especial: Lucas, Sérgio, Letycia, Guilherme, Carlos, Paulo, Karine, e todos os outros que se fizeram presentes.

Ao meu Orientador, Leonardo, que sempre me apoiou durante toda minha trajetória durante a faculdade, desde a época da graduação até o mestrado, sempre me auxiliando em todos os momentos difíceis, por mais difíceis que fossem.

Ao meu coorientador, Marcelo Maia, pelos ensinamentos dados durante este período.

A prof^a Érica, pelos incentivos e também contribuições diretas e indiretas na presente dissertação.

Aos professores, membros da banca, Matheus Pereira dos Santos e Thiago Mendes de Freitas, que ajudaram a enriquecer a presente dissertação com suas considerações pertinentes.

Ao Wilson Vianna, Biólogo e renomado especialista em peixes ornamentais no Brasil. Que teve papel fundamental no meu crescimento pessoal e profissional, me colocando diretamente em contato com criadores, lojistas, aquarofilistas entre outras pessoas envolvidas no hobby contribuindo também de forma ativa no meu experimento.

A Associação de Aquicultores de Patrocínio de Muriaé e Barão de Monte Alto, em especial ao criador Gabriel, que contribuíram de forma direta com meu experimento.

Dedico esta dissertação ao meu tio, Fernando (in memoriam), uma pessoa iluminada que contribuiu em minha vida em todos os momentos que pode.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

FRANÇA, Igor de Fiuza. **Inversão sexual de larvas de betta *Betta splendens* por meio de manipulação térmica.** 21p. Dissertação (Mestre em Ciências). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Com relação às vertentes da Aquicultura, a piscicultura ornamental vem crescendo exponencialmente nos últimos anos no Brasil. Dentre as espécies criadas, o betta, *Betta splendens*, possui grande importância comercial no Brasil e no mundo, sendo facilmente mantido em pequenos recipientes. Dentre suas características, os machos da espécie possuem desenvolvimento acentuado das nadadeiras e cores mais vibrantes, atribuindo beleza singular e agregando valor superior quando comparado às fêmeas. O presente experimento objetivou avaliar a influência do fator temperatura durante a larvicultura de *Betta splendens*, e seus possíveis efeitos na mortalidade e proporção de machos e fêmeas obtidos, buscando alcançar uma maior proporção de machos através da manipulação térmica, visto que são de maior interesse comercial. Para tal, foram utilizados 20 casais adultos para a reprodução e obtenção das larvas utilizadas no experimento. Posteriormente, as larvas recém-eclodidas foram separadas em grupos de 30 animais sendo cada grupo inserido em 40 béqueres que representaram as unidades experimentais. Estes foram subdivididos em diferentes regimes térmicos, denominados: T25, T28, T30 e T33 (25, 28, 30 e 33°C, respectivamente). Seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado (4x10). O tratamento termal foi mantido até os 15 DPE (dias pós-eclosão), momento no qual a temperatura de 28°C foi restabelecida para todos os tratamentos. No encerramento do regime termal e novamente aos 45 DPE foi contabilizado a mortalidade, objetivando avaliar o efeito direto e residual, respectivamente, das temperaturas testadas. No final do experimento foi contabilizado o número de machos e fêmeas obtidos nos diferentes tratamentos térmicos para análise da proporção sexual obtida. Todos os resultados foram submetidos a ANOVA (5%) e – em caso de diferença significativa – ao teste de Tukey à 5%. Houve efeito significativo da mortalidade em função da temperatura apenas aos 15 DPE ($P < 0,001$) onde os tratamentos T25, T28 e T30 apresentaram os menores valores para tal parâmetro em comparação ao T33. Para a razão sexual, os tratamentos que apresentaram os maiores valores para a proporção de machos obtidos ($P = 0,037$) foram T28, T30 e T33 (45,74; 51,14 e 67,21%, respectivamente). Conclui-se que a manipulação termal durante o período larval em *Betta splendens* pode ser uma estratégia para o aumento da proporção de machos, devendo ser considerado o aumento da mortalidade em função da elevação da temperatura.

Palavras-chave: piscicultura, ornamental, masculinização, larvicultura.

ABSTRACT

FRANÇA, Igor de Fiuza. **Sexual inversion of betta *Betta splendens* larvae by thermal manipulation.** 21p. Dissertation (Master's degree in Science). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Regarding to Aquaculture, ornamental fish farming has grown exponentially in recent years in Brazil. Among the species reared, the betta, *Betta splendens*, has great commercial importance in Brazil and in the world, being easily kept in small containers. Among its characteristics, the males of the species have marked development of the fins and more vibrant colors, attributing singular beauty and adding superior value when compared to the females. The present experiment aimed to evaluate the influence of the temperature factor during *Betta splendens* larviculture, and its possible effects on mortality and proportion of males and females obtained, seeking to achieve a higher proportion of males through thermal manipulation, since they are of greater commercial interest. For this purpose, 20 couples were used to reproduce and breed the larvae used in the experiment. Subsequently, the newly hatched larvae were separated into groups of 30 animals with each group inserted in 40 beakers that represented the experimental units. These were subdivided into different thermal regimes, named: T25, T28, T30 and T33 (25, 28, 30 and 33 °C, respectively). A randomized design followed (4x10). The thermal treatment was maintained until 15 DAH (days after hatching), at which time the temperature of 28 °C was restored for all treatments. At the end of the thermal regime and again at 45 DAH, mortality was counted, aiming to assess the direct and residual effect, respectively, of the tested temperatures. At the end of the experiment, the number of males and females obtained in the different heat treatments was counted to analyze the sexual proportion obtained. All results were submitted to ANOVA (5%) and - in case of significant difference - the Tukey test at 5%. There was a significant effect of mortality as a function of temperature only at 15 DPE ($P < 0.001$) where treatments T25, T28 and T30 showed the lowest values for this parameter compared to T33. For sex ratio, the treatments that showed the highest values for the proportion of males obtained ($P = 0.037$) were T28, T30 and T33 (45.74; 51.14 and 67.21%, respectively). It is concluded that the thermal manipulation during the larval period in *Betta splendens* can be a strategy to increase the proportion of males, and the increase in mortality due to temperature manipulation should be considered.

Keywords: fish-farming, ornamental, masculinization, larviculture.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de mortalidade (%) em função dos diferentes níveis de temperatura até os 15 e 45 DPE. Sendo que, T25, T28, T30 e T33 equivalem a 25, 28 30 e 33 °C, respectivamente.	14
Tabela 2. Valores médios para a razão sexual de machos e fêmeas (%) em função dos diferentes níveis de temperatura até o final do experimento.	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recipientes de vidro utilizados para a manutenção dos reprodutores no laboratório. (esq. machos e dir. fêmeas).	7
Figura 2. Aquários utilizados para reprodução dos peixes. As fêmeas foram mantidas inicialmente dentro de recipientes plásticos transparentes perfurados estimulando o processo reprodutivo. A fim de evitar interferências entre casais, foram alocadas barreiras visuais entre os aquários.	8
Figura 3. Processo de separação das larvas com auxílio de pipeta descartável.	9
Figura 4. Caixa térmica utilizada para os tratamentos de 28, 30 e 33°C. Termostatos e bombas foram utilizados para a manutenção da temperatura da água durante o experimento, a cada 6 horas, a temperatura era mensurada nos recipientes.	10
Figura 5. Recipientes utilizados na etapa intermediária.	11
Figura 6. Piscina de 1000 L utilizada na fase final. Cestos onde os animais foram alocados até a determinação sexual.	12
Figura 7. Dimorfismo sexual em <i>Betta splendens</i> . (a) Macho pode apresentar prolongamento das nadadeiras e cores mais vibrantes em comparação as fêmeas (de acordo com a variedade), geralmente agressivo com outros machos da espécie. (b) Fêmea apresenta o ventre abaulado, além de ponto branco na região denominado ovipositor.	13

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Determinação Sexual	3
2.2	Período Lábil.....	4
2.3	Uso de Hormônios e Seus Desafios	5
2.4	Obtenção de populações monossexo e limitações	5
2.5	Reversão Sexual em <i>Betta splendens</i>	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1	Ética, Local e Duração do Experimento	7
3.2	Manutenção dos Reprodutores.....	7
3.3	Obtenção das Larvas	8
3.4	Delineamento Experimental	8
3.4.1	Etapa inicial: banho termostatizado (0 – 15 DPE)	8
3.4.2	Etapa intermediária: período pós-regime térmico (15 – 45 DPE).....	11
3.4.3	Etapa final: período de identificação do sexo (após os 45 DPE).....	11
3.5	Análise Estatística.....	13
4	RESULTADOS	14
5	DISCUSSÃO	15
6	CONCLUSÃO	17
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura no Brasil é uma atividade em franca expansão, dados de produção demonstraram que em 10 anos (2007-2017) a atividade apresentou um crescimento de cerca de 123% (MYHRE et al., 2017). Entre suas vertentes, a criação de peixes e outros organismos aquáticos destinados a fins ornamentais vêm ganhando destaque, tendo seu crescimento alavancado pela popularização do aquarismo no mundo. A atividade apresenta um crescimento anual médio de cerca de 14% desde 1985, envolvendo mais de 100 países e 5.400 espécies entre organismos marinhos e de água doce (ZUANON, SALARO e FURUYA, 2011).

O Brasil é considerado um dos principais exportadores da América do Sul, com uma média de 5 milhões de exemplares exportados em 10 anos, e um recorde de 41 milhões de peixes ornamentais exportados no ano de 2008 (SISCOMEX, 2018). A exportação se restringe a espécies nativas que, por sua vez, são obtidas através da pesca, sendo a principal fonte de renda de pequenas comunidades pesqueiras pelo país (ANJOS et al., 2009). Em contrapartida, a produção em cativeiro é muitas vezes limitada à produção de espécies exóticas, de baixa exigência tecnológica e amplamente difundidas no aquarismo. Com isso, o ramo da piscicultura ornamental – que hoje abastece quase que exclusivamente o mercado interno – é um dos ramos da aquicultura que, se melhor organizado e coordenado, possui grande potencial de crescimento para os próximos anos (RIBEIRO et al., 2008).

A grande popularidade e disseminação de determinadas espécies voltadas para o aquarismo tem características análogas como: exotividade, fácil manutenção, adaptação a diferentes condições ambientais e mercado consumidor já consolidado. Dentre estas, o betta (*Betta splendens*) se destaca pela sua exuberância – com uma variedade de formatos e cores de nadadeiras. Capaz de respirar o oxigênio atmosférico, o betta está entre as espécies de peixe que possuem órgão de respiração acessório chamando labirinto, que permite trocas gasosas do peixe com o ar, o que viabiliza sua manutenção em recipientes de pequeno volume. Além destas características, o betta é extremamente prolífero, sendo facilmente reproduzido em cativeiro (FARIA et al, 2007).

Entre as condições para o sucesso da atividade, a priorização de produção de indivíduos machos de *Betta splendens* é de extrema importância, pois estes apresentam desenvolvimento acentuado das nadadeiras e cores mais vibrantes em relação às fêmeas, atingindo maiores valores de mercado (THONGPRAJUKAEW et al., 2014). Com o objetivo de aumentar o número de machos obtidos a partir de uma única prole, técnicas de inversão sexual com o uso de hormônios foram anteriormente investigadas na espécie (REIS, ALMEIDA e PIFERRER, 2016; KIPOUROS et al., 2011; KAVUMPURATH e PANDIAN, 1994; KIRANKUMAR e PANDIAN, 2002).

No entanto, alguns fatores podem limitar o uso de hormônios em pisciculturas ornamentais – como o custo elevado e difícil acesso ao esteroide – e, além disso, existem riscos para a saúde humana associado ao manuseio e possível liberação de resíduos no ambiente quando não utilizados de forma adequada (BUDD et al., 2015).

Técnicas alternativas e mais sustentáveis já são empregadas com sucesso na obtenção de populações monossexo em peixes. Fatores como a temperatura, pH e manipulação social podem influenciar diretamente na proporção sexual em diversas espécies, sendo entre estas a manipulação termal a mais elucidada e de simples aplicação prática até o momento, podendo ser empregada em alternativa ao uso de hormônios (BUDD et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes tratamentos térmicos durante o desenvolvimento larval de *Betta splendens*, verificando a sobrevivência dos animais e a proporção sexual obtida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Determinação Sexual

O processo de determinação sexual transcorre por uma série de mecanismos fisiológicos e químicos, podendo ser distintos de acordo com a espécie em questão. Na maior parte das vezes, é coordenado primordialmente pelo código genético. Contudo, em alguns casos, fatores ambientais podem influenciar diretamente na determinação, sobrepondo o efeito dos genes. Em muitas espécies de répteis, por exemplo, a determinação sexual está diretamente ligada à temperatura experimentada durante a embriogênese (MODI e CREWS, 2005).

Entre os vertebrados, os peixes são os que apresentam maior variabilidade de mecanismos de determinação sexual, podendo ser classificados em diferentes grupos. Os GSD – *genetic sex determination* – onde se encontram as espécies que tem seu sexo determinado por genes; ESD – *environmental sex determination* – onde o sexo é definido por efeitos do ambiente (temperatura, pH, entre outros); e os que apresentam interação entre os dois mecanismos supracitados (GSD+ESD) (SANTOS, LUZIO e COIMBRA, 2017). Acredita-se que os mecanismos de ESD foram desenvolvidos durante o processo evolutivo de determinadas espécies com o propósito de manipulação populacional, podendo ser vantajoso em determinadas condições ambientais específicas (MANK, PROMISLOW e AVISE, 2006).

Entre os mecanismos evolutivos de determinação sexual por efeito do ambiente, o mecanismo associado à ação da temperatura, chamado também de TSD – *temperature sex determination* – está entre os evidenciados em peixes. Foi inicialmente descrito em um peixe marinho da família Atherinopsidae, *Menidiamenidia*. Foi verificada a modificação da razão sexual – ou número de machos e fêmeas – ao longo do ano no ambiente natural e em ensaio laboratorial com temperatura controlada, demonstrando um aumento significativo de fêmeas durante regimes de temperatura fria. A partir desta pesquisa, uma série de estudos foram desenvolvidos objetivando identificar a predominância de tal mecanismo em diferentes espécies de peixes (CONOVER e KYNARD, 1981).

Em espécies expostas a condições de temperatura que de fato seriam verificadas na natureza, a oscilação da razão sexual de acordo com a temperatura é menos comum do que se pensava, gerando discussões acerca de sua abundância e prevalência (OSPINA-ÁLVAREZ e PIFERRER, 2008). Boa parte das espécies investigadas com a presença de tal mecanismo não são consideradas de potencial produtivo para a aquicultura, salvo algumas exceções como o peixe-rei (*Odontesthes bonarienses*) (STRUUSSMANN et al., 1996).

Contudo, espécies de caráter produtivo podem ser muitas vezes expostas a condições ambientais diferentes das condições observadas em seu meio natural. Por exemplo, quando peixes são criados e reproduzidos em pisciculturas, é desejável que variáveis como: temperatura, pH e oxigênio dissolvido sejam monitoradas e, se possível, controladas artificialmente com a implementação de tecnologias, atingindo assim melhores resultados produtivos. Desta forma, algumas espécies que têm seu sexo determinado primariamente pelo efeito genético, podem ser expostas a condições que permitam a modificação intencional do sexo, que não ocorreria de outra forma que não em um ambiente artificial, como por exemplo a utilização de diferentes temperaturas que não ocorreriam no ecossistema natural de uma determinada espécie de peixe. Espécies que se enquadram nessa categoria possuem o mecanismo chamado GSD + TE – *Genetic sexual determination + temperature effect* (BUDD et al., 2015).

O mecanismo fisiológico envolvido na determinação sexual pelo efeito genético associado a ação da temperatura ainda é pouco elucidado. Sabe-se que a concentração de hormônios andrógenos e estrógenos durante o período lábil – período no qual as gônadas seguem indiferenciadas – é crucial na determinação do sexo em peixes. A temperatura é capaz de modular a expressão do gene *cyp19a* do complexo enzimático da aromatase, que por sua vez tem como produto a conversão de hormônios andrógenos em estrógenos. Neste mecanismo, temperaturas elevadas têm a capacidade de inibir a expressão do gene *cyp19a*, através de sua desnaturação, consequentemente os níveis de hormônios estrógenos são momentaneamente reduzidos e o animal tende a se diferenciar como macho durante o período termo sensível, ocorrendo a masculinização de fêmeas genéticas, os chamados neomachos (NAVARRO-MARTÍN et al., 2011).

Pesquisadores identificaram tal comportamento em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), onde obtiveram até 81% de machos submetidos a temperatura de 36,5°C durante os primeiros 20 dias após a absorção do saco vitelínico (AZAZA, DHRAÏEF e KRAÏEM, 2008).

Em contrapartida, em estudo com salmão vermelho *Oncorhynchus nerka*, foi verificado aumento significativo no número de fêmeas quando determinada população – obtida previamente por inseminação artificial – foi submetida a um aumento de temperatura de cerca de 2°C durante a fase embrionária (8,4-10,5°C). A proporção variou de 62% nas populações que não receberam nenhum tipo de tratamento térmico para 84% (CRAIG, FOOTE e WOOD, 1996). O mesmo foi verificado em bagres (*Ictalurus punctatus*) expostos a temperatura de 34°C, com uma proporção de 1 macho:1,68 fêmeas, quando comparado ao grupo de 20 e 27°C, onde não houve variação significativa na razão sexual (PATIÑO et al., 1996). No robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), foram obtidos apenas machos em animais mantidos a 15°C, sendo que no mesmo período, na temperatura de 25°C, não foi observada flutuação da razão sexual entre machos e fêmeas (BLÁZQUEZ et al., 1998).

Os presentes estudos evidenciam que a temperatura pode ser fator crucial na determinação sexual, e que ainda, outros mecanismos não elucidados podem atuar concomitantemente, influenciando de forma direta na proporção de machos e fêmeas obtidos, variando de acordo com a espécie.

2.2 Período Lábil

O tipo, duração e momento do tratamento utilizado para a reversão sexual pode variar muito de acordo com a espécie em questão. Fatores abióticos e hormônios exógenos, podem ser utilizados individualmente ou em conjunto para a obtenção de populações monossexo, contudo, o momento e a duração correta do tratamento são importantes fatores a serem considerados na execução.

O momento ideal para execução é conhecido como “período lábil” – intervalo específico durante o desenvolvimento do animal onde as gônadas ainda estão indiferenciadas – neste momento não há definição do sexo e os tratamentos utilizados tendem a ser mais efetivos (BAROILLER, COTTA e SAILLANT, 2009).

O conhecimento prévio acerca do desenvolvimento gonadal bem como do período lábil é imprescindível para o desenvolvimento de protocolos mais eficazes de manipulação sexual, sendo particular de acordo com a espécie estudada.

2.3 Uso de Hormônios e Seus Desafios

Entre as técnicas conhecidas e utilizadas na manipulação sexual de peixes, a administração de hormônios tem sido a frequentemente utilizada devido sua fácil aplicação em escala comercial e consistência na produção de populações monossexo. A técnica foi inicialmente descrita no medaka (*Oryzias latipes*), onde houve sucesso na indução artificial do sexo através do uso de hormônios estrógenos e andrógenos em peixes indiferenciados sexualmente, resultando respectivamente, em fêmeas e machos funcionais (YAMAMOTO, 1953; YAMAMOTO, 1958).

A utilização de hormônios se mostra a técnica mais efetiva na geração de populações monossexo em peixes, sendo sua aplicação eficiente também em espécies com determinação cromossômica presente (GSD), como a tilápia, salmão do atlântico e truta arco-íris (TAYAMEN e SHELTON, 1978; SOWER et al., 1984; e PADOA, 1939). Contudo, deve ser levado em consideração todo o risco associado à utilização de tal técnica, que, se mal executada, pode ser prejudicial para o produtor, consumidor e até o meio ambiente, através da geração de resíduos poluentes.

O uso excessivo de hormônios pode levar muitas vezes a deformidades nos animais ou até mesmo inverter o efeito desejado, levando ao aumento do número de animais do sexo não objetivado (CHATAIN, SAILLANT e PERUZZI, 1999). Existem os riscos associados ao manuseio de tais substâncias, que muitas vezes podem ser prejudiciais à saúde de produtores inexperientes. Danos ao meio ambiente também devem ser avaliados, como por exemplo o descarte indevido da água utilizada em meios naturais, podendo causar diversos impactos negativos (FAWELL et al., 2001).

Considerando todos os fatores negativos associados ao uso de hormônios em pisciculturas, técnicas alternativas vêm ganhando espaço nos últimos anos, como a manipulação dos fatores ambientais (BUDD et al., 2015).

2.4 Obtenção de populações monossexo e limitações

Em países onde a aquicultura é consolidada não é recente o uso de técnicas para a produção de populações monossexo, sendo uma tecnologia que permite melhores resultados produtivos e maiores índices de lucratividade (REIS, ALMEIDA e PIFERRER, 2016). Existem diversas vantagens associadas à obtenção de populações monossexo na produção de peixes, como: melhores índices de desempenho ligados ao sexo, evitar reproduções indesejadas durante o ciclo produtivo, redução de risco de introdução de espécies não-nativas em ambientes naturais e, como no caso do betta *Betta splendens*, a obtenção de um maior número de indivíduos machos que possuem maior valor de mercado (KAVUMPURATH e PANDIAN 1994).

Pesquisadores vêm investigando o efeito direto da temperatura sobre a sobrevivência e desenvolvimento de diferentes espécies de peixes, identificando as faixas ideais para melhores resultados produtivos.

Em pesquisa com diferentes espécies de tilápia (*O. niloticus*; *O. aureus*; híbrido *O. niloticus* x *O. aureus* e tilápia vermelha), larvas foram submetidas a três regimes de temperatura distintos (25, 30 e 35°C). O autor obteve os melhores valores de crescimento – em peso e tamanho – e maior taxa de sobrevivência na temperatura intermediária (30°C) até os 35 dias de vida, estabelecendo a faixa adequada para o cultivo (ABDEL-HAKIM, et al., 2014).

Pesquisadores demonstraram o efeito de diferentes temperaturas (23, 26, 29 e 32°C) associadas a dois regimes alimentares (700 e 1300 náuplios de artêmia/L) em larvas de *Lophiosilurus alexandri* (pacamã), sendo que, para a espécie, não houve efeito das temperaturas testadas na taxa de sobrevivência a dos animais. Por outro lado, a temperatura influenciou significativamente no comprimento total e taxa de crescimento específico, sendo 31,4 e 31°C consideradas ótimas para tais parâmetros (P700 e P1.300, respectivamente) (TAKATA et al., 2014).

Foi demonstrado relação direta entre diferentes temperaturas (0, 2, 4, 6, 8°C) e a duração do período de incubação de ovos de *Gadus macrocephalus*, observando piores resultados de eclosão na temperatura mais baixa (0°C) em comparação as demais faixas. A temperatura influenciou no tamanho das larvas recém-eclodidas e no tamanho máximo obtido das larvas pré-alimentação exógena. Estas pesquisas corroboram que a temperatura tem papel fundamental nas fases iniciais de desenvolvimento, impactando de forma significativa tanto na sobrevivência quanto no crescimento dos peixes, sendo um fator limitante para a utilização de protocolos de reversão por temperatura (LAUREL et al., 2008).

2.5 Reversão Sexual em *Betta splendens*

Buscando aumento na proporção de machos, estudos anteriores verificaram a eficiência do uso de hormônios na reversão sexual de *Betta splendens*. Inicialmente, pesquisadores obtiveram até 100% machos com o uso de hormônios sintéticos e naturais na alimentação em diferentes concentrações, até os 40 dias pós-eclosão. Posteriormente, os machos obtidos no experimento foram reproduzidos com outras fêmeas, tendo como resultado a geração de proles de até 100% fêmeas, provando a presença de machos revertidos ou homogaméticos (XX) (KAVUMPURATH e PANDIAN, 1994).

Em outro estudo, pesquisadores administraram na alimentação diferentes doses de 17 α -metiltestosterona, sendo ofertado do 4º ao 11º dia pós-eclosão nas concentrações de, 1, 2, 3 e 4 mg/Kg de alimento inerte. Os resultados obtidos foram de até 100% de machos nas doses mais elevadas (KIPOUROS et al., 2011).

Outra forma de administração de hormônio é através de imersão por banho. Pesquisadores demonstraram que banhos de 17 α -metiltestosterona, com duração de 3 hs/dia, no 2º, 5º e 8º dia pós-eclosão e na concentração de 900 μ /L, levaram a obtenção de até 98% de machos, entretanto o tratamento influenciou na sobrevivência que foi de 71% na maturidade sexual (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2002).

Podemos observar que nos estudos anteriores houve mortalidade significativa de animais que receberam hormônios, sendo que, concentrações maiores levaram a maiores índices de mortalidade e a maiores taxas de reversão.

Testamos no presente experimento o uso de metodologia alternativa ao uso de hormônios para a masculinização do peixe betta *Betta splendens*. Para tal, larvas recém-eclodidas foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos com a hipótese de que a elevação da temperatura – a partir da temperatura ideal de criação da espécie – propicia um aumento na proporção de indivíduos machos revertidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética, Local e Duração do Experimento

O presente trabalho foi submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ, sob o processo nº 0042-04-2019. O experimento foi realizado nas instalações da Estação de Biologia Marinha (EBM), localizada em Itacuruçá, distrito de Mangaratiba/RJ, pertencente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Latitude: -22.92930151; Longitude: -43.90697569), tendo duração total de 180 dias.

3.2 Manutenção dos Reprodutores

Inicialmente, foram obtidos 20 casais adultos de *Betta splendens* da variedade *longtail* de linhagem comercial, cedidos por produtores registrados na Associação dos Aquicultores de Patrocínio de Muriaé e Barão do Monte Alto-MG (AQUIPAM - BMA), com cerca de 4 meses de idade. Os animais foram identificados, pesados (peso médio (g): machos = $1,78 \pm 0,18$; fêmeas = $1,03 \pm 0,07$) e distribuídos em recipientes de vidro individuais contendo 2 litros de água cada (Figura 1).



Figura 1. Recipientes de vidro utilizados para a manutenção dos reprodutores no laboratório. (esq. machos e dir. fêmeas).

O laboratório foi climatizado a 28°C com auxílio de condicionador de ar, onde os animais permaneceram em quarentena por 60 dias até a obtenção das proles por reprodução natural. A cada 2 dias, cerca de 50% da água dos recipientes era renovada e os dejetos eram sifonados com o auxílio de uma mangueira. Foi utilizada ração comercial, ofertada duas vezes ao dia (09:00 e 18:00), e duas vezes na semana foi oferecido *bloodworm* (larvas de mosquitos da família Chironomidae, congelados) para os adultos.

Durante todo o período experimental foi utilizada água declorada, previamente filtrada com filtro de luz UV (CUBOS®, 75W, H0, Cristal de Quartzo) e armazenada em caixas d'água com capacidade de 2000L até a utilização. O pH da água era monitorado através de teste colorimétrico (LABCON®, pH tropical) e corrigido para neutralidade com bicarbonato

de sódio comercial, quando necessário, sendo a faixa ideal para a espécie entre 6–8 (RIEHL e BAENSCH, 1993).

3.3 Obtenção das Larvas

Após o período de quarentena, os casais foram formados e distribuídos em aquários de vidro convencionais, previamente higienizados, com volume útil de cerca de 19L (Figura 2). Inicialmente os casais foram mantidos em contato visual durante as primeiras 24 horas, com a posterior liberação da fêmea para reprodução, que ocorreu nas 24 horas subsequentes. Após esse período a fêmea foi retirada e o macho seguiu com a incubação dos ovos até a eclosão, que ocorreu até às 48 horas posteriores. O protocolo completo teve duração de aproximadamente 96 horas, onde foram obtidas as larvas utilizadas nos tratamentos térmicos.



Figura 2. Aquários utilizados para reprodução dos peixes. As fêmeas foram mantidas inicialmente dentro de recipientes plásticos transparentes perfurados estimulando o processo reprodutivo. A fim de evitar interferências entre casais, foram alocadas barreiras visuais entre os aquários.

3.4 Delineamento Experimental

3.4.1 Etapa inicial: banho termostatzado (0 – 15 DPE)

As larvas recém-eclodidas (D0) de cada casal foram distribuídas em béqueres de 300mL, com água tratada, em grupos de 30 animais/cada, sendo cada béquer considerado uma unidade experimental (Figura 3). Foram formados grupos de cada casal para atender a cada um dos tratamentos.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado de acordo com o modelo matemático: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$; em que Y_{ij} são as variáveis observadas; μ é a média geral; T_i é o efeito fixo de tratamento em quatro níveis de temperatura, sendo: 25, 28, 30 e 33 °C (T_{25} , T_{28} , T_{30} e T_{33} , respectivamente) e e_{ij} é o efeito aleatório do erro, sendo as temperaturas obtidas através de banhos termostatzados.

Para os banhos termostatizados, os béqueres eram imersos em água e em seguida aclimatados a 1°C/hora até a temperatura desejada. Para a manutenção da temperatura no tratamento T25 foi utilizada incubadora tipo B.O.D. (SP LABOR©, SP-225), onde os béqueres foram mantidos imersos dentro de bacia retangular no interior da câmara de incubação. Para os tratamentos T28, T30 e T33 foram instalados termostatos com aquecedor (BOYU©, HT8200, 200W) dentro de caixas térmicas, sendo a imersão realizada no interior da mesma. Além disso, foram instaladas bombas submersíveis (SARLO BETTER©, MINI A, 60L/h) que mantinham a água em constante circulação, mantendo a homogeneidade de temperatura no interior dos béqueres (Figura 4).



Figura 3. Processo de separação das larvas com auxílio de pipeta descartável.



Figura 4. Caixa térmica utilizada para os tratamentos de 28, 30 e 33°C. Termostatos e bombas foram utilizados para a manutenção da temperatura da água durante o experimento, a cada 6 horas, a temperatura era mensurada nos recipientes.

O banho termostatizado teve duração total de 15 dias a partir do momento de eclosão das larvas (0-15 DPE), sendo o período ontogênico correspondente ao surgimento das primeiras gônias em *Betta splendens* (DUARTE et al., 2012). Durante o período de tratamento térmico, as temperaturas foram monitoradas diariamente com auxílio de um medidor multiparâmetro digital (AKSO©, AK-88), apresentando as seguintes médias ao final da etapa: $25,0 \pm 0,2$; $27,9 \pm 0,1$; $30,0 \pm 0,2$ e $33,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, dentro das temperaturas propostas inicialmente em cada tratamento.

A partir dos 3 DPE as larvas receberam alimentação exógena, sendo composta de náuplios de artêmia salina recém eclodidos (<24 h de eclosão). A alimentação foi ofertada até a saciedade aparente dos animais três vezes ao dia (08:00, 13:00 e 19:00) com o auxílio de pipeta descartável. A cada dois dias, 40% do volume total de água foi renovada com água tratada e climatizada para a reposição em cada tratamento. Os resíduos decantados no béquer eram sifonados com o uso de mangueira plástica. Ao final da primeira etapa (15 DPE) foi contabilizado o número de larvas sobreviventes em cada recipiente para posterior análise estatística da mortalidade dos animais (%).

3.4.2 Etapa intermediária: período pós-regime térmico (15 – 45 DPE)

Posteriormente ao período de tratamento térmico, os peixes foram aclimatados a temperatura de 28°C, respeitando-se a variação de 1°C/hora, e então foram redistribuídos em recipientes circulares com volume total de 3L de água (figura 5). O protocolo para manutenção dos animais foi similar ao da etapa inicial, sendo que a partir do 30º DPE foi iniciado o fornecimento de ração em pó comercial em coalimentação com náuplios de artêmia.

A coalimentação foi gradativamente reduzida e substituída por ração na dieta dos animais. A etapa intermediária teve duração total de 30 dias (até os 45 DPE) onde, ao final, foi feita nova contagem de animais sobreviventes para identificar um possível efeito residual do tratamento térmico sobre a sobrevivência dos animais.



Figura 5.Recipientes utilizados na etapa intermediária.

3.4.3 Etapa final: período de identificação do sexo (após os 45 DPE)

Na última etapa, foram utilizados dois tanques retangulares com capacidade total de 1000L, onde os animais foram distribuídos aleatoriamente em hapas, cada uma com identificação respectiva ao tratamento térmico submetido (Figura 6). As hapas permitiam a troca livre de água, que era recirculada através de uma bomba submersível (2700L/h). Aos tanques foi acoplado sistema de filtragem mecânica com o uso de manta acrílica, com circulação contínua de água. Semanalmente, a manta acrílica era substituída e cerca de 60% da água dos tanques renovada, com o sifonamento dos resíduos. Nesta etapa a ração em pó foi gradativamente substituída por ração comercial extrusada, sendo oferecida duas vezes ao dia.

Ao longo da última etapa, animais que pudessem ser identificados pelo sexo eram removidos e contabilizados para posterior análise estatística. A determinação do sexo na espécie é evidenciada pelo surgimento de características sexuais secundárias (Figura 7). Nos machos, ocorre o crescimento acentuado das nadadeiras dorsal, caudal e ventral, além de comportamento agressivo característico. As fêmeas podem ser determinadas pelo abaulamento do ventre e o surgimento de um ponto branco no abdômen denominado ovipositor (FARIA et al., 2007). A etapa final durou até os 180 dias de experimento.



Figura 6. Piscina de 1000L utilizada na fase final. Cestos onde os animais foram alocados até a determinação sexual.

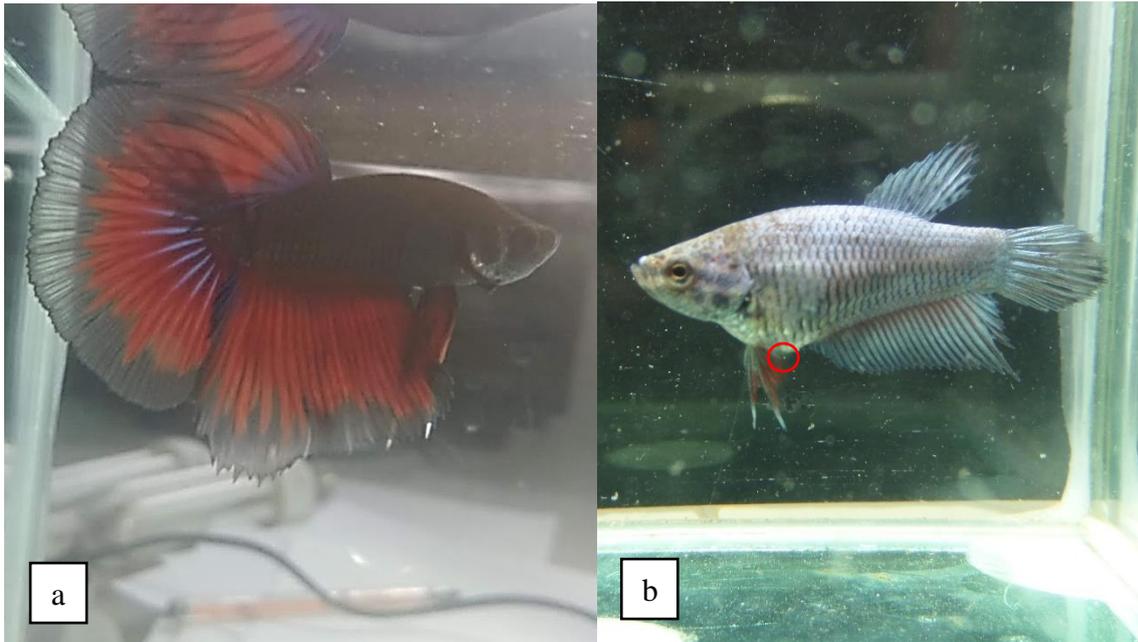


Figura 7. Dimorfismo sexual em *Betta splendens*. (a) Macho pode apresentar prolongamento das nadadeiras e cores mais vibrantes em comparação a fêmea (de acordo com a variedade), geralmente agressivo com outros machos da espécie. (b) Fêmea apresenta o ventre abaulado, além de ponto branco na região denominado ovipositor. Fonte: Arquivo pessoal.

3.5 Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de Bartlett para verificar a homocedasticidade. A partir desta análise os valores em percentuais foram transformados em arco seno. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando detectadas diferenças entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas no software R.

Ao longo do experimento, dois béqueres (repetições) reduziram drasticamente a proporção de machos sem nenhuma razão aparente. Todas as demais repetições se mantiveram com padrão de resposta para a proporção de machos e fêmeas, logo decidiu-se por remover os dados considerados como outliers.

A remoção dos outliers foi baseada no resíduo estudentizado fora do intervalo de $\pm 1,5$ usando a ferramenta de boxplot do software R (SCHWERTMAN, 2004).

4 RESULTADOS

Na Tabela 1, encontram-se os valores de mortalidade referentes a duas etapas do experimento. Para a primeira variável, foi avaliada a mortalidade em porcentagem até os 15 DPE, com o objetivo de identificar o efeito direto da temperatura na sobrevivência dos animais. Para a segunda variável – mortalidade (%) aos 45 DPE – avaliou-se um possível efeito residual da temperatura na segunda etapa do experimento.

Tabela 1. Valores médios de mortalidade (%) em função dos diferentes níveis de temperatura até os 15 e 45 DPE. Sendo que, T25, T28, T30 e T33 equivalem a 25, 28 30 e 33 °C, respectivamente.

Variáveis	Tratamentos térmicos (°C)				EPM	p-valor
	T25	T28	T30	T33		
MORT (15 DPE)	13,33a	6,29a	15,27a	45,00b	2,95	<0,001
MORT (45 DPE)	4,00	0,43	1,63	4,41	0,49	0,08

MORT = mortalidade; 15 DPE = 15 dias pós-eclosão; 45 DPE = 45 dias pós-eclosão; EPM = Erro padrão médio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância.

Houve diferença estatística para mortalidade aos 15 DPE ($P < 0,001$). Os tratamentos T25, T28 e T30 apresentaram menor taxa de mortalidade quando comparado ao T33. Para a mortalidade aos 45 DPE, correspondente ao efeito residual dos tratamentos térmicos, não foi observada diferença estatística ($P = 0,08$). Portanto, a mortalidade frente aos 4 tratamentos térmicos (T25, T28, T30 e T33) foi similar nesta etapa.

Na Tabela 2, encontram-se os valores referentes à razão sexual (%) obtida ao final do experimento em função das temperaturas testadas.

Tabela 2. Valores médios para a razão sexual de machos e fêmeas (%) em função dos diferentes níveis de temperatura até o final do experimento.

Variáveis	Tratamentos térmicos (°C)				EPM	p-valor
	T25	T28	T30	T33		
MACHOS (%)	43,43b	45,74ab	51,14ab	67,21a	3,349	0,037
FÊMEAS (%)	56,56a	54,26ab	48,86ab	33,00b	3,349	0,037

EPM = Erro padrão médio. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Houve diferença estatística para a proporção de machos e fêmeas obtidos ao final do experimento ($p = 0,037$). No tratamento T33, houve significativamente uma maior proporção de machos em relação ao T25, contudo, este não diferiu dos tratamentos T28 e T30. O resultado foi inversamente proporcional quando levado em consideração a proporção de fêmeas, sendo superior no tratamento T25 em relação ao T33, não diferindo dos demais tratamentos (T28 e T30).

5 DISCUSSÃO

A temperatura é um dos principais parâmetros ambientais que afetam o meio aquático por influenciar direta e indiretamente outros parâmetros, como o teor de oxigênio dissolvido, concentração de amônia tóxica, a distribuição de organismos, a produtividade natural na água, períodos reprodutivos, crescimento, e em caso de algumas espécies de teleósteos, a razão sexual (BUDD et al. 2015; BOYD e TUCKER, 2012).

No presente estudo, a sobrevivência dos animais foi influenciada diretamente pelos regimes térmicos propostos, sendo observadas as menores taxas de mortalidade para o tratamento T28 durante o período de exposição. Esse resultado era esperado, dado que na literatura foi anteriormente demonstrado que a temperatura ideal de criação de *Betta splendens* adulto é de cerca de 27,5°C (FARIA et al, 2007).

Entretanto, durante a segunda etapa (15DPE aos 45DPE), não verificamos diferença entre os resultados de mortalidade nos tratamentos. Isso demonstra que o protocolo de adaptação térmica de 1°C/hora para 28°C foi efetivo e que não ocorreu efeito residual de mortalidade, mesmo no tratamento onde houve maior variação termal (33-28°C).

Peixes são organismos pecilotérmicos (ou exotérmicos), tendo a taxa metabólica governada pela temperatura do ambiente onde se encontram. Temperaturas elevadas aceleram a taxa metabólica, e temperaturas reduzidas, por sua vez, diminuem a atividade fisiológica. Contudo, se a temperatura se eleva ou reduz além do limite fisiológico, existem consequências negativas para o animal, esses limites são chamados limite crítico inferior e limite crítico superior (BOYD e TUCKER, 2012). Os principais efeitos relacionados ao desbalanço termal é, primeiramente, redução da ingestão de alimento, retardo do crescimento, passando por redução da resposta imune, podendo ocasionar o aparecimento de patógenos oportunistas, até culminar na morte do animal.

Nos resultados obtidos no presente experimento em *Betta splendens*, podemos afirmar que a faixa ideal de temperatura para a fase de larvicultura está compreendida entre 25 e 30°C. Esse resultado corrobora com outros estudos que investigaram a temperatura ideal durante a larvicultura de algumas espécies de peixes, como tilápia *Oreochromis niloticus* (RANA, 1990), kinguio *Carassius auratus* (KESTEMONT, 1995) e tambaqui *Collossoma macropomum* (SOUZA, GUALBERTO e O'SULLIVAN, 2013).

Neste estudo, as características de dimorfismo sexual puderam ser observadas a partir de 45 DPE, independente da temperatura a qual foram submetidos. Foi verificada uma maior proporção de machos com a elevação da temperatura, com pouco mais de 65% de machos obtidos no tratamento T33. Além disso, não foi observada a presença de anormalidades anatômicas externas que possam ser atribuídas aos tratamentos térmicos.

Pesquisadores obtiveram resultados superiores na masculinização de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), onde tratamentos de 32 e 34°C levaram a 98 e 91% de machos, respectivamente (ZANONI et al., 2013). Para a espécie, a reversão para machos é essencial no aspecto produtivo, pois os machos possuem desenvolvimento acelerado quando comparado as fêmeas. Além disso, a tilápia é extremamente prolifera e precoce, podendo se reproduzir nos viveiros e conseqüentemente gerando lotes heterogêneos em peso e idade (REIS, ALMEIDA e PIFERRER, 2016).

Experimentos com a carpa comum *Carassius carassius*, demonstraram o efeito em larvas expostas a duas temperaturas distintas (24 e 30°C). As larvas utilizadas no experimento foram obtidas através de fertilização artificial, onde a fêmea recebeu espermatozoides de um neomacho induzido por hormônio. Foi verificado que a temperatura de 30°C propiciou o

aparecimento de indivíduos machos (21,7% de machos) frente ao tratamento a 24°C (0% de machos), demonstrando o papel crucial que a temperatura exerce na razão sexual em peixes, além de sobrepor mecanismos genéticos primários (FUJIOKA, 2000). Em estudo similar, pesquisadores identificaram o mesmo padrão no peixe japonês, *Carassius auratus*. As larvas foram obtidas previamente através do cruzamento de indivíduos homogaméticos (XX) e então expostas a diferentes temperaturas. Para esta espécie, o efeito foi ainda mais perceptível, nas larvas expostas a temperatura de 15°C obteve-se 94,6% de fêmeas, frente a 7,7% obtidas a 30°C (GOTO-KAZETO, 2006). Estes trabalhos corroboram a complexidade da determinação sexual em peixes e o papel fundamental que a temperatura pode exercer nesse processo, como verificado no presente estudo.

A teoria que melhor explica o comportamento de aumento de machos frente aos diferentes regimes térmicos, como foi observado no presente estudo (43-67%), é a da inibição da aromatase. A enzima está envolvida na catálise da conversão da testosterona em estradiol. Com isso, a exposição a temperaturas elevadas – fora da faixa experimentada naturalmente pela espécie – pode levar a desnaturação dessa enzima. O aumento da proporção de machos pode ser explicado pela baixa conversão de testosterona em estradiol, que está associada à desnaturação da enzima. Além disso, é essencial que a exposição ocorra durante o período lábil, período no qual o sexo fenotípico ainda é indefinido.

No bagre europeu, *Dicentrarchus labrax*, as fêmeas são mais desejadas, pesquisadores consideram que deve-se levar em conta o momento correto para o tratamento térmico utilizado, como foi considerado no presente estudo (NAVARRO-MARTÍN et al., 2009). Em seu trabalho o autor obteve até 90% de fêmeas, obtidas a partir de diferentes reprodutores e de diferentes progênies expostos a apenas um regime térmico, mas em períodos distintos na pós-fertilização. Anteriormente, outros pesquisadores obtiveram resultados similares, concluindo que em nenhuma faixa de temperatura foi possível a produção de 100% de fêmeas na espécie, associando o resultado a fatores genéticos não ligados a influência do ambiente (MYLONAS et al., 2005). De forma similar, não conseguimos obter 100% de animais de um único sexo em *Betta splendens* nas temperaturas experienciadas, demonstrando que para a espécie, outros fatores associados aos reprodutores podem estar associados a definição do sexo gonadal durante o período lábil.

6 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que na faixa de temperatura entre 25 e 30 °C pode-se obter sobrevivência satisfatória na larvicultura do *Betta splendens*. Além disso, conclui-se que a manipulação térmica permitiu uma proporção de até 67% machos e 43% fêmeas, dentro do período de 15 dias pós-eclosão e utilizando temperatura de 33 °C.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAKIM, N.; HUSSEIN, M.; MOUSA, M.; ATTIA E.; NEMAKY, F. Effect of rearing temperature on larval growth and the development in different tilapia species. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, 18(2), 1-14, 2014.
- ANJOS, H. D. B.; AMORIM, R.M.S.; JULIO ALBERTO SIQUEIRA, J.A.; ANJOS, C.R. Exportação de peixes ornamentais do estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 259-274, 2009.
- AZAZA, M.S.; DHRAÏEF, M.N.; KRAÏEM, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia, **Journal of Thermal Biology**, v. 33 n. 2 p. 98-105, 2008.
- BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H.; SAILLANT, E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. **Sexual development**, 3(2-3), 118-135, 2009.
- BLÁQUEZ, M.; ZANUY S.; CARILLO, M.; PIFERRER F. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). **Journal of experimental Zoology**, v. 281, n. 3, p. 207-216, 1998.
- BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Pond aquaculture water quality management**. Springer Science & Business Media, 2012.
- BUDD, A. M.; BANH, Q. Q.; DOMINGOS, J. A.; JERRY, D. R. Sex Control in Fish: Approaches, Challenges and Opportunities for Aquaculture. **Journal of marine science and engineering**, v. 3, p. 329-355, 2015.
- CHATAIN, B.; SAILLANT, E.; PERUZZI, S. Production of monosex male populations of European seabass, *Dicentrarchus labrax L.* by use of the synthetic androgen 17 α -methyldehydrotestosterone. **Aquaculture**, 178, 225–234, 1999.
- CONOVER, D. O.; KYNARD, B. E. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. **Science** v. 213, n. 4507 p. 577-579, 1981.
- CRAIG, J.K.; FOOTE, C.J.; WOOD, C.C. Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** , v. 53, n. 1, p. 141-147, 1996.
- DUARTE, S. C.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; FERREIRA, A. V.; MATTOS, D. D. C.; BRANCO, A. T. Ontogeny and embryonic description of *Betta splendens*, Perciformes (Regan, 1910). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 880-893, 2012.
- FARIA, P.M.C.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; SOUZA, A.B.; CARVALHO, D.C.; MELO, D.C.; SALIBA, E.O.S. Criação, manejo e reprodução do peixe, *Betta splendens* (Regan 1910), **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 134-149, 2007.
- FAWELL, J. K.; SHEAHAN, D.; JAMES, H. A.; HURST, M.; SCOTT, S. Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in Severn Trent Water. **Water Research**, v. 35, n. 5, p. 1240-1244, 2001.
- FUJIOKA, Y. Effects of hormone treatments and temperature on sex-reversal of *Nigorobuna Carassius carassius grandoculis*. **Fish Sci** 68: 889-893, 2000.
- GOTO-KAZETO, R.; ABE, Y.; MASAI, K.; YAMAHA, E.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. Temperature-dependent sex differentiation in goldfish: Establishing the temperature-

sensitive period and effect of constant and fluctuating water temperatures. **Aquaculture** 254: 617-624, 2006.

KAVUMPURATH, S.; PANDIAN, T. J. Masculinization of *Poecilia reticulata* by dietary administration of synthetic or natural androgen to gravid females. **Aquaculture**, v. 116, n. 1, p. 83-89, 1994.

KESTEMONT, P. Influence of feed supply, temperature and body size on the growth of goldfish *Carassius auratus* larvae. **Aquaculture**, 136(3-4), 341-349, 1995.

KIPOUROS, K.; PASCHOS, I.; GOUVA, E.; ERGOLAVOU, A.; PERDIKARIS, C. Masculinization of the ornamental Siamese fighting fish with oral hormonal administration. **ScienceAsia** v. 37, p. 277-280, 2011.

KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T. J. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. **Journal of experimental zoology** v. 293, p. 606-616, 2002.

LAUREL, B. J.; HURST, T. P.; COPEMAN, L. A.; DAVIS, M. W. The role of temperature on the growth and survival of early and late hatching Pacific cod larvae (*Gadus macrocephalus*). **Journal of Plankton Research**, 30(9), 1051-1060, 2008.

MANK, J. E.; PROMISLOW, D.; AVISE, J. C. Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, n. 1, p. 83-93, 2006.

MODI, W.S., CREWS, D. Sex chromosomes and sex determination in reptiles. **Current Opinion in Genetics & Development**, 15, 660-665, 2005.

MYHRE, P.; NUNES, J.P.; SUP LICY, F.M.; VIDAL, E.A.G.; ROMBENSO, A.N.; HAYASHI, L.; KANEMOTO, F.T.; MATIAS, J.F.N. World Food Giant – Brazil Aiming to be One of the Top Five Aquaculture Producers in 2020. **World Aquaculture**, v. 48, n. 3, p. 31-37, 2017.

MYLONAS, C. C.; ANEZAKI, L.; DIVANACH, P.; ZANUY, S.; PIFERRER, F.; RON, B.; PEDUAL, A.; BEN ATIA, I.; GORSHKOV, S.; TANDLER, A. Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 652-668, 2005.

NAVARRO-MARTÍN, L.; BLÁZQUEZ, M.; VIÑAS, J.; JOLY, S.; PIFERRER, F. for the production of highly female-biased stocks. **Aquaculture**, v. 296, n. 3-4, p. 347-358, 2009.

NAVARRO-MARTÍN, L.; VIÑAS, J.; RIBAS, L.; DÍAZ, N.; GUTIÉRREZ, A.; DI CROCE, L.; PIFERRER, F. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002447, 2011.

OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 2-4, 2008.

PADOA, E. Further observations on the differentiation of sex, normal and modified by the administration of follicular hormone, in the iridée trout (*Salmo irideus*) (in French). **Biomorphosis**, 1, 337-354, 1939.

PATIÑO, R.; DAVIS, K.B.; SCHOORE, J.E.; UGUZ, C.; STRUESSMANN, C.A.; PARKER, N.C.; SIMCO, B.A.; GOUDIE, C.A. Sex differentiation of channel catfish gonads:

normal development and effects of temperature. **Journal of Experimental Zoology**, v. 276, n. 3, p. 209-218, 1996.

RANA, K.J. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L.) eggs and fry: I. Gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development. **Aquaculture**, 87(2): 165-181, 1990.

REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L.; PIFERRER, F. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 22-28, 2016.

RIBEIRO, F. D. A. S.; CARVALHO JUNIOR, J. R.; FERNANDES, J. B. K.; NAKAYAMA, L. Comércio brasileiro de peixes ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, n. 110, p. 54-59, 2008.

RIEHL, R.; BAENSCH, H. A. Melle: Mergus, Verlag für Natur-und Heimtierkunde. **Aquarium Atlas**, Vol.1, 992p. 1993.

SANTOS, D.; LUZIO, A.; COIMBRA, A. M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: a review on the impact of environmental factors. **Aquatic Toxicology**, 191, 141-163, 2017.

SCHWERTMAN, N. C.; OWENS, M. A.; ADNAN, R. A simple more general boxplot method for identifying outliers. **Computational statistics & data analysis**, 47(1), 165-174, 2004.

SISCOMEX. SISTEMA INTEGRADO DE COMÉRCIO EXTERIOR. Recuperado 15 de junho de 2020, de <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>, 2018

SOUZA, J.; GUALBERTO, G.; O'SULLIVAN, F. D. A. **Influência da temperatura no crescimento de juvenis de tambaqui**. In Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 10., 2013, Manaus. Anais. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 191-201, 2013.

SOWER, S. A.; DICKHOFF, W. W.; FLAGG, T. A.; MIGHELL, J. L.; MAHNKEN, C. V. Effects of estradiol and diethylstilbesterol on sex reversal and mortality in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, 43, 75–81, 1984.

STRUUSSMANN, C. A.; MORIYAMA, S.; HANKE, E. F.; COTA, J. C.; TAKASHIMA, F. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey, *Odontheistes bonariensis*. **Journal of fish biology** v. 48, n. 4, p. 643-651, 1996.

TAKATA, R.; COSTA, D. C.; MELILLO FILHO, R.; LUZ, R. K. Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. **Neotropical Ichthyology**, 12(4), 853-859, 2014.

TAYAMEN, M.M.; SHELTON, W.L. Inducement of sex reversal in *Sarotherodon niloticus*(Linnaeus). **Aquaculture**, 14, 349–354, 1978.

THONGPRAJUKAEW, K.; KOVITVADHI, S.; KOVITVADHI, U.; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. Pigment deposition and in vitro screening of natural pigment sources for enhancing pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). **Aquaculture research**, v. 45, n. 4, p. 709-719, 2014.

YAMAMOTO, T. O. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of Experimental Zoology**, 123(3), 571-594, 1953.

YAMAMOTO, T. O. Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of Experimental Zoology**, 137(2), 227-263, 1958.

ZANONI, M. A.; LEAL, T. V.; CAETANO FILHO, M.; DE OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P. Sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Supreme variety, fingerlings submitted to different temperatures for sexual differentiation phase. **Semina: Ciências Agrárias** 34.1, 455-466, 2013.

ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 165-174, 2011.