












## Aspectos gonadais, perfil de testosterona e estradiol da tainha Lebranche *Mugil liza* submetida a diferentes temperaturas durante a fase de larvicultura

Gonadal aspects, testosterone and estradiol profiles of the Lebranche mullet *Mugil liza* subjected to different temperatures during the larviculture phase

Vanessa Martins da Rocha<sup>1</sup>, Cleize Sales da Silva<sup>1</sup>, Marina Cesconeto dos Santos<sup>1</sup>, Mariana Rangel Pilotto<sup>1</sup>, Fabiola Santiago Pedrotti<sup>1</sup>, Marco Shizuo Owatari<sup>1\*</sup>, Caio Magnotti<sup>1</sup>, Maurício Laterça Martins<sup>1</sup>, Vinicius Ronzani Cerqueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 

\* Autor correspondente: owatarimarco@hotmail.com

Recebido: 25 de março, 2024. Aceito: 04 de outubro, 2024. Publicado: 07 de fevereiro, 2025. Editor: Rondineli P. Barbero

**Resumo:** No Brasil, a tainha Lebranche é a espécie Mugilidae mais importante para a indústria pesqueira. Contudo, recentemente a espécie foi recomendada para classificação como *quase ameaçada*. Neste sentido, a aquicultura surge como uma ferramenta poderosa para a conservação e desenvolvimento dos recursos naturais. O presente estudo avaliou a influência de diferentes temperaturas durante a larvicultura de *Mugil liza* e seus efeitos tardios no desenvolvimento gonadal e na quantificação hormonal após 24 meses. Inicialmente, os ovos fecundados (45 ovos L<sup>-1</sup>) foram mantidos em tanque circular de 60 L até a eclosão. Após a eclosão, as larvas foram submetidas a quatro tratamentos em triplicata em diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30 °C) durante 35 dias. Em seguida, os juvenis foram transferidos para unidades de crescimento onde permaneceram identificados, conforme os tratamentos, durante 24 meses. O peso e o comprimento dos peixes foram significativamente diferentes na fase de larvicultura. As análises histológicas mostraram gônadas masculinas imaturas, em maturação e maduras. Os níveis de estradiol nos peixes foram baixos, independente do estágio de maturação. Para a testosterona os maiores valores foram observados em machos maduros (1,29 ± 0,07 ng mL<sup>-1</sup>). Não foram observadas diferenças significativas (p > 0,05) nas concentrações de estradiol e testosterona em relação à temperatura. Porém, houve diferenças significativas (p < 0,05) na concentração de testosterona dependendo da maturação sexual. Os resultados sugerem que a temperatura exerce um efeito masculinizante na tainha Lebranche. Além disso, a temperatura afetou diretamente o crescimento larval. Em suma, os resultados fornecem evidências de que a temperatura pode desempenhar um papel fundamental na determinação do sexo em *M. liza*.

**Palavras-chave:** piscicultura marinha; Mugilidae; quantificação hormonal; índice gonadossomático.

**Abstract:** In Brazil, the Lebranche mullet is the most important Mugilidae species for the fishing industry. However, recently, the species has been recommended for classification as near threatened. In this sense, aquaculture has emerged as a powerful tool for natural resource conservation and



development. The present study evaluated the influence of different temperatures during *Mugil liza* larviculture and their late effects on gonadal development and hormonal quantification after 24 months. The fertilized eggs (45 eggs L<sup>-1</sup>) were initially kept in a 60 L circular tank until hatching. After hatching, the larvae were subjected to four treatments in triplicate at different temperatures (21, 24, 27 and 30 °C) for 35 days. The juveniles were subsequently transferred to growth units where they remained identified, according to the treatments, for 24 months. The weight and length of the fish were significantly different in the larviculture phase. Histological analyses revealed immature, maturing, and mature male gonads. The estradiol levels in the fish were low, regardless of the maturation stage. For testosterone, the highest values were observed in mature males (1.29 ± 0.07 ng mL<sup>-1</sup>). No significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) in the concentrations of estradiol and testosterone in relation to temperature. However, there were significant differences ( $p < 0.05$ ) in testosterone concentration depending on sexual maturation. The results suggest that temperature exerts a masculinizing effect on *M. liza*. Furthermore, temperature directly affected larval growth. In summary, the results provide evidence that temperature may play a crucial role in sex determination in *M. liza*.

**Keywords:** marine fish farming; Mugilidae; hormonal quantification; gonadosomatic index.

## 1. Introdução

A tainha, *Mugil liza*, é um peixe pelágico da família Mugilidae que se distribui amplamente na costa atlântica da América do Sul, desde o Caribe até a Argentina<sup>(1,2)</sup>. Em relação à biologia reprodutiva, é uma espécie dioica, com hábitos migratórios que resultam na formação de grandes cardumes<sup>(3)</sup>. A migração reprodutiva da tainha, explorada comercialmente entre os estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, inicia-se em abril e se estende até julho, com picos de desova ocorrendo em junho entre os estados de Santa Catarina (região norte) e Paraná<sup>(4)</sup>.

No Brasil, a tainha é a espécie Mugilidae mais importante para a indústria pesqueira<sup>(5)</sup>, onde a produção anual dos estados de Santa Catarina e São Paulo é próxima a 8.069 e 1.304 toneladas, respectivamente<sup>(6)</sup>. No entanto, recentemente, a espécie tem sido recomendada para classificação como quase ameaçada<sup>(1, 3, 7)</sup>. Nesse sentido, a aquicultura tem surgido como uma ferramenta poderosa para a conservação e desenvolvimento dos recursos naturais. Nos últimos anos, a tainha tem se destacado em diversos estudos no Brasil, demonstrando a relevância ecológica dessa espécie, bem como seu enorme potencial aquícola na piscicultura experimental<sup>(8, 9, 10, 11, 12, 13)</sup>. No entanto, um requisito fundamental para a domesticação de espécies potencialmente promissoras é a compreensão e o controle dos processos reprodutivos dos peixes em cativeiro<sup>(14)</sup>.

Segundo Baroiller e D’Cotta<sup>(15)</sup>, a temperatura é o fator ambiental que mais afeta a determinação do sexo fenotípico em peixes. A temperatura interfere na esteroidogênese gonadal, modulando a expressão do gene da aromatase e outros genes, enzimas e hormônios reprodutivos não esteroides produzidos no cérebro e na glândula pituitária<sup>(16)</sup>. Portanto, espera-se que tratamentos baseados em temperatura possam influenciar espécimes durante o período lábil<sup>(17)</sup>, uma fase que caracteriza o início do processo de diferenciação gonadal, e que os animais sejam suscetíveis à definição do sexo<sup>(18,19)</sup>. Algumas características fisiológicas que surgem mais tarde em outros estágios de desenvolvimento dos peixes

podem ser influenciadas pela temperatura durante o desenvolvimento larval, incluindo taxa de crescimento, distribuição reprodutiva e migração, além da determinação do sexo <sup>(20)</sup>. A influência da temperatura na modulação fenotípica de tainhas para determinação sexual não é clara; no entanto, sabe-se que fatores ambientais como diminuição da temperatura e aumento da salinidade são estímulos para migração de cardume e agregação reprodutiva <sup>(21,22)</sup>.

Por outro lado, sob condições controladas em aquicultura, com diferentes temperaturas (17, 20, 23, 26 e 29 °C), a maior taxa de eclosão de ovos de tainha *M. liza* ocorreu a 23,2 °C, com a maior sobrevivência larval ocorrendo a 23,9 °C, enquanto a 16,5 °C, ocorreu 70% de mortalidade <sup>(13)</sup>. Talvez a manipulação da temperatura durante o estágio larval, da eclosão ao estágio juvenil, possa influenciar os aspectos gonadais e o perfil hormonal sexual da tainha, como observado em muitas espécies, onde maiores números de fêmeas ocorrem em temperaturas mais baixas, enquanto mais machos ocorrem em temperaturas mais altas <sup>(23)</sup>. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de quatro diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30 °C) nas fases iniciais da larvicultura, bem como verificar os efeitos tardios da variação de temperatura nos aspectos gonadais, perfis de testosterona e estradiol da tainha *M. liza* dois anos após a larvicultura.

## 2. Material e métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo CEUA número 3102220419).

### 2.1. Localização experimental e origem dos peixes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Estação de Maricultura Elpídio Beltrame (EMEB) da UFSC, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27° 34' 02" S, 48° 25' 44" W). Os ovos de tainha foram obtidos a partir da desova induzida de reprodutores já aclimatados no LAPMAR, seguindo procedimentos descritos por Cerqueira et al. <sup>(24)</sup> e Magnotti et al. <sup>(25)</sup>. Os reprodutores eram mantidos em tanques circulares (3,2 m de diâmetro e 1,0 m de profundidade) com capacidade de 8.000 L e sistema de fluxo contínuo. A salinidade foi de 35‰, o teor de oxigênio foi de aproximadamente 6 mg L<sup>-1</sup>, a temperatura variou de 18 °C (inverno) a 28 °C (verão) e o fotoperíodo natural foi mantido.

### 2.2. Delineamento experimental e procedimentos específicos

Após a desova a 23,9 °C, os ovos fertilizados (45 L<sup>-1</sup>) foram transferidos para 12 unidades experimentais (tanques circulares de 60 L). Após a eclosão, as larvas foram mantidas por 35 dias a 21, 24, 27 e 30 °C (em triplicata), as temperaturas ideais para a embriogênese larval, sobrevivência e desenvolvimento inicial, de acordo com estudos anteriores <sup>(13)</sup>. Os tanques experimentais continham "água verde" estática usando a microalga *Nannochloropsis oculata* a 300.000–500.000 células mL<sup>-1</sup> por 18 dias, seguido por um sistema de fluxo contínuo, inicialmente com renovação de água de 10% diariamente para 100% em 35 dias <sup>(24, 26)</sup>. A sala experimental foi climatizada a uma temperatura constante de 21 °C, enquanto as

temperaturas nos tratamentos foram controladas com aquecedores termostatos de 500 W (precisão de  $\pm 1$  °C).

Até o 15º dia, diariamente as larvas foram alimentadas com o rotífero *Brachionus rotundiformis* (2 a 30 mL<sup>-1</sup>). Os náuplios (0,5 a 1,0 mL<sup>-1</sup>) e *Artemia* sp. metanauplii (1,0 a 5,0 mL<sup>-1</sup> três vezes ao dia 8h, 12h e 16h), que foram posteriormente enriquecidos por 24 h com ácidos graxos (*red pepper*, Bernaqua, Bel) de acordo com o desenvolvimento larval. Por fim, a transição da alimentação viva para uma dieta inerte foi realizada por meio de uma dieta seca comercial (Sano S-Pak 5/8, Inve, EUA), oferecida em seis porções diárias (8h, 10h, 12h, 14h, 16h e 18h).

Após a transição alimentar total (no 35º dia), uma amostra de 30 peixes de cada tratamento foi pesada (biomassa total) e medida (comprimento total). Em seguida, 120 animais de cada tratamento foram transferidos para unidades experimentais de 500 L (três para cada temperatura), com fluxo contínuo (100% diário) e temperatura da água variando de 20 a 24 °C. Os peixes foram alimentados com dieta comercial de 0,8 mm (Nutripiscis Starter, Presence, Brasil; 45% proteína bruta, 9% lipídio) cinco vezes ao dia até a saciedade aparente <sup>(12)</sup> até que os peixes atingissem aproximadamente 5,0 g.

Após exposição a diferentes temperaturas, os peixes foram transferidos e mantidos separadamente (conforme tratamentos térmicos) em unidades experimentais medindo 3,2 m de diâmetro  $\times$  1,0 m de altura, com capacidade de 8.000 L com fluxo de água contínuo, bombeado diretamente do oceano na praia de Moçambique, Florianópolis, Brasil (27° 34'02"S, 48°25'44"W), com renovação de água de 200-300% diariamente. A temperatura da água variou de 18 °C (agosto) a 27 °C (janeiro). Os tainhas juvenis foram alimentados inicialmente com ração comercial de 1,3 mm (Nutripiscis Starter, Presence, Brasil, 45% de proteína bruta) até atingirem 100 g. Os peixes foram posteriormente alimentados com ração comercial de 2-3 mm (Nutripiscis AL45, Presence, Brasil, 45% de proteína bruta) quatro vezes ao dia até a saciedade aparente.

Após 12 meses, foi realizada amostragem para avaliar a maturação sexual. Vinte indivíduos de cada unidade experimental foram eutanasiados com benzocaína (200 mg L<sup>-1</sup>), e as gônadas foram extraídas através de uma incisão ventral para avaliação macroscópica <sup>(27)</sup>. As gônadas foram pesadas para determinar o índice gonadossomático (GSI) <sup>(28)</sup>. Como nenhuma evidência de maturação sexual foi observada neste momento, 50 indivíduos de cada tratamento foram mantidos nas mesmas condições por mais um ano.

Após 24 meses, quando a temperatura da água estava em aproximadamente 18 °C, foi realizada a amostragem para avaliar a maturação sexual. Vinte peixes de cada tratamento foram eutanasiados com benzocaína (200 mg L<sup>-1</sup>), e as gônadas foram extraídas através de uma incisão ventral para avaliação macroscópica <sup>(27)</sup>. As gônadas foram pesadas para determinação do índice gonadossomático (GSI) <sup>(28)</sup>, fixadas em solução de Davidson por 24 h, e transferidas para álcool etílico 70% para conservação até a preparação da lâmina histológica.

Amostras de sangue de 20 peixes por tratamento foram coletadas por punção do vaso caudal com seringas de insulina emulsificadas com solução anticoagulante HEMSTB (EDTA

K2 15 gd L<sup>-1</sup>) e mantidas em microtubos sob refrigeração. As amostras de sangue foram posteriormente centrifugadas a 2.000 × g por 10 min a 4 °C para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20 °C até a quantificação dos hormônios testosterona (T) e estradiol (E2).

### 2.3. Análise histológica e classificação do desenvolvimento gonadal

As análises histológicas das gônadas dos peixes foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos AQUOS/UFSC. As amostras foram desidratadas em série crescente de álcool, clarificadas em xilol, incluídas em parafina a 60 °C, cortadas em secções de 4 µm (Micrótomo LUPETEC MRP09, Lupetec®, Brasil) e coradas com hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas foram posteriormente preparadas em meio *Entellan*® e analisadas. Os estágios de desenvolvimento do epitélio germinativo foram identificados por microscopia de luz (Leica, ICC50 HD, Alemanha) e classificados de acordo com o grau de desenvolvimento gonadal proposto para *M. liza* por meio de metodologia adaptada de Albieri e Araújo<sup>(27)</sup> e Lemos et al.<sup>(4)</sup>. Para o desenvolvimento gonadal, as características histológicas incluíram a presença de espermatogônias, as maiores células da linhagem espermatogênica. Para a maturação, todos os estágios de desenvolvimento apresentam, após divisões mitóticas de espermatogônias (espermátides, espermátócitos e espermatozoides), células espermáticas agrupadas em ninhos. Para a maturação funcional, túbulos cheios de espermatozoides começam a se acumular no ducto deferente (ducto espermático). As espermátides são mais visíveis perto das paredes dos túbulos, mas todos os tipos de células estão presentes.

### 2.4. Quantificação hormonal

A quantificação hormonal foi realizada no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica LABCAI/UFSC. Os níveis de testosterona e estradiol foram quantificados por meio de kits comerciais (testosterona EIA-1559, estradiol EIA-2693; DRG Instruments GMBH, Alemanha), com os quais foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) em fase sólida, baseado no princípio de ligação competitiva, onde a testosterona endógena da amostra de peixe compete com um conjugado de testosterona e peroxidase de raiz-forte pela ligação ao anticorpo revestido. Após a incubação, o conjugado não ligado é lavado. A quantidade de conjugado de peroxidase ligado é inversamente proporcional à concentração de testosterona na amostra. Após a adição da solução de substrato, a intensidade da cor desenvolvida é inversamente proporcional à concentração de testosterona na amostra. Esteroides foram extraídos de 400 µl de plasma sanguíneo com 2,0 mL de solvente diclorometano para cada amostra. Após evaporação do solvente via nitrogênio líquido, as amostras foram reconstituídas em 100 µl de solução padrão zero do kit DRG contendo zero ng mL de estradiol e testosterona. A análise foi realizada de acordo com as diretrizes do fabricante. As amostras foram analisadas com um espectrofotômetro (SpectraMax 5, Molecular Devices, Estados Unidos) a 450 nm, e a análise dos dados e gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prism 8. O plasma de tainha apresentou recuperação (técnica “spike and recovery”): 113,8% de testosterona e 106,0% de estradiol; os coeficientes de variação intra-ensaio foram 5,57 para testosterona e 7,74 para estradiol; e os coeficientes de variação inter-ensaio foram 6,19 para testosterona e 8,67 para estradiol.

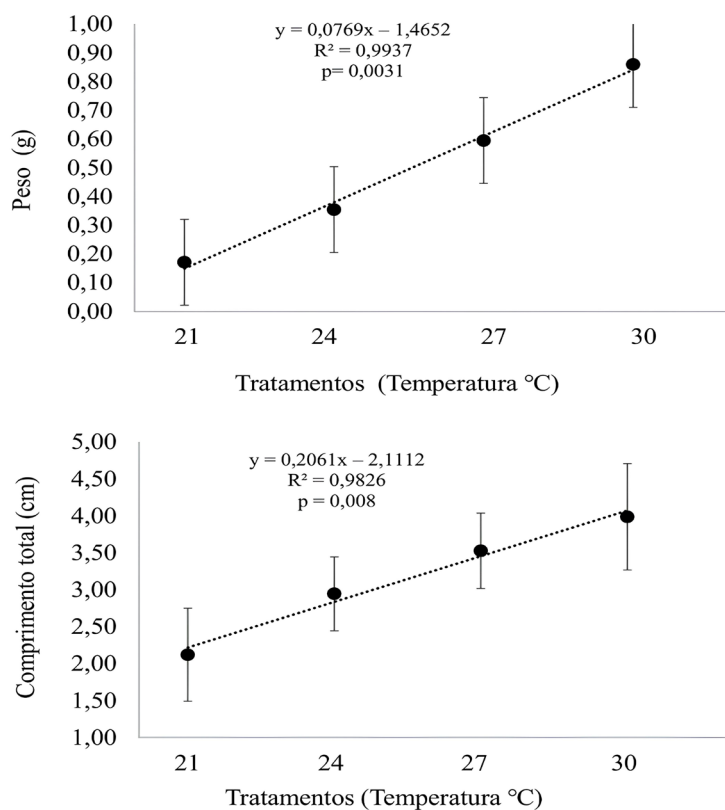
## 2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar a normalidade e homocedasticidade da variância, respectivamente. Os dados que atenderam aos pré-requisitos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando encontrada diferença significativa, foram submetidos ao teste de *Tukey* por meio do programa estatístico *STATISTICA 7*. Foi aplicado um modelo de análise de regressão para o peso e comprimento final de juvenis de tainha (*M. liza*) no 35º dia de larvicultura em diferentes temperaturas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5%.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Índices de crescimento

O desenvolvimento larval nos primeiros 35 dias foi diretamente relacionado à temperatura. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas no peso e comprimento dos peixes devido à temperatura da água. Durante a larvicultura, foi observado um aumento linear no peso e comprimento, de acordo com o aumento da temperatura (Figura 1). No entanto, após 24 meses, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas apenas para o comprimento. Comparados com os peixes submetidos ao tratamento de 30 °C, aqueles submetidos ao tratamento de 21 °C durante a larvicultura atingiram maiores comprimentos após dois anos. Por outro lado, o peso não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 1).



**Figura 1.** Análise de regressão do peso e comprimento total da tainha (*Mugil liza*) no 35º dia de larvicultura em diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30 °C). Os resultados da análise de regressão foram significativos ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. Os dados foram coletados de 30 peixes de cada tratamento.



**Tabela 1.** Peso total, comprimento total e índice gonadosomático (IGS) da tainha (*Mugil liza*). Os dados são relativos ao 2º ano após a fase de larvicultura em diferentes temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C. Os valores são apresentados como médias e desvios-padrão ( $\pm$ DP). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos. Amostras foram coletadas de 20 peixes de cada tratamento.

Tratamentos (°C)	Peso (g)	Comprimento (cm)	IGS (%)
21	466,56 $\pm$ 15,67	35,27 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	0,56 $\pm$ 0,671 <sup>a</sup>
24	463,80 $\pm$ 11,24	34,55 $\pm$ 0,26 <sup>ab</sup>	0,030 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>
27	465,61 $\pm$ 18,59	34,77 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	0,32 $\pm$ 0,542 <sup>a</sup>
30	419,91 $\pm$ 15,40	33,42 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,708 <sup>a</sup>
ANOVA (valor-p)	0,0991	0,0077	0,0136

\*IGS = Índice gonadosomático.

Esses resultados eram esperados para uma espécie tropical/subtropical cuja temperatura para melhor crescimento foi determinada por Okamoto et al. <sup>(8)</sup>, que testaram temperaturas de 20, 25 e 30 °C no cultivo de tainhas juvenis pesando 0,87  $\pm$  0,25 g e observaram que o crescimento dos peixes foi otimizado na temperatura de 30 °C. Entretanto, essas tainhas foram capturadas na natureza e transferidas para engorda em cativeiro. Durante o período de engorda, podemos destacar a capacidade de recuperação do crescimento de *M. liza*, mesmo após comprometimentos causados pelas baixas temperaturas durante o período larval. Ao final do período de dois anos, o crescimento foi compatível com dados já observados para a mesma espécie, em que peixes de 11 meses de idade tinham comprimento de 25,7  $\pm$  0,4 cm e peso de 205,7  $\pm$  11,5 g <sup>(25)</sup>; e maior que *M. cephalus*, que aos dois anos de idade tinha peso médio de 210,3  $\pm$  20,04 <sup>(29)</sup>.

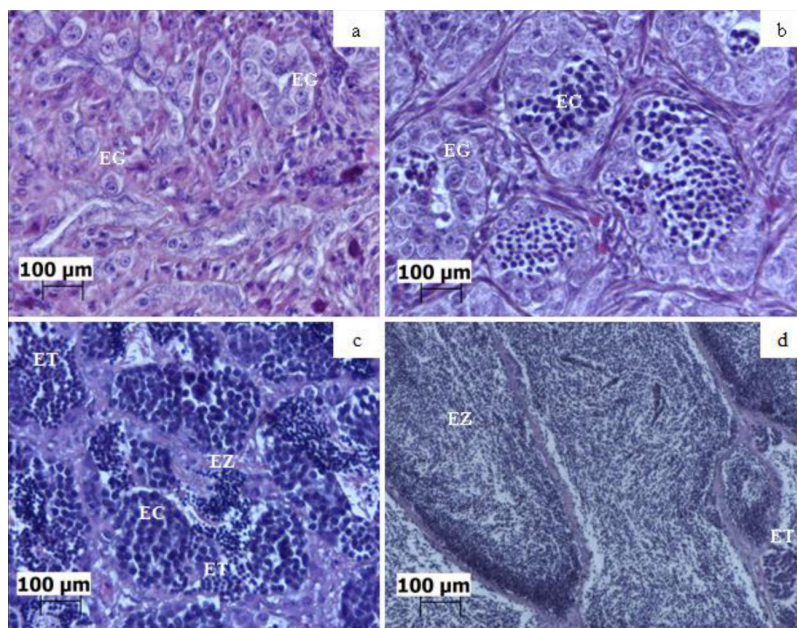
### 3.2. Análise histológica gonadal

Vinte e quatro meses após a larvicultura, foi possível identificar apenas gônadas masculinas nos espécimes, que foram classificadas em três estágios de desenvolvimento testicular: A – Imaturo, B – Maturação e C – Maturidade funcional (Tabela 2). Gônadas femininas ou feminizadas, ou seja, aquelas contendo tecido testicular composto exclusivamente por células germinativas femininas, não foram observadas. Nos testículos imaturos, apenas espermatogônias, as maiores células germinativas dos espermatozoides, puderam ser observadas (Figura 2a). Na fase de maturação, todos os estágios de desenvolvimento celular foram observados: as células estavam agrupadas em ninhos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Alguns peixes apresentaram espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos e ductos espermáticos (Figura 2b e c). Machos com maturidade funcional apresentaram espermatozoides acumulados nos túbulos e ductos espermáticos em grande número (Figura 2d), e as espermátides eram mais visíveis perto das paredes dos túbulos, embora todos os tipos de células estivessem presentes (espermatogônias, espermatócitos e espermátides).

A maturação gonadal completa em machos de *M. liza*, com sêmen classificado como apto para desova, foi verificada aos 11 meses de idade <sup>(30)</sup>, e os machos foram capazes

de se reproduzir com  $25,7 \pm 0,4$  cm de comprimento e  $205,7 \pm 11,5$  g de peso <sup>(11)</sup>. Os IGS dos peixes submetidos a diferentes temperaturas durante a fase de larvicultura diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos após 24 meses. Comparado com os outros tratamentos, o tratamento de 24 °C apresentou menor IGS (Tabela 1).

Os dados de IGS, observações macroscópicas e análises histológicas das gônadas revelaram a diferenciação e maturação sexual dos peixes, confirmando que encontramos apenas machos de *M. liza* no segundo ano, independentemente do tratamento de temperatura. Este é um achado incomum, considerando que em trabalhos anteriores sobre propagação artificial desta espécie, não houve relatos semelhantes de lotes monossexuais <sup>(24, 25, 31)</sup>. Da mesma forma, não temos informações de que isso poderia ocorrer em populações naturais do gênero *Mugil* ou outros mugilídeos <sup>(4, 32, 33)</sup>. No entanto, esta é uma questão muito relevante que permite a construção de muitas hipóteses. Suspeita-se que as questões supracitadas podem ser diferenciadas por população, que até recentemente eram consideradas duas espécies distintas (*M. platanus* e *M. liza*), que inclusive apresentavam características morfológicas distintas e, talvez, até mesmo um ciclo de vida diferente. Nesse sentido, é importante que novos estudos sejam conduzidos com a população de *M. liza* na região sul do Brasil.



**Figura 2.** Análise histológica gonadal de tainha (*Mugil liza*). Os dados são relativos ao segundo ano após a fase de larvicultura em diferentes temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C. Cortes longitudinais de testículos aos 24 meses de idade. (a) Testículos imaturos: cordões de espermatogônias (EG). (b) Testículos em maturação: presença de espermatogônias (EG) e espermatócitos (EC). (c) Espermatócitos (EC) e espermatídeos (ET) foram agrupados em espermatócitos, além da presença de espermatozoides (EZ). (d) Testículos em maturidade funcional: muitos espermatozoides estão presentes no lúmen dos túbulos; as espermatídeos (ET) são mais visíveis perto das paredes dos túbulos. Coloração hematoxilina-eosina (H&E). Amostras foram coletadas de 20 peixes de cada tratamento.

Para algumas espécies, como o robalo europeu *Dicentrarchus labrax* <sup>(34, 35)</sup> e o peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* <sup>(36)</sup>, as proporções sexuais são tendenciosas para as fêmeas em baixas temperaturas, enquanto para outras, como o peixe-rei da Patagônia



*Patagonina hatcheri*, o sexo parece ser determinado geneticamente <sup>(36)</sup>. Além disso, os efeitos do parentesco e da endogamia podem causar depressão nas variáveis sexuais <sup>(37, 38)</sup>. Os resultados do presente estudo sugerem que a manipulação da temperatura durante o estágio larval, da eclosão à transformação em juvenil, pode influenciar a determinação sexual da tainha. No entanto, mais dados experimentais são necessários para confirmar essa hipótese. Além disso, a determinação sexual dependente da temperatura em peixes tem sido investigada nos últimos anos, uma vez que a ocorrência de um padrão único de proporção sexual em algumas espécies pode ser influenciada pelos possíveis efeitos das mudanças climáticas <sup>(23, 39)</sup>.

**Tabela 2.** Desenvolvimento testicular de tainha (*Mugil liza*) com dois anos de idade após larvicultura em diferentes temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C. Os dados mostram o número de indivíduos classificados dentro de cada fase do desenvolvimento testicular.

Desenvolvimento testicular	Tratamentos (Temperatura °C)			
	30	27	24	21
Imaturo	8	11	10	9
Maturando	5	6	6	4
Maturidade funcional	7	3	4	7
Total de machos	20	20	20	20

### 3.3 Análise hormonal

Os valores de estradiol nos peixes machos foram baixos, independentemente do estágio de maturação. Para testosterona, o maior valor foi observado em machos maduros ( $1,29 \pm 0,07$  ng mL<sup>-1</sup>). Não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas concentrações de estradiol e testosterona relacionadas à temperatura. No entanto, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na concentração de testosterona dependendo da maturação sexual (Tabela 3).

O desenvolvimento sexual precoce em espécies comercialmente importantes é desejável na aquicultura. A capacidade de controlar a plasticidade sexual dos peixes é um fator importante que pode influenciar tanto a reprodução eficiente quanto a comercialização dos peixes, pois influencia o crescimento e a qualidade do produto <sup>(40)</sup>. No presente estudo, ao final do segundo ano, foi possível identificar macroscopicamente machos sexualmente maduros ou em maturação, indicando que a exposição precoce a diferentes temperaturas não afetou o desenvolvimento gonadal. Mesmo sem a observação de amostras de fêmeas, nossos dados confirmam o potencial de *M. liza* como uma espécie adequada para a aquicultura, uma vez que em tainhas selvagens machos, valores de IGS maiores que 4,2% foram observados para peixes com comprimento de 41,76 cm <sup>(4)</sup>, enquanto em cativeiro, Castro et al. <sup>(11)</sup> relataram valores de IGS de até  $1,8 \pm 0,4\%$  para machos maduros com 1 ano e  $25,7 \pm 0,4$  cm. Peixes maduros menores provavelmente podem facilitar o manejo do estoque reprodutor na indústria aquícola.

**Tabela 3.** Quantificação hormonal no plasma sanguíneo de tainha (*Mugil liza*) submetida a diferentes temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C. Os dados são relativos ao segundo ano pós-larvicultura em diferentes temperaturas e são apresentados como médias ( $\pm$  DP) e valores máximos e mínimos de testosterona e estradiol no plasma sanguíneo dos peixes. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre o desenvolvimento testicular. Total de machos = n25; Maduro = n15; Maturando = n4; Imaturo = n6.

Tratamentos (°C)	Testosterona (ng mL <sup>-1</sup> )			Estradiol (pg mL <sup>-1</sup> )		
	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
21	0,56 $\pm$ 0,46	1,29	0,116	29,69 $\pm$ 11,00	42,29	18,62
24	0,23 $\pm$ 0,13	0,45	0,103	32,12 $\pm$ 7,37	41,09	22,26
27	0,30 $\pm$ 0,36	0,85	0,050	36,58 $\pm$ 15,67	64,86	21,51
30	0,37 $\pm$ 0,40	0,99	0,041	34,77 $\pm$ 10,82	44,63	19,44
valor-p	0,4122			valor-p		0,4483
Desenvolvimento testicular	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
Maduro	0,51 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	1,29	0,07	30,44 $\pm$ 9,06	43,14	18,62
Maturando	0,16 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,45	0,05	31,51 $\pm$ 8,73	41,64	21,12
Imaturo	0,09 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,11	0,04	36,22 $\pm$ 8,77	44,63	21,51
valor-p			0,0001	valor-p		0,5810

Em populações selvagens de tainha *Mugil*, o comprimento na primeira maturidade para fêmeas é de 450,60 mm, enquanto para machos é de 436,30 mm <sup>(41)</sup>. Em cativeiro, a primeira maturação ocorreu em animais com menos de 380 mm de comprimento para fêmeas e 330 mm de comprimento para machos <sup>(24)</sup>. Embora as tainhas fêmeas adultas sejam geralmente maiores que os machos, a espécie não apresenta dimorfismo sexual externo; portanto, visualmente, não é possível distinguir o sexo <sup>(33)</sup>. As gônadas de peixes menores que 5,0 cm de comprimento total não apresentaram nenhuma característica masculina ou feminina. Além disso, embora 0,2% dos peixes de 15 a 20 cm de comprimento e 37,3% dos peixes machos tenham iniciado a diferenciação sexual, a maioria (62,5%) dos peixes permaneceu indiferenciada, e apenas aqueles maiores que 20 cm foram sexualmente diferenciados (83%). No entanto, a espermatogênese começa em peixes maiores que 25 cm, enquanto a ovogênese começa em peixes maiores que 29 cm <sup>(33, 42)</sup>. Estimamos aqui o tamanho da primeira maturidade sexual do macho *M. liza* em aproximadamente 33-35 cm aos dois anos de idade, pois anteriormente não era possível visualizar as células iniciais, ou seja, não havia características masculinas ou femininas, corroborando as informações mencionadas acima.

A testosterona afeta a espermatogênese em peixes machos, influenciando a multiplicação das espermatogônias e a formação de espermatozoides <sup>(43, 44)</sup>. Essas informações corroboram os achados do presente estudo e explicam o perfil hormonal observado no plasma sanguíneo dos peixes, onde os valores de testosterona em machos maduros foram maiores do que os de machos imaturos (0,507 e 0,091 ng mL<sup>-1</sup>), enquanto os valores de estradiol não foram relacionados ao desenvolvimento testicular (30,44–36,22 pg mL<sup>-1</sup>). Nossos achados estabelecem, de forma inédita, os primeiros dados sobre o perfil hormonal da tainha macho *M. liza* de origem aquícola. Por outro lado, diferentemente de nossos achados, em *M. cephalus* selvagem maduro, o valor médio de testosterona foi de 182 ng mL<sup>-1</sup>, enquanto o valor de

estradiol foi de 0,9 pg mL<sup>-1</sup> (45), indicando um padrão diferente entre os ambientes selvagem e cultivado.

Nossos projetos atuais estão alinhados com preocupações e visam elucidar as condições e fatores que podem influenciar a determinação sexual da tainha *M. liza*. Recebemos uma quantidade significativa de informações da indústria pesqueira em diversas regiões do Brasil em diferentes latitudes, o que nos ajudará a compreender por que encontramos lotes masculinizados de peixes em cativeiro no LAPMAR. Nossa posição geográfica influencia isso? O sistema de criação em médio e longo prazo favorece essa condição? Talvez a questão nutricional, uma vez que fornecemos rações comerciais com proteínas de origem vegetal, influencie a maturação gonadal e algumas questões hormonais? Portanto, inúmeras hipóteses surgem, e o presente estudo se torna um ponto de partida para novas investigações envolvendo a determinação sexual de *M. liza*.

#### 4. Conclusão

Os resultados fornecem evidências de que a temperatura pode desempenhar um papel fundamental na determinação do sexo em *M. liza*. A faixa de temperatura usada durante a fase larval sugeriu masculinizar a tainha e afetou diretamente o crescimento larval. Assim, é recomendável que estudos futuros explorem temperaturas abaixo de 21 °C para aprofundar o entendimento dos mecanismos envolvidos na determinação do sexo em *M. liza*, proporcionando informações essenciais para estratégias de manejo e conservação.

#### Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

#### Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

#### Contribuições do autor

Conceituação: V. M. Rocha, C. S. Silva, M. C. Santos, M. R. Pilotto, F. S. Pedrotti e M. S. Owatari. Curadoria de dados: V. M. Rocha, C. S. Silva, M. C. Santos, M. R. Pilotto, F. S. Pedrotti e M. S. Owatari. Análise formal: V. M. Rocha, C. S. Silva, M. C. Santos, M. R. Pilotto, F. S. Pedrotti e M. S. Owatari. Investigação: V. M. Rocha, C. S. Silva, M. C. Santos, M. R. Pilotto, F. S. Pedrotti e M. S. Owatari. Gerenciamento de projeto: C. Magnotti, M. L. Martins e V. R. Cerqueira. Supervisão: C. Magnotti, M. L. Martins e V. R. Cerqueira. Visualização: C. Magnotti, M. L. Martins e V. R. Cerqueira. Redação (rascunho original): V. M. Rocha, C. S. Silva, M. C. Santos, M. R. Pilotto, F. S. Pedrotti e M. S. Owatari. Redação (revisão e edição): C. Magnotti, M. L. Martins e V. R. Cerqueira.

#### Referências

1. Costa MR, Martins RRM, Tomás ARG, Tubino RDA, Monteiro-Neto C. Biological aspects of *Mugil liza* Valenciennes, 1836 in a tropical estuarine bay in the southwestern Atlantic. Reg Stud Mar Sci. 2021; 43, 101651. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101651>
2. Schroeder R, Avigliano E, Volpedo AV, Fortunato RC, Barrulas P, Daros FA, Schwingel PR, Dias MC, Correia AT. Lebranche mullet *Mugil liza* population structure and connectivity patterns in the southwest Atlantic ocean using a multidisciplinary approach. Estuar Coast Shelf Sci. 2023; 288, 108368. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2023.108368>

3. Aguirre-Pabon JC, Berdugo GO, Narváez JC. Population structure and low genetic diversity in the threatened lebranche *Mugil liza* in the Colombian Caribbean. *Fish Res.* 2022; 256, 106485. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106485>
4. Lemos VM, Varela Jr AS, Schwingel PR, Muelbert JH, Vieira JP. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *J Fish Biol.* 2014; 85(3), 671-687. <https://doi.org/10.1111/jfb.12452>
5. MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Plano de manejo para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil. 2015. Disponível em: <https://repositorio.icmbio.gov.br/handle/cecav/1514>
6. SAP - Secretaria de Aquicultura e Pesca - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. GTT - COTA: Relatório do grupo técnico de trabalho para avaliação das cotas de tainha para a temporada de pesca de 2021. 2021; 60 p. Disponível em: <https://www.gov.br/mpa/pt-br/assuntos/pesca/principais-recursos-pesqueiros/tainha>
7. ICMBio - Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation. Red Book of Brazilian Fauna Threatened by Extinction: Volume I. 2018; 1st ed. Ministry of the Environment, Brasília. Available at: [https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoesdiversas/livro\\_vermelho\\_2018\\_vol1.pdf](https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoesdiversas/livro_vermelho_2018_vol1.pdf)
8. Okamoto MH, Sampaio LAND, Maçada ADP. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica.* 2006; 28(1): 61-66. Available in: <http://repositorio.furg.br/handle/1/693>
9. Carvalho CVAD, Bianchini A, Tesser MB, Sampaio LA. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquac Res.* 2010; 41(4), 511-518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02340.x>
10. Lisboa V, Barcarolli IF, Sampaio LA, Bianchini A. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranche mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotrop Ichthyol.* 2015; 13, 447-452. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140122>
11. Castro J, Magnotti C, Angelo M, Sterzelecki F, Pedrotti F, Oliveira MF, Soligo T, Fracalossi D, Cerqueira VR. Effect of ascorbic acid supplementation on zootechnical performance, haematological parameters and sperm quality of lebranche mullet *Mugil liza*. *Aquac Res.* 2019; 50(11), 3267-3274. <https://doi.org/10.1111/are.14284>
12. Silva ECD, Sterzelecki FC, Musialak LA, Sugai JK, Castro JDJP, Pedrotti FS, Magnotti C, Cipriano FDS, Cerqueira VR. Effect of feeding frequency on growth performance, blood metabolites, proximate composition and digestive enzymes of Lebranche mullet (*Mugil liza*) juveniles. *Aquac Res.* 2020; 51(3), 1162-1169. <https://doi.org/10.1111/are.14466>
13. Angelo M, Lisboa MK, Magnotti CCF, Pilotto MR, Mattos JJ, Cerqueira VR. Temperature influence on the embryogenesis, survival and initial development of *Mugil liza* larvae. *Aquac Res.* 2021; 52(8), 3705-3712. <https://doi.org/10.1111/are.15215>
14. Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol.* 2010; 165(3), 516-534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>
15. Baroiller JF, D’Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicol Pharmacol.* 2001; 130(4), 399-409. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)
16. Strüssmann CA, Nakamura M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol Biochem.* 2002; 26, 13-29. <https://doi.org/10.1023/A:1023343023556>
17. Blázquez M, Zanuy S, Carillo M, Piferrer F. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J Exp Zool.* 1998; 281(3), 207-216. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980615\)281:3<207::AID-JEZ6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980615)281:3<207::AID-JEZ6>3.0.CO;2-R)
18. Blázquez M. Critical period of androgeninducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *J Fish Biol.* 2001; 58(2), 342-358. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb02257.x>
19. Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture.* 2001; 197(1-4), 229-281. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)

20. Jonsson B, Jonsson N. Phenotypic plasticity and epigenetics of fish: embryo temperature affects later-developing life-history traits. *Aquat Biol.* 2019; 28, 21-32. <https://doi.org/10.3354/ab00707>
21. Vieira JP, Scalabrin C. Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platanus* Gunther, 1980) no sul do Brasil. *Atlântica.* 1991; 13(1), 131-141.
22. Herbst DF, Hanazaki N. Local ecological knowledge of fishers about the life cycle and temporal patterns in the migration of mullet (*Mugil liza*) in Southern Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2014; 12, 879-890. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20130156>
23. Ospina-Alvarez 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.* 2008; 3(7), e2837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837>
24. Cerqueira VR, Carvalho CVAD, Sanches EG, Passini G, Baloi M, Rodrigues RV. Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2017; 41(1), 94-102. Retrieved from: [http://cba.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p094-102%20\(RB677\).pdf](http://cba.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p094-102%20(RB677).pdf)
25. Magnotti C, Santos FC, Pedrotti FS, Cerqueira VR. Advances in reproduction of the lebranche mullet *Mugil liza*: maturation and spawning of f1 breeders in captivity. *Bol Inst Pesca.* 2020; 46(3). <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2020.46.3.586>
26. Yousif OM, Fatah AA, Krishna Kumar K, Minh DV, Hung BV. Induced spawning and larviculture of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758) in the Emirate of Abu Dhabi. *Aquac Asia.* 2010; 15(1), 41-43.
27. Albieri RJ, Araújo FG. Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. *Zoologia.* 2010; 27, 331-340. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000300003>
28. Vazzoler AE. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática* (Ed): Anna Emília Amato de Moraes Vazzoler. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI. 1996; 169p.
29. Chang CF, Lan SC, Chou HY. Gonadal histology and plasma sex steroids during sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *J Exp Zool.* 1995; 272(5), 395-406. <https://doi.org/10.1002/jez.1402720509>
30. Magnotti C, Figueroa E, Farias JG, Merino O, Valdebenito I, Oliveira RPS, Cerqueira V. Sperm characteristics of wild and captive lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), subjected to sperm activation in different pH and salinity conditions. *Anim Reprod Sci.* 2018; 192, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.004>
31. Carvalho CVAD, Passini G, Sterzelecki FC, Baloi MF, Cerqueira VR. Maturação, desova e larvicultura da tainha *Mugil liza* em laboratório. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2019; 43(1), 31-36. Retrieved from <http://cba.org.br/>
32. Crosetti D, Blaber SJ. *Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae)*. CRC Press. 2015; pp 539.
33. González-Castro M, Minos G. Sexuality and reproduction of Mugilidae. In: Crosetti, D., & Blaber, S. J. *Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae)*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York. 2016; 539, 227-263.
34. Pavlidis M, Koumoundouros G, Steriotti A, Somarakis S, Divanach P, Kentouri M. Evidence of temperature dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J Exp Zool.* 2000; 287(3), 225-232. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20000801\)287:3%3C225::AID-JEZ4%3E3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20000801)287:3%3C225::AID-JEZ4%3E3.0.CO;2-D)
35. Navarro-Martín L, Blázquez M, Viñas J, Joly S, Piferrer F. Balancing the effects of rearing at low temperature during early development on sex ratios, growth and maturation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): limitations and opportunities for the production of highly female-biased stocks. *Aquaculture.* 2009; 296(3-4), 347-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.022>
36. Strüssmann CA, Calsina Cota JC, Phonlor G, Higuchi H, Takashima F. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environ Biol Fish.* 1996; 47, 143-154. <https://doi.org/10.1007/BF00005037>
37. Fessehaye Y, Bovenhuis H, Rezk MA, Crooijmans R, van Arendonk JA, Komen H. Effects of relatedness and inbreeding on reproductive success of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 2009; 294(3-4), 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.001>



38. Piferrer F. Determinación y diferenciación sexual en los peces. In: La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Ed: Carrilo, M. A. Fundación OESA. 2009; 4, p. 249-336. Available in: <http://hdl.handle.net/10261/102818>. Accessed in 09 January 2024.
39. Geffroy B, Wedekind C (2020) Effects of global warming on sex ratios in fishes. *J Fish Biol.* 2020; 97(3), 596-606. <https://doi.org/10.1111/jfb.14429>
40. Budd AM, Banh QQ, Domingos JA, Jerry DR. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J Mar Sci Eng.* 2015; 3(2), 329-355. <https://doi.org/10.3390/jmse3020329>
41. Garbin T, Castello JP, Kinas PG. Age, growth, and mortality of the mullet *Mugil liza* in Brazil's southern and southeastern coastal regions. *Fish Res.* 2014; 149, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.09.008>
42. McDonough CJ, Roumillat WA, Wenner CA. Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fish Bull.* 2005; 103(4), 601-619.
43. Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can J Fish Aquat Sci.* 1982; 39(1), 65-79. <https://doi.org/10.1139/f82-009>
44. Golshan M, Alavi SMH. Androgen signaling in male fishes: Examples of anti-androgenic chemicals that cause reproductive disorders. *Theriogenology.* 2019; 139, 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.020>
45. Kumar P, Arasu ART, Kailasamm M, Sukumarran K, Subburj R, Tyagraj G, Natarajan M. Gonadal development and steroid hormone profile of wild caught grey mullet (*Mugil cephalus*). *Biol Rhythm Res.* 2015; 46(4), 601-610. <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1034974>