

**Fundação Universidade Federal do Rio Grande  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura**

**CRESCIMENTO E FECUNDIDADE DO PEIXE ANUAL  
*AUSTROLEBIAS NIGROFASCIATUS* (CYPRINODONTIFORMES:  
RIVULIDAE) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

**Matheus Vieira Volcan**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Aquicultura, como requisito para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Aquicultura.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo  
Co-orientador: Prof. Dr. Luis André Nassr Sampaio**

**Rio Grande – RS - Brasil  
Março de 2009**

**CRESCIMENTO E FECUNDIDADE DO PEIXE ANUAL *AUSTROLEBIAS*  
*NIGROFASCIATUS* (CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE) SOB  
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

**Matheus Vieira Volcan**

**Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo**  
**Orientador**

**Prof. Dr. Luis André Nassr Sampaio**  
**Co-orientador**

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	vii
<b>Resumo geral</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	xi
<b>Introdução geral</b> .....	1
Referências bibliográficas.....	4
<b>Capítulo I</b> .....	6
<b>Crescimento inicial e diferenciação sexual fenotípica do peixe anual <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> Costa &amp; Cheffe (Cyprinodontiformes: Rivulidae) em condições de laboratório</b> .....	7
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Material e métodos.....	12
Resultados.....	14
Discussão.....	19
Agradecimentos.....	23
Referências bibliográficas.....	23
<b>Capítulo II</b> .....	25
<b>Fecundidade do peixe anual <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> Costa &amp; Cheffe (Cyprinodontiformes, Rivulidae) mantido em diferentes temperaturas sob condições de laboratório</b> .....	26
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e métodos.....	32

Resultados.....	33
Discussão.....	36
Agradecimentos.....	39
Referências bibliográficas.....	39
<b>Discussão geral</b> .....	43
Referências bibliográficas.....	45
<b>Conclusão geral</b> .....	49

Dedico a meus pais Nadna e Frank e meus  
avós Elon e Eni

## **Agradecimentos**

A minha mãe Nadna, por todo apoio e incentivo que recebi durante essa jornada. Muito obrigado por tudo.

Ao meu pai Frank, que apesar da distância sempre me deu incentivo ao estudo.

Aos meus avós Elon e Eni, que sempre estiveram presentes na minha vida e foram grandes exemplos, contribuindo de forma valiosa para minha formação, agradeço por todo apoio.

Ao amigo e orientador Ricardo Robaldo pelas valiosas sugestões e contribuições, assim como o apoio e confiança, e a sua família por ter sempre me acolhido bem em sua casa ao longo da construção e revisão desta dissertação.

Ao meu co-orientador Luis André Sampaio, pelas sugestões, correções e contribuições ao trabalho.

Ao professor Mario Chim pelas correções e sugestões ao trabalho e pela disposição do local para realização dos experimentos.

A Alinca Fonseca, minha namorada, amiga e companheira para todos os momentos, por toda ajuda ao longo do mestrado, além do valioso auxílio em laboratório durante os experimentos.

A João Xavier, Taíse Wellwig, Léa Carolina Costa e Viviana Lisboa pelo auxílio em laboratório e pela ótima companhia no Saco do Justino.

A todos os amigos do Saco do Justino, pelo auxílio e disposição durante os experimentos.

Aos meus grandes amigos Luis Esteban e Ândrio Gonçalves pelas sugestões e apoio a este estudo.

A todos que dão ensejo e graça à nossa jornada, em especial ao meu irmão Tarso Costa e os amigos Matheus Pêra, Gustavo Wallwitz, Michel Corrêa e Andersom Ferreira.

Ao curso e funcionários do programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Ao IBAMA/ICMBio pela licença de coleta expedida.

A CAPES (PROAP) pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que participaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste estudo MUITO OBRIGADO!!!

## Resumo geral

O peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* é uma espécie endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim, no Sul do Brasil, onde se encontra ameaçado de extinção. Os efeitos da temperatura sobre o crescimento e reprodução de *A. nigrofasciatus* foram estudados em cativeiro. Experimento 1 – crescimento: Ovos fertilizados naturalmente, estocados em laboratório em ambiente úmido, foram expostos a água e dentro de 12h eclodiram. O comprimento padrão médio dos peixes recém eclodidos foi  $4,67 \pm 0,25$  mm. Os juvenis foram mantidos a 16 e 22°C por oito semanas e o crescimento foi mais rápido na temperatura mais elevada durante as primeiras semanas, mas tão logo tenham iniciado as desovas (quatro semanas após a eclosão), a taxa de crescimento foi reduzida e ao final de oito semanas eles mediam  $23,68 \pm 3,73$  e  $22,68 \pm 5,36$  mm ( $p > 0,05$ ), respectivamente em 16 e 22°C. Fêmeas mantidas a 22°C alcançaram  $23,00 \pm 2,83$  mm e foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que aquelas mantidas em 16°C ( $17,91 \pm 2,47$  mm). A primeira desova na temperatura reduzida foi observada somente na oitava semana após a eclosão. Não foi observada diferença significativa no crescimento para os machos. O sexo de *A. nigrofasciatus* parece ser determinado pela temperatura, houve uma maior proporção de machos (1:0,6) a 16°C do que a 22°C (1:1,1). Experimento 2 – reprodução: Doze casais foram coletados no ambiente e distribuídos em 12 aquários, mantidos a 17, 21 e 25°C (quatro replicas para cada temperatura) e acompanhados por cinco semanas. A média da fecundidade semanal foi de  $30 \pm 15$ ;  $32 \pm 10$  e  $38 \pm 19$  para 17, 21 e 25°C, respectivamente, sem apresentar diferença significativa entre os tratamentos. Ao término do experimento, a fecundidade semanal acumulada também não diferiu entre os tratamentos e apresentou média de  $150 \pm 49$ ,  $159 \pm 3$  e  $190 \pm 56$  para 17, 21 e 25°C, respectivamente. Ao término do estudo, o crescimento dos machos não foi influenciado pela temperatura ( $p > 0,05$ ), entretanto fêmeas mantidas a 17 e 21°C foram significativamente maiores que aquelas mantidas a 25°C. O fator de condição também foi reduzido na temperatura mais alta sugerindo que os reprodutores de *A. nigrofasciatus* devem ser mantidos em temperatura reduzida para o sucesso reprodutivo.

Palavras chave: peixe anual, crescimento, reprodução, ambientes sazonais, sistema lagunar Patos-Mirim.

## Abstract

The annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*, an endemic species to the coastal lagoons of Southern Brazil is currently endangered. The effects of temperature on growth and reproduction of *A. nigrofasciatus* were studied in captivity. Experiment 1 – growth: Naturally fertilized eggs were kept in the laboratory in a humid environment, once they were exposed to water, larvae hatched within 12 hours. Total length of newly hatched larvae was  $4.67\pm 0.25$  mm. They were kept at 16 e 22°C for eight weeks and larvae grew faster at the higher temperature during the first weeks, but as soon as they started to spawn (four weeks after hatching), growth rate was reduced and at the end of the eight weeks they measured  $23.68\pm 3.73$  e  $22.68\pm 5.36$  mm ( $P>0.05$ ), respectively for 16 e 22°C. Females reared at 22°C reached  $23.0\pm 2.83$  and were significantly larger ( $P<0.05$ ) than those reared at 16°C ( $17.91\pm 2.47$  mm). The first spawns at the lower temperature were only observed eight weeks after hatching. There was no significant difference in growth for males. Sex of *A. nigrofasciatus* seems to be thermolabile determined, there was a higher proportion of males (1:0.6) at 16°C than at 22°C (1:1.1). Experiment 2 – reproduction: Twelve couples were collected in the wild and distribute in 12 aquaria kept at 17, 21 e 25°C (four replicates for each temperature) where they were followed for five weeks. As a result, the weekly average of eggs per gram of female was  $30\pm 15$ ,  $32\pm 10$  and  $38\pm 19$  to 17, 21 and 25°C, respectively. There were no significant differences between treatments. At the end of five weeks the average number of eggs was  $150\pm 49$ ,  $159\pm 3$  and  $190\pm 56$  for the treatments of 17, 21 and 25°C, respectively. At the end of the study, growth of males was not influenced by temperature ( $P>0.05$ ), however, females kept at 17 and 21°C were significantly larger than those reared at 25°C. Condition factor was also reduced at the highest temperature suggesting that broodstock of *A. nigrofasciatus* should be kept at lower temperatures for successful breeding.

Key words: annual fish, growth, reproduction, seasonal environment, Patos-Mirim Lagoon system.

## INTRODUÇÃO GERAL

Peixes anuais são definidos como um grupo de Cyprinodontiformes, que habitam ambientes aquáticos sazonais em várias partes da América do Sul e da África (Costa 2008). No Brasil, todas as espécies registradas pertencem a Rivulidae. O Rio Grande do Sul registra dois gêneros para essa família, *Austrolebias* Costa e *Cynopoecilus* Regan, sendo o primeiro o de maior representatividade (Costa 2006).

*Austrolebias* compreende a um diversificado clado de peixes anuais que habitam ambientes sazonais que se formam durante a estação chuvosa no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Em contraste com outros peixes anuais restritos geograficamente a áreas quentes tropicais de várias partes do mundo, a maioria das espécies de *Austrolebias* é endêmica de áreas de clima temperado, onde as estações de chuva ocorrem nos meses mais frios, conseqüentemente, são encontrados em águas frias (Costa 2006).

Nessas espécies, os indivíduos crescem e atingem maturidade sexual rapidamente (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1966, Arenzon et al. 1999, Errea & Danulat 2001), deixando seus ovos depositados no substrato em profundidades de até 15 cm (Vaz-Ferreira et al. 1966). Com a seca do charco toda a população de adultos morre. No entanto, os ovos permanecem vivos em estágio de diapausa, com seu desenvolvimento embrionário temporariamente estacionado (Podrabsky & Hand 1999), com a chegada da próxima estação chuvosa os ovos eclodem e uma nova geração é formada. As larvas crescem rapidamente, apresentando as maiores taxas de crescimento nos primeiros dois meses de vida, atingindo maturidade sexual precocemente em cerca de 6-8 semanas, onde irão desovar por longo período (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1969 1970).

A sobrevivência em condições ambientais extremamente variáveis como o estresse hídrico, baixos níveis de oxigênio e ampla flutuação de temperatura, exige dos peixes anuais diversas adaptações relacionadas ao seu ciclo de vida, constituindo características típicas do grupo (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1970, Errea & Danulat 2001). Entretanto, as mesmas peculiaridades que os tornam aptos a viverem nesses ambientes hostis fazem com que as espécies sejam extremamente dependentes da integridade física do seu biótopo. O

avançado grau de degradação das áreas úmidas, aliado ao fato das espécies apresentarem restrita área de distribuição, faz com que no Rio Grande do Sul a maioria das espécies de peixes anuais seja considerada ameaçada de extinção. De toda ictiofauna sob risco de extinção no Estado, 39% pertence à Rivulidae (Reis et al. 2003). Inserida neste contexto, *Austrolebias nigrofasciatus*, uma espécie de pequeno porte e endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim, extremo sul do Rio Grande do Sul, consta na Lista de Fauna Ameaçada de Extinção na categoria “Em Perigo” (Reis et al. 2003).

A espécie apresenta marcado dimorfismo sexual e caracteriza-se pelo padrão de colorido dos machos, composto por faixas azul claro, paralela aos raios na metade basal das nadadeiras dorsal e anal, e por uma mancha negra bordeando a parte posterior das nadadeiras dorsal e anal (Costa & Cheffe 2001) (Figura 1). Sobre a espécie descrita em 2001, até o momento não foram realizados estudos que abordem aspectos bio-ecológicos. Porém, pesquisas realizadas com rivulídeos têm demonstrado que estes organismos apresentam peculiaridades que os apontam como excelentes modelos biológicos, quais sejam: os ovos podem ser estocados por vários meses em condições de laboratório, garantindo estoques de exemplares de mesma origem, mesmo fora do período reprodutivo da espécie; são facilmente mantidos em condições de laboratório, onde reproduzem, na maioria das vezes, diariamente, garantindo uma soma significativa de ovos; os peixes são altamente sensíveis a tóxicos demonstrando resultados reproduzíveis (Arenzon et al. 2002, Arenzon et al. 2003), além de serem considerados bons indicadores de qualidade ambiental (Arezo et al. 2007). Entretanto, são escassos estudos, com espécies de *Austrolebias* que visem analisar aspectos biológicos e reprodutivos (Arenzon et al. 1999 2002, Bellote & Costa 2004), para que desta forma possam subsidiar informações para otimizar a cultura das espécies.

A criação de peixes em cativeiro seja para aquarismo, utilização em testes de laboratório ou para subsidiar planos de manejo e repovoamento implica em um prévio conhecimento das características biológicas e reprodutivas da espécie e as ótimas condições ambientais para sua manutenção em cativeiro. Um passo essencial para o sucesso no cultivo de peixes é a definição das ótimas condições ambientais, onde a temperatura é um dos fatores mais influentes (Debnath et al. 2006). Em espécies de Rivulidae

a temperatura está relacionada com o desenvolvimento embrionário (Arezo et al. 2007, Arenzon et al. 2002), crescimento (Errea & Danulat 2001, Liu & Walford 1965, 1970, Liu et al. 1975) reprodução e tempo de vida (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1966, 1970, Arenzon et al. 1999). A importância dos peixes anuais como organismos modelo para laboratório (Arenzon et al. 2002, 2003), bioindicadores (Arezo et al. 2007), controladores de pragas (Fletcher et al. 1992, Frenkel & Goren 2000) e como peixes ornamentais (Costa 2008), além da situação de ameaça de extinção para a maioria das espécies, (Reis et al. 2003), agregam maior valor a estudos que contemplem esse grupo de peixes e que dessa forma possam fornecer subsídios para o cultivo, manejo e futuros planos de conservação das espécies. Deste modo, objetivou-se verificar através de ensaios de laboratório o crescimento e fecundidade do peixe anual *A. nigrofasciatus* e a influência da temperatura nestes fatores.



**Figura 1. Casal de *Austrolebias nigrofasciatus*.**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arenzon, A., A. C. Peret & M. B. C. Bohrer. 1999. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hydrobiologia* 411: 65-70.
- Arenzon, A., C. A. Lemos & M. B. C. Bohrer. 2002. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* 62(4B): 743-747.
- Arenzon, A., R. F. Pinto, Colombo, P. & M. T. Raya-Rodriguez. 2003. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9): 2188-2190.
- Arezo, M. J., S. D'Alessandro, N. Papa, R. Sá & N. Berois. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39: 89-98.
- Bellote, D. F. & W. J. E. M. Costa. 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.
- 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.
- Costa, W. J. E. M. & M. M. Cheffe. 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). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS* 14 (2): 179-200.
- Debnath, D., A. K. Pal, N. P. Sahu, K. Baruah, S. Yengkokpam, T. Das & S. M. Manush. 2006. Thermal tolerance and metabolic activity of yellowtail

- catfish *Pangasius pangasius* (Hamilton) advanced fingerlings with emphasis on their culture potential. *Aquaculture*, 258: 606-610.
- Errea, A. & E. Danulat. 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes* 61: 261–268.
- Fletcher, M., A. Teklehaimanot & G. Yemane. 1992. Control of mosquito larvae in the port city of Assab by an indigenous larvivorous fish *Aphanius dispar*. *Acta Tropical* 52: 155–166.
- Frenkel, V. & M. Goren. 2000. Factors affecting growth of killifish, *Aphaniusdispar*, a potential biological control of mosquitoes. *Aquaculture* 184: 255–265.
- 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. & R.L.Walford. 1969. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish *Cynolebias bellottii* Steindachner. *Zoologica* 54: 1–16.
- Liu, R. K. & Walford, R. L. 1970, Observations on the lifespans several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. *Experimental Gerontology* 5: 241-246.
- Liu, R. K.; Leung, E. & Walford, R. L. 1975. Effect of temperature transfer on growth of laboratory populations of a south American annual fish *Cynolebias bellotti*. *Growth* 39: 337-343.
- Podrabsky, J. E. & S. Hand. 1999. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *The Journal of Experimental Biology* 202: 2567-2580.
- Reis, R. E., Z. M. S. Lucena, C. A. S. Lucena & L. R. Malabarba. 2003. Peixes. In: Fontana, C. S., G. A. Bencke & R. E. Reis (eds.). Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 632 pp.
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra de Soriano & J. S. Señorans. 1966. Integracion de La fauna de vertebrados em algunas masas de agua dulce temporales del Uruguay. *Comp. Trab. Dpto. Zool. Vert.* 25: 1- 16.

Walford, R. L. & R. K. Liu. 1965, Husbandry, life-span and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii*. *Experimental Gerontology* 1: 161-171.

## CÁPITULO I

**Crescimento inicial e diferenciação sexual fenotípica do peixe anual  
*Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe (Cyprinodontiformes:  
Rivulidae) em condições de laboratório**

Co-autores: Alinca Peres da Fonseca, Mario Roberto Chim Figueiredo,  
Luis André Sampaio & Ricardo Berteaux Robaldo

*[A ser submetido ao periódico Environmental Biology of Fishes]*

**Environmental Biology of Fishes**

**Crescimento inicial e diferenciação sexual fenotípica do peixe anual  
*Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe (Cyprinodontiformes:  
Rivulidae) em condições de laboratório**

Volcan, M.V.<sup>a,b</sup>; Fonseca, A.P.<sup>c</sup>; Figueiredo, M.R.C.<sup>a</sup>; Sampaio, L.A.<sup>a</sup>; Robaldo,  
R.B.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>*Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).  
Email: matheusvolcan@hotmail.com*

<sup>b</sup>*Instituto Pró-Pampa (IPPampa), Laboratório de Ictiofauna. Av. Adolfo Fetter, 1112, bairro  
Recanto de Portugal Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 96083-000*

<sup>c</sup>*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal de  
Pelotas (UFPEL)*

## RESUMO

*Austrolebias nigrofasciatus* é uma espécie anual, endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim no extremo sul do Brasil e atualmente é considerada sob ameaça de extinção. O efeito da temperatura sobre o crescimento inicial e a diferenciação sexual de *A. nigrofasciatus* foi avaliado em laboratório, a partir de ovos mantidos úmidos em laboratório. Após a eclosão os peixes foram mantidos por oito semanas a 16 e 22°C. O crescimento foi acompanhado mediante biometrias semanais. O comprimento padrão das larvas recém eclodidas foi de  $4,67 \pm 0,25$  mm e ao final de oito semanas apresentavam médias de  $23,68 \pm 3,73$  e  $22,68 \pm 5,36$  mm, respectivamente para 16 e 22°C. Na temperatura mais elevada os peixes apresentaram maior taxa de crescimento e atingiram dimorfismo sexual em idade inferior aqueles mantidos a 16°C. As fêmeas criadas a 22°C atingiram o maior comprimento ( $23,00 \pm 2,83$  mm) do que aquelas mantidas em 16°C ( $17,91 \pm 2,47$  mm). Na temperatura mais baixa houve diferença significativa entre o comprimento de machos e fêmeas em todas as biometrias, fato não observado a 22°C. Os resultados deste trabalho demonstram que juvenis de *A. nigrofasciatus* devem ser criados a 22°C durante os primeiros dois meses de idade, garantindo assim uma maior taxa de crescimento até a puberdade.

*Palavras chave:* peixe anual, crescimento, ambientes sazonais, sistema lagunar Patos-Mirim

## Abstract

This study evaluated the early growth of annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. Fish is endemic of the Patos-Mirim lagoon system in southern Brazil, where it is threatened with extinction. In order to verify the effect of temperature on initial growth of *A. nigrofasciatus*, eggs stored in the laboratory were hatched and juveniles submitted by eight weeks to controlled temperature traits on 16 and 22°C. The growth were weekly determined by biometry. The length of newly hatching larvae was  $4,67 \pm 0,25$  mm and during of eighth week showed averages of  $23,68 \pm 3,73$  and  $22,68 \pm 5,36$  mm, respectively for 16 and 22°C. At the higher temperature fish had higher initial growth rate and reached sexual dimorphism in earlier age those kept at 16°C. Females reared at 22°C reached  $23,00 \pm 2,83$  mm and were significantly larger than those reared at 16°C ( $17,91 \pm 2,47$  mm). At lower temperature there was a significant difference between the size of males and females in all the biometrics, was not observed at 22°C. Considering the results, it appears that juveniles to be developed in captivity should be kept at 22°C until the first months of age, thus ensuring a higher growth rate until puberty.

*Key words:* annual fish, growth, seasonal environments, Patos-Mirim lagoon system.

## Introdução

A maioria das espécies pertencentes à família Rivulidae são conhecidas como peixes anuais por completarem seu ciclo de vida em ambientes aquáticos temporários, sendo encontrados em estágio adulto, somente em curtos períodos do ano (Costa 2006). Os indivíduos dessas espécies crescem e atingem maturidade sexual rapidamente (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1966, Arenzon et al. 1999, Errea & Danulat 2001), deixando seus ovos depositados no substrato em profundidades de até 15 cm (Vaz-Ferreira et al. 1966). Com a seca do charco toda a população de adultos morre. No entanto, os ovos permanecem vivos em estágio de diapausa, aguardando a próxima estação chuvosa, quando irão eclodir e iniciar um novo ciclo de vida (Podrabsky & Hand 1999).

Espécies de *Austrolebias* habitam charcos sazonais que se formam durante as estações chuvosas no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. A maioria das espécies vive em zonas de clima temperado, onde as estações chuvosas se passam nos meses do inverno, sendo conseqüentemente encontrados em águas frias (Costa 2006). *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe (2001) é uma espécie de pequeno porte, endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim no extremo sul do Rio Grande do Sul. Apresenta marcado dimorfismo sexual e caracteriza-se pelo padrão de colorido dos machos, composto por faixas azul claro, paralela aos raios na metade basal das nadadeiras dorsal e anal, e por uma mancha negra bordeando a parte posterior das nadadeiras dorsal e anal (Costa & Cheffe 2001).

A sobrevivência em condições ambientais extremamente variáveis como o estresse hídrico, baixos níveis de oxigênio e ampla flutuação de temperatura, exige dos peixes anuais diversas adaptações relacionadas ao seu ciclo de vida, constituindo características típicas do grupo (Liu & Walford 1965, 1970, Errea & Danulat 2001). Entretanto, as mesmas peculiaridades que os tornam aptos a viverem nesses ambientes hostis, fazem com que estas espécies sejam dependentes da integridade física do seu biótopo. Em função de atividades antrópicas deletérias em seu habitat, Reis et al. (2003) incluem *A. nigrofasciatus* na Lista de Fauna Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul

na categoria “Em Perigo”, pois ela possui uma área de distribuição restrita e baixa plasticidade ecológica (Costa & Cheffe 2001).

Até o momento ainda não foram realizados estudos que abordem aspectos bio-ecológicos desta espécie. A importância dos peixes anuais como organismos modelo para laboratório (Arenzon et al. 2002a 2003), bioindicadores (Arezo et al. 2007), controladores de pragas (Fletcher et al. 1992, Frenkel & Goren 2000) e como peixes ornamentais (Costa 2008), além da situação de ameaça de extinção para a maioria das espécies, agregam maior valor a estudos que contemplem esse grupo de peixes e que dessa forma possam fornecer subsídios para o cultivo, manejo e futuros planos de conservação das espécies.

Um passo essencial para o sucesso da manutenção de peixes em cativeiro é a definição das condições ambientais ótimas, onde a temperatura é um dos fatores mais influentes (Brett & Groves 1979). Em espécies de Rivulidae a temperatura está relacionada com o desenvolvimento embrionário (Arezo et al. 2007, Arenzon et al. 2002a), crescimento (Errea & Danulat 2001, Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1970) reprodução (Arenzon et al. 1999) e longevidade (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1966, 1970). Em conformidade a amplitude térmica registrada para o ambiente da *Austrolebias adloffii*, espécie do mesmo grupo de *A. nigrofasciatus*, Walford & Liu (1965) estudaram o efeito da temperatura sobre a biologia deste peixe a 16 e 22°C. Da mesma forma, Calviño (2005) apontou a mesma faixa de temperatura como ideal para a manutenção de *Austrolebias toba* em cativeiro.

Considerando a influência da temperatura na biologia das espécies e a escassez de informações sobre o papel desta variável nas diferentes fases de vida dos peixes anuais, o presente estudo teve por objetivo estudar o efeito da temperatura sobre o crescimento inicial e a idade para o dimorfismo sexual de *A. nigrofasciatus*.

## **Material e métodos**

### *Produção e eclosão dos ovos*

O experimento foi realizado no Laboratório de Aqüicultura Continental da Universidade Federal do Rio Grande. Um “pool” de ovos fertilizados de *A.*

*nigrofasciatus* foi obtido a partir de 12 casais oriundos de um charco localizado no campus da Universidade Federal de Pelotas (31°48'25"S: 52°25'11"W), Rio Grande do Sul, Brasil. Os ovos foram mantidos em meio a substrato de fibra de coco úmida, dentro de sacos hermeticamente fechados, na ausência de luz e em temperatura ambiente (18-25°C), por aproximadamente seis meses.

Para eclosão, os ovos foram depositados em copos de Beaker de 1L, enterrados a 10cm de profundidade em fibra de coco desfiada, imersos em 500 mL de água destilada e mantidos em temperatura controlada a  $18,0 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$  por 24h. Os reprodutores que deram origem aos ovos utilizados no estudo foram capturados sob licença de coleta do IBAMA/ICMBio n°15108-1.

### *Ensaio de laboratório*

Os peixes recém eclodidos foram medidos em seu comprimento padrão. Após a biometria inicial os exemplares foram aleatoriamente divididos em dois aquários de 30 L, sob densidade de estocagem de 1 larva/L e mantidos em temperatura constante de 16 e 22°C. A temperatura da água foi mantida através de aquecedor (20 W) e termostato digital (Aquaterrm®/FullGauge/0,1°C). A água foi mantida sob aeração constante e o fotoperíodo utilizado foi de 12h de luz por dia. Para mitigar o estresse do cativeiro e auxiliar na manutenção da qualidade da água foram colocados exemplares da macrófita submersa *Ceratophyllum demersum* L., macrófita abundante no biótopo da espécie. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (12 e 20h) com zooplâncton, de forma que a cada reposição fossem encontrados presas residuais, constituído basicamente por copépodes e cladóceros, produzidos em viveiro escavado, mediante adubação orgânica.

Na biometria inicial (n=80) após anestesia em banho de benzocaína (50mg/L) foi empregado microscópio estereoscópico dotado de ocular micrométrica (0,01mm) e nas seguintes foi utilizado paquímetro digital (0,01mm). Durante oito semanas de experimento, foram realizadas biometrias semanais, com exceção da segunda, efetuada duas semanas após a eclosão devido à sensibilidade das larvas ao manejo neste período, constatada pela mortalidade de 25% destas na primeira biometria. Nas biometrias realizadas, todos exemplares de cada tratamento foram medidos. A diferenciação sexual

fenotípica foi constatada pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários da espécie, descritos por Costa & Cheffe (2001).

Diariamente foram verificados as condições de temperatura, oxigênio dissolvido (0,1 mg/L) e pH, com posterior renovação de aproximadamente 20% do volume do aquário. A temperatura média ( $\pm$ DP) foi  $16,12\pm 0,19$  e  $22,05\pm 0,23^{\circ}\text{C}$ , o pH médio  $7,45\pm 0,04$  e  $7,52\pm 0,05$  e a concentração média de oxigênio dissolvido  $8,04\pm 0,29$  e  $7,59\pm 0,32\text{mg/L}$ , para os tratamentos de 16 e  $22^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Não foram constatadas diferenças significativas na concentração de oxigênio e pH entre os tratamentos.

#### *Análises estatísticas*

Os dados de comprimento foram comparados mediante teste “t” de Student, sob um nível de significância de 95%. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Para verificar a diferença na razão sexual entre os dois tratamentos se utilizou o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistica 7.0.

### **Resultados**

A sobrevivência dos peixes mantidos na temperatura de  $16^{\circ}\text{C}$  foi de 97% e na de  $22^{\circ}\text{C}$  de 85%.

O comprimento padrão das larvas recém eclodidas foi de  $4,67\pm 0,25\text{mm}$ . Os peixes mantidos na temperatura mais elevada ( $22^{\circ}\text{C}$ ) apresentaram maior crescimento inicial até a sexta semana. Entretanto, ao final de oito semanas, não foram registradas diferenças significativas no comprimento final, com comprimento de  $23,68\pm 3,73$  e  $22,68\pm 5,36\text{ mm}$ , respectivamente para 16 e  $22^{\circ}\text{C}$  (Figura 1).

Os machos responderam de forma semelhante à temperatura com médias de comprimento ao final de oito semanas de  $25,61\pm 4,46$  e  $24,67\pm 4,77\text{mm}$ , nas condições de 16 e  $22^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (Figura 2). As fêmeas mantidas na temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$  obtiveram crescimento significativamente maior ( $p<0,05$ ) do que as mantidas a  $16^{\circ}\text{C}$  em todas as biometrias, com comprimento médio

final para a menor e a maior temperatura de  $17,91 \pm 2,47$  e  $23 \pm 2,83$ mm, respectivamente (Figura 2).

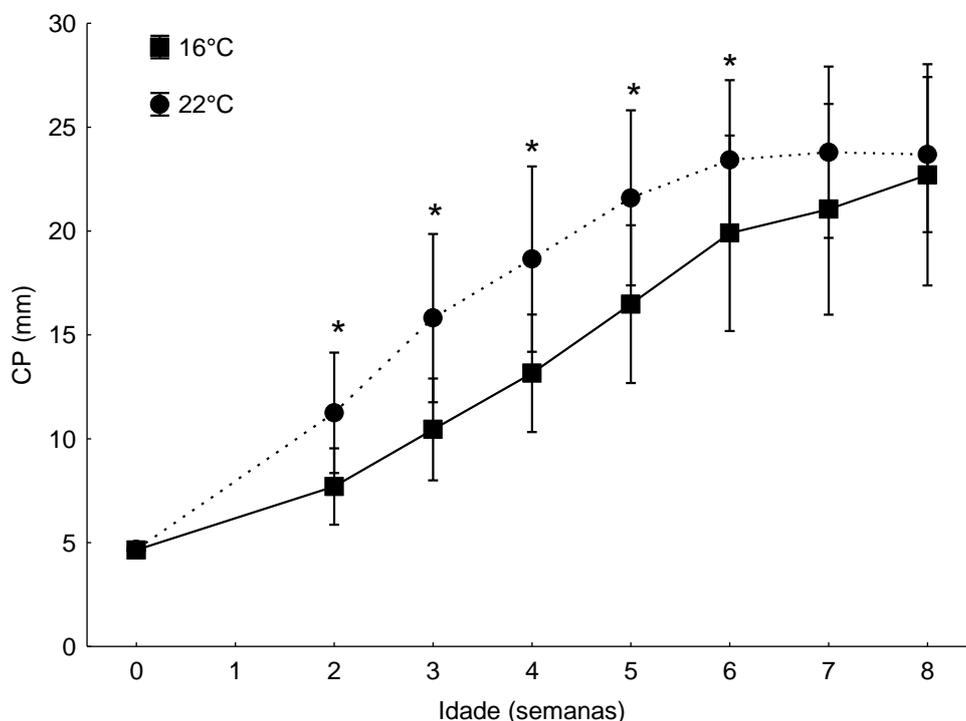


Figura 1. Comprimento padrão (média  $\pm$  desvio padrão) de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em laboratório à 16 e 22°C durante as primeiras oito semanas de vida. \* indica diferença significativa (“t” Student;  $p < 0,05$ ).

Os machos atingiram maior comprimento que as fêmeas ao longo de todo período experimental quando mantidos a 16°C, em contraste a similaridade de tamanho observada entre os sexos à 22°C (Figura 3).

Na terceira semana de estudos foram registrados os primeiros peixes com dimorfismo sexual na temperatura mais elevada, e na quarta semana foi constatada a maturação sexual das fêmeas, comprovada pelo comportamento reprodutivo e postura de ovos, enquanto na temperatura de 16°C os primeiros machos e fêmeas foram identificados apenas na quinta e sexta semana, respectivamente. Somente a partir da oitava semana foi observada a postura de ovos dos peixes mantidos em 16°C. Estes resultados demonstram precocidade no dimorfismo e maturidade sexual na temperatura mais elevada. Em ambos os tratamentos juvenis foram registrados até a sexta semana.

A idade e o comprimento padrão em que mais de 50% dos exemplares em cada tratamento atingiram o dimorfismo sexual foi alcançado pelas fêmeas na sétima semana e comprimento de  $17,08 \pm 2,15$  mm a  $16^{\circ}\text{C}$  e na quarta semana com  $21,38 \pm 2,15$  mm a  $22^{\circ}\text{C}$ . Para os machos, o dimorfismo foi alcançado na quinta semana a  $16^{\circ}\text{C}$  com  $20,45 \pm 2,17$  mm e na quarta semana a  $22^{\circ}\text{C}$  com  $21,31 \pm 4,33$  mm (Figura 4). Os resultados demonstram uma reduzida dispersão do comprimento médio das fêmeas se comparada a dos machos em ambos os tratamentos. Entretanto a média do coeficiente de variação do comprimento para os machos ( $17,89 \pm 2,30\%$ ) foi maior do que para as fêmeas ( $12,36 \pm 2,18\%$ ) apenas na temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$  (“t” teste;  $p < 0,0001$ ).

A relação de machos e fêmeas entre os tratamentos foi de 1:0,6 e 1:1,1 nas temperaturas de 16 e  $22^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Embora os peixes mantidos a  $22^{\circ}\text{C}$  tenham apresentado tendência a uma maior proporção na relação macho/fêmea, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos.

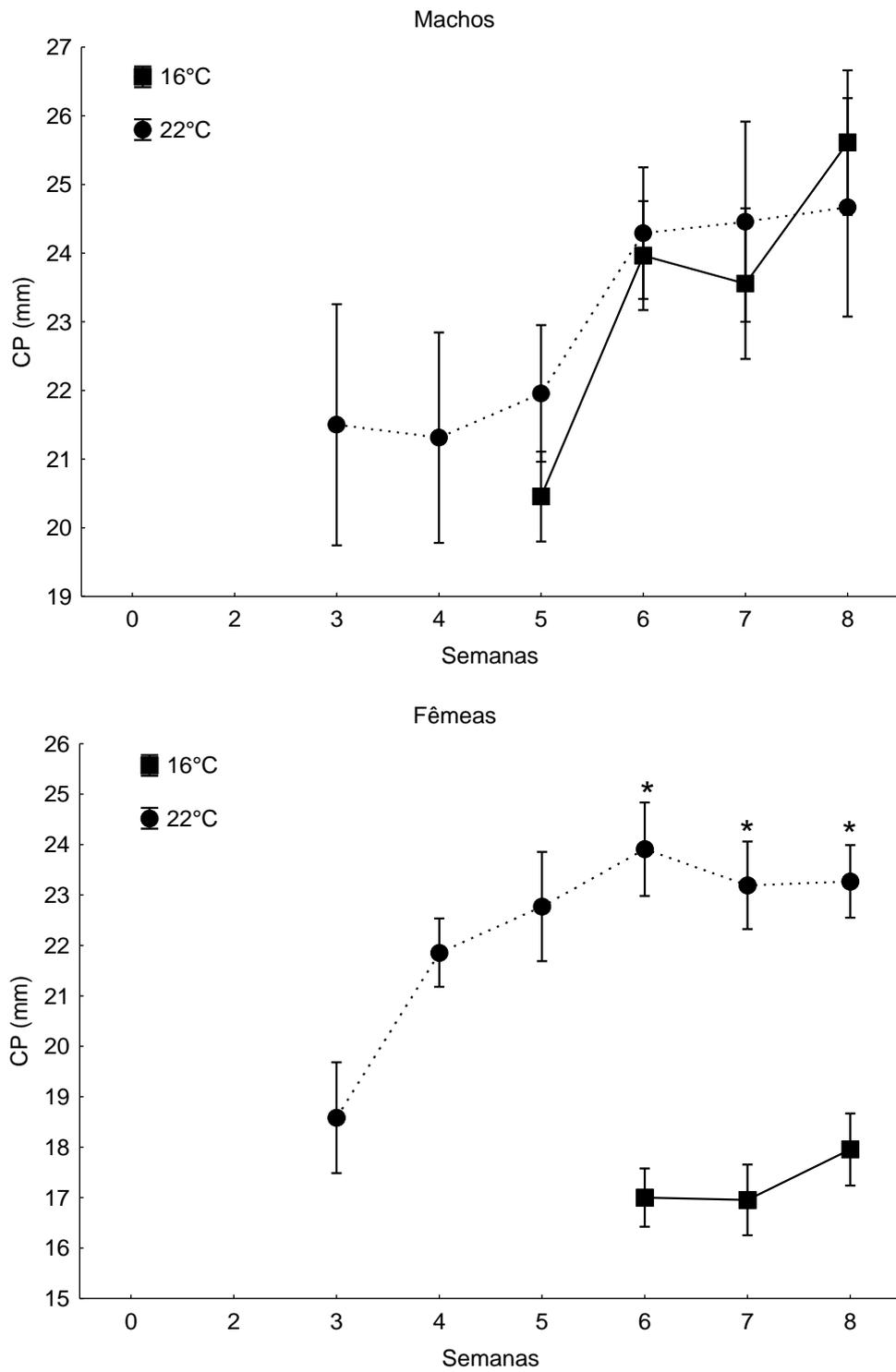


Figura 2. Crescimento de machos e fêmeas de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em laboratório sob temperaturas de 16 e 22 °C por oito semanas. Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento padrão. \* indica diferença significativa entre as médias (“t” Student;  $p < 0,05$ ).

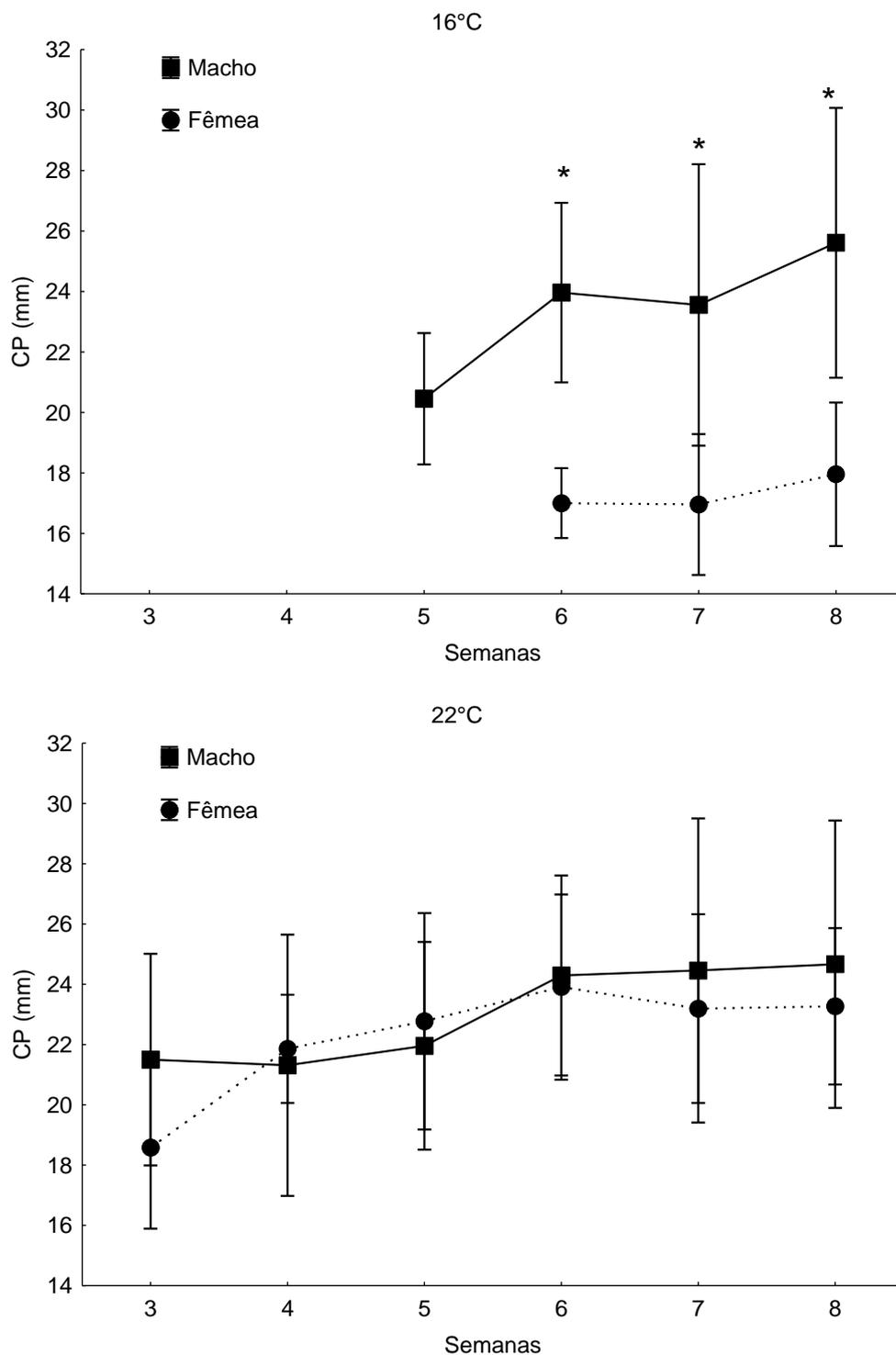


Figura 3. Crescimento de *Austrolebias nigrofasciatus* em laboratório sob temperaturas de 16 e 22 °C por oito semanas a partir da eclosão. Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento padrão. \* indica diferença significativa entre as médias (“t” Student;  $p < 0,05$ ).

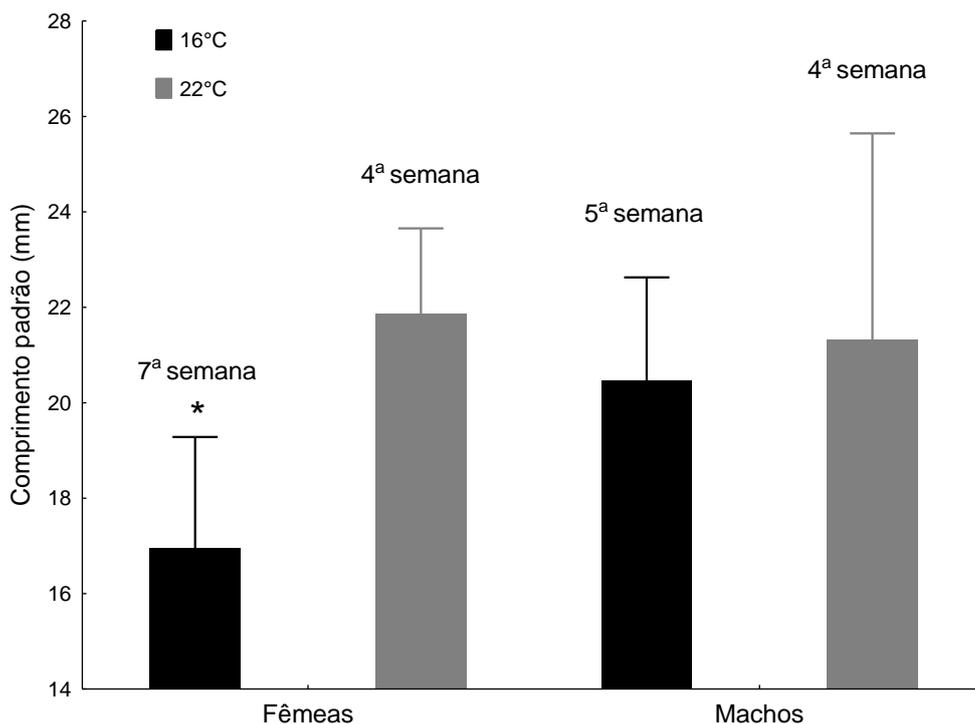


Figura 4. Efeito da temperatura sobre o comprimento padrão médio em que 50% dos exemplares de *Austrolebias nigrofasciatus* atingem dimorfismo sexual. \* indica diferença significativa entre os tratamentos (“t” Student;  $p < 0,05$ ).

## Discussão

Neste trabalho não foi observada mortalidade associada aos tratamentos, uma vez que, as mortes registradas ocorreram de forma acidental durante as biometrias. Entretanto, são conhecidos efeitos significativos da temperatura na mortalidade de outras espécies de *Austrolebias*. De acordo com Liu & Walford (1970) para *Austrolebias adloffii*, *Austrolebias bellottii* e *Austrolebias wolterstorffi* mantidas entre 20 e 22°C a taxa de 50% de mortalidade é alcançada entre 11 e 15 meses de vida em laboratório, enquanto que entre 15 e 16°C essa mesma taxa ocorre entre 20 e 27 meses. Esses mesmos autores registraram mortalidade natural somente a partir do sexto mês de criação, idade superior aquela máxima acompanhada neste trabalho.

O comprimento máximo já registrado para *A. nigrofasciatus* é 42,7 mm, sendo que os machos apresentam maior crescimento do que as fêmeas (Costa & Cheffe 2001). Tomando-se esse valor como referência observa-se que com

apenas dois meses de idade, *A. nigrofasciatus* alcança cerca de 60% de seu comprimento máximo em laboratório. De acordo com Liu & Walford (1969) esse rápido crescimento inicial é próprio das espécies de *Austrolebias*.

A relação da temperatura com a taxa de crescimento em peixes anuais foi observada também por Errea & Danulat (2001) que, no ambiente natural de *Austrolebias viarius*, relataram as maiores taxas de crescimento no início e final do ciclo de vida, justamente nos meses em que foram registradas as temperaturas mais elevadas. Estes autores, ao avaliar o efeito da temperatura no crescimento de *A. viarius* em laboratório, verificaram que os indivíduos mantidos a 25°C apresentam maior crescimento e maturidade sexual precoce quando comparados com aqueles criados a 15°C. Os resultados de Errea & Danulat (2001) contrastam com as observações feitas em laboratório por Walford & Liu (1965) para *A. adloffii*. Esta espécie quando mantida a 16 ou 22°C apresentou maior taxa crescimento e maior tamanho final na temperatura inferior. O mesmo ocorreu com *A. bellotti* e *A. wolterstorffi*, os quais, quando mantidos a 15°C, apresentaram maior crescimento que a 20°C (Liu & Walford 1970).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram maior crescimento inicial a 22°C, com efeito diferenciado em relação ao sexo. A maior temperatura testada propiciou maior crescimento inicial e diferenciação sexual fenotípica precoce para ambos os sexos. Entretanto, em 16°C o menor crescimento inicial observado nas fêmeas não se repetiu para os machos, os quais, ao longo de todo o período acompanhado, foram maiores que as fêmeas nesta temperatura. O maior crescimento dos machos foi observado também para *A. bellotti* (Liu et al. 1975) e *A. adloffii* (Walford & Liu 1965), bem como para *Cynopocilus melanotaenia* (Arenzon et al. 2001).

Conforme Liu & Walford (1969), para peixes anuais, temperaturas mais altas estimulam o crescimento das espécies apenas nas primeiras fases, enquanto que ao longo da vida temperaturas mais baixas favorecem o crescimento somático em função de retardarem o desenvolvimento das gônadas. Esses autores sugerem ainda que o reduzido tamanho das fêmeas deva estar associado ao investimento energético na produção dos ovos. Os resultados de Walford & Liu (1965) estão de acordo com esta afirmação ao demonstrarem que a ovoposição mensal de *Austrolebias adloffii* a 22°C foi muito elevada nos

primeiros meses após a puberdade e foi drasticamente reduzida nos meses restantes, em contraste a uma produção intermediária, porém mais homogênea a 16°C.

Independente da condição reprodutiva, Liu et al. (1975) relataram que a transferência de 22°C para 16°C resulta no incremento da taxa de crescimento de *A. bellotti*. De acordo com Liu & Walford (1970) e Liu et al. (1975), o maior crescimento dos peixes anuais em baixas temperaturas pode estar relacionado à maior eficiência da conversão alimentar nessas condições.

Embora não se tenha disponibilizado nos aquários qualquer tipo de substrato para a desova, a partir da quarta semana no tratamento de 22°C foi registrada a postura de ovos no fundo do aquário, evidenciando a maturidade sexual antecipada das fêmeas na temperatura mais elevada. Para aquelas mantidas em 16°C, os primeiros sinais de atividade reprodutiva foram observados apenas na oitava semana. A rápida maturidade sexual em peixes anuais também foi observada em estudos reprodutivos de *A. adloffii* por Walford & Liu (1965) e de *C. melanotaenia* por Arenzon et al. (1999), os quais observaram que estas espécies atingem a maturidade sexual após 6 a 8 semanas de vida, a primeira mantida em 22°C e a segunda em temperatura ambiente (17-25°C). A precocidade do dimorfismo nos machos também foi observada em *Austrolebias toba* por Calviño (2005), com as primeiras características sexuais secundárias tendo sido observadas com 21 dias pós-eclosão, seguida de atividade sexual de corte aos 24 dias, porém ainda não havendo desova, uma vez que as fêmeas nesta idade ainda não se encontravam maduras.

Foram registrados territorialismo e agressão entre os machos de *A. nigrofasciatus*, fato que não ocorreu com as fêmeas. De acordo com Belote & Costa (2004) o padrão geral de comportamento de *Austrolebias* é similar à maioria das outras espécies de Rivulidae, exceto pela ausência de brigas entre as fêmeas. A reduzida dispersão do comprimento médio das fêmeas se comparada a dos machos em ambos os tratamentos provavelmente reflita um fenômeno de pressão social por tamanho/hierarquia imposto durante um período mais prolongado pelos machos de maior porte que nesta temperatura mais elevada diferenciaram duas semanas antes em relação aqueles mantidos à 16°C.

Apesar de Arezo et al. (2007) demonstrarem histologicamente que a diferenciação sexual de *Austrolebias charrua* ocorre ainda na fase embrionária, foi observada maior proporção de machos de *A. nigrofasciatus* quando criados à 16°C, sugerindo possível influência da temperatura na determinação fenotípica do sexo, comum a muitos teleósteos (Devlin & Nagahama 2002). Em concordância a esta hipótese, Harrington (1967) relatou que o rivulídeo *Kryptolebias marmoratus*, o qual apresenta apenas 1% de machos em sua população natural na Flórida, pode ser induzido em laboratório a até 100% de machos por incubação e manutenção dos juvenis em baixa temperatura (19°C) e com uma maior variabilidade na proporção sexual pela manutenção de juvenis em temperatura elevada (30°C). Harrington (1968) aponta uma possível termolabilidade do sexo em juvenis de *K. marmoratus* e sugere que o efeito da temperatura na indução à diferenciação de machos pode constituir um sistema de determinação do sexo pelas condições ambientais.

Peixes anuais em geral estão expostos a acentuada flutuação das condições abióticas em seu habitat natural (Errea & Danulat 2001, Arenzon et al. 2002b). Frenkel & Goren (2000) estudando o efeito da temperatura sobre o crescimento do peixe anual *Aphanius dispar*, entre 18 e 27°C, demonstraram que este fator favorece o crescimento da espécie entre 18 e 23°C. Da mesma forma, estudos de efeito da temperatura no ciclo de vida de espécies de *Austrolebias* têm revelado que estas apresentam comprimento final maior em temperaturas entre 15-16°C se comparados a 20-22°C (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1970). A influência da temperatura no crescimento inicial de *A. nigrofasciatus* registrado neste estudo aponta para que este grupo de peixes apresente efeito diferenciado da temperatura associado ao sexo e ao crescimento inicial.

Neste trabalho, foi constatado o rápido crescimento inicial de *A. nigrofasciatus*, que resultou em dimorfismo sexual e maturação precoces na temperatura de 22°C, quando comparado a 16°C. Considerando essas informações, concluímos que juvenis a serem desenvolvidos em cativeiro devem ser mantidos a 22°C até os primeiros meses de idade, em prol do crescimento mais rápido até a puberdade.

## Agradecimentos

A João Xavier, Taise Wellwig, Lea Carolina Costa e Viviana Lisboa pelo auxílio em laboratório. A Luis Esteban Lanés pelas sugestões e revisão do manuscrito. Ao IBAMA/ICMBio pela licença de coleta expedida (15108-1). A CAPES (PROAP) pela bolsa concedida ao primeiro autor. L.A. Sampaio é Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq (processo 301673/2006-3).

## Referências bibliográficas

- Arenzon, A., A. C. Peret & M. B. C. Bohrer. 1999. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hydrobiologia* 411: 65-70.
- Arenzon, A., A. C. Peret & M. B. C. Bohrer. 2001. Growth of the annual fish *Cynopoecilus melanoaenia* (Regan, 1912) based in temporary water body population in Rio Grande do Sul state, Brasil (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Revista Brasileira de Biologia* 61(1): 117-123.
- Arenzon, A., C. A. Lemos & M. B. C. Bohrer. 2002a. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* 62(4B): 743-747.
- Arenzon, A., C. A. Lemos & M. B. C. Bohrer. 2002b. Culture Parameters of the Annual Fish, *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan, 1912) Based on a Temporary Water Body Characteristics (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Journal of The Americam Killifish Association*. 35(5): 133-136.
- Arenzon, A., R. F. Pinto, Colombo, P. & M. T. Raya-Rodriguez. 2003. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 22 (9): 2188-2190.
- Arezo, M. J., S. D'Alessandro, N. Papa, R. Sá & N. Berois. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39: 89-98.

- Bellote, D. F. & W. J. E. M. Costa. 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.
- Brett, J.R. & T.D.D. Groves. 1979. Physiological energetics. Pages 559-675. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R, editors. Bioenergetics and Growth. Fish Physiology, vol. VIII. Academic Press, London.
- Calviño, P.A. 2005. *Austrolebias toba* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), uma especie nueva de pez anual de la Argentina. Rev. Mus. Argentino Ciec. Nat. 7(2):183-190.
- 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. & M. M. Cheffe. 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). Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS 14 (2): 179-200.
- Devlin, R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208: 191-364.
- Errea, A. & E. Danulat. 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. Environmental Biology of Fishes 61: 261–268.
- Frenkel, V. & M. Goren. 2000. Factors affecting growth of killifish, *Aphanius dispar*, a potential biological control of mosquitoes. Aquaculture 184: 255–265.
- Harrington, R. W. Jr. 1967. Environmentally controlled induction of primary male gonochorists from eggs of the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. Biol. Bull. 132: 174-199.
- Harrington, R.W. Jr. 1968. Delimitation of the thermolabile phenocritical period of sex determination and differentiation in the ontogeny of the normally hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. Physiol. Zool. 41: 447-460.

- 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. & R.L.Walford. 1969. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish *Cynolebias bellottii* Steindachner. *Zoologica* 54: 1–16.
- Liu, R. K. & Walford, R. L. 1970, Observations on the lifespans several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. *Experimental Gerontology* 5: 241-246.
- Liu, R. K.; Leung, E. & Walford, R. L. 1975. Effect of temperature transfer on growth of laboratory populations of a south American annual fish *Cynolebias bellotti*. *Growth* 39: 337-343.
- Podrabsky, J. E. & S. Hand. 1999. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *The Journal of Experimental Biology* 202: 2567-2580.
- Reis, R. E., Z. M. S. Lucena, C. A. S. Lucena & L. R. Malabarba. 2003. Peixes. In: Fontana, C. S., G. A. Bencke & R. E. Reis (eds.). *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 632 pp.
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra de Soriano & J. S. Señorans. 1966. Integracion de La fauna de vertebrados em algunas masas de agua dulce temporales del Uruguay. *Comp. Trab. Dpto. Zool. Vert.* 25: 1- 16.
- Walford, R. L. & R. K. Liu. 1965, Husbandry, life-span and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii*. *Experimental Gerontology* 1: 161-171.

## CÁPITULO II

### **Fecundidade do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe (Cyprinodontiformes, Rivulidae) mantido em diferentes temperaturas sob condições de laboratório**

Co-autores: Luis André Sampaio & Ricardo Berteaux Robaldo

*[A ser submetido ao periódico Environmental Biology of Fishes]*

**Environmental Biology of Fishes**

**Fecundidade do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe (Cyprinodontiformes, Rivulidae) mantido em diferentes temperaturas sob condições de laboratório**

Volcan, M.V.<sup>a,b</sup>, Sampaio, L. A.<sup>a</sup> & Robaldo, R.B.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>*Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Email: matheusvolcan@hotmail.com*

<sup>b</sup>*Instituto Pró-Pampa (IPPampa), Laboratório de Ictiofauna. Av. Adolfo Fetter, 1112, bairro Recanto de Portugal Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 96083-000*

<sup>c</sup>*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)*

## Resumo

O peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* é uma espécie endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim e está sob ameaça de extinção. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito da temperatura na fecundidade de *A. nigrofasciatus* em laboratório. Doze casais foram mantidos durante cinco semanas em aquários de 30 L nas temperaturas de 17, 21 e 25°C, com quatro repetições cada. A média da fecundidade semanal por grama de fêmea foi de 30±15; 32±10 e 38±19 para 17, 21 e 25°C, respectivamente, sem apresentar diferença significativa entre os tratamentos. Ao término do experimento, a fecundidade semanal acumulada também não diferiu entre os tratamentos e apresentou média de 150±49, 159±3 e 190±56 para 17, 21 e 25°C, respectivamente. Durante o período experimental não foi observado efeito da temperatura no crescimento dos machos, porém para as fêmeas foi observado crescimento significativo em todos os tratamentos com os melhores resultados encontrados em 17 e 21°C. O fator de condição corporal dos peixes foi inferior na temperatura de 25°C demonstrando tendência ao balanço energético desfavorável com o aumento da temperatura. Os resultados obtidos apontam para que temperaturas entre 17 e 21°C estejam em uma amplitude térmica adequada para a manutenção de reprodutores da espécie.

*Palavras chave:* reprodução, cativo, peixe anual, sistema lagunar Patos-Mirim.

## **Abstract**

The annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* is an endemic species of the Patos-Mirim lagoon system and is under threat of extinction. This study aimed to determine the effect of temperature on the fecundity of *A. nigrofasciatus* in the laboratory. Thus, 12 couples were divided into 30 L aquaria, providing treatments, 17, 21 and 25°C, with four replicates each, for five weeks. As a result, the weekly average of eggs per gram of female was  $30\pm 15$ ,  $32\pm 10$  and  $38\pm 19$  to 17, 21 and 25°C, respectively. There were no significant differences between treatments. At the end of five weeks the average number of eggs was  $150\pm 49$ ,  $159\pm 3$  and  $190\pm 56$  for the treatments of 17, 21 and 25°C, respectively. During the experimental period was not observed effect of temperature on growth of males, but for females it was observed significant growth in all treatments with the best results in 17 and 21°C. The body condition factor was reduced to 25°C showing tendency to negative energy balance with increasing temperature. The results indicate that temperatures between 17 and 21°C are in a suitable temperature range for brood stock maintenance.

*Key words:* breeding, captivity, annual fish, Patos-Mirim lagoon system.

## Introdução

Peixes anuais são definidos como um grupo que habita exclusivamente ambientes aquáticos sazonais em várias partes da América do Sul e da África (Costa 2008). Eles fazem parte dos Cyprinodontiformes e todas as espécies registradas no Brasil pertencem à Rivulidae. O Rio Grande do Sul registra dois gêneros para essa família, *Austrolebias* Costa e *Cynopoecilus* Regan, com maior representatividade do primeiro. *Austrolebias* compreende um diversificado clado de peixes anuais que habitam ambientes formados durante a estação chuvosa no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Em contraste com outros peixes anuais restritos geograficamente a áreas quentes tropicais de várias partes do mundo, a maioria das espécies de *Austrolebias* é endêmica de áreas de clima temperado, onde as estações de chuva ocorrem nos meses mais frios, conseqüentemente, sendo encontrados também em águas frias (Costa 2006).

A seca do ambiente causa a morte da população adulta de *Austrolebias*. Entretanto, os seus ovos permanecem vivos, enterrados no substrato com seu desenvolvimento estacionado (Podrabsky & Hand 1999). Com a chegada da próxima estação chuvosa os ovos eclodem e uma nova geração é formada. As larvas crescem rapidamente, apresentando as maiores taxas de crescimento nos primeiros dois meses de vida, atingindo maturidade sexual precocemente em cerca de 6-8 semanas, onde irão desovar por toda vida (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1969, 1970, Arenzon et al. 1999).

Pesquisas realizadas com rivulídeos têm demonstrado que estes organismos apresentam peculiaridades que os apontam como excelentes modelos biológicos, quais sejam: os ovos podem ser estocados por vários meses em condições de laboratório, garantindo estoques de exemplares de mesma origem, mesmo fora do período reprodutivo da espécie; são facilmente mantidos em laboratório, onde reproduzem diariamente, garantindo uma soma significativa de ovos (Arenzon et al. 1999, 2002, 2003), além de serem considerados bons indicadores de qualidade ambiental (Arezo et al. 2007).

Os representantes de *A. nigrofasciatus* apresentam pequeno porte e são endêmicos do sistema lagunar Patos-Mirim no extremo sul do Rio Grande do Sul. O avançado grau de degradação das áreas úmidas, aliado ao fato das

espécies apresentarem restrita área de distribuição, faz com que no Rio Grande do Sul a maioria das espécies de peixes anuais seja considerada ameaçada de extinção. De toda ictiofauna sob risco de extinção no Estado, 39% são Rivulidae (Reis et al. 2003). Inserida neste contexto, *A. nigrofasciatus*, se encontra sob risco de extinção, na categoria “Em Perigo”.

O sucesso reprodutivo de uma espécie depende de onde e quando ela se reproduz e dos recursos alocados para essa finalidade (Wootton 1990), sendo determinado, em última instância, pela capacidade de seus integrantes reproduzirem-se em ambientes variáveis, mantendo populações viáveis (Vazzoler 1996). As espécies de peixes anuais apresentam desova parcelada e reproduzem ao longo de toda a sua vida após atingirem a maturidade sexual (Liu & Walford 1969, Shibatta 2005). Neste grupo de peixes o desenvolvimento gonadal só é interrompido pela sua morte no período de seca da área úmida (Arenzon et al. 1999), contabilizando uma quantia significativa de ovos estocados no substrato ao final do período reprodutivo.

Os peixes apresentam temperatura ótima para sobrevivência, crescimento e reprodução (Handeland et al. 2008). Diversos estudos têm revelado que a temperatura exerce grande influência no ciclo de vida dos peixes anuais, atuando desde o desenvolvimento embrionário (Arenzon et al. 2002), longevidade (Walford & Liu 1965, Liu & Walford 1970) e sobrevivência (Errea & Danulat 2001).

Portanto, o conhecimento das melhores condições ambientais para manutenção de reprodutores em cativeiro, é necessário para estudos que visem manter a espécie através da produção de ovos em cativeiro. Por *A. nigrofasciatus* ser uma espécie ameaçada de extinção, o conhecimento de técnicas e subsídios para a sua criação, permite aportar estratégias para os planos de sua conservação. Uma das etapas para iniciar a criação é ter o domínio da reprodução em cativeiro, sendo importante o conhecimento das condições ambientais apropriadas para a manutenção de reprodutores em laboratório. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi conhecer o efeito da temperatura na fecundidade de *A. nigrofasciatus*.

## Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura Continental da Universidade Federal do Rio Grande. Os reprodutores utilizados no estudo foram capturados em uma área úmida localizada no campus da Universidade Federal de Pelotas (31°48'25"S: 52°25'11"W), Rio Grande do Sul, sob licença de coleta do IBAMA/ICMBio nº15108-1. Para avaliar o efeito da temperatura na fecundidade, foram testadas temperaturas de 17, 21 e 25°C. Foram dispostos um casal por aquário, sendo quatro repetições para cada temperatura. Cada unidade experimental possuía volume de 30L. Os aquários foram mantidos em sala climatizada a 16°C e para o controle da temperatura foram utilizados aquecedor (20 W) e termostato digital (Aquaterm® /0,1°C). O experimento teve duração de cinco semanas.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (12 e 20h) com zooplâncton, constituído basicamente por copépodes e cladóceros, produzidos em viveiro escavado, mediante adubação orgânica, de forma que fossem encontrados exemplares vivos nos aquários no dia seguinte. Utilizou-se aeração constante e fotoperíodo de 12h. Para mitigação do estresse do cativeiro e auxílio na manutenção da qualidade da água foram utilizados exemplares da macrófita submersa *Ceratophyllum demersum* L.. Todas as unidades apresentavam ninhos artificiais para desova constituídos de pote plástico translúcido (20 X 15 X 5cm) com 40g de fio de lã acrílica preta como substrato para postura, entrelaçada sobre sacos de tela de nylon (2mm) contendo 100 g de fibra de coco moída como fonte de substâncias húmicas para manutenção da qualidade dos ovos. Semanalmente foi realizada a triagem da lã e a separação dos ovos.

A fecundidade foi determinada pelo número de ovos postos pelas fêmeas a cada semana e pelo somatório destes, determinando o número total de ovos ao final do experimento. Para a padronização dos dados referentes a fecundidade todos os valores estão relacionados ao peso úmido das fêmeas, sendo apresentados como número de ovos/g de fêmea. Diariamente foram verificados a temperatura (0,01°C), o pH (Solar SL110; 0,01) e a concentração de oxigênio dissolvido (Oxímetro YSI-55; 0,01 mg/L), com posterior renovação de aproximadamente 20% do volume do aquário. A temperatura média dos tratamentos foi de 17,1±0,16; 21,23±0,32 e 25,07±0,29°C; o pH apresentou

valores médios de  $7,87 \pm 0,07$ ;  $7,81 \pm 0,07$  e  $7,76 \pm 0,05$ ; e o oxigênio dissolvido de  $9,07 \pm 0,39$ ;  $8,02 \pm 0,28$  e  $7 \pm 0,26$  para 17, 21 e 25°C, respectivamente. Ao contrário do pH, as concentrações médias de oxigênio dissolvido apresentaram diferenças significativas entre os três tratamentos (ANOVA; Tukey;  $\alpha=5\%$ )

Foram realizadas biometrias nos reprodutores ao início e final do estudo, com auxílio de paquímetro (0,01mm) e balança digital (0,01 g). O crescimento dos reprodutores foi acompanhado determinando-se a taxa de crescimento específico (TCE) pela equação:  $TCE = (\ln C_f - \ln C_i) / (t_f - t_i) \times 100$ ; onde  $C_f$  representa o comprimento padrão final,  $C_i$  o comprimento padrão inicial e  $(t_f - t_i)$  o período acompanhado em dias. Para o cálculo da TCE em peso foi empregada a mesma equação considerando-se o peso inicial ( $P_i$ ) e final ( $P_f$ ).

O fator de condição ( $K$ ) foi calculado pela razão entre o peso corpóreo e o comprimento padrão (CP), elevado ao expoente 2,4, representado pela seguinte equação:  $K = (P/CP^{2,4}) \times 10^4$  onde CP representa o comprimento padrão (mm) P o peso (g) dos reprodutores. Este expoente foi calculado pela relação entre o  $\text{Log}_{10}(\text{CP})$  e  $\text{Log}_{10}(P)$  dos exemplares no início do experimento.

Os dados referentes à fecundidade foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão e testados mediante ANOVA (uma via). Os pressupostos para a ANOVA foram avaliados pelo teste de Cochran e pelo contraste entre os valores observados e os esperados para uma distribuição normal. Diferenças significativas entre médias foram determinadas pelo emprego do teste de Tukey. Diferenças dentro dos tratamentos entre os valores médios iniciais e finais do fator de condição e das variáveis relativas ao crescimento em comprimento e peso foram avaliadas mediante teste “t” de Student. Todos os contrastes foram realizados sob um nível de significância de 95%.

## **Resultados**

Durante o período experimental foi registrado crescimento significativo apenas para as fêmeas mantidas nas temperaturas de 17 e 21°C (Tabela 1). A TCE em comprimento não apresentou efeito significativo da temperatura, porém demonstrou tendência inversa com esta variável para as fêmeas, o que foi confirmado pela diferença observada na TCE em peso (Tabela 1). O fator de

condição corporal foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) para as fêmeas mantidas em 17 do que daquelas criadas a 25°C (Tabela 1).

*Tabela 1.* Valores médios de comprimento padrão (mm) inicial (CPI) e final (CPf), peso (g) inicial (Pi) e final (Pf), fator de condição corporal inicial (Ki) e final (Kf) e taxa de crescimento específico (TCE %/dia) em comprimento (CP) e peso (P) de machos e fêmeas de *Austrolebias nigrofasciatus*, mantidos sob condições de laboratório durante cinco semanas. Letras minúsculas significam diferença entre as médias dentro dos tratamentos (“t” Student;  $\alpha = 5\%$ ); letras maiúsculas representam diferenças ente os tratamentos (ANOVA; Tukey;  $\alpha = 5\%$ ).

Variável	Machos			Fêmeas		
	17°C	21°C	25°C	17°C	21°C	25°C
CPI	34±2,16 <sup>Aa</sup>	35±1,82 <sup>Aa</sup>	34,5±3,41 <sup>Aa</sup>	30±1,41 <sup>Aa</sup>	33±2,44 <sup>Aa</sup>	30,25±1,25 <sup>Aa</sup>
CPf	35,25±2,36 <sup>Aa</sup>	36±1,41 <sup>Aa</sup>	37,5±2,12 <sup>Aa</sup>	35,75±1,25 <sup>ABb</sup>	37,25±1,5 <sup>Bb</sup>	33,25±1,89 <sup>Ab</sup>
Pi	1,03±0,2 <sup>Aa</sup>	1,2±0,26 <sup>Aa</sup>	1,13±0,32 <sup>Aa</sup>	0,79±0,09 <sup>Aa</sup>	0,95±0,18 <sup>Aa</sup>	0,83±0,15 <sup>Aa</sup>
Pf	1,34±0,27 <sup>Aa</sup>	1,39±0,28 <sup>Aa</sup>	1,33±0,13 <sup>Aa</sup>	1,35±0,08 <sup>Ab</sup>	1,38±0,1 <sup>Ab</sup>	1,01±0,12 <sup>Ba</sup>
TCE <sub>CP</sub>	0,14±0,24 <sup>A</sup>	0,08±0,07 <sup>A</sup>	0,19±0,05 <sup>A</sup>	0,5±0,15 <sup>A</sup>	0,35±0,17 <sup>A</sup>	0,26±0,18 <sup>A</sup>
TCE <sub>P</sub>	0,77±0,40 <sup>A</sup>	0,42±0,34 <sup>A</sup>	0,56±0,23 <sup>A</sup>	1,55±0,30 <sup>A</sup>	1,10±0,50 <sup>AB</sup>	0,60±0,45 <sup>B</sup>
Ki	2,16±0,32 <sup>Aa</sup>	2,34±0,23 <sup>Aa</sup>	2,16±0,25 <sup>Aa</sup>	2,24±0,15 <sup>Aa</sup>	2,13±0,11 <sup>Aa</sup>	2,28±0,18 <sup>Aa</sup>
Kf	2,58±0,21 <sup>Aa</sup>	2,54±0,37 <sup>Aa</sup>	2,26±0,53 <sup>Aa</sup>	2,53±0,15 <sup>Ab</sup>	2,34±0,06 <sup>ABb</sup>	2,25±0,16 <sup>Ba</sup>

As fêmeas de *A. nigrofasciatus*, apresentaram posturas médias de 30±15; 32±10 e 38±19 por semana para 17, 21 e 25°C, respectivamente. Na segunda semana a fecundidade das fêmeas mantidas a 25°C foi maior ( $p < 0,05$ ) do que daquelas criadas a 17°C, enquanto que na quinta semana este resultado foi inverso (Figura 1). Ao final de cinco semanas a fecundidade total não diferiu estatisticamente e foi de 150±49 159±3 e 190±56 para os tratamentos de 17, 21 e 25°C, respectivamente (Figura 2), onde não diferiram estatisticamente.

O coeficiente de variação da fecundidade semanal média não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, porém apresentou uma tendência de redução a 21°C e de aumento a 17°C. Já o coeficiente de variação da fecundidade média acumulada por temperatura foi significativamente menor a 21°C (Figura 3).

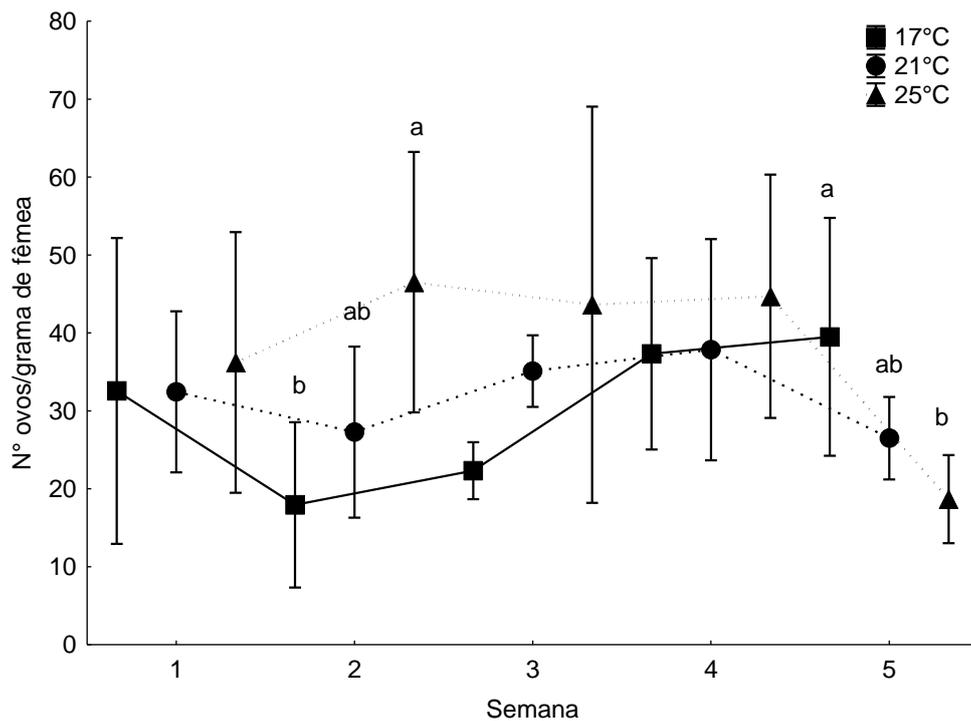


Figura 1. Efeito da temperatura sobre a fecundidade semanal (média±DP) de *Austrolebias nigrofasciatus* durante um período de cinco semanas. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA; Tukey;  $\alpha=5\%$ ).

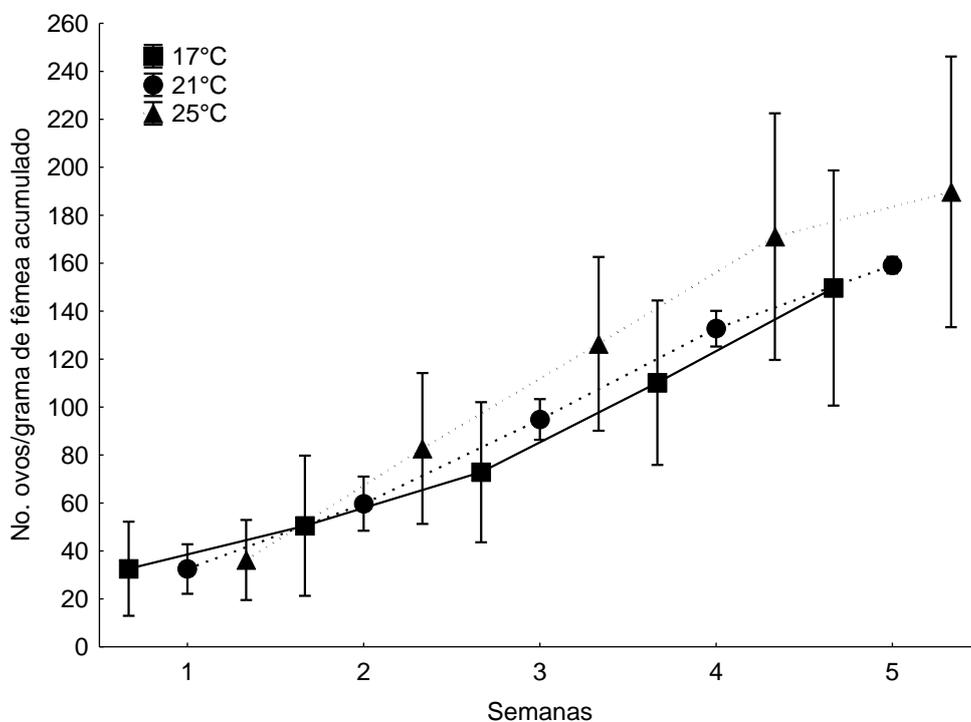


Figura 2. Efeito da temperatura sobre a fecundidade semanal acumulada de *Austrolebias nigrofasciatus*. Não foram observadas diferenças significativas (ANOVA; Tukey;  $\alpha=5\%$ ).

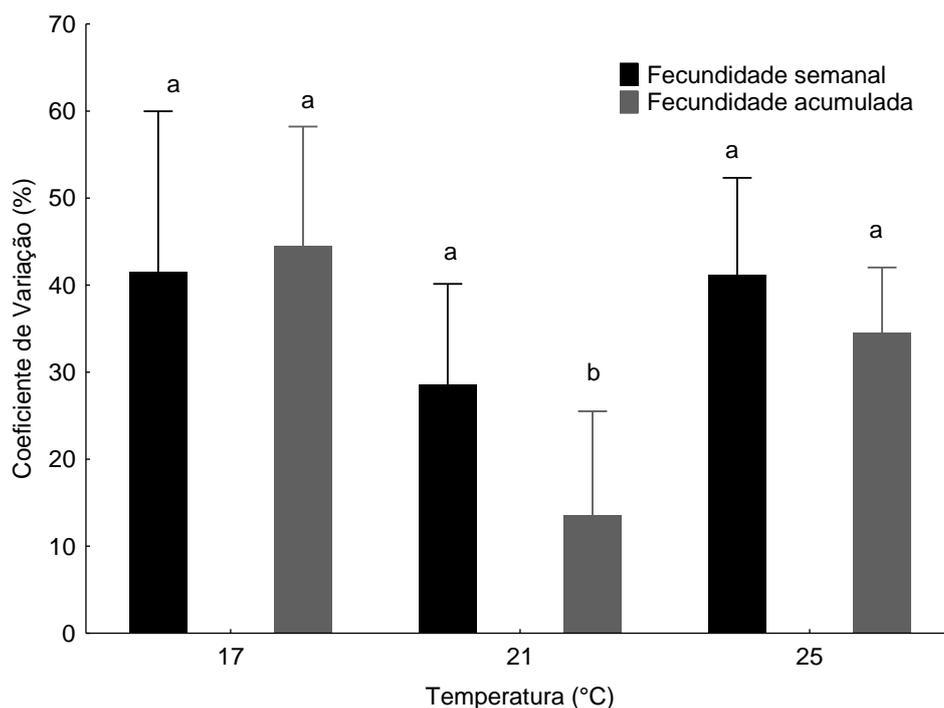


Figura 3. Média ( $\pm$ desvio padrão) do coeficiente de variação da fecundidade semanal e fecundidade semanal acumulada de *Austrolebias nigrofasciatus* sob três diferentes temperaturas ao longo de cinco semanas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias (ANOVA; Tukey;  $\alpha=5\%$ ).

## Discussão

A temperatura ótima para o crescimento e sobrevivência de peixes pode mudar com a idade e comprimento. Juvenis de várias espécies preferem temperaturas mais elevadas do que os adultos (McCauley & Huggins 1979, Handeland et al. 2003). Para peixes anuais, Liu & Walford (1969) afirmam que temperaturas elevadas estimulam o crescimento apenas nas primeiras fases da vida, enquanto que temperaturas mais baixas favorecem o crescimento de indivíduos maduros em função de retardarem o desenvolvimento das gônadas e também possivelmente por promoverem maior eficiência da conversão alimentar nessas condições (Liu & Walford 1970, Liu et al. 1975).

Neste estudo as fêmeas mantidas nas temperaturas mais baixas apresentaram peso e fator de condição corporal ( $K$ ) superiores aquelas mantidas na temperatura mais elevada. Este fator estabelece a relação entre o peso e o comprimento dos indivíduos e prevê um índice freqüentemente

utilizado para quantificar a condição de saúde em peixes. As mudanças do valor de  $K$  podem indicar variações do estado de maturação gonadal e da eficiência com a qual os peixes se alimentam e convertem o alimento em ganho de peso (Wootton 1990). O menor peso e fator de condição das fêmeas mantidas a 25°C, aliado ao decréscimo na produção de ovos na última semana, sinalizam para uma condição desfavorável à manutenção de reprodutores na temperatura elevada. Liu & Walford (1965) demonstraram que fêmeas de *A. adloffii* mantidas a 22°C por um período de 12 meses realizaram a postura de mais de 90% do total de ovos nos três primeiros meses, o que implicou em acentuada perda de peso das fêmeas nesta condição. Conforme Liu & Walford (1969), para fêmeas de peixes anuais uma grande percentagem do peso é determinada pelo número e estado de desenvolvimento dos óvulos, sendo estes, fatores que por sua vez, dependem da desova ou freqüência de acasalamento. Utilizando os dados de produção de ovos de uma população de *Austrolebias bellotti*, os mesmos autores calcularam que a massa de ovos produzidos em um mês pode representar aproximadamente 30% do peso corporal de uma fêmea. No presente estudo, em contraste a estes resultados anteriores, o menor peso e fator de condição das fêmeas não pôde ser explicado pelo suposto efeito da temperatura elevada no aumento da produção de ovos, uma vez que a fecundidade não diferiu entre os tratamentos.

Ao comparar a ovoposição semanal de *A. nigrofasciatus* com espécies de peixes anuais foram observados valores dentro da amplitude registrada para outros rivulídeos. Ao reproduzir *Simpsonchthys boitonei* em laboratório, Shibatta (2005) obteve 84 ovos, a partir de nove casais durante três dias de ensaio, com produção de 2 a 15 ovos por casal. Liu & Walford (1969) observaram para *A. bellotti* fecundidade média semanal de 21,5 ovos por fêmea. Entretanto, de acordo com os mesmos autores, ensaios de reprodução com os peixes oriundos desses ovos não foram bem sucedidos, registrando no primeiro mês de experimento fecundidade de 4,3 ovos por fêmea. Esta baixa fecundidade foi atribuída pelos autores à limitação na oferta de alimento. Para *Austrolebias toba*, Calviño (2006) contabilizou 230 ovos ao manter um macho e duas fêmeas em laboratório durante 15 dias de estudo sob variação de temperatura entre 16 e 22°C, apresentando uma média de 57,5 ovos por fêmea a cada semana.

O efeito da temperatura na fecundidade foi observado também para *Austrolebias adloffii*, por Walford & Liu (1965), os quais obtiveram médias para o primeiro mês de experimento de 18 e 38,3 ovos por fêmea para os tratamentos de 16 e 22°C, respectivamente. Os mesmos autores registraram fecundidade nos peixes mantidos a 22°C aproximadamente três vezes maior que os da temperatura inferior ao final de três meses de experimento. Entretanto, apesar da produção de ovos ser reduzida em 16°C, as fêmeas apresentaram médias mensais mais homogêneas, enquanto que na população da temperatura mais elevada ocorreu acentuado decréscimo na produção após o pico reprodutivo, com fecundidade média inferior a dois ovos/mês. Nesse estudo o único evento de redução na fecundidade foi associado a temperatura mais elevada, porém constatado apenas na última semana de experimento. Outro efeito desfavorável de temperatura elevada na reprodução de peixes anuais foi apontado por Arenzon et al. (2002), os quais observaram que todos os ovos de *Cynopoeilus melanotaenia* mantidos em 25°C geraram juvenis com más formações morfológicas, inviabilizando sua sobrevivência.

Na aquariofilia, a reprodução de peixes anuais geralmente é realizada com a manutenção de um macho para duas fêmeas, diferentemente do empregado neste estudo. Embora o comportamento durante o processo reprodutivo não tenha sido metodologicamente acompanhado, observou-se que quando se mantém um casal por unidade, o macho corteja a fêmea de forma constante e eventualmente a agride caso esta não demonstre interesse. A disposição de duas fêmeas para um macho, como foi utilizado para ensaios de reprodução com outras espécies de Rivulidae (Liu & Walford 1969, Calviño 2005), talvez amenize a pressão exercida sobre a fêmea, possibilitando maior intervalo de tempo entre as desovas.

Ao verificar os parâmetros físico-químicos do charco onde foram capturados os reprodutores (entre julho e novembro de 2008), observamos que dentre os fatores abióticos acompanhados a temperatura foi o fator que mais sofreu variação, onde registramos em intervalo de apenas 24 horas flutuação de 20°C (9-29°C) com temperatura mínima registrada de 9°C em outubro e máxima de 42°C em novembro (dados não publicados). Essa ampla flutuação de temperatura também foi registrada por outros autores para pequenas áreas úmidas sazonais (Vaz-Ferreira et al. 1966, Errea & Danulat 2001). A

similaridade observada na produção de ovos entre os tratamentos neste estudo pode refletir a adaptação destes peixes frente à elevada amplitude térmica registrada em seu ambiente natural.

Os resultados obtidos demonstram que a fecundidade semanal e a produção total de ovos, de maneira geral, não foram influenciadas pela temperatura, porém foi observada maior homogeneidade na produção de ovos ao longo do experimento nas temperaturas reduzidas e ao mesmo tempo evidências de balanço energético desfavorável nas fêmeas mantidas na temperatura mais elevada. Desta forma, considerando-se a amplitude térmica avaliada, conclui-se que a reprodução de *Austrolebias nigrofasciatus* em cativeiro deva ser realizada em temperaturas entre 17 e 21°C.

### **Agradecimentos**

A João Xavier, Taise Wellwig, Lea Carolina Costa e Viviana Lisboa pelo auxílio em laboratório. A Luis Esteban Lanés pelas sugestões e revisão do manuscrito. Ao IBAMA/ICMBio pela licença de coleta expedida (15108-1). A CAPES (PROAP) pela bolsa concedida ao primeiro autor. L.A. Sampaio é Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq (processo 301673/2006-3).

### **Referências bibliográficas**

- Arenzon, A., A. C. Peret & M. B. C. Bohrer. 1999. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hydrobiologia* 411: 65-70.
- Arenzon, A., C. A. Lemos & M. B. C. Bohrer. 2002. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* 62(4B): 743-747.
- Arenzon, A., R. F. Pinto, Colombo, P. & M. T. Raya-Rodriguez. 2003. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9): 2188-2190.

- Arezo, M. J., S. D'Alessandro, N. Papa, R. Sá & N. Berois. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39: 89-98.
- Bellote, D. F. & W. J. E. M. Costa. 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.
- Calviño, P. 2005. *Austrolebias toba* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), una especie nueva de pez anual de la Argentina. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.* 7(2): 188-190.
- 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
- Costa, W. J. E. M. & M. M. Cheffe. 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). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS* 14 (2): 179-200.
- Errea, A. & E. Danulat. 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes* 61: 261–268.
- Ferrer, J., L. R. Malabarba & W. J. E. M. Costa. 2008. *Austrolebias paucisquama* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), a new species of annual killifish from southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6(2):175-180.
- Fletcher, M., A. Teklehaimanot & G. Yemane. 1992. Control of mosquito larvae in the port city of Assab by an indigenous larvivorous fish *Aphanius dispar*. *Acta Tropical* 52: 155–166.
- Frenkel, V. & M. Goren. 2000. Factors affecting growth of killifish, *Aphaniusdispar*, a potential biological control of mosquitoes. *Aquaculture* 184: 255–265.

- García, D., M. Loureiro & B. Tassino. 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology* 6(2): 243-248
- Handeland, S. O., B. Björnsson, A. M. Th. Arnesen & S. O. Stefansson. 2003. Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of wild and farmed strains. *Aquaculture* 220: 367-384.
- 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. & R.L.Walford. 1969. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish *Cynolebias bellottii* Steindachner. *Zoologica* 54: 1–16.
- Liu, R. K. & Walford, R. L. 1970, Observations on the lifespans several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. *Experimental Gerontology* 5: 241-246.
- Liu, R. K.; Leung, E. & Walford, R. L. 1975. Effect of temperature transfer on growth of laboratory populations of a south American annual fish *Cynolebias bellotti*. *Growth* 39: 337-343.
- Mc Cauley, R. W. & N. W. Huggins. 1979. Ontogenetic and non-thermal seasonal effects on preferenda of fish. *Am. Zool.* 19: 267-271.
- Podrabsky, J. E. & S. Hand. 1999. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *The Journal of Experimental Biology* 202: 2567-2580.
- Reis, R. E., Z. M. S. Lucena, C. A. S. Lucena & L. R. Malabarba. 2003. Peixes. In: Fontana, C. S., G. A. Bencke & R. E. Reis (eds.). Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 632 pp.
- Shibatta, O. 2005. Reprodução do pirá-brasília, *Simpsonichthys boitonei* Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae), e caracterização de seu habitat na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(4): 1146-1151.
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra de Soriano & J. S. Señorans. 1966. Integracion de La fauna de vertebrados em algunas masas de agua dulce temporales del Uruguay. *Comp. Trab. Dpto. Zool. Vert.* 25: 1- 16.

- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: EDUEM. 169 pp.
- Walford, R. L. & R. K. Liu. 1965, Husbandry, life-span and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii*. *Experimental Gerontology* 1: 161-171.
- Wootton, R.J. 1990. Ecology of Teleost Fishes. Chapman & Hall, London. 404 pp.

## DISCUSSÃO GERAL

O comprimento máximo já registrado para *A. nigrofasciatus* foi de um macho de 42,7 mm (Costa & Cheffe 2001). Tomando-se esse valor como referência observa-se que com apenas dois meses, *A. nigrofasciatus* alcança 60% de seu comprimento máximo. Conforme Liu & Walford (1969) esse rápido crescimento inicial é próprio das espécies do gênero.

A relação da temperatura com a taxa de crescimento em peixes anuais foi observada também para outras espécies de Rivulidae. Errea & Danulat (2001), relataram as maiores taxas de crescimento no início e final do ciclo de vida de *A. viarius* em seu biótopo, justamente nos meses em que foram registradas as temperaturas mais elevadas. Os mesmos autores em laboratório verificaram que os indivíduos mantidos a 25°C apresentam maior crescimento e maturidade sexual precoce quando comparados com aqueles criados a 15°C. Conforme Walford & Liu (1965), *A. adloffii* quando mantida a 16 ou 22°C apresentou maior taxa crescimento e maior comprimento final na temperatura inferior. O mesmo ocorreu com *A. bellotti* e *A. wolterstorffi*, os quais, quando mantidos a 15°C, apresentaram maior crescimento que a 20°C (Liu & Walford 1970).

Nos peixes a condição de temperatura ótima para o crescimento e sobrevivência pode mudar com a idade e tamanho. Juvenis de várias espécies preferem temperaturas mais elevadas do que os adultos (McCauley & Huggins 1979, Handeland et al. 2003). Para peixes anuais, Liu & Walford (1969) afirmam que temperaturas elevadas estimulam o crescimento apenas nas primeiras fases da vida, enquanto que temperaturas mais baixas favorecem o crescimento de indivíduos maduros em função de retardarem o desenvolvimento das gônadas e também possivelmente por promoverem maior eficiência da conversão alimentar nessas condições (Liu & Walford 1970, Liu et al. 1975).

A rápida maturidade sexual em *A. nigrofasciatus* foi constatada para outros peixes anuais. Walford & Liu (1965) e Arenzon et al. (1999), observaram para duas espécies de anuais que estas atingem a maturidade sexual após 6 a 8 semanas de vida. Calviño (2005) observou as primeiras características

sexuais secundárias para *Austrolebias toba* aos 21 dias pós-eclosão, seguida de atividade sexual de corte aos 24 dias.

Ao estudar a fecundidade de *A. nigrofasciatus* foi observado que as fêmeas mantidas nas temperaturas mais baixas apresentaram peso e fator de condição corporal (*K*) superiores aquelas mantidas na temperatura mais elevada. O menor peso e fator de condição das fêmeas mantidas a 25°C, aliado ao decréscimo na produção de ovos na última semana, sinalizam para uma condição desfavorável à manutenção de reprodutores na temperatura elevada. Liu & Walford (1965) demonstraram que fêmeas de *A. adloffii* mantidas a 22°C por um período de 12 meses realizaram a postura de mais de 90% do total de ovos nos três primeiros meses, o que implicou em acentuada perda de peso das fêmeas nesta condição. Conforme Liu & Walford (1969), para fêmeas de peixes anuais uma grande percentagem do peso é determinada pelo número e estado de desenvolvimento dos óvulos, sendo estes, fatores que por sua vez, dependem da desova ou freqüência de acasalamento. Utilizando os dados de produção de ovos de uma população de *A. bellotti*, os mesmos autores calcularam que a massa de ovos produzidos em um mês pode representar aproximadamente 30% do peso corporal de uma fêmea. No presente estudo, em contraste a estes resultados anteriores, a redução do peso e do fator de condição das fêmeas não pôde ser explicada pelo suposto efeito da temperatura elevada no aumento da produção de ovos, uma vez que a fecundidade não diferiu entre os tratamentos.

Ao comparar a ovoposição semanal de *A. nigrofasciatus* com espécies de peixes anuais foram observados valores dentro da amplitude registrada para outros rivulídeos (Liu & Walford 1969, Shibatta 2005, Calviño 2006).

O efeito da temperatura na fecundidade foi observado também para *A. adloffii*, por Walford & Liu (1965), os quais obtiveram médias para o primeiro mês de experimento de 18 e 38,3 ovos por fêmea para os tratamentos de 16 e 22°C, respectivamente. Os mesmos autores registraram fecundidade nos peixes mantidos a 22°C aproximadamente três vezes maior que os da temperatura inferior ao final de três meses de experimento. Entretanto, apesar da produção de ovos ser reduzida em 16°C, as fêmeas apresentaram médias mensais mais homogêneas, enquanto que na população da temperatura mais elevada ocorreu acentuado decréscimo na produção após o pico reprodutivo,

com fecundidade média inferior a dois ovos/mês. Nesse estudo o único evento de redução na fecundidade foi associado a temperatura mais elevada constatada na última semana de experimento. Outro efeito desfavorável de temperatura elevada na reprodução de peixes anuais foi apontado por Arenzon et al. (2002), os quais observaram que todos os ovos de *C. melanotaenia* mantidos em 25°C geraram juvenis com mal formações morfológicas, inviabilizando sua sobrevivência.

Ao verificar os parâmetros físico-químicos do charco onde foram capturados os reprodutores (entre julho e novembro de 2008), observamos que dentre os fatores abióticos acompanhados a temperatura foi o fator que mais sofreu variação, onde registramos em intervalo de apenas 24 horas flutuação de 20°C (9-29°C) com temperatura mínima registrada de 9°C em outubro e máxima de 42°C em novembro (dados não publicados). Essa ampla flutuação de temperatura também foi registrada por outros autores para pequenas áreas úmidas sazonais (Vaz-Ferreira et al. 1966, Errea & Danulat, 2001). A similaridade observada na produção de ovos entre os tratamentos neste estudo pode refletir a adaptação destes peixes frente à elevada amplitude térmica registrada em seu ambiente natural.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arenzon, A., A. C. Peret & M. B. C. Bohrer. 1999. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hydrobiologia* 411: 65-70.
- Arenzon, A., C. A. Lemos & M. B. C. Bohrer. 2002. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Brazilian Journal of Biology* 62(4B): 743-747.
- Arenzon, A., R. F. Pinto, Colombo, P. & M. T. Raya-Rodriguez. 2003. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9): 2188-2190.

- Arezo, M. J., S. D'Alessandro, N. Papa, R. Sá & N. Berois. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39: 89-98.
- Bellote, D. F. & W. J. E. M. Costa. 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.
- Calviño, P. 2005. *Austrolebias toba* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), una especie nueva de pez anual de la Argentina. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.* 7(2): 188-190.
- 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
- Costa, W. J. E. M. & M. M. Cheffe. 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). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS* 14 (2): 179-200.
- Errea, A. & E. Danulat. 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes* 61: 261–268.
- Ferrer, J., L. R. Malabarba & W. J. E. M. Costa. 2008. *Austrolebias paucisquama* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), a new species of annual killifish from southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6(2):175-180.
- Fletcher, M., A. Teklehaimanot & G. Yemane. 1992. Control of mosquito larvae in the port city of Assab by an indigenous larvivorous fish *Aphanius dispar*. *Acta Tropical* 52: 155–166.
- Frenkel, V. & M. Goren. 2000. Factors affecting growth of killifish, *Aphaniusdispar*, a potential biological control of mosquitoes. *Aquaculture* 184: 255–265.

- García, D., M. Loureiro & B. Tassino. 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology* 6(2): 243-248
- Handeland, S. O., B. Björnsson, A. M. Th. Arnesen & S. O. Stefansson. 2003. Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of wild and farmed strains. *Aquaculture* 220: 367-384.
- 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. & R.L.Walford. 1969. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish *Cynolebias bellottii* Steindachner. *Zoologica* 54: 1–16.
- Liu, R. K. & Walford, R. L. 1970, Observations on the lifespans several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. *Experimental Gerontology* 5: 241-246.
- Liu, R. K.; Leung, E. & Walford, R. L. 1975. Effect of temperature transfer on growth of laboratory populations of a south American annual fish *Cynolebias bellotti*. *Growth* 39: 337-343.
- Mc Cauley, R. W. & N. W. Huggins. 1979. Ontogenetic and non-thermal seasonal effects on preferenda of fish. *Am. Zool.* 19: 267-271.
- Podrabsky, J. E. & S. Hand. 1999. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *The Journal of Experimental Biology* 202: 2567-2580.
- Reis, R. E., Z. M. S. Lucena, C. A. S. Lucena & L. R. Malabarba. 2003. Peixes. In: Fontana, C. S., G. A. Bencke & R. E. Reis (eds.). *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 632 pp.
- Shibatta, O. 2005. Reprodução do pirá-brasília, *Simpsonichthys boitonei* Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae), e caracterização de seu habitat na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(4): 1146-1151.
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra de Soriano & J. S. Señorans. 1966. Integracion de La fauna de vertebrados em algunas masas de agua dulce temporales del Uruguay. *Comp. Trab. Dpto. Zool. Vert.* 25: 1- 16.

- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: EDUEM. 169 pp.
- Walford, R. L. & R. K. Liu. 1965, Husbandry, life-span and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii*. *Experimental Gerontology* 1: 161-171.
- Wootton, R.J. 1990. Ecology of Teleost Fishes. Chapman & Hall, London. 404 pp.

## CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, concluímos que:

- *A. nigrofasciatus* apresenta efeito da temperatura associado ao sexo e as fases de vida;
- O crescimento de juvenis de *A. nigrofasciatus*, até o momento da puberdade, é maior a 22°C do que a 16°C;
- A maturação sexual é atingida mais cedo nos peixes mantidos a 22°C do que naqueles a 16°C;
- A temperatura não influencia quantitativamente a fecundidade da espécie, apesar de promover uma maior homogeneidade no número de ovos produzidos ao longo do tempo a 21°C;
- Temperaturas entre 17 e 21°C favorecem o balanço energético de fêmeas durante a reprodução.