

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**ALINCA PERES DA FONSECA**

**REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PEIXE ANUAL *Austrolebias  
nigrofasciatus* Costa & Cheffe, 2001 EM LABORATÓRIO**

**RIO GRANDE, RS**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PEIXE ANUAL *Austrolebias  
nigrofasciatus* Costa & Cheffe, 2001 EM LABORATÓRIO**

**Autor: Alinca Peres da Fonseca**

**Orientador: Dr. Ricardo Berteaux Robaldo**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de  
Doutor em Aquicultura no Programa  
de Pós Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal do Rio Grande**

**RIO GRANDE, RS  
OUTUBRO DE 2015**

**Banca examinadora:**

Ricardo Berteaux Robaldo (orientador - UFPel)

Mario Roberto Chim Figueiredo (IO/FURG)

Marcelo Hideo Okamoto (FURG)

Daniel Loebmann (FURG)

Everton Rodolfo Behr (UFSM)

*Dedico à minha família, João, Marina e Matheus.*

## *Agradecimentos*

*Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho. Ao meu companheiro Matheus, por todo auxílio que foi determinante para concretizar o trabalho, mas principalmente por estar ao meu lado, sendo um marido e, mais uma vez, um pai maravilhoso, que me deu segurança e força para seguir em frente.*

*À minha filha Marina que entrou comigo nesta jornada e continua enchendo meus dias de graça. Ao pequenino João, que chegou chegando e me mostrou que sou mais capaz do que imaginava. Aos meus pais Eliane e Afranio que acreditam na minha capacidade e sempre me apoiam nas minhas escolhas.*

*Aos meus irmãos e amigos de todas as horas, Lucília e Afrânio.*

*Aos meus sogros Nadija e Frank, vó Eni, vó Elon e cunhados, que sempre me incentivam. Muito obrigada às amigas Marília, Lizi e Bê, que sempre me lembram de que no final tudo dá certo e me proporcionam momentos de descontração e alegria.*

*As amigas Celle, Nessa e Jú, que mesmo distante sei que torcem pelo meu sucesso.*

*Ao amigo e orientador Ricardo Robaldo que além de ter sido um elemento determinante na concretização do trabalho foi extremamente compreensivo e paciente.*

*Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura da UFPEL pelo auxílio e companhia nos trabalhos, especialmente à Dani, com quem constituí uma parceria que pretendo preservar para sempre.*

*Ao curso, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande. Ao Romano e à Marta pelas contribuições nos ensinamentos e processamento de material histológico.*

*À Universidade Federal de Pelotas pela disposição do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura para realização dos experimentos e aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.*

*Aos membros da banca examinadora, muito obrigada pela atenção e contribuições.*

*À Capes pela concessão da bolsa de estudos.*

## **Resumo**

Peixes anuais são considerados organismos extremos por viverem exclusivamente em áreas úmidas sazonais e possuem adaptações únicas para sobrevivência nestes ambientes. Apesar de serem considerados bons modelos para ensaios de laboratório, poucos estudos têm sido realizados com o intuito de aprimorar as técnicas de manejo de Rivulidae Neotropicais. Assim, foram realizados três estudos para elucidar questões do desenvolvimento e reprodução de *Austrolebias nigrofasciatus* em laboratório. No primeiro capítulo foi manipulada a quantidade de fêmeas, mantendo uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) fêmeas para cada macho por unidade experimental, com cinco repetições, para verificar a oviposição (OV), a taxa de fertilização (TF), e a razão entre neutrófilos (N): linfócitos (L). A OV média por fêmea não diferiu, mas a TF foi inferior no T4 coincidindo com o aumento da razão N:L nos machos. Até o T3 a adição de fêmeas aumenta o total de ovos fertilizados disponível. Diante dos resultados, observamos que aumentar a razão de fêmeas para até três por macho favorece o desempenho reprodutivo da espécie. O segundo experimento analisou a sobrevivência, trajetória e tempo de desenvolvimento embrionário em diferentes meios de incubação. Foi verificado que até a diapausa II (DII) não existe influência dos meios no padrão de desenvolvimento, mas desta fase em diante o meio de água com casca de coco em pó apresentou atraso no tempo de desenvolvimento. O meio úmido com solução de Yamamoto foi o que apresentou os primeiros embriões completamente desenvolvidos, com 27 dias após a postura. Ovos que foram mantidos na mesma água dos reprodutores desde a postura permaneceram na DI. A sobrevivência em todos os meios de incubação foi alta (70 a 98 %). Conclui-se que todos os meios são viáveis para a manutenção dos embriões, podendo se alterar as trajetórias de desenvolvimento através da manipulação das diapausas. No terceiro e último estudo, para identificar a forma como o enchimento inicial da vesícula gasosa é comprometido, impedindo a natação normal (belly sliders), e determinar as implicações disto no crescimento dos juvenis, analisamos histologicamente a vesícula gasosa de peixes com natação normal e de rampantes durante o crescimento inicial. Verificamos que os rampantes apresentam metaplasia com descamação do epitélio da vesícula gasosa e hemorragia, além de apresentar crescimento inferior. Concluímos que em laboratório a incidência desta patologia é um problema relevante e responsável por uma grande quantidade de juvenis inviáveis.

## **Abstract**

Annual fish are considered extreme organisms by live only in seasonal wetlands possess unique adaptations for survival in these environments. Although they are considered good models for laboratory tests, few studies have been conducted in order to improve Neotropical Rivulidae management techniques. So three study was conducted in order to clarify some issues related to the reproduction and development of *Austrolebias nigrofasciatus* in the laboratory. In the first, manipulate the proportion of females maintaining one (T1), two (T2), three (T3) and four (T4) females per male per experimental unit, with five replicates, to verify oviposition, fertilization rate and the ratio of neutrophils (N): lymphocytes (L). The oviposition mean per female did not differ, but the fertilization rate was lower in T4 coinciding with increasing stress response in males. By the females addition up to T3 increases the mean of total fertilized eggs. Given the results, we found that increasing the ratio up to three female to male favors the reproductive performance of the species. The second experiment analyzed the survival and time and pathway of development of annual fish embryo of *A. nigrofasciatus* in different incubation media. It was found that up to the diapause II (DII) stage there is no influence of the incubation media in the embryonic development, but this stage on water with powdered coconut shell was late in development time compared to other . The damp incubation with Yamamoto's solution was the one that presented the first fully developed embryos at 27 days after laying. Eggs that have been kept in the same water of the breeders from the posture remained in DI. The survival at all incubation media was high (70 to 98%). We conclude that all means are feasible to maintain the embryos, and may change the developmental trajectories through the manipulation of diapauses. In the third and final study, to identify how the initial filling of the swim bladder *A. nigrofasciatus* is damaged, preventing normal swimming, and determine the implications of this condition on the growth of juveniles analyzed histologically the swim bladder of fish with normal swimming and belly-sliders during the initial growth. We found that the belly-sliders have metaplasia with epithelium peeling of the gas bladder and the presence of hemorrhage, besides presenting lower growth compared to fish with normal swimming. We conclude that the incidence of this disease is a recurring problem and of great importance to maintaining annual fish lab, accounting for a large number of unviable juveniles.

## Sumário

1. Introdução geral .....	8
1.1. Peixes anuais .....	8
1.2. Reprodução e desenvolvimento.....	10
1.3. Criação de peixes anuais .....	12
1.4. <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> .....	14
2. Objetivos .....	16
2.1.1. Objetivo geral .....	16
2.1.2. Objetivos específicos.....	16
3. Referências.....	17
4. Capítulo 1 .....	22
5. Capítulo 2 .....	40
6. Capítulo 3.....	61
7. Conclusões gerais.....	74



## 1. Introdução geral

### 1.1. Peixes anuais

Os peixes anuais são Cyprinodontiformes que habitam ambientes aquáticos sazonais em várias partes da América do Sul e da África (Costa, 2008). Na América do Sul todas as espécies pertencem à família Rivulidae, enquanto no continente africano são representadas pela família Nothobranchidae. Evolutivamente estes táxons são grupos irmãos, sendo estreitamente relacionados e compartilhando diversas características fisiológicas, biológicas e ecológicas (Costa, 1998).

Os rivulídeos são conhecidos como peixes anuais por habitarem áreas úmidas sazonais, que secam em determinados períodos do ano (Volcan *et al.*, 2011). Geralmente as espécies enterram seus ovos no substrato, onde permanecem durante a estação de seca até o início das chuvas, quando as áreas alagam os ovos eclodem e um novo ciclo é iniciado (Wourms, 1972; Podrabsky & Culpepper, 2012).

Geralmente as áreas úmidas com ocorrência de peixes anuais são pequenas, rasas e isoladas (Costa, 2002; Volcan *et al.*, 2010; 2013a; 2013b), o que as torna um ambiente altamente variável, susceptível às variações físicas e químicas do ambiente (Fonseca *et al.*, 2013), como variações de temperatura que podem chegar à quase 20° C em um único dia (Volcan *et al.*, 2011). Estes peixes apresentam adaptações únicas dentre os vertebrados para a sobrevivência nesses ambientes temporários, especialmente a resistência dos ovos à seca, o rápido crescimento e maturação sexual e o curto ciclo de vida (Podrabsky 1999; Wourms 1972; Arenzon *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2011).

Diante deste habitat efêmero, os rivulídeos estão entre os maiores e mais abundantes e predadores, apresentando hábito alimentar oportunista (Laufer *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2011). A estratégia de reprodução adotada para perpetuar diante dessas condições extremamente variáveis é possuir alta fertilidade. Assim, após a maturidade sexual os peixes reproduzem continuamente (Wourms, 1972; Haas, 1976; Pri-Tal *et al.*, 2011).

Os peixes anuais possuem marcado dimorfismo sexual, onde os machos apresentam nadadeiras maiores e os mais diversos padrões de cores e contornos

característicos de cada espécie, enquanto as fêmeas geralmente são pardas (Costa, 2002). O temperamento também difere desde o início da maturação, os machos são mais agressivos e competitivos entre si, enquanto as fêmeas são mais pacíficas e sociáveis (Podrabsky, 1999; Belote & Costa, 2004; Volcan *et al.*, 2012).

A proporção sexual de algumas espécies de peixes pode sofrer mudanças ao longo do hidroperíodo, com maior homogeneidade no início do ciclo, tendendo a maior densidade de fêmeas conforme o tempo passa e os peixes crescem e maturam (O'Rourke & Mendelson, 2013), portanto, quando adultos, as fêmeas de peixes anuais são frequentemente encontradas em maior proporção na natureza (Nascimento *et al.*, 2012; Volcan *et al.*, 2013), podendo apresentar razões de mais de oito fêmeas por macho (Reichard *et al.*, 2009). Fatores como competição intra e interespecífica e predação por aves podem ter influência significativa nesta variação temporal da razão sexual (Haas, 1976).

Devido à peculiaridade do habitat, a dispersão dos peixes é limitada, portanto, a maioria das espécies possui reduzida área de distribuição, sendo assim considerados especialistas de habitat (Costa, 2002), além de serem consideradas raras (Nogueira *et al.*, 2010). O habitat dos peixes anuais não é vulnerável apenas às variações ambientais, a maioria das espécies de peixes anuais sofre ameaça de extinção, por seu habitat ser constantemente descaracterizado por atividades humanas (Reis *et al.*, 2003; Rosa & Lima, 2008; Volcan *et al.*, 2015). Entre estas atividades estão principalmente a agropecuária e a expansão urbana (Volcan *et al.* 2015), além da falta de fiscalização e cumprimento de leis que protegem esses ambientes, as áreas úmidas, já que os mesmos são áreas de preservação permanente (APP) (Lei Federal nº 4.771 de 1965).

Em função de seu ciclo de vida peculiar e as consequentes características evolutivas atípicas, estes peixes vêm se tornando alvos de estudos que, da mesma forma que chegam auxiliando na elucidação de características genéricas dos vertebrados, surpreendem pelas suas, cada vez mais conhecidas, singularidades (Genade *et al.*, 2005). O ciclo de vida e o habitat das diversas espécies deste grupo de peixes são muito semelhantes, sendo muitas vezes possível inferir sobre a biologia dos congêneres através de estudos específicos (García *et al.*, 2008).

## 1.2. Reprodução e desenvolvimento

A estratégia de reprodução para perpetuar diante de condições extremamente variáveis é a alta fertilidade, após a maturidade sexual os peixes anuais reproduzem continuamente até a senilidade ou morte (Wourms, 1972; Haas, 1976; Pri-Tal *et al.*, 2011). No comportamento de reprodução os machos são mais ativos (García *et al.*, 2008). Belote & Costa (2004) e García *et al.* (2008) afirmam que os movimentos de cortejo são altamente conservados dentre as espécies do gênero *Austrolebias*. A oviposição ocorre após o enterramento total do casal no substrato, que pode atingir até 15 cm de profundidade (Vaz-Ferreira *et al.*, 1966).

Caracteres embriológicos dos peixes anuais rivulídeos os classificam como um grupo único dentre os vertebrados (Podrabsky, 1999; Berois *et al.*, 2014). Segundo Arezo *et al.* (2005) o desenvolvimento embrionário dos peixes anuais está intimamente relacionado com seu ciclo de vida peculiar. Ao comparar o desenvolvimento desses peixes com outros vertebrados é observado um fenômeno exclusivo dos rivulídeos, a ocorrência de diapausas (Wourms, 1972; Podrabsky, 1999; Arezo *et al.*, 2005; Pri-Tal *et al.*, 2011; Berois *et al.*, 2014). As diapausas são estágios em que o desenvolvimento embrionário dos peixes anuais pode ser estacionado, sendo observada uma redução metabólica brusca neste período. São conhecidas três etapas do desenvolvimento em que ocorrem as diapausas. Esses estágios são denominados de diapausa I, II e III e cada um deles confere um grau de resistência e uma função, conforme as características bióticas e abióticas às quais os embriões estão expostos (Wourms, 1972; Podrabsky & Hand, 1999; Arezo *et al.*, 2005; Genade *et al.*, 2005; Podrabsky *et al.*, 2010; Pri-Tal *et al.*, 2011).

A diapausa I é facultativa, quando presente, ocorre no intervalo entre a epibolia e a embriogênese, antes da formação do eixo embrionário. Nesta fase os blastômeros dispersam completamente em torno do vitelo, podendo permanecer desta forma até que um sinal ambiental seja percebido, fazendo com que voltem a se agregar. Este padrão de segmentação é tido como exclusivo dos peixes anuais dentre os vertebrados (Wourms, 1972). A fase recebe este nome, mas não é considerada uma diapausa verdadeira, já que ocorre antes da embriogênese e não envolve diminuição do metabolismo (Podrabsky & Hand, 1999). Em condições de laboratório, raramente esta diapausa ocorre (Podrabsky,

1999; Blazek *et al.*, 2013), entretanto já foi observado que ao manter os ovos em contato com a água dos reprodutores ou de outros peixes adultos, a diapausa I está presente (Inglima *et al.*, 1981; Arezo *et al.*, 2005).

A diapausa II ocorre obrigatoriamente em todos os embriões. É uma fase determinante no desenvolvimento dos peixes anuais e, portanto, é o estágio mais extensivamente estudado (Wourms, 1972; Podrabsky & Hand, 1999). Provavelmente é a fase que confere maior tolerância e permite a sobrevivência dos peixes anuais frente à seca e privação prolongada de oxigênio (Podrabsky *et al.*, 2007). Neste estágio, os embriões têm o coração batendo e os elementos básicos do sistema nervoso central já formados (Wourms, 1972). Ao começar a entrar na diapausa II os embriões apresentam braquicardia, que vai intensificando com o tempo, até que o metabolismo fica tão lento que dificilmente pode-se observar a pulsação cardíaca (Arenzon *et al.*, 2002). A entrada e saída da diapausa II pode ser controlada por fatores bióticos e abióticos. A entrada pode ocorrer devido a fatores bióticos, como caracteres genéticos (Podrabsky & Hand, 1999) e a idade materna, onde fêmeas mais novas possuem maiores concentrações de estradiol no ovário e isto faz com que os embriões entrem na diapausa (Pri-Tal *et al.*, 2011). Por outro lado, pode ocorrer controlada por fatores abióticos como fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de oxigênio (Podrabsky, 1999; Arenzon *et al.*, 2002; Podrabsky *et al.*, 2012).

A diapausa III ocorre quando os embriões estão plenamente desenvolvidos, prontos para a eclosão (Wourms, 1972). Esta fase é normalmente obrigatória, mas, em estudos em laboratório, constatou-se que ela não esteve presente em uma pequena parcela dos indivíduos (Pri-Tal *et al.*, 2011). Durante a Diapausa III os peixes se encontram prontos para eclosão. Neste estágio o metabolismo sofre uma depressão significativa e passa a elevar gradativamente conforme os peixes permanecem nesta condição (Wourms, 1972; Podrabsky & Hand, 1999; Podrabsky & Somero, 2007; Pri-Tal *et al.*, 2011).

Nem todos os embriões vão sofrer cada um dos estágios de diapausa. A ocorrência e duração das mesmas podem ser reguladas por fatores bióticos e abióticos, podendo variar individualmente e entre as espécies (Wourms, 1967; Podrabsky & Hand, 1999; Pri-Tal *et al.*, 2011). Este fator é importante para que o ambiente seja colonizado por novos indivíduos várias vezes a partir do início da estação chuvosa (Podrabsky &

Hand, 1999), garantindo que a seca precoce do ambiente não cause a extinção de uma população (Pri-Tal *et al.*, 2011).

Ao eclodir, um problema frequentemente observado nos peixes anuais em laboratório é a ocorrência de larvas que não inflam a vesícula gasosa. Peixes com este problema são denominados “belly-slider” na língua inglesa e “rampantes” na portuguesa e espanhola (Podrabsky, 1999; Genade *et al.*, 2005; Calviño *et al.*, 2007; Blazek *et al.*, 2013). Algumas vezes esta condição pode permanecer por algumas horas, mas geralmente em até 24 horas após a eclosão os peixes apresentam natação normal (Podrabsky, 1999), mas o problema se encontra nos peixes que permanecem com a deformidade. Apesar de serem menos vigorosos e crescerem mais lentamente (Podrabsky, 1999) que os peixes normais (que inflam a bexiga), há divergências sobre a capacidade dos peixes rampantes de reproduzir. Wourms (1967) afirma que os rampantes não apresentam deficiências reprodutivas, enquanto Blazek *et al.* (2013) observaram que eles são incapazes de reproduzir normalmente.

### 1.3.Criação e manutenção de peixes anuais em laboratório

A possibilidade de estocar os ovos por vários meses, garantindo estoques de exemplares de mesma origem mesmo fora do período reprodutivo; a facilidade de manutenção de populações em condições de laboratório; a sensibilidade a tóxicos demonstrando resultados altamente reproduzíveis (Arenzon *et al.*, 2002; Arenzon *et al.*, 2003); o envelhecimento precoce, podendo ser gerada mais de uma coorte ao longo do ano (Liu & Walford, 1966; 1969); além de serem considerados bons indicadores de qualidade ambiental (Arezo *et al.*, 2007), são algumas das características do grupo que os tornam excelentes organismos modelo para estudos em laboratório (Podrabsky, 1999; Genade *et al.*, 2005; Berois *et al.*, 2014).

A manipulação das vias de desenvolvimento facilita o cultivo e transporte de peixes anuais em cativeiro, pois o momento de realizar a eclosão se torna flexível, sendo possível escolher melhores condições para ter as larvas no laboratório, por exemplo, disponibilidade de mão de obra e recursos para sua manutenção. Porém, há indícios de que o tempo de diapausa, assim como as características físico-químicas a

que os embriões estão expostos, possuem forte influência sobre o sucesso na eclosão de peixes anuais, portanto, acertar esta lacuna depende mais de feeling e experiência do que de mão de obra especializada e equipamentos técnicos (Berois *et al.*, 2014).

Além da influência das características físicas e químicas do meio na trajetória e tempo de desenvolvimento, este período representa um desafio para a manutenção de ovos de peixes anuais em laboratório, demandando cuidados para evitar a contaminação dos ovos, (Podrabsky, 1999; Polačik & Reichard, 2011). Em alguns casos os ovos recebem um tratamento anterior à utilização e também podem ser acrescentados antibióticos e antifúngicos aos meios de incubação para evitar a sua contaminação e mortalidade (Podrabsky, 1999; Arenzon *et al.*, 2002; Blazek *et al.*, 2013).

Outro aspecto difícil na reprodução de peixes anuais em laboratório é a ocorrência das larvas rampantes, que não inflam a vesícula gasosa. Por não possuir capacidade de se manter na coluna d'água a atividade de locomoção é mais dispendiosa e a disponibilidade de alimento se restringe ao que se encontra no fundo dos aquários, conferindo crescimento mais lento (Podrabsky, 1999).

As altas taxas de peixes anuais rampantes limitam sua reprodução em laboratório (Blazek *et al.*, 2013). Wourms (1967) supôs que, ao manter os ovos dos peixes anuais em turfa ligeiramente umedecida hidratando-os lentamente até a eclosão, seria possível obter uma redução na taxa de rampantes, porém Podrabsky (1999) descartou esta teoria, afirmando que independente do nível de umidade a utilização da turfa obteve melhores resultados, demonstrando que o enchimento da vesícula gasosa é facilitada por elementos químicos diretos da água de eclosão. No entanto, estas proposições não explicam como o problema ocorre, a sua causa e não apontam uma solução para o mesmo.

Em decorrência da fragilidade e da constante destruição das áreas úmidas por assoreamento, desmatamento, poluição e drenagens, recentemente foi implantado o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção, o qual inclui, em suas estratégias, a criação de técnicas para a manutenção dos peixes em laboratório aplicadas a sua conservação (ICMBio, 2013).

#### 1.4. *Austrolebias nigrofasciatus*

No Rio Grande do Sul o gênero *Austrolebias* é o mais representativo dentre os peixes anuais (Costa, 2008). *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Figura 1) é uma espécie de pequeno porte, endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim (Costa, 2006) e está incluída na lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, na categoria “Em Perigo” (Rosa & Lima, 2008; ICMBio, 2012). Além disso é considerada uma espécie ameaçada em nível mundial (Volcan *et al.* 2009). No Plano de Ação mencionado anteriormente, a espécie é apontada como “focal” dentro de seu grupo, devido à sua distribuição e a relação com as demais espécies que utilizam o mesmo nicho, ou seja, ações que visem sua conservação serão úteis à outras espécies.

Atualmente os estudos com *A. nigrofasciatus* no campo e em laboratório têm crescido. O efeito da temperatura sobre o crescimento e reprodução da espécie foi avaliado por Volcan *et al.* (2011; 2013a). Fatores como a dinâmica e a influência de variáveis ambientais nas suas populações também foram avaliados recentemente (Volcan *et al.*, 2015). Tendo em vista o interesse ecológico e científico da conservação da espécie em questão, a vulnerabilidade de seu habitat a ação antrópica, as lacunas no conhecimento da biologia deste grupo de peixes e a necessidade de elaboração de protocolos de criação eficientes para espécies ameaçadas de extinção, estudos são fundamentais para a compreensão da sua biologia, além de serem essenciais para subsidiar trabalhos de manejo populacional e repovoamento, contribuindo assim para a sua conservação. Espera-se com o presente estudo que o conhecimento sobre a biologia da espécie em questão possa ser inferido para seus congêneres e, assim, auxilie no esclarecimento das particularidades do ciclo de vida dos peixes anuais em geral.



Figura 1. Macho (acima) e fêmea (abaixo) de *Austrolebias nigrofasciatus*. Foto de Matheus Volcan



## 2. Objetivos

### 2.1.1. Objetivo geral

Estudar a reprodução e o desenvolvimento do peixe anual *A. nigrofasciatus* em laboratório

### 2.1.2. Objetivos específicos

Verificar o desempenho reprodutivo de *A. nigrofasciatus* nas proporções de uma, duas três e quatro fêmeas por macho;

Analisar a resposta de estresse em diferentes proporções sexuais;

Avaliar a sobrevivência de embriões de *A. nigrofasciatus* em diferentes meios de incubação;

Analisar a influência dos meios de incubação no tempo e nas vias de desenvolvimento embrionário;

Verificar a morfologia de juvenis de *A. nigrofasciatus* que eclodem com natação normal e que eclodem rampantes;

Comparar o crescimento de juvenis normais e rampantes;

Avaliar a persistência dos sinais da patologia que torna os juvenis rampantes ao longo do crescimento inicial de *A. nigrofasciatus*.

### 3. Referências

- Arenzon, A., Peret, A. C. & Bohrer, M. B. C. 1999. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus maelanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hydrobiologia*, 411: 65-70.
- Arenzon, A., Lemos, C.A. & Bohrer, M.B.C.. 2002. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* 62: 743-747.
- Arenzon, A., R. F. Pinto, Colombo, P. & Raya-Rodriguez, M. T. 2003. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2188-2190.
- Arezo, M. J., Pereiro, L. & Berois, N. 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology* 66: 1357–1370.
- Arezo, M. J., D'Alessandro, S., Papa, N., De Sá, R. & Berois, N. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39: 89-98.
- Belote, D. F. & Costa, W. J. E. M. 2004. Reproductive behavior patterns in three species of the South American annual fishes genus *Austrolebias* Costa, 1998 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Nova Série, Zoologia* 514: 1-7.
- Blažek, R., Polačik, M. & Reichard, M. 2013. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4: 1-7.
- Berois, N., Arezo, M. J., De Sa & R. O. 2014. The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell & Developmental Biology* 3: 136. doi:10.4172/2168-9296.1000136
- Calviño, P. A.; Alonso, F. & Torres, J. S. 2007. Llenado de gas de la vejiga natatoria de post-larvas de peces anuales sudamericanos (Cyprinodontiformes; Rivulidae). *Boletín de Killi Club Argentino* 13:18-39.
- Costa, W. J. E. M. 1998. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *Journal of Comparative Biology* 3: 220–225.

- Costa W.J.E.M. 2002. Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação. Curitiba, ed. Universidade Federal do Paraná (UFPR), 238pp.
- Costa W.J.E.M. 2006. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213, 1–162.
- Costa, W. J. E. M. 2008. Catalog of aplocheiloid killifishes of the world. 1. ed. Rio de Janeiro: Reproarte. 127pp.
- Fonseca, A. P., Volcan, M. V., Sampaio, L. A., Romano, L. A. & Robaldo, R. B. 2013. Growth of critically endangered annual fish *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) at different temperatures. *Neotropical Ichthyology* 11: 837-844.
- García, D., M. Loureiro & Tassino, B. 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology* 6: 243-248.
- Genade, T. , M. Benedetti , E. Terzibasi, P. Roncaglia, D. R. Valenzano, A. Cattaneo & A. Cellerino. 2005. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* 4: 223-233.
- Gonçalves, C. S., Souza, U. P. & Volcan, M. V. 2011. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9: 191-200.
- Haas, R. 1976. Selection in *Nothobranchius guentheri* (Pisces: cyprinodontidae). *Evolution* 30: 614-622.
- Inglima, K.; Perlmutter, A. & Markofsky, J. 1981. Reversible Stage-Specific Embryonic Inhibition Mediated by the Presence of Adults in the Annual Fish *Nothobranchius guentheri*. *Journal of Experimental Zoology* 215: 23-33.
- ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2013. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção. Brasília. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-rivulideos/sumario-executivo-rivulideos.pdf> (14 April 2013).
- Laufer, G., Arim, M., Loureiro, M., Piñero-Guerra, J. M., Clavijo-Baquet, S. &

- Fagúndez, C. 2009. Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. *Neotropical Ichthyology* 7: 77-86.
- Liu, R. K. & Walford, R. L. 1966. Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish *Cynolebias adloffii*. *Nature* 212: 1277-1278.
- Liu, R. K. & Walford, R. L. 1969. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish *Cynolebias bellottii* Steindachner. *Zoologica* 54: 1–16.
- Nascimento, W. S., Yamamoto, M. E. & Sathyabama, C. 2012. Proporção sexual e relação peso-comprimento do peixe anual *Hypsolebias antenori* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) de poças temporárias da região semiárida do Brasil. *Biota Amazônica* 2, 37-44.
- Nogueira, C., Buckup, P. A., Menezes, N. A., Oyakawa, O. T., Kasecker, T. P., Neto, M. B. R. & Silva, J. M. C. 2010. Restricted-range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters. *PLoS ONE* 5, e11390.
- O'Rourke, C. F. & Mendelson, T. C. 2013. Behavioural responses to season and adult sex ratio in the fantail darter *Etheostoma flabellare*. *Animal Behaviour* 85: 43-49.
- Podrabsky, J. E. & Hand, S. 1999. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* 202:2567-2580.
- Podrabsky, J. E. & Somero, G. N. 2007. An inducible 70 kDa-class heat shock protein is constitutively expressed during early development and diapause in the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Cell stress & chaperones* 12: 199–204.
- Podrabsky, J. E. 1999. Husbandry of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* with special emphasis on the collection and rearing of embryos. *Environmental Biology of Fishes*. 54: 421–43.
- Podrabsky, J. E. & Culpepper, K. M. 2012. Cell cycle regulation during development and dormancy in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Cell cycle* 11: 1697–1704.
- Podrabsky, J. E., Garrett, I. D. & Kohl, Z. F. 2010. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* 213: 3280–3288.

- Podrabsky, J. E., Lopez, J. P., Fan, T. W. M., Higashi, R. & Somero, G. N. 2007. Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: insights from a metabolomics analysis. *Journal of Experimental Biology* 210: 2253-2266.
- Podrabsky, J. E., Menze, M. A. & Hand, S. C. 2012. Long-Term Survival of Anoxia Despite Rapid ATP Decline in Embryos of the Annual Killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 317: 524–532.
- Polačik, M., Donner, M. T. & Reichard, M. 2011. Age structure of annual *Nothobranchius* fishes in Mozambique: is there a hatching synchrony? *Journal Fish Biology* 78: 796-809.
- Pri-Tal, B. M., Blue, S., Paub, F. K. Y. & Podrabsky, J. E. 2011. Hormonal components of altered developmental pathways in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *General and Comparative Endocrinology* 174: 166–174.
- Reichard, M., Polačik, M., Sedláček, O. 2009. Distribution, colour polymorphism and habitat use of the african killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *Journal of Fish Biology* 74: 198–212.
- Reis, R. E.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S.; Malabarba, L. R. 2003. Fishes. 117-145 pp. In: Red book of threatened fauna in Rio Grande do Sul. C. S. Fontana, G. A. Bencke and R. E. Reis (Eds). Edipucrs, Porto Alegre, Brasil 632 pp.
- Rosa, R.S. & Lima, F.C.T. 2008. Peixes. pp. 9-285. In: Machado, A.B.M.; Drummond G. M. & Paglia, A. P. (ed.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília. Ministério do Meio Ambiente, 907 pp.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra de Soriano, B. & Señorans, J. S. 1966. Integracion de La fauna de vertebrados em algunas masas de agua dulce temporales del Uruguay. *Compilaciones de los Trabajos del Departamento de Zoologia de Vertebrados* 25: 1- 16.
- Volcan, M. V., Lanés, L. E. K. & Gonçalves, A. C. 2009. Threatened fishes of the world: *Austrolebias nigrofasciatus* Costa and Cheffe, 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Environmental Biology Fishes* 86: 443-444.

- Volcan, M. V., Lanés, L. E. K. & Cheffe, M. M. 2010. Distribuição e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no município do Chuí, sul do Brasil. *Biotemas* 23: 51-58.
- Volcan, M. V., Gonçalves, A. C. & Lanés, L. E. K. 2011. Distribution, habitat and conservation status of two threatened annual fishes (Rivulidae) from southern Brazil. *Endangered Species Research* 13: 79-85.
- Volcan, M. V., Fonseca, A. P., Figueiredo, M. R. C., Sampaio, L. A. & Robaldo, R. B. 2012. Effect of temperature on growth of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. *Biota Neotropica* 12: 68-73.
- Volcan, M. V., Sampaio, L. A., Bongalhardo, D. C. & Robaldo, R. B. 2013a. Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. *Journal of Applied Ichthyology* 29: 648–652.
- Volcan, M. V., Gonçalves, A. C. & Guadagnin, D. L. 2013b. Length–weight relationship of three annual fishes (Rivulidae) from temporary freshwater wetlands of southern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology* 1188-1190.
- Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Gonçalves, A. C. & Guadagnin, D. L. 2015. Annual fishes (Rivulidae) from Southern Brazil: A broad-scale assessment of their diversity and conservation. In: Nibia Berois, Graciela García, Rafael O. de Sá. (Org.). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group 1: 342pp.
- Wourms, J. P. 1967. Annual Fishes. In *Methods in Developmental Biology* (Wilt, F. H. & Wessels, N., eds), pp. 123–137. New York: Thomas and Crowell Company.
- Wourms, J. P. 1972. The developmental biology of annual fishes. III. Pre embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology* 182:389–414.

#### 4. Capítulo 1

Formatado nas normas da revista *Environmental Biology of Fishes*

Influência da razão sexual no desempenho reprodutivo e estresse no peixe anual

*Austrolebias nigrofasciatus*

Influência da razão sexual no desempenho reprodutivo e estresse no peixe anual  
*Austrolebias nigrofasciatus*

Resumo

Fêmeas maduras de peixes anuais são frequentemente encontradas em maior proporção na natureza. Ao manter peixes anuais em casal em laboratório, muitas vezes pode se observar o assédio e agressão que os machos exercem sobre as fêmeas. Neste contexto, objetivou-se avaliar o desempenho reprodutivo e o estresse de *Austrolebias nigrofasciatus* em diferentes proporções sexuais, mantendo uma (T1), duas (T2), três (T3) e quatro (T4) fêmeas com um macho por unidade experimental (UE). Não houve diferença estatística na média de oviposição absoluta (ovos por fêmea). No T4, houve aumento na resposta ao estresse de machos em comparação com T1 e T2 ( $p = 0,008$ ), coincidindo com a diminuição na taxa de fertilização em relação ao T1 ( $p = 0,03$ ). No entanto, verificou-se um aumento de fertilização total (ovos fertilizados por UE) no T3 em relação ao T1 ( $p = 0,001$ ). O que pode indicar que a resposta de estresse não influencia o desempenho reprodutivo dos machos até que esta proporção seja alcançada. Verificamos o aumento do desempenho reprodutivo, aumentando a proporção de fêmeas para até três por macho; no entanto, contra a nossa hipótese, as fêmeas não mostraram alteração na fertilidade e no estresse em relação à proporção sexual, mas sim os machos. Os resultados sugerem que a espécie é adaptada para lidar com os períodos de baixa densidade de machos no fim do ciclo reprodutivo, sem prejuízo no desempenho reprodutivo com proporção de até três fêmeas por macho.

Influence of sex ratios on reproductive performance and stress in the annual fish  
*Austrolebias nigrofasciatus*

Alinca Peres da Fonseca<sup>a,b,\*</sup>, Danieli Guterres<sup>b</sup>, Matheus Vieira Volcan<sup>c</sup>, Bruna Zafalon-Silva<sup>b</sup>, Ricardo Berteaux Robaldo<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, 96210-030

<sup>b</sup>Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura, Universidade Federal de Pelotas,



Capão do Leão, 96010-900

<sup>c</sup>Laboratório de Ictiologia, Instituto Pró-Pampa, Pelotas, Rio Grande do Sul, 96010-630

\*Correspondence to: Alinca Fonseca, Rua Uruguai, 1242, CEP 96010630, Pelotas, RS, Brasil

Phone: 55 (53) 32757586

E-mail: [alincaf@gmail.com](mailto:alincaf@gmail.com)

## Abstract

Mature female annual fish are often found in a higher proportion in nature. By keeping the annual fish in pairs in a laboratory, the harassment and aggression that males exercise over females can often be observed. In this context, we aimed to assess the reproductive performance of and the stress experienced by *Austrolebias nigrofasciatus* in different sex ratios, maintaining one (T1), two (T2), three (T3) and four (T4) females with one male per experimental unit (EU). There was no statistical difference in the mean absolute oviposition (eggs per female). In T4, there was an increase in the stress response of males compared to T1 and T2 ( $p = 0.008$ ), coinciding with a decrease in the fertilization rate as compared to T1 ( $p = 0.03$ ). However, we verified an increase of total fertilization (fertilized eggs per EU) in T3 compared to T1 ( $p = 0.001$ ). This may indicate that the stress response does not affect the reproductive performance of males until this proportion is reached. We revealed the reproductive performance increase by increasing the proportion of females by up to three per male; however, against our hypothesis, the females showed no change in fertility and in stress according to the sex ratio, unlike the males. The results suggest that the species has adapted to cope with periods of low density of males at the end of the reproductive cycle, avoiding damaging reproductive performance with a ratio of up to three females per male.

## Keywords

Reproduction · Sexual proportion · Stress response · Oviposition · Fertilization

## 1. Introduction

The life history and the social and reproductive behaviour of the annual fish (Rivulidae) are peculiar, and show differences between the sexes from the beginning of maturation (Volcan et al. 2012; Fonseca et al. 2013). Annual fish live in areas of seasonal flooding, shallow wetlands that become dry at certain times of year, and they exhibit rapid growth and early sexual maturation (Arenzon et al. 1999; Errea and Danulat 2001; Volcan et al. 2012). Most species bury their eggs in the substrate, where they remain until the beginning of the rains when the wetlands flood and the eggs hatch, initiating a new life cycle (Wourms 1972; Podrabsky and Hand 1999). Males have marked secondary sexual characteristics (Costa 2008) and tend to be aggressive and competitive with each other, while females are less active and more peaceful (Podrabsky 1999; Belote and Costa 2004; Volcan et al. 2012; Blažec et al. 2013; Reichard et al. 2014).

The sex ratio of some fish species can undergo changes during the life cycle, with greater homogeneity at the beginning of the cycle, with the ratio of females to males being highest as time goes on and as the fish grow and mature (O'Rourke and Mendelson 2013; Passos et al. 2014), as is the case with Rivulidae. Females of annual fish are often found in greater proportions in nature (Nascimento et al. 2012; Volcan et al. 2013; Passos et al. 2014; Reichard et al. 2014), where one can find ratios of more than eight females per male (Reichard et al. 2009). Factors such as intra- and interspecific competition and predation, such as by birds, can have a significant influence on this temporal variation in the sex ratio, since males are usually more colourful and attractive than females, and therefore more prone to predation (Haas 1976).

The proportion of breeding females and males in a population is considered the operational sex ratio (OSR) and is determined by the adult sex ratio in the population, the spatial and temporal distribution of the two sexes and their potential reproductive rates (Clutton-Brock and Parker 1992). This ratio can directly affect the harassment to which females are subjected and the costs of resisting this (Clutton-Brock and Parker 1995). Aggressive behaviour in reproduction can respond to seasonal changes which can be either unpredictable or predictable in the OSR (O'Rourke and Mendelson 2013). These sexual conflicts occur mainly when the optimal number of copulations for males

and females is different. This discrepancy usually occurs because the males can engage in a higher number of copulations relative to the females' number of reproductive fitness peaks (Arnqvist and Nilsson 2000). Above these peaks, additional copulations may reduce the benefits to the reproductive performance of females (Zeh and Zeh 2003; Smith and Sargent 2006; O'Rourke and Mendelson 2013).

Stress adversely affects the reproductive performance of teleost fish, and fish species vary in their reproductive behaviour and success when placed in artificial habitats; consequently, different approaches are used to manage reproduction for different species of fish (Conte 2004). Keeping annual fish species in pairs routinely shows that males are insistent and aggressive towards females during courtship, which may cause stress to the females (Volcan et al. 2012). Some studies have thus used more females than males for the maintenance of annual fish (Volcan et al. 2012; Fonseca et al. 2013; Blažec et al. 2013). However, it is unknown how males and females respond to different sex ratios and physiological changes. Factors affecting the breeding conditions may be reflected in the number and quality of the offspring; therefore, to understand the consequences of stressful events for a population requires an understanding of the effects of stress on individual fish. Such an understanding is fundamental to conservation biology, the management of populations and aquaculture (Schreck et al. 2001). Fertility is one indicator of the reproductive performance of annual fish (Volcan et al. 2011; Volcan et al. 2013); the gonadosomatic index (GSI) and the liver somatic index (LSI) are also often used to assess the reproductive period and the nutritional and gonadal condition of fish (Encina and Granado-Lorencio 1997; Lambert and Dutil 2000). The principal method used to examine the stress in fish is the measurement of cortisol, which evaluates the primary stress response when glucocorticoids are released by the hypothalamus-pituitary-interrenal axis (Barton and Iwama 1991; Brydges et al. 2009). One can thus observe a secondary stress response where, under the effect of glucocorticoids, the number of lymphocytes in the blood decreases (lymphocytopenia) and neutrophils migrate into the bloodstream, increasing its circulating quantity (neutrophilia) (Davis et al. 2008). Thus, recent studies on the basal concentrations of leukocytes have provided answers about fish welfare (Zebral et al. 2015). The ratio of neutrophils:lymphocytes (N:L) may be used as a stress marker, especially for juvenile or small fish (e.g., Zebral et al. 2015) such as annual fish species. In response to stress,

lymphocytes bind to endothelial cells and move to tissues, for example in the spleen, lymphonodes and skin. Neutrophils migrate from these tissues, especially the endothelium, into the bloodstream (Davis et al. 2008).

The pressure on the females and the likely stress at the time of reproduction in annual fish pairs should be mitigated where there is more than one female per male, possibly increasing reproductive performance by allowing an interval for energy recovery and maturation of oocytes, alternating reproductive events between females (Volcan et al. 2012). In this context, we aimed to analyse the effect of the sex ratio on the reproductive performance and stress experienced by the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Costa and Cheffe 2001) — a small species endemic to the floodplain of the São Gonçalo channel in the Patos-Mirim lagoon system of southern Brazil, and which is considered endangered (ICMBio 2013). We hypothesized that by increasing the proportion of females, the pressure on females would be decreased, which would be reflected in reduced stress and an increase in oviposition. We also hypothesized that the stress levels of males would remain moderate and hardly modified by the sex ratio, i.e., that their reproductive functions would not be damaged.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Fish maintenance and experimental design

We conducted the study in September 2013 in the Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura of the Universidade Federal de Pelotas, with fish from temporary ponds located in the floodplain of the Padre Doutor stream (31° 48'19.25" S and 52° 25'19.11" W), in the municipality of Capão do Leão. For the collection of breeders, we used a D-shaped hand net (60 x 40 cm and 2 mm mesh).

Immediately after collection, we transported the fish to the laboratory. Females were randomly transferred to the experimental units (EU), which consisted of cylindrical pots with dimensions to accommodate a density of 0.7 fish/L (2.9 L at a 1:1 sex ratio, to 7.6 L at a 1:4 sex ratio). The EUs had continuous aeration at a constant temperature of 20°C, a controlled photoperiod (12L:12D), Java moss (*Taxiphyllum barbieri*) providing shelter and nesting material, with coconut-shell powder as a substrate for egg laying. We kept the males isolated in 3 L aquaria without a nest for 48 hours, before

transferring them to the EUs with the females.

For food, we offered native zooplankton (cladocerans and copepods) *ad libitum*, daily. To maintain water quality, we monitored the pH (using a pHmetro Hanna, 0.01), temperature (mercury thermometer, 0.1°C), total toxic ammonia (Nutrafin®-Hagen, Germany) three times a week, and we performed a partial (50%) weekly water change. We did not find any differences in mean water quality parameters between treatments (ANOVA,  $p > 0.05$ ). The pH ranged from  $7.32 \pm 0.07$  to  $7.42 \pm 0.07$ , and total toxic ammonia ranged from  $0.005 \pm 0.002$  to  $0.006 \pm 0.002$  ppm.

The acclimation period was seven days, in which we kept the fish in the same experimental conditions, with one male per EU, and manipulated the proportion of females. The treatments (T), with five replications, consisted of the following sex ratios (female:male) — (T1) 1:1, (T2) 2:1, (T3) 3:1 and (T4) 4:1.

After the acclimation period, we changed the nest for a new substrate and kept them in EUs for 14 days. Subsequently, we removed the nests and counted the eggs. All eggs were observed with a stereomicroscope (45 x) to check the fertilization, determined by the presence of perivitelline space. We measured a sample from 30 to 100 fertilized eggs in each nest, according to the highest available position, using a stereomicroscope equipped with a micrometered ocular lens. We considered absolute oviposition to be the number of eggs laid (fertilized or not) per female, absolute fertilization as the number of fertilized eggs laid per female, relative oviposition as the number of eggs laid (fertilized or not) by the total weight of females (g) per EU and relative fertilization as the number of fertilized eggs laid by the total weight of females (g) per EU. We defined the fertilization rate as the percentage of fertilized eggs in relation to absolute oviposition. The total oviposition and total fertilization values were defined by the total laid eggs (fertilized or not) and total eggs fertilized per EU, respectively.

For making blood smears, which were still in the presence of nests, we removed each fish with netting and subjected them to cryoanaesthesia. Then we sectioned the caudal peduncle end and, with the aid of heparinized microtubes for a haematocrit (1 mm), obtained the peripheral blood sample. For securing the extensions, we immersed the slides in methanol PA, and then brushed them with 5% Giemsa (Tavares-Dias and Moraes 2004). We analysed the blades on the microscope (1000 x), evaluating the first 100 leukocytes observed for the leukocyte profile and calculated the N:L ratio,

according to Davis et al. (2008).

We measured the fish using a calliper (0.1 mm) for their total length (TL), and weighed them with a precision scale (0.0001 g). We placed them in 10% formalin and later moved them to 70% alcohol. We dissected the gonads and the liver, and weighed them on a precision scale (0.0001) for analysis of the GSI (GSI=gonad weight/total weight (g)) and the LSI (LSI=liver weight/total weight (g)).

The capture and maintenance of fish were made under the IBAMA/ICMBio licence (41713-1). All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice in which the studies were conducted.

## *2.2 Statistical analysis*

We performed statistical analysis using Statistica 7.0 software. After confirmation of the normality and homoscedasticity of data, we tested the effect of treatments on oviposition, fertilization rate, GSI, LSI and N:L by ANOVA (one-way) followed by a Tukey19s test, at a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ). To compare results between males and females, we used a t-test. We transformed the data of fertilization rates and the N:L ratios by Arc Sine ( $= \arcsin (X / 100)$ ) to test the assumptions for ANOVA.

## 3. Results

### *3.1 Breeders*

The average weight (mean  $\pm$  SE) of breeders ranged from  $0.90 \pm 0.06$  to  $1.08 \pm 0.20$  g for females and  $1.07 \pm 0.11$  to  $1.27 \pm 0.14$  g for males. TL (mean  $\pm$  SE) ranged from  $40.07 \pm 0.73$  to  $42.60 \pm 2.23$  mm for females and  $42.80 \pm 1.24$  to  $45.60 \pm 1.63$  mm for males. We did not find differences in the weights and lengths of females or males between treatments (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Survival was total during the study period.

### *3.2 Reproductive performance*

Neither the GSI and the LSI of females and males nor the diameter of the eggs differed between treatments (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ ; Table 1). The GSI and the LSI were higher in females than in males in all treatments (t-test,  $p < 0.05$ ).

Table 1: Gonadosomatic index (GSI), liver somatic index (LSI) and fertilized egg diameter (mean  $\pm$  standard error) of *Austrolebias nigrofasciatus*, kept in proportions of one female (F):one male (M) (T1), 2F:1M (T2), 3F:1M (T3) and 4F:1M (T4) with five replications over 14 days. There was no significant difference in means between the treatments (ANOVA, Tukey,  $p>0.05$ ).

	Females		Males		Egg diameter (mm)
	GSI	LSI	GSI	LSI	
T1	4.91 $\pm$ 0.98	2.91 $\pm$ 0.40	0.65 $\pm$ 0.13	1.96 $\pm$ 0.31	1.38 $\pm$ 0.01
T2	6.88 $\pm$ 0.44	2.21 $\pm$ 0.39	0.80 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.26	1.38 $\pm$ 0.01
T3	6.93 $\pm$ 0.70	2.79 $\pm$ 0.26	0.70 $\pm$ 0.16	1.05 $\pm$ 0.35	1.40 $\pm$ 0.01
T4	7.76 $\pm$ 0.79	3.23 $\pm$ 0.50	0.69 $\pm$ 0.16	1.10 $\pm$ 0.26	1.39 $\pm$ 0.01

There were no differences in the means of relative oviposition or relative fertilization between treatments. We found a higher fertilization rate at T1 compared to T4 ( $p<0.05$ ; Fig. 1).

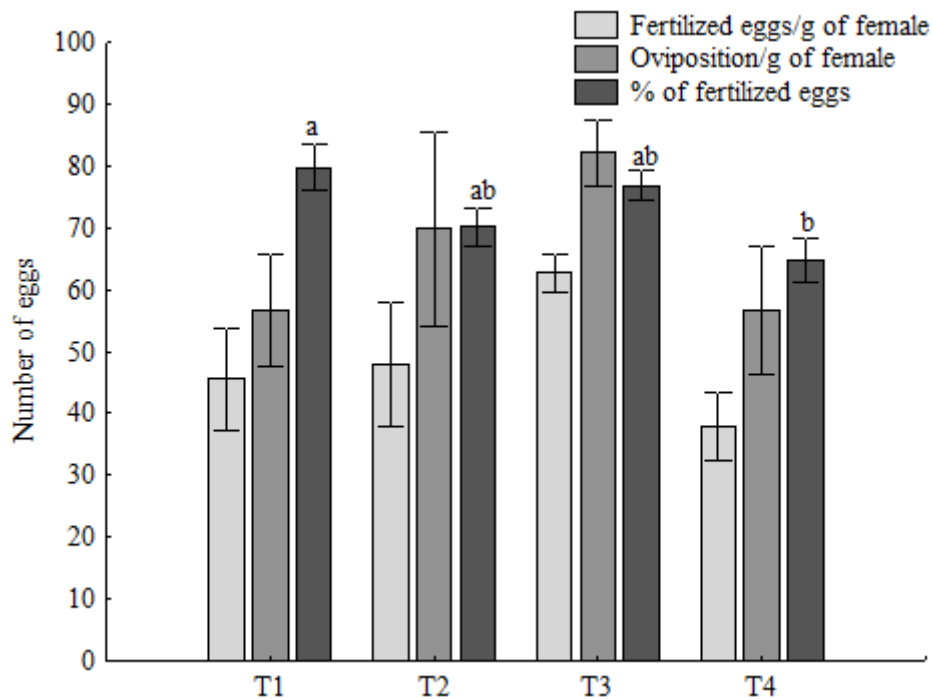


Figure 1: Percentage of fertilized eggs, relative fertilization (relative to weight (g) of the female) and oviposition (mean  $\pm$  standard error) of *Austrolebias nigrofasciatus* kept in proportions of one female (F):one male (M) (T1), 2F:1M (T2), 3F:1M (T3) and 4F:1M (T4) with five replications over 14 days. Different letters show significant differences between treatments (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ ).

There were no differences in the means of absolute oviposition or absolute fertilization between treatments. The total oviposition and total fertilization were higher in T3 and T4 compared to T1 (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ ), while the T2 did not differ from other treatments (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ ; Fig. 2).

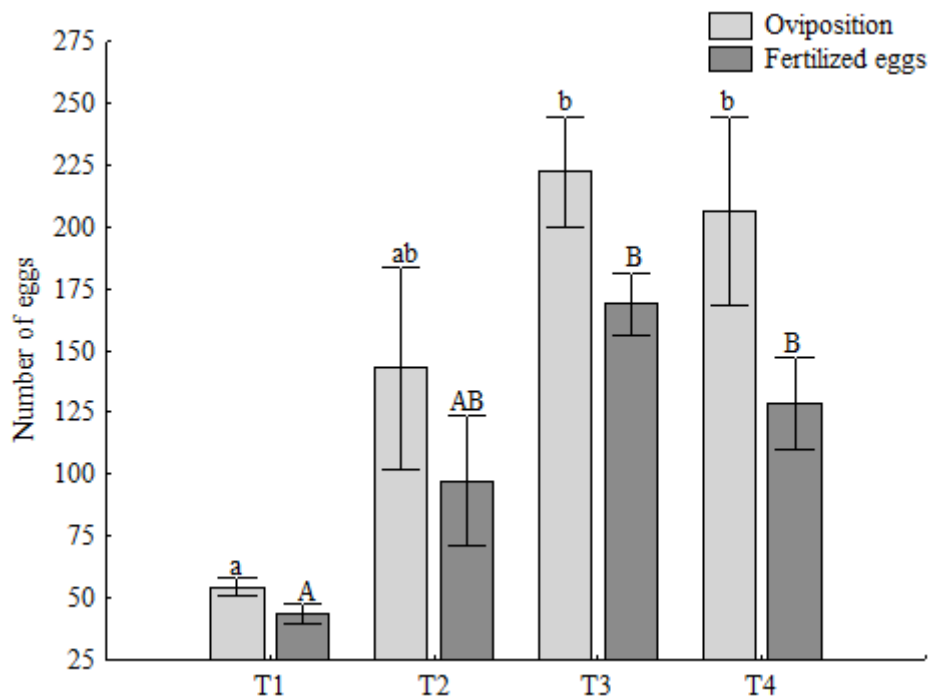


Figure 2: Total oviposition and total fertilization (mean  $\pm$  standard error) of *Austrolebias nigrofasciatus* kept in proportions of one female (F):one male (M) (T1) 2F:1M (T2) 3F:1M (T3) and 4F:1M (T4) with five replications over 14 days. Different letters show significant differences between treatments — lower case for oviposition and upper case for fertilized eggs (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ ).

### 3.3 Leukocyte profile



We observed that the N:L ratio remained similar for females in all treatments; however, we observed higher values for males when the ratio of females to males was higher: T4 had a higher N:L ratio than T1 and T2 (ANOVA, Tukey  $p > 0.05$ ), and did not differ from T3 (Fig. 3).

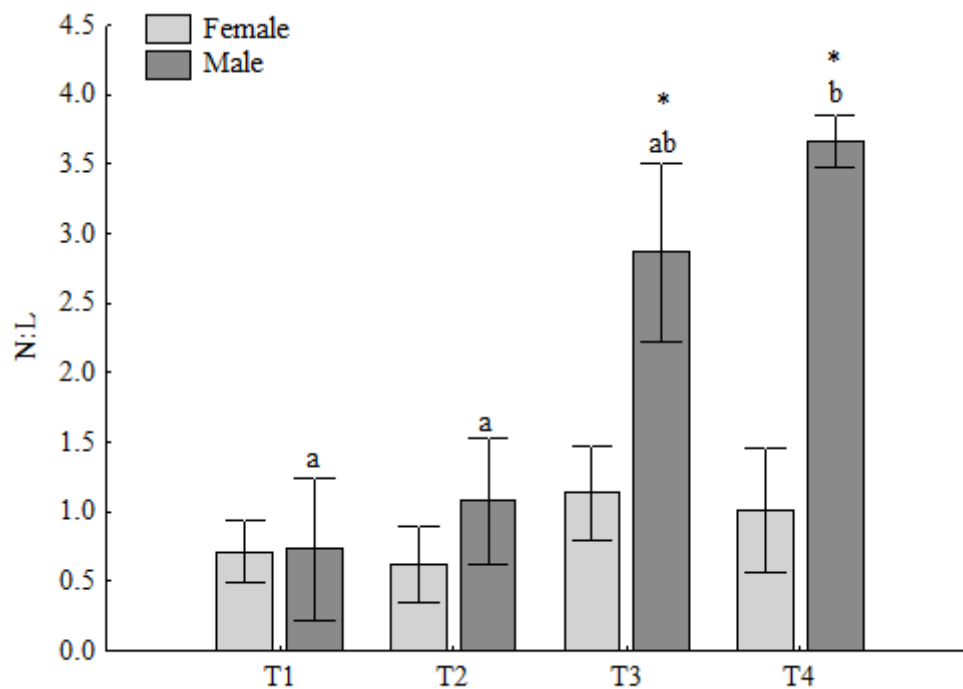


Figure 3: Neutrophil:lymphocyte ratio (N:L) (mean  $\pm$  standard error) of males and females of *Austrolebias nigrofasciatus* kept in proportions of one female (F):one male (M) (T1), 2F:1M (T2), 3F:1M (T3) and 4F:1M (T4) with five replications over 14 days. Different letters show significant differences in the N:L of males between treatments (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ ) and “\*” between sexes in the treatment (t test,  $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The results for oviposition, fertilization and the N:L ratio of males suggest that there is a limitation to reproductive capacity with a larger ratio of females to males. Although some individual studies have demonstrated the influence of the formation of couples and the characteristics of males and/or females on egg diameter (Walsh and Reznick 2008; Moshgani and Van-Dooren 2011), no influence of the treatments on this attribute

was verified, suggesting that the sex ratio should not interfere in this regard.

We observed that with ratios of up to three females per male (T1, T2 and T3), there was no difference in absolute oviposition or absolute fertilization, but there was increased total oviposition and total fertilization with treatment, as expected, considering the increase of females. However, in T4, the fertilization rate was lower than that of T1. Although there was no statistical difference, there was a trend of an increase in the mean oviposition up to the ratio of three females per male, which may be quantitatively important when the goal is obtaining eggs. The addition of females showed an increase of at least 15% in the mean oviposition for each female added. For the species *Danio rerio*, reproductive success can be increased by increasing the number of females, provided that there is only one male maintained per experimental unit (Spence and Smith 2005).

Physiological stress responses can affect many reproductive aspects, including behaviour (Conte, 2004), which has an associated energy cost, and with changes in energy partitioning during the stress response, which ends up having a negative influence on reproductive performance (Schreck 2010). The occurrence of stress due to the insistence of males in smaller proportions of females was not observed. In a study with *A. nigrofasciatus*, where pairs were kept for a longer period, it was observed that males were insistent and aggressive during courtship to the point of possibly stressing and debilitating the females (Volcan et al. 2012). Despite the shorter period of this study, we observed that the female GSI tended to be lower when the fish were kept in pairs, indicating that (in the long term) the ability of females to mature oocytes and meet the reproductive demand of males can be increased. Corroborating this fact was that the male LSI also demonstrated a tendency to be higher in this condition, evidencing the availability of nutritional substrate to invest in the gonads. Generally, the optimal number of copulations is higher for males than for females (Arnqvist and Nilsson 2000), which can cause sexual conflict, especially if the availability of females limits the production of offspring (Clutton-Brock and Vincent 1991). Faced with chronic and intense stressors, the stress response can lead to functional impairment, resulting in decreased growth and reproduction, and immunosuppression (Zebral et al. 2015).

For the Poeciliidae *Gambusia affinis*, different sex ratios did not change the physical

condition of the males, but there was a decrease in oviposition with an increase in the number of females (Smith and Sargent 2006). However, the matter of whether the performance of males could impair the performance of the females was not considered in the study.

We observed an increase in the stress levels of the males in T3 and T4; however, there was impairment in reproductive performance only in T4. Depending on the duration, frequency and intensity of the stress response, it can become dysfunctional and compromise physiological and behavioural factors (Zebral et al. 2015). Therefore, the increase in oviposition and the total number of eggs fertilized in T3 may indicate that although the stress response of males in these proportions did not yet affect reproductive performance, it did mark a transition point after which further increase would have an impact.

In animals, sexual selection, as well as the secondary sexual characteristics, is usually more pronounced in males. It is the male who must actively demonstrate the ability to overcome other males and conquer females in order to have reproductive success (Clutton-Brock 2009). Competition is usually more pronounced in one sex than the other, often males competing for females (de Jong et al. 2009), but this may vary over time or between populations (Forsgren et al. 2004; Shibata and Kohda 2006). Social behaviours, such as competitiveness and the formation of couples, often evolve in response to the OSR (De Jong et al. 2009); one sex is likely to be competitive and solicitous when it is abundant relative to the other (O'Rourke and Mendelson 2013). Despite not having been the target of observation in our study, we found that in the highest proportion of female courtship behaviour directed to a specific female often attracted another female who accompanied and participated in the reproductive event, and who eventually buried her eggs along with the couple in the substrate; this has been observed for other *Austrolebias* species (Belote and Costa 2004).

Although there is complex courtship behaviour directed towards a female, where the male attracts her attention and leads her to the outcome of the reproductive event (García et al. 2008), it is likely that the male does not have the same success when mating with two or more females simultaneously. He will not be able to fertilize them both; in this sense, a higher proportion of females is expected to decrease the fertilization rate. The increase in density in one sex can directly affect behaviour, e.g.,

increasing competition by increasing the rate at which fish meet competitors, while increasing the density of the opposite sex can lead to the aggregation of potential partners, offering the opportunity for monopolization (Kokko and Rankin 2006). Passos et al. (2014) observed that the reproductive behaviour of *Austrolebias reicherti* is connected to the OSR, where, early in the cycle when the sex ratio is more equal, females prefer larger males to smaller ones. However, they become less selective when approaching the dry season when the ponds dry out, which drastically decreases the number of males in the environment — this shows that reproductive behaviour depends on the population context.

These studies, as well the results we have presented, demonstrate that interaction between the sexes has a more complex role to play than those of courtship, mating and fertilization, because with four females, the reproductive performance of males was harmed as their stress response increased. Therefore, we infer that T4 represents a disadvantage in this interaction, which can occur due to changes in behavioural performance: the competition of females in the formation of pairs, or the search for territory, food or chemical signals, decreased the concentration of pheromones or male metabolites (Smith and Sargent 2006). However, further studies are needed to define these changes and evaluate their relationship to the stress of males, as well as to establish which behavioural or gonadal conditions cause damage to reproductive performance.

## **Conclusion**

Reproductive performance was increased by increasing the proportion of females, resulting in the greater availability of fertilized eggs with the same number of males. However, while females showed no change in stress levels depending on the sex ratio, the males did, indicating that the reproductive capacity of males is impaired with four females to one male. The experimental design of this study does not address many of the other relationships present in the natural environment, such as the interaction between males. Nevertheless, the results suggest that the species is adapted to handle situations such as a low proportion of females up to a sex ratio of three females per male in the laboratory, as occurs along the life cycle in the natural environment, although

reproductive performance may be impaired when the proportion of females to males is higher than this. The results showed that increasing the ratio of females up to three per male favours the reproductive performance of *Austrolebias nigrofasciatus*.

#### Acknowledgements

Alinca Fonseca thanks CAPES for her Ph.D. scholarship and Ricardo Robaldo thanks the CNPq for the research fellowship grant (307478/2012-2).

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

#### References

Arnqvist G, Nilsson T (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim Behav* 60:145–164

Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis* 1:3–26

Belote DF, Costa WJEM (2004) Reproductive behavior patterns in three species of the South American annual fishes genus *Austrolebias* Costa, 1998 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Nova Série, Zoologia* 514:1-7

Blažek R, Polačik M, Reichard M (2013) Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 24:7 p

Brydges NM, Boulcott P, Ellis T, Braithwaite VA (2009) Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Appl Anim Behav Sci* 16:295–301

Clutton-Brock TH, Parker GA (1995) Punishment in animal societies. *Nature* 373:209-215

Clutton-Brock TH, Parker GA (1992) Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *Q Rev Biol* 67:437–456

Clutton-Brock TH, Vincent ACJ (1991) Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature* 351:58–60

- Clutton-Brock TH (2009) Sexual selection in females. *Anim Behav* 77:3–11
- Conte FS (2004) Stress and the welfare of cultured fish. *Appl Anim Behav Sci* 8:205–223
- Costa WJEM (2008) Catalog of aplocheiloid killifishes of the world (1st. ed.) Rio de Janeiro, BR: Reproarte
- Costa WJEM, Cheffe MM (2001) Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the laguna dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (Ahl) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Com Mus Cien Tecnol PUCRS* 14:179-200
- Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM (2008) Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen* 16:23–29
- Encina L, Granado-Lorencio C (1997) Seasonal variations in the physiological status and energy content of somatic and reproductive tissues of chub. *J Fish Biol* 50:511-522
- Fonseca AP, Volcan MV, Sampaio LA, Romano LA, Robaldo RB (2013) Growth of Critically Endangered annual fish *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) at different temperatures. *Neotrop Ichthyol* 11:837-844
- Forsgren E, Amundsen T, Borg ÅA, Bjelvenmark J (2004) Unusually dynamics sex roles in a fish. *Nature* 429:551–554
- Haas R (1976) Selection in *Nothobranchius guentheri* (Pisces: Cyprinodontidae). *Evolution* 30:614-622
- ICMBio- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2012). Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes Rivulídeos ameaçados de extinção. Available in: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/plano-de-acao/2833-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-dos-rivulideos.html> (Accessed 30 March 2015)
- de Jong K, Wacker S, Amundsen T, Forsgren E (2009) Do operational sex ratio and density affect mating behaviour? An experiment on the two-spotted goby. *Anim Behav* 78:1229–1238
- Kokko H, Rankin DJ (2006) Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:319–334
- Lambert Y, Dutil JD (2000) Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod

(*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves. *Can J Fish Aquat Sci* 57:815-825

Lima LC, Ribeiro LP, Leite RC, Melo DC (2006) Estresse em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 30:113-117

Nascimento WS, Yamamoto ME, Sathyabama C (2012) Proporção sexual e relação peso-comprimento do peixe anual *Hypsolebias antenori* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) de poças temporárias da região semiárida do Brasil. *Biota Amazônica* 2:37-44

Passos C, Tassinio B, Reyes F, Rosenthal GG (2014) Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. *PlosOne* 9:5 p

Podrabsky JE (1999) Husbandry of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* with special emphasis on the collection and rearing of embryos. *Env Biol Fishes* 54:421-431

Podrabsky JE, Hand S (1999) The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *J Exp Biol* 202:2567-2580

Reichard M, Polačik M, Sedláček O (2009) Distribution, colour polymorphism and habitat use of the african killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *J Fish Biol* 74:198–212

Reichard M, Polačik M, Blažek R, Vrtílek M (2014) Female bias in the adult sex ratio of African annual fishes: interspecific differences, seasonal trends and environmental predictors. *Evol Ecol* 28:1105-1120

Schreck CB (2010) Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocr* 165:549–556

Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197:3–24

Shibata J, Kohda M (2006) Seasonal sex role changes in the blenniid *Petroscirtes breviceps*, a nest brooder with paternal care. *J Fish Biol* 12:203–214

Smith CC, Sargent RC (2006) Female fitness declines with increasing female density but not male harassment in the western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Anim Behav* 71:401–407

Spence R, Smith C (2005) Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim Behav* 69:1317–1323

- Walsh MR, Reznick DN (2008) Interactions between the direct and indirect effects of predators determine life history evolution in a killifish. *Proc Nat Acad Sci USA* 105:594-599
- Volcan MV, Fonseca AP, Robaldo RB (2011) Reproduction of the threatened Annual Killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), confined in a natural environment. *J Threat Taxa* 3:1864-1867
- Volcan MV, Sampaio LA, Bongalhardo DC, Robaldo RB (2012) Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. *J Appl Ichthyol* 29:648–652
- Volcan MV, Gonçalves ÂC, Guadagnin DL (2013) Length–weight relationship of three annual fishes (Rivulidae) from temporary freshwater wetlands of southern Brazil. *J Appl Ichthyol* 29:1188–1190
- Zebral YD, Zafalon-Silva B, Mascarenhas MW, Robaldo RB (2015) Leucocyte profile and growth rates as indicators of crowding stress in pejerrey fingerlings (*Odontesthes bonariensis*). *Aquac Res*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/are.12384>
- Zeh JA, Zeh DW (2003) Toward a new sexual selection paradigm: polyandry, conflict and incompatibility (invited article). *Ethology* 109:929–950



## 5. Capítulo 2

Formatado nas normas da revista Journal of Fish Biology

Efeito do meio de incubação no tempo e a trajetória de desenvolvimento embrionário do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae)

**Efeito do meio de incubação no tempo e a trajetória de desenvolvimento  
embrionário do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae)**

A. P. DA FONSECA<sup>1,2,\*</sup>; M. V. VOLCAN<sup>3</sup>; R. B. ROBALDO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande,  
Estação Marinha de Aquicultura, Rua do Hotel, n 02, Cassino Rio Grande, 96210-030,  
RS, Brasil*

<sup>2</sup>*Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura, Instituto de Biologia, DFF, prédio  
26, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, 96010-900, RS, Brasil*

<sup>3</sup>*Laboratório de Ictiologia, Instituto Pró-Pampa, Rua Uruguai, n 1242, Centro, Pelotas,  
96010-630, RS, Brasil*

\*Autor correspondente. Tel.: +55 (53) 91147337; email: alincaf@gmail.com

**RESUMO**

Peixes anuais são considerados organismos extremos por viverem exclusivamente em áreas úmidas sazonais e possuem adaptações únicas para sobrevivência nestes ambientes. As diapausas são características marcantes neste grupo de peixes, caracterizadas pela pausa no desenvolvimento embrionário em função de sinais internos e ambientais. Para analisar a sobrevivência, trajetória e tempo de desenvolvimento embrionário do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* em diferentes meios de incubação, ovos foram acompanhados da postura até o completo desenvolvimento em quatro meios líquidos e dois meios úmidos sob condições experimentais durante 130 dias. Foi verificado que até a fase anterior à entrada em diapausa II (DII) não existe influência dos meios no padrão de desenvolvimento, mas desta fase em diante o meio de água com casca de coco em pó apresentou atraso no tempo de desenvolvimento em relação aos demais tratamentos, chegando aos 100 dias de estudo com cerca de 80 % dos embriões em DII. Todos os demais meios apresentaram uma parcela significativamente inferior de embriões que permaneceram em DII. Já o meio úmido

com solução de Yamamoto foi o que apresentou o desenvolvimento mais acelerado. A partir de 27 dias após a postura foram observados os primeiros embriões completamente desenvolvidos. Os ovos levaram em média de 46 a 58 dias para que 50 % em cada tratamento alcançassem a diapausa III. Ovos que foram mantidos na mesma água dos reprodutores desde a postura permaneceram na DI. A sobrevivência em todos os meios de incubação foi alta em comparação com outros estudos, entre 70 e 98 %. Diante destes resultados conclui-se que todos os meios testados são viáveis para a manutenção dos embriões, podendo se alterar as trajetórias de desenvolvimento através da manipulação das diapausas, o que contribui para que a espécie seja considerada organismo modelo para estudos de laboratório.

## INTRODUÇÃO

Peixes anuais são considerados organismos extremos e apresentam diversas adaptações para sobreviver no ecossistema que habitam (Berois *et al.*, 2013; Berois *et al.*, 2014). Vivem em poças de água pequenas e rasas que, obrigatoriamente, secam em determinada época do ano e, portanto, estão sujeitas a variações extremas das características físicas e químicas em um curto período de tempo (Volcan *et al.*, 2011). O ecossistema onde vivem é considerado um dos mais ameaçados de destruição no mundo (Amezaga *et al.* 2002), o que compromete a situação de conservação dos organismos que dependem dele (Gibbis, 2000).

O anualismo ocorre em peixes das famílias Nothobranchidae no continente africano e Rivulidae nas Américas do Norte, Central e do Sul (Costa, 2008). A maioria das espécies de ambas as famílias depositam seus ovos no substrato, estes ovos permanecem vivos estocados no solo mesmo durante o período de seca completa das poças. Com a inundação das áreas úmidas os ovos eclodem, dando início a um novo ciclo de vida (Wourms, 1972; Podrabsky & Hand, 1999; Volcan *et al.*, 2011).

A sobrevivência dos ovos de peixes anuais só é possível graças a características únicas da sua embriogênese entre os vertebrados, que possibilitou a sobrevivência destes peixes mesmo sob condições altamente adversas, como a seca completa de seu habitat, por meio de diferentes estágios de Diapausa (Wourms, 1972). Alguns Cyprinodontiformes de água doce, estuarinos e marinhos não anuais, igualmente

possuem ovos com capacidade de resistir à seca do ambiente, e os mecanismos para isto são semelhantes aos observados para os peixes anuais (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2009). O desenvolvimento embrionário destes peixes apresenta três fases peculiares em que a embriogênese pode ficar estacionada, são denominadas Diapausas I, II e III. A Diapausa I (DI) compreende a dispersão dos blastômeros após a fase de epibolia, sabe-se que em baixa temperatura ou disponibilidade de oxigênio ela pode ocorrer (Wourms, 1972) e que o contato com metabólitos de peixes adultos pode induzir a permanência dos embriões nesta condição (Inglima *et al.*, 1981). A Diapausa II (DII) é determinante no desenvolvimento dos peixes anuais e, portanto, é o estágio mais extensivamente estudado, pois é a etapa que confere maior tolerância às mudanças ambientais (Wourms, 1972; Podrabsky & Hand, 1999). Neste estágio, os embriões têm o coração pulsátil e os elementos básicos do sistema nervoso central já formados (Wourms, 1972). A Diapausa III (DIII) ocorre quando os embriões estão completamente formados e prontos para eclodir (Podrabsky *et al.*, 2010). As DII e DIII são caracterizadas por uma queda brusca no metabolismo, podendo os embriões permanecer nestas fases até que um sinal ambiental ou interno seja percebido (Podrabsky *et al.*, 2010; Pri-Tal *et al.*, 2011).

Como as diapausas são influenciadas por características químicas e físicas do ambiente (Wourms, 1972; Podrabsky & Hand, 1999; Tingaud-Sequeira *et al.*, 2009; Podrabsky *et al.*, 2010) as trajetórias de desenvolvimento de embriões de peixes anuais podem ser manipuladas através do manejo destas propriedades nos meios de incubação. No entanto, apesar dos avanços nos estudos sobre o anualismo, pouco se conhece sobre os sinais ambientais que atuam nestas fases como gatilhos às diapausas ou à retomada do desenvolvimento e eclosão (Inglima *et al.*, 1981; Podrabsky & Hand, 1999; Podrabsky *et al.*, 2010).

Os estudos que envolvem o manejo dos ovos de peixes anuais vêm utilizando diversos meios de incubação líquidos como água (Arenzon *et al.*, 2002; Tingaud-Sequeira *et al.*, 2009; Blažek *et al.*, 2013), meios específicos (Podrabsky, 1999) e solução de Yamamoto (Wourms, 1972; Podrabsky, 1999; Arezo *et al.*, 2005; Blažek *et al.*, 2013) para a sua manutenção em laboratório, além de meios úmidos, em que os ovos ficam em contato com o ar em câmara úmida (Arenzon *et al.*, 2002; Tingaud-Sequeira *et al.*, 2009; Reichard & Polačik, 2010; Volcan *et al.*, 2012; Blažek *et al.*, 2013). No entanto, são poucas as informações que compararam ou investigaram a

sobrevivência e padrão de desenvolvimento dos embriões nestes meios (Podrabsky, 1999; Arenzon *et al.*, 2002; Blažek *et al.*, 2013).

No presente estudo o efeito de diferentes meios de incubação foi testado na sobrevivência e trajetória durante o desenvolvimento embrionário de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001, uma espécie de pequeno porte, que apresenta rápido crescimento inicial e maturidade sexual precoce (Volcan *et al.* 2012, 2013), sob condições experimentais. Os resultados obtidos são discutidos no contexto da história de vida e adaptação das espécies anuais a ambientes sazonais, assim como no aperfeiçoamento das técnicas de manejo em laboratório.

## **METODOLOGIA**

### **COLETA E MANUTENÇÃO DOS REPRODUTORES**

Os reprodutores foram coletados utilizando puçá em forma de “D”, com 60 cm de largura e 40 cm de altura, e malha de 5mm entre nós. Os peixes foram capturados em áreas úmidas localizadas na várzea do Canal São Gonçalo, sob licença do IBAMA/ICMBio, nº 41713-1. Após a coleta, um plantel de reprodutores, 70 fêmeas e 30 machos, foi mantido em tanque de 200 L, com aeração constante, musgo de Java para refúgio, e três ninhos que consistiram em potes de 5 L com 15 cm de altura de casca de coco em pó como substrato para desova. Como alimento, foi ofertado zooplâncton nativo (cladóceros e copépodos) *ad libitum* uma vez ao dia.

### **OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS OVOS**

Para o estudo de sobrevivência e desenvolvimento os ninhos foram mantidos por sete dias no tanque de reprodutores, posteriormente parte do substrato foi removida e triada e os ovos coletados, dos quais, com auxílio de estereomicroscópio, foi verificada a fertilização, que foi confirmada quando se observou o espaço perivitelínico, e a fase do desenvolvimento embrionário, que deveria estar na etapa de dispersão dos blastômeros, ou DI, para ser admitida no estudo. O restante da fibra com ovos que não foram utilizados nos experimentos foi mantida nos ninhos, na mesma água de origem dos reprodutores, por período de 30 dias para analisar a trajetória de desenvolvimento

dos ovos sob efeito da mesma água dos reprodutores. Após esse período 200 ovos foram analisados para verificar o estágio de desenvolvimento.

## MEIOS DE INCUBAÇÃO E UNIDADES EXPERIMENTAIS

Foram testados meios de incubação líquidos e meios úmidos. Os meios líquidos testados foram: (1) Água; (2) Solução de Yamamoto (Arezo *et al.*, 2005); (3) Solução de Yamamoto com 100 U/mL de Penicilina + Estreptomicina (antibióticos); (4) Água com casca de coco em pó. Estes meios foram utilizados para analisar diferentes variáveis utilizando diferentes unidades experimentais: para verificar a sobrevivência os ovos foram acondicionados em coletor universal de 80 mL imersos em 40 mL de cada meio; para análise do desenvolvimento embrionário os ovos foram acondicionados em frascos acrílicos de 15 mL contendo 10 mL de cada meio de incubação líquido.

Os meios de incubação úmidos com exposição ao ar consistiram de pote universal de 80 mL com o fundo coberto com os ovos dispostos sobre discos de algodão umedecidos. Foram utilizados dois tratamentos: (1) algodão umedecido em solução de Yamamoto e (2) algodão umedecido com água sobre 3 g de casca de coco em pó disposta no fundo de cada pote. A casca de coco em pó foi coberta com o disco de algodão para não ficar em contato físico com os ovos. Os ovos foram dispostos sobre os meios de forma que não encostaram uns nos outros. As mesmas unidades experimentais foram utilizadas para análise da sobrevivência e desenvolvimento em meios de incubação úmidos.

A água empregada nos meios foi destilada e mantida com aeração antes da utilização. A casca de coco em pó foi previamente submersa em água e fervida para posterior utilização nos meios de incubação. Os lotes com ovos foram mantidos em recipientes hermeticamente fechados, em ambiente climatizado a 20 °C e no escuro, sendo expostos ao ar e à claridade apenas no momento das observações e manutenção dos meios. A variação semanal da temperatura foi registrada com termômetro de máxima e mínima.

No final do experimento foi verificado nos meios de incubação líquidos o pH com pHmetro digital - precisão de 0,01 e a amônia com kit colorimétricos Nutrafin®/Hagen/Alemanha - 0,1 mg/L. A amônia total e a temperatura não apresentaram variação entre os tratamentos, ficando a amônia entre  $0,00061 \pm 0,0001$

mg.L<sup>-1</sup> e 0,00101±0,00010 mg.L<sup>-1</sup> e a temperatura entre 20,49±0,11 °C e 20,81±0,07 °C. O pH da água com casca de coco em pó, 6,79±0,04, foi inferior aos demais tratamentos (ANOVA; Tukey; p<0,05), 7,12±0,02, 7,14±0,02 e 7,12±0,01 para água, solução de Yamamoto e solução de Yamamoto com PE, respectivamente.

#### ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Para verificar o tempo de desenvolvimento até a dispersão dos blastômeros um ninho foi mantido por 24 horas no tanque dos reprodutores e posteriormente foram triados 20 ovos que foram mantidos em meio líquido de água com casca de coco em pó. Os ovos foram verificados a cada 24 horas até a observação de reagregação dos blastômeros.

Para os meios de incubação líquidos as seguintes fases do desenvolvimento embrionário foram registradas, de acordo com Arenzon *et al.* (2002) e Arezo *et al.* (2005): F1 – reagregação; F2 – eixo embrionário e/ou vesícula de Kupfer; F3 – somitogênese com menos de 20 somitos; F4 – somitogênese de 20 a 34 somitos; F5 – somitogênese a partir de 35 somitos ou DII; F6 – pigmentação; F7 – desenvolvimento completo ou DIII (Figura 1).

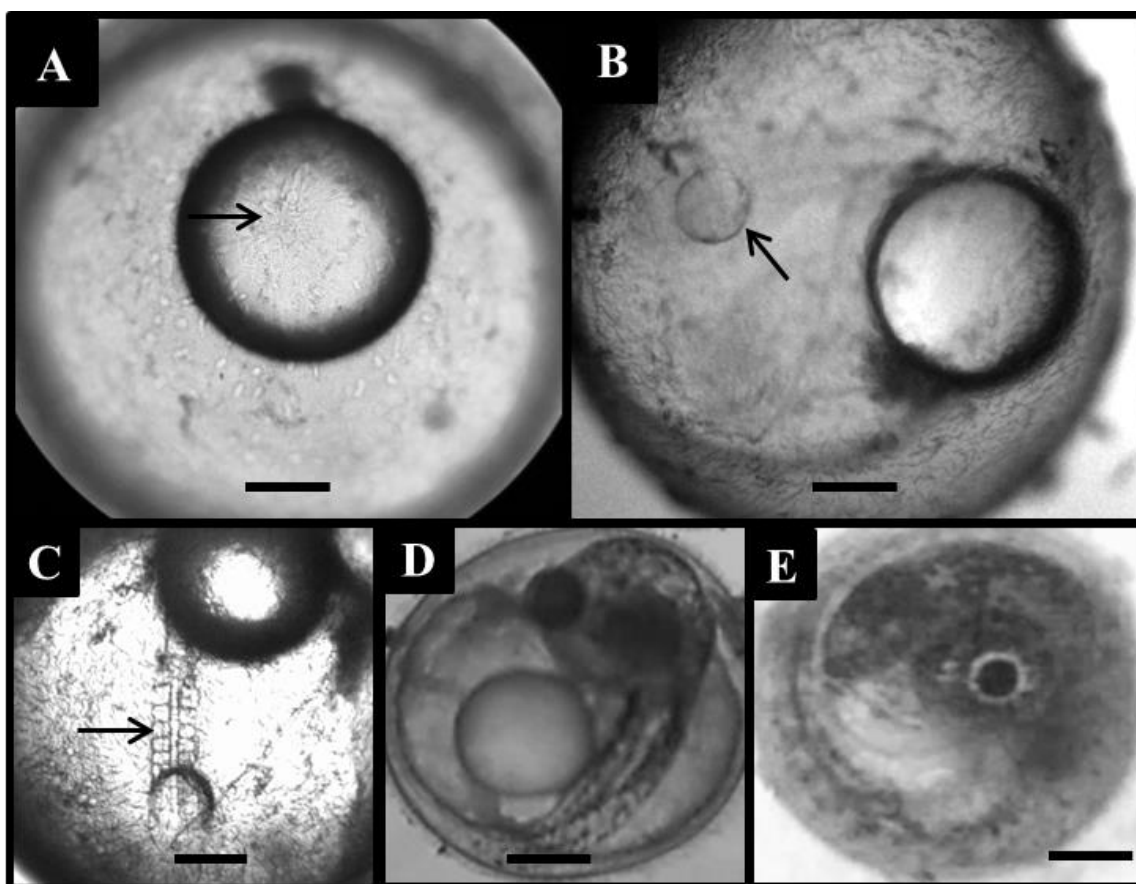


Figura 1: Fases de desenvolvimento de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* (A – reagregação dos blastômeros (seta); B – vesícula de Kupfer (seta); C – somitogênese (seta); D – pigmentação; E – Diapausa III). Escala = 200  $\mu\text{m}$  (A e B); 300  $\mu\text{m}$  (C, D e E).

Foram considerados em DII os embriões do meio líquido que permaneceram na F5 por pelo menos 30 dias, e em DIII os que estavam totalmente pigmentados, com os olhos prateados e com a cauda sobreposta à cabeça, prontos para eclosão (Arenzon *et al.*, 2002).

Nos meios de incubação úmidos, pela dificuldade de observar os embriões sem submergir os ovos, apenas as fases de pigmentação e DIII foram registradas.

## SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO

Para analisar a sobrevivência e as etapas e tempo de desenvolvimento embrionário nos meios de incubação líquido foram utilizadas diferentes unidades experimentais:



foram formados 24 lotes contendo 50 ovos cada para verificar a sobrevivência, sendo seis repetições para cada meio de incubação, e 12 lotes com 10 ovos cada para análise do desenvolvimento embrionário, com três repetições por meio de incubação.

Foram formados oito lotes com 30 ovos cada para verificar a sobrevivência e o desenvolvimento em meio de incubação úmido com exposição ao ar, com quatro repetições para cada meio.

A sobrevivência foi observada nos períodos de 8, 15, 25, 36, 46, 53, 62 e 75 dias após a exposição dos ovos, mesma oportunidade em que os meios foram trocados.

Durante os primeiros 30 dias as fases de desenvolvimento embrionário foram verificadas diariamente e posteriormente a cada sete dias até os 100 dias de estudo. Para comparar o desenvolvimento em diferentes meios de incubação foi analisado o tempo necessário para o primeiro embrião de cada tratamento completar o desenvolvimento e o tempo para 50% dos embriões de cada meio alcançar as etapas de desenvolvimento embrionário registradas.

## TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM DII DO MEIO LÍQUIDO PARA MEIO ÚMIDO

Após os 100 dias de experimento, todos os ovos dos diferentes meios que foram analisados quanto ao desenvolvimento embrionário e que permaneceram em DII foram transferidos para meio úmido. Os ovos foram estocados em pote universal de 80 ml, com disco de algodão de 1 g umedecido com 5 ml de solução de Yamamoto, fechado hermeticamente e mantidos no escuro a temperatura controlada em 20°C. Cada lote continha de dois a nove ovos, conforme a quantidade de ovos que permaneceu em DII de seu lote de origem. Após 30 dias de transferência para o meio úmido os embriões foram observados em lupa (45x), sem remover do meio, e verificamos o avanço no desenvolvimento embrionário. Para evitar erro de interpretação pelo baixo N amostral de alguns lotes de embriões em DII transferidos para meio úmido, não foram considerados tratamentos ou repetições nesta análise.

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparação entre médias foi empregada ANOVA (uma via), seguida do teste de Tukey, sob nível de significância de 95%, através do programa “Statistica 7.0”. Para

análises em percentual os dados foram transformados por Arco de Seno.

## RESULTADOS

Os ovos se mantiveram nas fases de uma célula até 16 células, entre a postura e 24h de incubação. Entre 24 e 48h de incubação os ovos permaneceram na fase de blástula. A epibolia foi verificada nos ovos incubados entre 72 e 96h. A dispersão dos blastômeros ou DI foi observada com 96 a 120h de incubação (Figura 2). Foi verificado um único caso de reagregação dos blastômeros, observado com pelo menos 144h de incubação (Figura 2F).

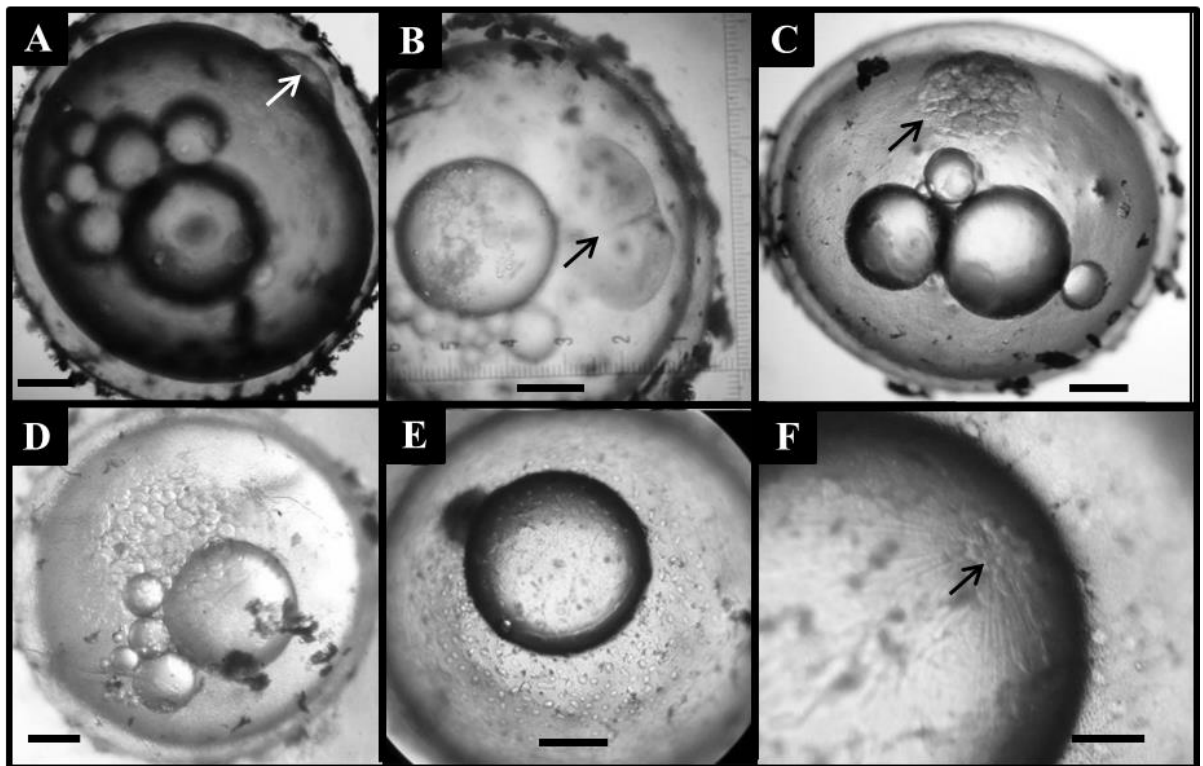


Figura 2: Ovos de *Austrolebias nigrofasciatus* incubados em água com casca de coco em pó a 20°C. A - estágio de uma célula (seta), zero a 24h de incubação; B - início da clivagem, zero a 24h de incubação; C - estágio de blástula (seta), 24 a 48h de incubação; D - início da epibolia, 72 a 96h de incubação; E - dispersão dos blastômeros; F - reagregação dos blastômeros.

blastômeros, 96 a 120h de incubação; F – reagregação dos blastômeros (seta), a partir de 144h de incubação (n=20). Escala = 200  $\mu$ m (A, B, C, D e E); 300  $\mu$ m (F).

A sobrevivência final em solução de Yamamoto foi de  $92,9 \pm 12,2\%$ , na solução de Yamamoto com antibióticos de  $91,7 \pm 0,8\%$ , e nos meios úmidos com solução de Yamamoto e com fibra foram de  $98,7 \pm 1,2\%$  e de  $96,2 \pm 1,6\%$ , respectivamente, não diferindo significativamente entre si. Por outro lado, os valores foram superiores a de água com fibra de coco em pó com  $73,7 \pm 2,9\%$  de sobrevivência, enquanto que os ovos mantidos exclusivamente em água apresentaram sobrevivência de  $72,5 \pm 12,2\%$  não diferindo dos demais meios (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ) (Figura 3).

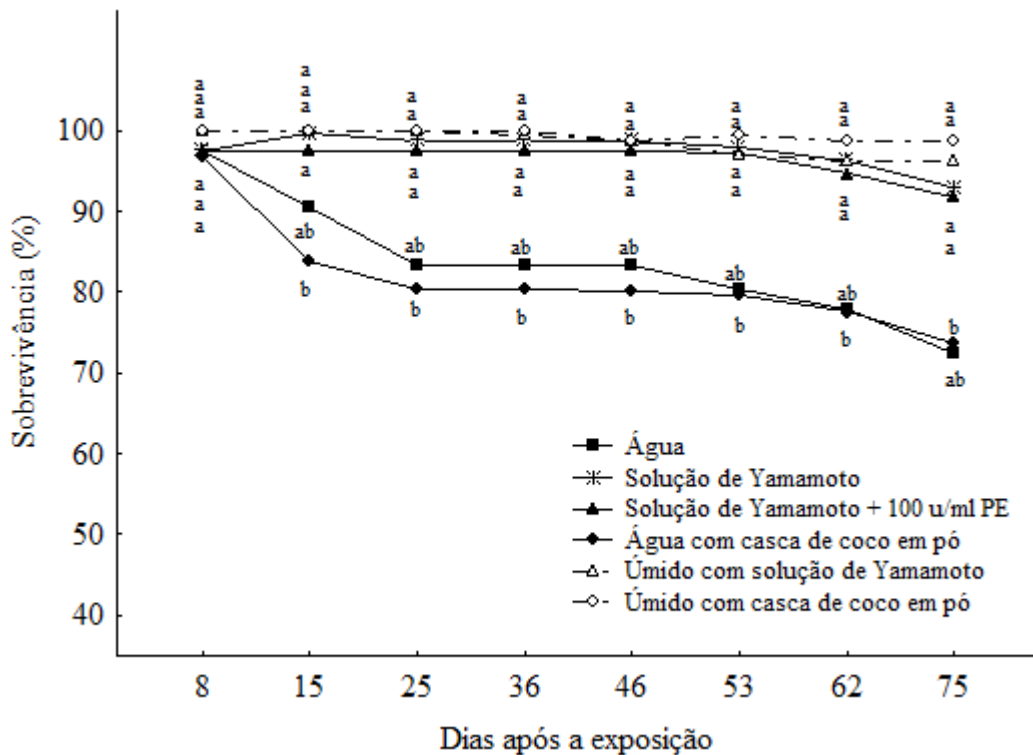


Figura 3: Sobrevivência de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos a diferentes meios de incubação. (PE = Penicilina-Estreptomicina). Letras diferentes representam diferenças significativas nas médias entre os tratamentos em determinado período (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ).

Os primeiros registros de embriões completamente desenvolvidos em meio

úmido ocorreram em 20 dias para o meio com Yamamoto e 28 dias com fibra. Em meio úmido os primeiros registros de embriões completamente desenvolvidos foram aos 28 dias de exposição para todos os meios de incubação.

Até a F4 não houve diferença entre os tratamentos no tempo para 50% dos embriões atingirem cada uma das fases de desenvolvimento, a partir da F5 no meio de água com fibra de coco em pó houve atraso no tempo de desenvolvimento em relação aos demais tratamentos, os quais apresentaram tempos semelhantes entre si. Com exceção da água com fibra de coco, que chegou aos 100 dias de estudo com mais de 50% dos embriões em DII, nos demais meios de incubação os embriões levaram em média de  $55 \pm 2$  a  $58 \pm 2$  dias de exposição para alcançar a DIII, enquanto o meio de incubação úmido com solução de Yamamoto foi o que apresentou menor tempo para 50% dos embriões completar o desenvolvimento,  $46 \pm 2$  dias (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ) (Figura 4).

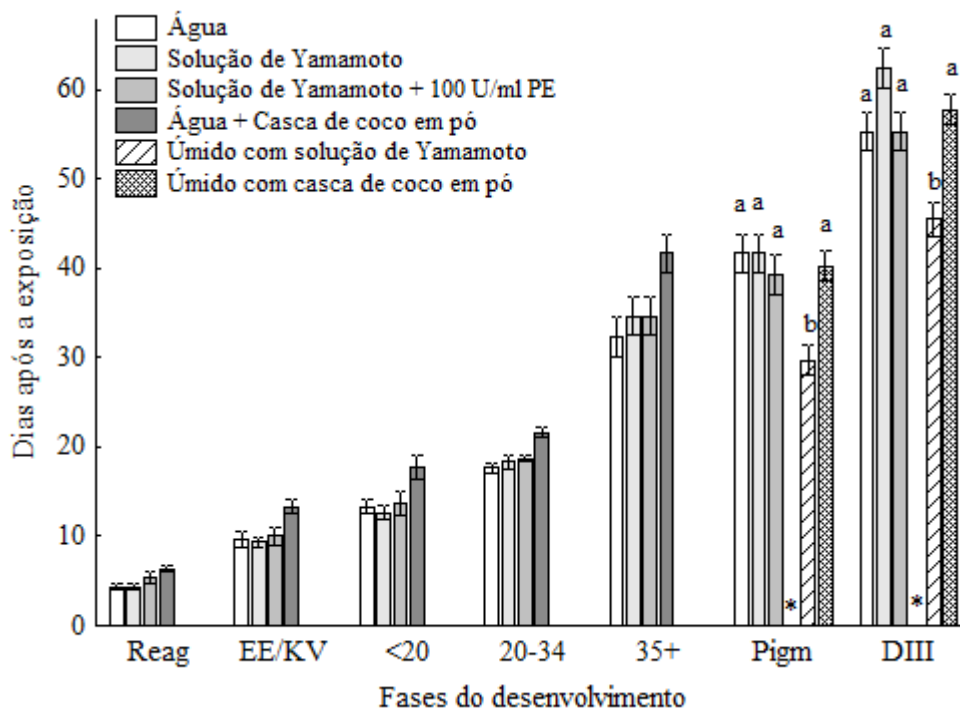


Figura 4 – Tempo para que 50% dos embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* atinjam cada fase do desenvolvimento quando mantidos em diferentes meios de incubação (PE=Penicilina-Estreptomicina; Reag=Reagregação; EE=Eixo embrionário; KV=Vesícula de Kupfer; <20=somitogênese com menos de 20 somitos; 20-34=

somitogênese de 20 a 34 somitos; 35+=somitogênese com 35 ou mais somitos; Pigm=pigmentando; DIII=Diapausa III). \* Até os 100 dias de estudo mais de 50% dos embriões mantidos em água com casca de coco em pó se mantiveram na fase 35+. Letras diferentes representam diferença significativa nas médias de tempo de desenvolvimento em cada fase (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ).

Todos os ovos mantidos por 30 dias no ninho com água do tanque de reprodutores permaneceu em DI. Por outro lado, nenhum dos ovos utilizados nos experimentos ficou preso nesta fase. Todos os meios apresentaram embriões que entraram em DII, porém a água com fibra de coco foi capaz de induzir uma parcela significativamente superior de embriões a entrar em DII ( $80,0 \pm 5,8$  %) em relação à água ( $46,7 \pm 3,3$  %), solução de Yamamoto ( $30,0 \pm 5,8$  %) e solução de Yamamoto com antibióticos ( $33,3 \pm 3,3$ %) (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ) (Figura 5).

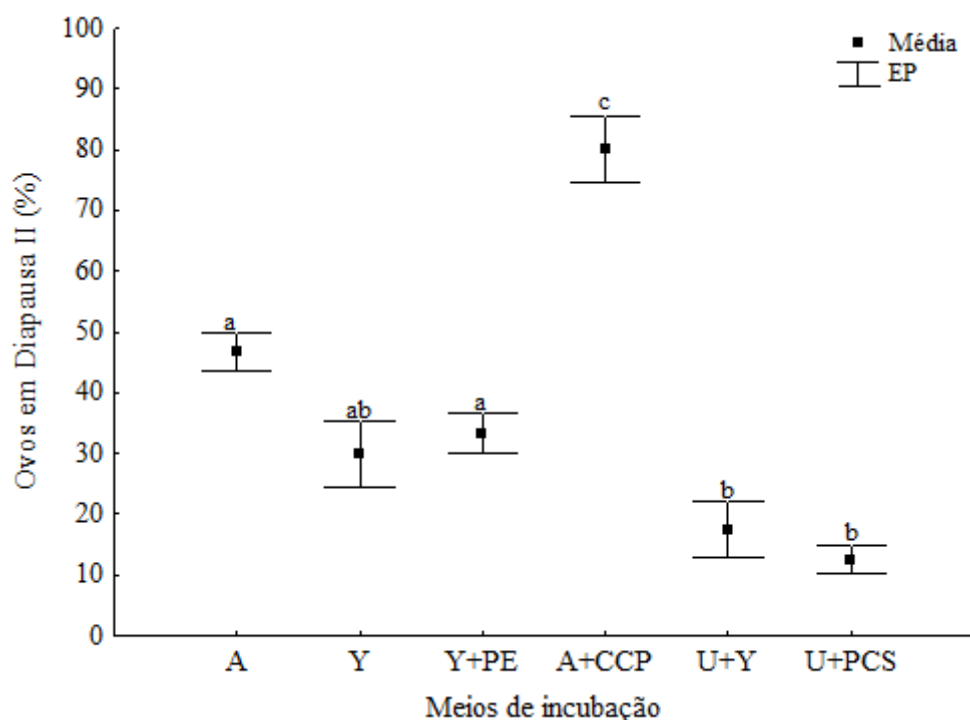


Figura 5: Percentual de ovos de *Austrolebias nigrofasciatus* que entraram em Diapausa II (DII) e permaneceram nesta fase por pelo menos 100 dias, mantidos em diferentes meios de incubação (A= Água; Y= Solução de Yamamoto; PE=Penicilina-Etrepomicina; CCP= Casca de coco em pó; U= Úmido). Letras diferentes representam

diferença nas médias (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ).

Após 30 dias da transferência dos embriões que estavam em DII para meio úmido, a sobrevivência foi de 96,5%. Desses embriões, 89,0% haviam iniciado a pigmentação ou estavam em DIII, e apenas 11% permaneciam em DII.

## DISCUSSÃO

Logo que os ovos foram expostos aos meios, o desenvolvimento iniciou, não sendo observados ovos na DI entre os utilizados nos diferentes meios de incubação ao longo do estudo. Entretanto, os ovos de mesma origem que foram mantidos nos ninhos com casca de coco em pó e água proveniente do tanque de reprodutores, ficaram na DI enquanto não foram retirados desta condição. Considerando as condições conhecidas para os ovos permanecerem em DI, existe a possibilidade de estes ovos estarem expostos à hipóxia, por estarem enterrados em matéria orgânica, pois a casca de coco em pó mantém uma camada macia, mas bastante compacta que pode impedir que o oxigênio disponível na água seja misturado em todas as camadas, além disso, a decomposição da fibra de coco pode resultar na redução de oxigênio dissolvido. Segundo Wourms (1972) a hipóxia prende os ovos de *Austrofundulus myersi* Dahl, 1958 na DI. Alguns estudos relatam também que ao manter os ovos de peixes anuais na água dos reprodutores ou de outros peixes adultos, estes se mantêm em DI (Inglima *et al.*, 1981; Arezo *et al.*, 2005), como observado neste estudo. O ninho foi retirado do tanque de reprodutores após sete dias de postura, contudo, não foi trocada a água ou adicionada aeração durante os 30 dias que foi armazenado, portanto os ovos podem ter ficado expostos a metabólitos dos adultos que os mantiveram em DI. A segunda opção pareceu ser mais apropriada para explicar o que ocorreu no presente estudo, uma vez que os embriões mantidos em casca de coco em pó nos meios de incubação não permaneceram em DI. Ainda assim, esta hipótese requer maior investigação, já que os ovos dos ninhos e os dos meios de incubação não estavam mantidos em condições de manejo idênticas.

Embriões de peixes anuais toleram diversas condições de incubação, especialmente após a epibolia (Wourms, 1967; Podrabsky, 1999), o que corrobora os

resultados obtidos, em que todos os meios de incubação testados revelaram ser viáveis para a manutenção dos ovos de *A. nigrofasciatus* a partir da dispersão dos blastômeros ou DI, fase que sucede a epibolia. Nos meios líquidos de Yamamoto e de água e nos meios úmidos a maioria dos embriões escapou da DII, o que vai ao encontro do observado para espécies de *Nothobranchius* Peters, 1868 incubados em solução de Yamamoto, água ou *peat moss*, onde a maior parte dos embriões ignorou as diapausas e completou o desenvolvimento rapidamente, como alguns embriões de *Nothobranchius kadleci* Reichard, 2010 que em 15 dias após a postura já estão totalmente desenvolvidos e prontos para eclodir (Blažek *et al.*, 2013). No presente estudo, o primeiro embrião completou o desenvolvimento em 20 dias de experimento em meio úmido com Yamamoto, considerando o intervalo de tempo máximo entre a postura e a exposição, embriões de *A. nigrofasciatus* podem completar seu desenvolvimento em 27 dias.

Características ambientais frequentemente alteram o tempo de desenvolvimento de diversos táxons, a temperatura geralmente apresenta relação positiva com a duração do período embrionário, como ocorre com peixes (Arenzon *et al.*, 2002) insetos aquáticos (Gillooly & Dodson, 2000) e até aves (Martin *et al.*, 2007), enquanto a salinidade apresenta relação inversa com a duração dos estágios iniciais de desenvolvimento de caranguejos estuarinos (Giménez & Anger, 2001). No entanto, dentre os vertebrados, a capacidade de alterar o tempo de embriogênese através da trajetória de desenvolvimento pelas diapausas é exclusiva de peixes anuais (Arezo *et al.*, 2005).

A casca de coco em pó foi utilizada com intuito de reproduzir características do meio natural, mantendo os ovos enterrados em substrato. No entanto, a utilização da casca de coco em pó como meio de incubação pode ter diversos pontos negativos, como a dificuldade de determinar a composição química da água, a interferência na coloração e resíduos que fixam no envelope do ovo dificultando sua observação. Além disto, há o despendimento de tempo e trabalho para separar os ovos das cascas, tal como ocorre com o *peat moss*, o meio de incubação favorito entre os criadores de peixes anuais (Podrabsky, 1999). Por outro lado, pela capacidade da casca de coco em pó de manter os embriões em DII, este é um meio interessante para a manipulação desta fase, possibilitando prolongar o tempo de desenvolvimento e selecionar o melhor período para continuar a embriogênese. Esta autonomia é importante na criação de organismos

vivos, pois permite eleger o período de desenvolvimento e eclosão que coincida com a disponibilidade de mão de obra e recursos necessários para sua manutenção.

Apesar da casca de coco em pó em meio líquido induzir os embriões a permanecer na DII, o mesmo não ocorreu para o meio úmido, entretanto foi observada redução na velocidade de desenvolvimento em relação ao meio úmido com Yamamoto, o que indica que a fibra deve conter substâncias que interferem na embriogênese da espécie. Observamos que o meio de incubação úmido com solução de Yamamoto com exposição ao ar conferiu embriogênese acelerada em relação aos meios líquidos e ao meio úmido com fibra de coco. Verificamos que ao transferir os ovos em DII para meio úmido em contato com o ar o desenvolvimento é retomado por quase todos os embriões. Neste sentido, a quebra na diapausa em função da troca de meio líquido para meio úmido pode refletir o sinal ambiental causado pela seca do biótopo, no entanto, não existem relatos de estudos que analisaram o desenvolvimento embrionário de ovos diretamente dos biótopos de peixes anuais para confirmar essa hipótese.

Além das características ambientais, traços de história de vida, como a estabilidade do ciclo hidrológico (Polačik et al., 2014) e a idade materna (Pri-Tal et al., 2012) podem ter influência nas vias de desenvolvimento e conseqüentemente no tempo para completar a embriogênese em peixes anuais. Neste sentido, considerando que os embriões foram adquiridos de reprodutores selvagens, características individuais podem se manifestar intrinsecamente nos resultados. Embora não tenhamos observado diferença no tempo para 50% dos embriões alcançarem cada fase do desenvolvimento antes da DII, todos os meios de incubação estudados apresentaram embriões que entraram em DII, contudo mais de 80% dos embriões mantidos em água com fibra de coco se mantiveram em DII, enquanto cerca de 70% dos mantidos em Yamamoto escaparam desta fase. Esta pode ser uma forma interessante de manipular a trajetória de desenvolvimento embrionário, possibilitando controlar e manejar os embriões em laboratório conforme for conveniente.

Apesar das escassas informações, outras formas de manipulação da DII já foram analisadas, como com os embriões de *Austrofundulus limnaeus* Schultz, 1949, que escapam da DII quando submetidos a temperaturas elevadas (Podrabsky et al., 2010). O maior fotoperíodo também pode induzir a quebra da DII (Podrabsky & Hand, 1999), o que não ocorreu em nosso estudo, uma vez que os embriões de todos os tratamentos



foram mantidos no escuro e foram submetidos à luminosidade com mesma frequência e intensidade durante as observações e manutenção.

Ao contrário do que esperávamos os embriões mantidos em água com casca de coco em pó apresentaram sobrevivência inferior aos mantidos em solução de Yamamoto. Não identificamos a causa destas mortalidades, se foi em função da intolerância dos ovos à composição química do meio ou se estes foram mortos por microrganismos que a casca de coco em pó não foi capaz de impedir a infecção e proliferação. Apesar de desinfetar a casca de coco em pó, fervendo para utilizar no meio de incubação, os ovos não foram tratados antes de sua utilização durante o estudo. Podrabsky (1999) realiza a desinfecção dos ovos de *A. limnaeus* com banho de hipoclorito de sódio no quarto dia após a fertilização para evitar a contaminação dos ovos por fungos, protozoários e bactérias. Entretanto, o processo configura mais uma etapa no manejo dos embriões em laboratório e é necessário conhecer o período seguro de realizar tal procedimento e os efeitos deste no desenvolvimento da espécie em questão. Outros estudos utilizaram a pré-lavagem dos ovos com antibióticos e antifúngicos, entretanto, os resultados de sobrevivência não foram superiores aos encontrados no presente estudo (Podrabsky, 1999; Arenzon *et al.*, 2002).

A mortalidade dos embriões mantidos em água provavelmente esteja relacionada à proliferação de fungos causada pelo contato de ovos mortos com ovos saudáveis, uma vez que, lotes que continham ovos com fungos, possuíam muitos ovos aglomerados e mortos, enquanto aqueles que não tinham fungos geralmente não apresentavam mortalidade. Ao contrário do observado no presente estudo, Blažek *et al.* (2013) encontraram taxas inferiores a 30% de sobrevivência utilizando água ou solução de Yamamoto como meio de incubação para ovos de *Nothobranchius* spp., que foram muito menores que os quase 80% de sobrevivência observados em peat moss no mesmo estudo. É importante salientar que Blažek *et al.* (2013) expuseram os ovos aos meios desde a postura, enquanto no presente estudo, a exposição aos meios foi iniciada após a fase mais sensível dos ovos, que é a anterior à epibolia (Wourms, 1967; Podrabsky, 1999).

Em nosso estudo a sobrevivência em solução de Yamamoto foi alta, superior a 90%, que corrobora com o encontrado para *A. limnaeus* em Yamamoto e em diversos outros meios de incubação líquidos (Podrabsky, 1999). Embora a sobrevivência tenha

tendência a ser inferior em água quando comparado à Yamamoto, a água pode ser viável como meio de incubação se houver interesse e disponibilidade para um manejo mais intenso, desinfetando os ovos antes de utilizar, retirando ovos mortos e trocando o meio diariamente, uma vez que as mortalidades massivas foram associadas à proliferação dos fungos. O que pode ser tecnicamente dispendioso dependendo da intensidade da rotina de criação de peixes anuais em laboratório. Observamos que a utilização de antibiótico na solução de Yamamoto é dispensável, uma vez que seu uso não altera a sobrevivência nem a rota de desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento inicial de *A. nigrofasciatus* em 20°C demonstrou ser mais acelerado quando comparado ao seu congênere *Austrolebias viarius* em 25°C (Arezo *et al.*, 2005), enquanto *A. nigrofasciatus* alcança a fase de blástula em até 48h, *A. viarius* leva três dias para chegar à mesma fase. O mesmo ocorre para as demais fases observadas, até *A. viarius* chegar à somitogênese (10 somitos ou menos) em 16 dias (Arezo *et al.*, 2005) enquanto *A. nigrofasciatus* chega a esta fase com aproximadamente 12 dias. Esta discrepância poderia ser ainda mais acentuada se as temperaturas empregadas fossem as mesmas, uma vez que a velocidade de desenvolvimento costuma estar diretamente relacionada com o aumento da temperatura (Markofsky & Matias, 1977).

Neste estudo apesar de esclarecer algumas relações dos meios de incubação com a sobrevivência e trajetória de desenvolvimento de ovos de peixes anuais, outros fatores ainda devem ser foco de futuras investigações como a análise das substâncias contidas na água dos reprodutores, responsável pela manutenção da diapausa I, assim como, a análise da composição química contida na água com fibra de coco que foi responsável pela manutenção da diapausa II. Além disso, embora tenhamos obtido resultados satisfatórios de sobrevivência, se desconhece os efeitos desses meios de incubação na taxa de eclosão, surgimento de “belly-sliders” e saúde das larvas eclodidas, que são problemas recorrentes durante o manejo e manutenção de peixes anuais em laboratório (Wourms, 1967; Podrabsky, 1999; Blažek *et al.*, 2013).

A partir dos resultados, conclui-se que a Solução de Yamamoto é o meio ideal para a incubação de embriões de *A. nigrofasciatus*, garantindo sobrevivência média de 90%, sem haver a necessidade de adicionar antibióticos. Contudo, constatamos que todos os meios são viáveis para a manutenção dos embriões. A água com fibra de coco,

embora tenha apresentado menor sobrevivência que os demais tratamentos, visando o manejo dos ovos em laboratório, pode conferir um meio interessante para a manipulação da DII, possibilitando prolongar a manutenção dos ovos e eleger o melhor período para continuar o desenvolvimento e obter os juvenis. Assim, esperamos que os resultados obtidos neste estudo possam ser replicados e aplicados para a maioria das espécies com ciclo de vida anual manejadas em laboratório.

### References

- Amezaga, J. M., Santamaria, L. & Green, A. J. (2002). Biotic wetland connectivity - supporting a new approach for wetland policy. *Acta Oecologica* **23**, 213-222.
- Arenzon, A., Lemos, C. A. & Bohrer, M. B. C. (2002). The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* **62**, 743-747.
- Arezo, M. J., Pereiro, L. & Berois, N. (2005). Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology* **66**, 1357-1370.
- Berois, N., Arezo, M. J., Papa, N. G. & Clivio, G. A. (2013). Annual fish: development adaptations for an extreme environment. *WIREs Developmental Biology* **1**, 595-602.
- Berois, N., Arezo, M. J., & De Sa, R. O. (2014). The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell & Developmental Biology* **3**, 136. doi:10.4172/2168-9296.1000136
- Blazek, R., Polačik, M. & Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* **4**, 1-7.
- Costa, W. J. E. M. 2008. Catalog of aplocheiloid killifishes of the world. 1. ed. Rio de Janeiro: Reproarte. 127pp.
- Gibbs, J. P. (2000). Wetland loss and biodiversity conservation. *Conservation Biology* **14**, 314-317.
- Gilloolyd, J. F. & Dodson, S. I. (2000). The relationship of egg size and incubation temperature to embryonic development time in univoltine and multivoltine aquatic insects. *Freshwater Biology* **44**, 595-604.

- Giménez, L. & Anger, K. (2001). Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Ecology* **260**, 241-257.
- Inglima, K.; Perlmutter, A. & Markofsky, J. (1981). Reversible Stage-Specific Embryonic Inhibition Mediated by the Presence of Adults in the Annual Fish *Nothobranchius guentheri*. *Journal of Experimental Zoology* **215**, 23-33.
- Markofsky, J. & Matias, J. R. (1977). The effects of temperature and season of collection on the onset and duration of diapause in embryos of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Journal of Experimental Zoology* **202**, 49–56.
- Martin, T. E., Auer, S. K., Bassar, R. D., Niklison, A. M. & Lloyd, P. (2007). Geographic variation in avian incubation periods and parental influences on embryonic temperature. *Evolution* **61**, 2558-2569.
- Podrabsky, J. E., Garrett, I. D. & Kohl, Z. F. (2010). Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* **213**, 3280–3288.
- Podrabsky J. E. & Hand, S. (1999). The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* **202**, 2567-2580.
- Podrabsky, J. E. (1999). Husbandry of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* with special emphasis on the collection and rearing of embryos. *Environmental Biology of Fishes* **54**, 421-431.
- Polačik, M., Blažek, R., Řežucha, R., Vrtílek, M., Tozzini, E. T., Reichard, M. (2014). Alternative intrapopulation life-history strategies and their trade-offs in an African annual fish. *Journal of Evolutionary Biology* **27**, 854-865.
- Pri-Tal, B. M., Blue, S., Paub, F. K.-Y., Podrabsky, J. E. (2011). Hormonal components of altered developmental pathways in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *General and Comparative Endocrinology* **174**, 166–174.
- Reichard, M. & Polačik, M. (2010). Reproductive isolating barriers between colour-differentiated populations of an African annual killifish, *Nothobranchius korthausae* (Cyprinodontiformes). *Biological Journal of the Linnean Society*

**100**, 62–72.

- Tingaud-Sequeira, A., Zapater, C., Chauvigne', F., Otero, D. & Cerda, J. (2009). Adaptive plasticity of killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos: dehydration stimulated development and differential aquaporin-3 expression. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **296**, R1041–R1052.
- Volcan, M. V., Fonseca, A. P. & Robaldo, R. B. (2011). Reproduction of the threatened Annual Killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), confined in a natural environment. *Journal Threatened Taxa* **3**, 1864-1867.
- Volcan, M. V., Fonseca, A. P., Figueiredo, M. R. C., Sampaio, L. A. & Robaldo, R. B. (2012). Effect of temperature on growth of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. *Biota Neotropica* **12**, 68-73.
- Volcan, M. V., Sampaio, L. A., Bongalhardo, D. C. & Robaldo, R. B. (2013). Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. *Journal of Applied Ichthyology* **29**, 648–652.
- Wourms, J. P. (1967). Annual Fishes. In: *Methods in Developmental Biology* (Wilt, F. H. & Wessels, N., eds), pp. 123–137. New York: Thomas and Crowell Company.
- Wourms, J. P. (1972). The developmental biology of annual fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology* **182**, 389–414.

## 6. Capítulo 3

Formatado nas normas da revista *Neotropical Ichthyology*

Metaplasia do epitélio da vesícula gasosa de peixes anuais (Rivulidae) resulta em  
natação insuficiente e retardo no crescimento

Metaplasia do epitélio da vesícula gasosa de peixes anuais (Rivulidae) resulta em natação insuficiente e retardo no crescimento

Alinca Peres da Fonseca<sup>1</sup>, Luís Alberto Romano<sup>1</sup>, Matheus Vieira Volcan<sup>3</sup>, Ricardo Berteaux Robaldo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Estação Marinha de Aquicultura, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Ictiologia, Instituto Pró-Pampa, Pelotas, RS, Brasil

## RESUMO

A criação de peixes anuais é frequentemente comprometida pela ocorrência de peixes que não inflam a vesícula gasosa após a eclosão. Estes peixes não têm capacidade de se manter e nadar na coluna d'água e se locomovem no fundo da água, por isso são chamados *belly-sliders*. Para identificar de que forma o enchimento inicial da vesícula gasosa do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* é comprometido, e determinar as implicações desta condição no crescimento dos juvenis, analisamos histologicamente a vesícula gasosa de peixes com natação normal e de *belly-sliders* durante o crescimento inicial (primeiro mês de vida). Verificamos que os *belly-sliders* apresentam metaplasia com descamação do epitélio da vesícula gasosa e presença de hemorragia, além de apresentar crescimento inferior em relação aos peixes com natação normal. Concluímos que a incidência desta patologia é um problema recorrente e de grande relevância para a manutenção de peixes anuais em laboratório, sendo responsável por uma grande quantidade de juvenis inviáveis, no entanto suas causas permanecem desconhecidas.

**Palavras-chave:** killifish; *belly-sliders*; eclosão; crescimento

**Título resumido:** Metaplasia na vesícula gasosa de peixes anuais

## INTRODUÇÃO

Peixes anuais têm adaptações únicas de desenvolvimento que são estreitamente relacionadas com seu ciclo de vida e que os fazem um bom modelo para estudos comparativos, de desenvolvimento, de envelhecimento e evolutivos (Genade *et al.*, 2005; Berois *et al.*, 2014). A criação de peixes anuais é frequentemente comprometida pela ocorrência de peixes que não inflam a vesícula gasosa após a eclosão (Wourms, 1967; Podrabsky, 1999; Genade *et al.*, 2005; Blažek *et al.*, 2013). Estes peixes não têm capacidade de se manter e nadar na coluna d'água e se locomovem no fundo, por isso são chamados *belly-sliders* (Wourms, 1967).

O correto enchimento inicial da vesícula gasosa possui uma janela de tempo restrita para acontecer e irá influenciar sua funcionalidade pelo resto da vida (Trotter *et al.*, 2001). Dentre os prejuízos que podem ser causados às larvas de peixes que não inflam a vesícula gasosa estão a diminuição do crescimento (Podrabsky, 1999; Trotter *et al.*, 2001), da capacidade de reproduzir (Blažek *et al.*, 2013) e da sobrevivência, bem como deformidades espinhais (Kitajima *et al.*, 1994)

O não enchimento inicial da vesícula gasosa nos teleósteos pode ocorrer pela incapacidade das larvas de chegar a superfície para ingerir o ar (Chatain & Ounais-Guschemann, 1990) e/ou pela presença de bactérias e detritos orgânicos na água ou superfície que, ao serem ingeridas, podem danificar o curso e impedir que o ar chegue à vesícula (Marty *et al.*, 1995). Além disso, doenças de origem viral, bacteriana, genética (Roberts, 2012), malformações (Trotter *et al.*, 2001) ou ainda idiopatias sem causa conhecida (Roberts, 2012), podem acometer a vesícula de gás de peixes fisóstomos ou fisoclistos.

Fatores bióticos e abióticos são conhecidos por influenciar no enchimento inicial da vesícula gasosa (Trotter *et al.*, 2003a; 2003b; Woolley & Qin, 2010). Considerando os peixes anuais algumas hipóteses já foram levantadas para explicar a ocorrência de *belly-sliders*, como o manejo dos embriões na fase de incubação (Wourms, 1967; Genade *et al.*, 2005) ou características físicas e químicas da água no momento da eclosão (Podrabsky, 1999; Genade *et al.*, 2005). Contudo, as implicações nas características morfofuncionais da vesícula gasosa que impede que seja inflada normalmente nos *belly-sliders* não são conhecidas. Portanto, nosso objetivo foi analisar a vesícula gasosa do



peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* com natação normal e de belly-sliders, a fim de identificar de que forma o enchimento inicial da vesícula gasosa destes peixes é comprometido e determinar as implicações desta condição no crescimento das larvas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para a coleta dos reprodutores utilizamos puçá em forma de “D”, com 0,60 m de largura e 0,40 m de altura, com malha de 5 mm entrenós. Coletamos os peixes para o estudo em áreas úmidas localizadas na várzea do Canal São Gonçalo, sob licença do IBAMA/ICMBio, nº 41713-1. Após a coleta, mantivemos um *pool* de reprodutores, 70 fêmeas e 30 machos, em tanque (200L) com aeração constante, musgo de Java para esconderijo, e três ninhos que consistiam em potes de 2 L com casca de coco em pó como substrato para desova. Para alimento, uma vez ao dia foi ofertado zooplâncton nativo (cladóceros e copépodos) *ad libitum*. Mantivemos os ninhos por sete dias no tanque, posteriormente removemos a fibra e triamos coletando os ovos, os quais, com auxílio de estereomicroscópio, verificamos a fertilização, que foi confirmada quando observamos o espaço perivitelínico.

Selecionamos 800 ovos e separamos em grupos de 40 unidades para evitar mortalidade e contaminação de lotes grandes de ovos. Mantivemos os ovos em coletores universais de 100 mL de volume, preenchidos com 40 mL de solução de Yamamoto (Arezo *et al.*, 2005) . Semanalmente separamos os ovos mortos e substituímos a solução de Yamamoto, mantendo os ovos nestas condições por 30 dias, conforme Fonseca *et al.* (in prep.). Climatizamos o ambiente (20°C) e mantivemos os ovos no escuro, submetendo a claridade apenas durante o manejo semanal. Posteriormente, transferimos 400 embriões em diapausa II em grupos de 40 unidades para 10 coletores universais com algodão umedecido com solução de Yamamoto, onde foram mantidos por mais 90 dias, os potes hermeticamente fechados e no escuro até o completo desenvolvimento embrionário (diapausa III).

Dos 400 ovos mantidos, selecionamos 300 em diapausa III para submeter às eclosões. Acondicionamos três grupos com 100 ovos cada em copos de Becker de 1 L com 200 ml de água (água corrente isenta de cloro), aeração constante e submersos em 1cm de casca de coco em pó (adaptado de Volcan *et al.*, 2012). Verificamos as eclosões após

quatro, oito, 24 e 48h. Imediatamente após cada observação separamos peixes recém eclodidos com natação normal de peixes com dificuldade de se manter na coluna d'água, os *belly-sliders*. Nas observações seguintes, separamos os peixes que não haviam inflado a vesícula gasosa logo após a eclosão, mas apresentaram natação normal nas observações posteriores (chamados aqui de “revertidos”), consideramos cada grupo como diferentes tratamentos (normais, *belly-sliders* e revertidos). Após a eclosão medimos o comprimento padrão (SL) de 10 larvas de cada tratamento com paquímetro digital.

Semanalmente medimos o CP e fixamos três peixes normais, cinco *belly-sliders* e cinco. Após este período os peixes foram incluídos em parafina e realizados cortes longitudinais de 5 µm. Os cortes foram montados em lâminas, desidratados, corados com hematoxilina-eosina e diafanizados em xilol para análise em microscópio ótico dotado de sistema de captura de imagens. Para a análise histológica, os peixes foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e posteriormente transferidos para álcool etílico 70%, onde permaneceram por 7 dias.

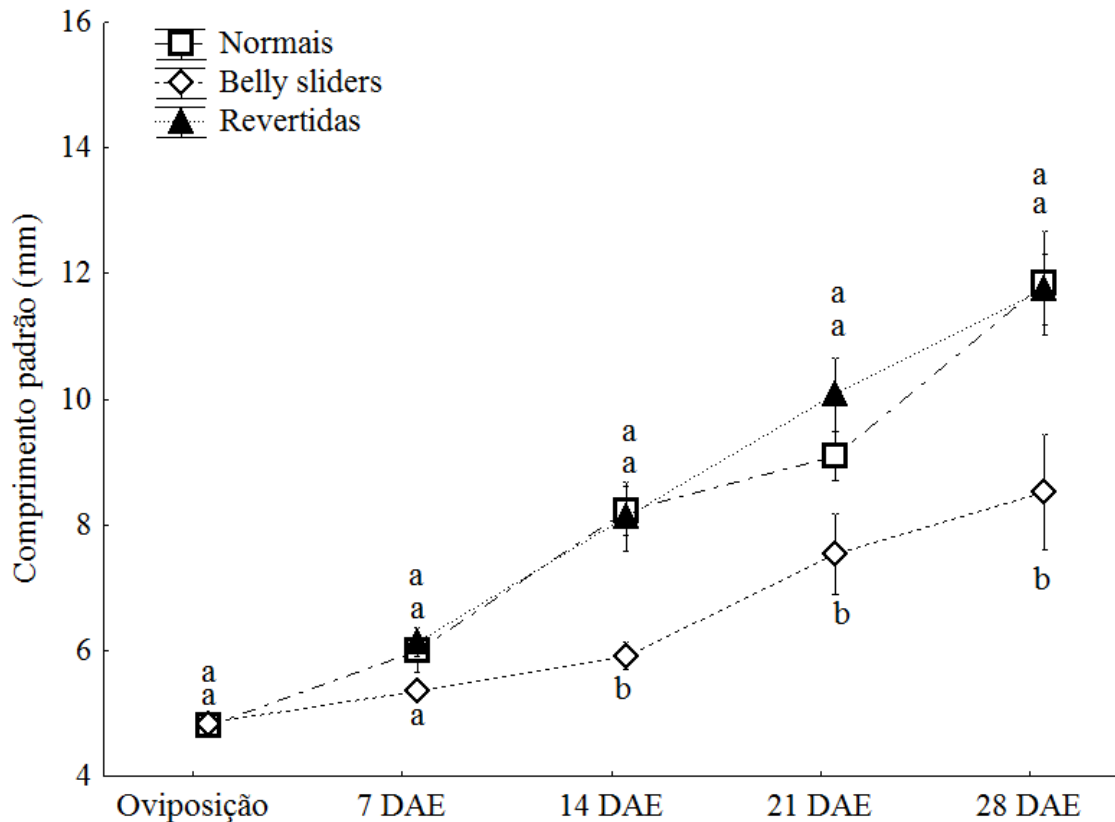
revertidos para análise histológica.

Para comparação entre médias CP foi empregada ANOVA (uma via) após teste dos pressupostos de normalidade dos dados e homocedasticidade das variâncias. A ANOVA foi seguida do teste de Tukey para amostras desiguais, sob nível de significância de 95%, através do programa “Statistica 7.0”.

## **RESULTADOS**

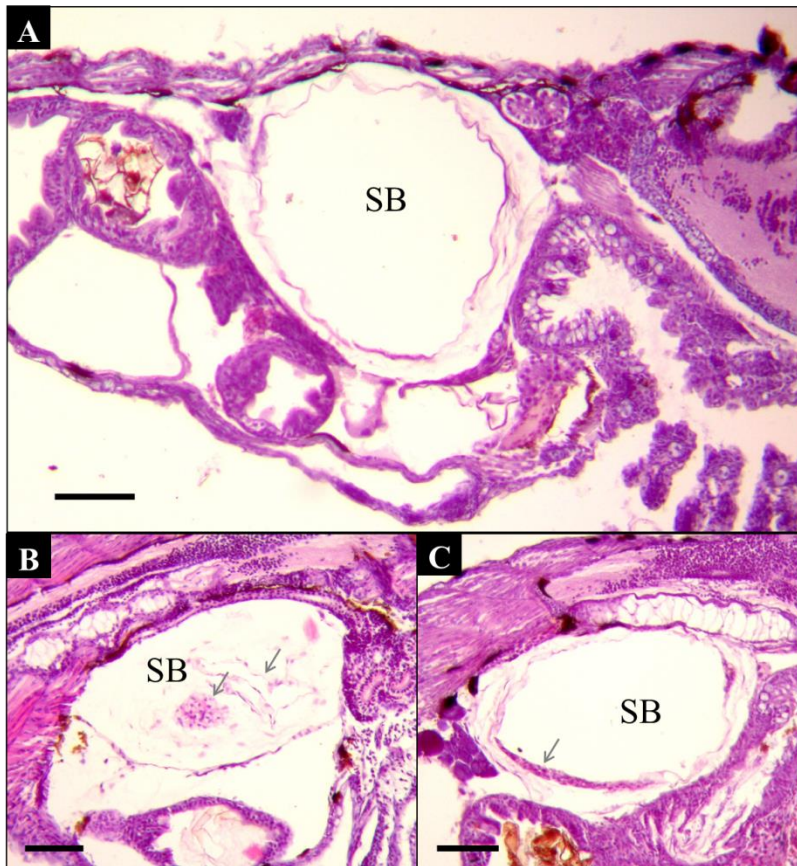
Dos 300 ovos que submetemos à eclosão, 123 eclodiram, destes,  $16,3 \pm 1,9$  % tinham natação normal,  $35,7 \pm 4,7$  % eram revertidos e  $48,0 \pm 3,8$  % eclodiram *belly-sliders* e permaneceram assim após 48h. Todos os animais que reverteram a situação de *belly-sliders* o fizeram dentro das primeiras 24h.

Até os sete dias de criação não observamos diferença no CP dos peixes com as diferentes condições de natação, porém, a partir dos 14 dias em diante, os peixes *belly-sliders* apresentaram CP inferior aos peixes normais ou revertidos (Fig. 1).



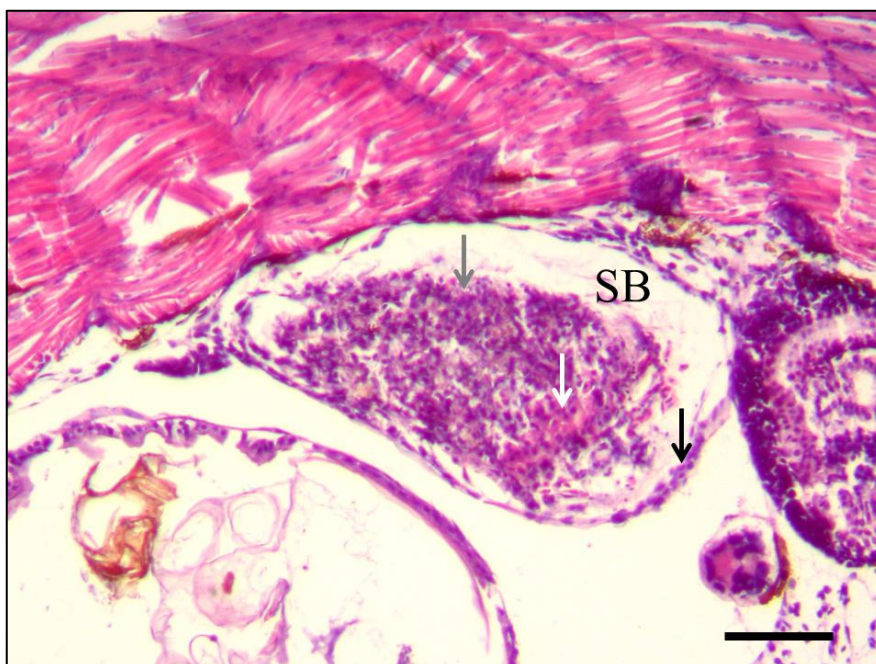
**Fig. 1.** Efeito da disfunção da vesícula gasosa no crescimento inicial de *Austrolebias nigrofasciatus*. Grupos: peixes normais (vesícula inflável); *belly-sliders* (bexiga não inflável) e que reverteram à condição normal (revertidos). DHA = dias após a eclosão. Letras distintas representam diferença entre as médias. (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ).

Observamos na análise histológica que os peixes normais e os revertidos apresentaram morfologia semelhante, com a vesícula repleta de gás (Fig. 3 A), ambos com raras células descamadas no lúmen (Fig. 3 B) e com ocorrência eventual de metaplasia setorial (Fig. 3C; Tabela 2), que aparentemente não compromete a funcionalidade da vesícula gasosa.



**Fig. 3.** Corte histológico (HE) de *Austrolebias nigrofasciatus* com sete dias após a eclosão que inflamam a vesícula gasosa (SB) até 24h após a eclosão. A – SB repleta de gás; B –SB inflada e células do epitélio da SB descamadas no lúmem (setas); C – SB inflada com metaplasia setorial do epitélio (seta). Escalas = 100  $\mu$ m.

Já as vesículas gasosas de peixes *belly-sliders* não enchem de gás e manifestam aparência patológica, com metaplasia do epitélio, descamação das camadas internas e hemorragia, causando obstrução do lúmen da vesícula (Fig.4), este diagnóstico se repetiu ao longo do tempo, desde a eclosão até os 28 dias, para os peixes que apresentam a patologia da vesícula (Tabela 1).



**Fig. 4.** Corte histológico (HE) de “belly-sliders” de *Austrolebias nigrofasciatus* que não inflamam a vesícula gasosa (SB) com 14 dias após a eclosão. Seta cinza – descamação de células do epitélio da SB; seta branca – eritrócitos indicando hemorragia; seta preta – metaplasia do epitélio da SB. Escala = 100  $\mu$ m.

**Tabela 1.** Frequência de ocorrência (%) de metaplasia (Met.), descamação do epitélio da vesícula gasosa (Desc.) e presença de eritrócitos indicando hemorragia (Hem.) no lúmen da vesícula gasosa.

DAE	Normal			Reversed			<i>Belly-slider</i>			
	N	Met. <sup>1</sup>	Desc.	N	Met. <sup>1</sup>	Desc.	N	Met.	Desc.	Hem. <sup>2</sup>
2	5	0 %	20 %	3	33 %	0 %	4	25%	25 %	100 %
7	3	33 %	0 %	3	67 %	0 %	4	100 %	100 %	100 %
14	4	50 %	0 %	3	33 %	33 %	5	100 %	100 %	100 %
21	2	0 %	0 %	3	33 %	0 %	3	100 %	100 %	33 %
28	-	-	-	4	0 %	0 %	4	100 %	100 %	50 %

<sup>1</sup>A metaplasia presente em peixes normais e revertidos é setorial, acomete apenas uma parcela da vesícula gasosa. <sup>2</sup>A hemorragia ocorreu apenas em peixes belly-sliders. DHE = dias após a eclosão.

## DISCUSSÃO

Verificamos no presente estudo que os peixes que apresentavam problemas de natação e dificuldade em se manter na coluna d'água apresentavam metaplasia, descamação do epitélio e hemorragia da bexiga gasosa. Embora muitos estudos relatem a ocorrência de *belly-sliders* em peixes anuais (Wourms, 1967; Podrabsky, 1999; Genade *et al.*, 2005; Blažek *et al.*, 2013), nenhum objetivou analisar quais estruturas eram afetadas e responsáveis pela disfunção da vesícula e consequentemente do nado. Neste sentido, metaplasia e descamação do epitélio da vesícula gasosa é uma patologia idiopática muito frequente que pode afetar uma variedade de espécies de peixes e que envolve a perda do controle de secreção de gás e da capacidade do peixe de se manter com fluabilidade neutra na coluna d'água (Roberts, 2012), porém nunca identificada antes em peixes anuais.

Apesar de ser uma patologia frequente, as causas da metaplasia do epitélio da vesícula gasosa também não são conhecidas para outros teleósteos, e, até onde se sabe, apenas deficiências de vitaminas, devido a má nutrição, foram associadas a essa disfunção (Roberts, 2012). Os reprodutores que originaram os ovos usados no presente estudo foram capturados do ambiente e mantidos em laboratório por período de duas semanas antes da obtenção dos ovos, e durante o manejo em laboratório foram alimentados com cladóceros e copépodos nativos, o que aumenta as chances de estarem com dieta equilibrada, no entanto, a hipótese não deve ser descartada, uma vez que no ambiente a disponibilidade de recursos pode variar temporalmente e consequentemente refletir na dieta dos reprodutores e na qualidade dos gametas (Sargent, 1995; Keppeler, 2014), no entanto, as evidências até hoje levantadas para peixes anuais não abordaram esta questão.

Outras causas que não a metaplasia são conhecidas por impedir o enchimento da vesícula gasosa, como malformações (Trotter *et al.*, 2001) e infecções (Roberts, 2012). No entanto, as infecções podem ser secundárias a algum dano que previamente acomete a vesícula, como ingestão de partículas que bloqueiam o duto pneumático (Roberts, 2012). Já as malformações podem ter relação com características ambientais como

temperatura (Trotter *et al.*, 2003a), intensidade luminosa e fotoperíodo (Trotter *et al.*, 2003b) durante a incubação. No presente estudo, nenhum dos peixes analisados apresentou algum indício de infecção ou malformação.

Alguns fatores abióticos também já foram testados na eclosão de peixes anuais, como a disponibilidade de oxigênio (Wourms, 1967) e a composição química da água (Podrabsky, 1999). Wourms (1967) mencionou que os embriões deveriam ser incubados em meio úmido, em contato com o ar, para que houvesse fonte de oxigênio suficiente para as larvas inflarem a vesícula gasosa nas primeiras horas após a eclosão. Já Podrabsky (1999) observou que independente do meio de incubação ser úmido ou líquido, a presença de turfa na água da eclosão diminui a incidência de belly-sliders e que, portanto, as propriedades químicas da água teriam maior influência do que a incubação, entretanto, o autor não apresentou dados sobre a proporção de peixes doentes que obteve com seus testes. Segundo Genade *et al.* (2005), a incubação prolongada pode aumentar a frequência de belly-sliders e que no momento da eclosão é necessário disponibilizar turfa ou extrato de turfa em uma profundidade de 1 cm de água para que as larvas possam nadar e encher suas vesículas de gás. Neste sentido, o protocolo de eclosão seguiu os autores mencionados anteriormente, onde utilizamos a casca de coco em todas as unidades experimentais de eclosão com o intuito de minimizar a ocorrência da patologia. No entanto, estudos considerando a influência do tempo de incubação na incidência de *belly-sliders* devem ser realizados para confirmar essa hipótese. Na natureza, por exemplo, as áreas úmidas podem não secar durante todo um ciclo e permanecerem alagadas por um longo período, como ocorre em períodos de El Niño (Volcan *et al.* 2015). No entanto, mesmo após esses eventos, onde os ovos permanecem em diapausa por período prolongado, não há registro da ocorrência de belly-sliders no ambiente natural. Causas como maior facilidade de predação e a ausência dessa patologia em indivíduos selvagens podem explicar esse padrão, no entanto maiores investigações são necessárias. Além disso, os ovos dos peixes anuais passam por diferentes estágios de diapausas que são interrompidas por fatores internos e ambientais. Assim, além da influência do tempo de incubação na incidência de patologias, o tempo em que o embrião permanece em cada uma das diapausas deve ser também considerado e objeto de futuras investigações.

Na larvicultura comercial, as perdas por problemas na vesícula gasosa são relativamente

comuns, geralmente acometendo cerca de 5-10 % dos juvenis produzidos, mas pode chegar a 50 % (Woolley & Qin, 2010). Diversos estudos com peixes anuais relatam a ocorrência frequente de belly-sliders, no entanto, pouco se sabe sobre as proporções em que esta patologia atinge as criações (Wourms, 1967; Podrabsky, 1999; Genade *et al.*, 2005; Blažek *et al.*, 2013). Em nosso estudo obtivemos quase 50 % de belly-sliders, mas em investigações sobre a influência de meios de incubação e do substrato no momento da eclosão já observamos de 10 a 90 % de frequência da doença, contudo, mesmo em condições controladas, os dados não apresentaram padrão e não pareceram ser reproduzíveis (comunicação pessoal).

Geralmente a vesícula de *Austrofundulus limnaeus* enche imediatamente após a eclosão, mas pode levar até 24h para alguns peixes começarem a apresentar natação normal (Podrabsky, 1999). O mesmo foi observado em nosso estudo, onde até as 24h de observação identificamos peixes que eclodiram belly-sliders apresentarem natação normal e se mantiveram nessa condição ao longo do período estudado.

A energia gasta para os peixes que não inflam a vesícula gasosa se manterem na coluna d'água, e a dificuldade para se locomover e buscar alimento levam os peixes acometidos pela doença a apresentar crescimento inferior (Woolley & Qin, 2010), o que vai ao encontro do observado em nosso estudo, onde durante o crescimento inicial os belly-sliders apresentaram CP inferior ao dos peixes com natação normal. Corroborando nossos resultados, Podrabsky (1999) observou que indivíduos de *Austrofundulus limnaeus* que não inflam a vesícula são menos vigorosos e crescem mais lentamente. Com base nos resultados observados concluímos que a incidência de patologia na vesícula gasosa é um problema recorrente e de grande relevância para a manutenção de peixes anuais em condições de laboratório, sendo responsável por uma grande quantidade de embriões inviáveis e incapazes de manter natação normal. A partir da descoberta dessa patologia na vesícula gasosa que acomete a maioria das espécies de peixes anuais, futuras investigações sobre a manutenção desses peixes em laboratório devem investigar os fatores responsáveis pela incidência dessa patologia.

## **AGRADECIMENTOS**



Os autores agradecem ao IBAMA/ICMBio pela concessão da licença de coleta (41713-1). A. P. Fonseca agradece à CAPES pela bolsa de doutorado. L. A. Romano (301002/2012-6) e R. B. Robaldo (307478/2012-2) são bolsistas de produtividade do CNPq.

## LITERATURA CITADA

- Berois, N., M. J. Arezo & R. O. de Sa. 2014. The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell & Developmental Biology* **3**, 136.
- Blazek, R., M. Polačik & M. Reichard. 2013. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo*, 4: 1-7.
- Chatain, B. & N. Ounais-Guschemann. 1990. Improved rate of initial swim bladder inflation in intensively reared *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 84: 345-353.
- Costa, W. J. E. M. 2009. Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration Freshwaters*, 20: 179-191.
- Genade, T., M. Benedetti, E. Terzibasi, P. Roncaglia, D. R. Valenzano, A. Cattaneo & A. Cellerino. 2005. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell*, 4: 223-233.
- Keppeler, F. W. Lanés, L. E. K. Rolon, A. S., Stenert, C., Lehmann, P., Reichard, M. & L. Maltchik. 2014. The morphology–diet relationship and its role in the coexistence of two species of annual fishes. *Ecology of Freshwater Fish*.
- Kitajima, C., T. Watanabe, Y. Tsukashima & S. Fujita. 1994. Lordotic deformation and abnormal development of swim bladders in some hatchery-bred marine physoclistous fish in Japan. *Journal World Aquaculture Society*, 25: 64-77.
- Marty, G. D., D. E. Hinton & R. C. Summerfelt. 1995. Histopathology of swimbladder noninflation in walleye (*Stizostedion vitreum*) larvae: role of development and inflammation. *Aquaculture*, 138: 35-48.
- Podrabsky, J. E. 1999. Husbandry of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* with special emphasis on the collection and rearing of embryos. *Environmental Biology of Fishes*, 54: 421-431.
- Roberts, R. J. (Ed). 2012. *Fish Pathology*. Wiley-Blackwell, 590p.

- Trotter A. J., S. C. Battaglene & P. M. Pankhurst. 2003a Effects of photoperiod and light intensity on initial swim bladder inflation, growth and post-inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture*, 221:141 – 156.
- Trotter, A. J., P. M. Pankhurst & P. R. Hart. 2001. Swim bladder malformation in hatchery- reared striped trumpeter *Latris lineata* (Latridae). *Aquaculture*, 198: 41–54.
- Trotter, A. J., P.M. Pankhurst & D.T. Morehead. 2003b. Effects of temperature on initial swim bladder inflation and related development in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture*, 221:141 – 156.
- Sargent, J. R. 1995. Origin and functions of Egg Lipids: Nutritional Implications. *In: Bromage, N. R & R. J. Roberts. (eds.) Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, pp.353-372.
- Volcan, M. V.; Lanés, L. E. K.; Gonçalves, Â. C.; D. L. Guadagnin. 2015. Annual fishes (Rivulidae) from Southern Brazil: A broad-scale assessment of their diversity and conservation. *In: Nibia Berois, Graciela García, Rafael O. de Sá. (Org.). Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity and Evolution*. 1ed.: CRC Press Taylor & Francis group, 2015, v. 1, p. 1-342.
- Woolley, L. D. & J. G. Qin. 2010. Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae. *Reviews in Aquaculture*, 2:181–190.
- Wourms, J. P. (Ed)1967. Annual Fishes. *In: Methods in Developmental Biology* (Wilt, F. H. & N. Wessels, eds), pp. 123–137. New York: Thomas and Crowell Company.

## 7. Conclusões gerais

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, conclui-se que em condições de laboratório:

- O desempenho reprodutivo é incrementado pelo aumento do número de fêmeas disponibilizada para cada macho, em uma proporção de até 3 : 1 (F:M);
- Há limitação da capacidade reprodutiva e aumento do estresse de machos quando mantidos com proporções maiores do que 3 : 1 (F:M);
- Até a entrada em diapausa II (DII) não existe influência dos meios de incubação utilizados no tempo de desenvolvimento;
- O meio de água com casca de coco em pó apresentou atraso no tempo de desenvolvimento em relação aos demais tratamentos, chegando aos 100 dias de estudo com cerca de 80 % dos embriões em DII;
- Os embriões completam o desenvolvimento (DIII) a partir de 27 dias após a postura;
- Ovos mantidos na mesma água dos reprodutores desde a postura permanecem em DI;
- Todos os meios são viáveis para a manutenção dos embriões, com alta sobrevivência e trajetórias de desenvolvimento que podem ser manipuladas alterando as diapausas ao manter nos meios de incubação pertinentes.
- O enchimento inicial da vesícula gasosa de *A. nigrofasciatus* é afetado por metaplasia com descamação do epitélio da vesícula gasosa e hemorragia, resultando em natação insuficiente (rampantes) em uma parcela significativa de larvas.
- Peixes rampantes apresentam crescimento inferior em relação aos peixes com natação normal.