

DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES DE *Austrolebias nigrofasciatus* EM DIFERENTES MEIOS DE INCUBAÇÃO

NATASHA CARVALHO AIRES¹; ALINCA PERES DA FONSECA^{1,2}; DANIELI GUTERRES¹; RICARDO BERTEAUX ROBALDO^{1,2,3}

¹Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura – *natasha.aires@gmail.com*

²Universidade Federal de Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – *alincaf@gmail.com*

³Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia – *ricardo_robaldoufpeledu.br*

1. INTRODUÇÃO

O controle do desenvolvimento de embriões de peixes anuais é importante para o seu manejo em laboratório e, devido às características peculiares na sua embriogênese, estes peixes permitem a manipulação das trajetórias de desenvolvimento, que podem ser controladas por características físicas ou químicas da incubação (PODRABSKY; GARRETT; KOHL, 2010). A embriogênese dos peixes anuais apresenta três fases, denominadas diapausa 1, 2 e 3. A diapausa 1 (D1) é menos estudada, mas acredita-se que o contato com peixes adultos pode induzir a permanência dos embriões nesta fase, enquanto as diapausas 2 (D2) e 3 (D3) são caracterizadas por uma queda brusca no metabolismo, podendo os embriões permanecerem nesta fase até que um sinal ambiental seja percebido (PODRABSKY; GARRETT; KOHL, 2010).

Alguns estudos vêm utilizando diversos meios de incubação como água pura ou com fibra de coco, turfa, “peat moss”, e solução de Yamamoto com ou sem antibióticos, no entanto, são poucas as informações a respeito da sobrevivência e do desenvolvimento de embriões nestes meios (WOURMS, 1976; AREZO; PEREIRO; BEROIS, 2005; REICHARD; POLACIK, 2010; VOLCAN et al., 2012; BLAZEK; POLACIK; REICHARD, 2013).

O período de incubação representa um desafio para a manutenção em laboratório devido à proliferação de fungos a partir de ovos mortos causando mortalidades massivas, especialmente quando são mantidos em água pura (dados não publicados). Entretanto, não existem estudos acerca da utilização da maioria dos meios de incubação mencionados e sabe-se que a utilização de antibióticos pode constituir uma ameaça à integridade ambiental (MARTINEZ, 2009). BLAZEK; POLACIK; REICHARD (2013) verificaram que embriões mantidos na água e na solução de Yamamoto apresentaram taxas de sobrevivência muito inferiores àqueles mantidos com “peat moss”.

Os ambientes destes peixes estão sujeitos a variações extremas das características físicas e químicas em um curto período de tempo por apresentarem volume de água reduzido e secarem em determinada época do ano (VOLCAN et al., 2011). Os peixes anuais brasileiros estão incluídos na família Rivulidae, a qual compreende o grupo mais expressivo de peixes ameaçados de extinção no país (ROSA; LIMA, 2008). Em decorrência desta fragilidade recentemente foi implantado o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção (ICMBio, 2012). Dentre as espécies avaliadas no referido Plano, *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe, 2001 foi considerada “espécie focal”

dentro de seu grupo, por ser endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim e estar incluída na lista da Fauna Ameaçada de Extinção, na categoria “Em Perigo” (ICMBio, 2012).

A hipótese deste estudo foi que diferentes meios de incubação podem apresentar diferentes trajetórias de desenvolvimento embrionário e que a utilização de solução de Yamamoto deve evitar a proliferação de fungos e a utilização de antibióticos na mesma deve evitar mortes prévias causadas por outros microrganismos, além disto, a utilização de casca de coco deve evitar que os ovos fiquem aglomerados, impedindo a propagação dos fungos entre eles, aumentando assim a sobrevivência dos embriões em relação aos ovos incubados em água pura. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e sobrevivência de embriões de *A. nigrofasciatus* em diferentes meios de incubação, com o intuito de otimizar as técnicas de manejo em laboratório, colaborando assim com a preservação dessa espécie ameaçada.

2. METODOLOGIA

Os reprodutores foram coletados com auxílio de puçá de 5mm de malha em áreas úmidas localizadas na várzea do Canal São Gonçalo, sob licença do IBAMA/ICMBio, nº 41713-1. Após a coleta, casais de reprodutores foram mantidos em aquários (50L) com aeração constante, musgo de Java, para esconderijo, e ninho com casca de coco em pó, utilizada como substrato para desova. Como alimento, foi ofertado zooplâncton nativo (cladóceros e copépodos) *ad libitum* diariamente.

O ninho foi mantido por sete dias no aquário, posteriormente a fibra foi removida e triada para a coleta dos ovos, os quais foram observados com auxílio de estereomicroscópio, para verificar a fertilização e a fase do desenvolvimento embrionário.

Os meios de incubação testados foram: T1 – Água pura (AP); T2 – Solução de Yamamoto (SY); T3 – Solução de Yamamoto com 100U/mL de Penicilina + Estreptomicina (YP); T4– Água com fibra de coco em pó (FC).

Dos ovos fertilizados em estágio inferior a reagregação dos blastômeros, foram formados 20 lotes com 50 unidades cada, acondicionados em coletor universal de 80mL com 40mL de cada meio de incubação para o acompanhamento da sobrevivência e 12 lotes com 10 unidades cada, acondicionados em frascos de 15mL com 10mL de cada meio de incubação para a verificação das fases de desenvolvimento. Os lotes da sobrevivência tiveram seis repetições e os do desenvolvimento três.

Durante os primeiros 30 dias a fase de desenvolvimento embrionário foi verificada diariamente, posteriormente foi verificada a cada sete dias. As fases registradas foram: 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 D2; F6 – pigmentação; F7 – cauda sobreposta a cabeça ou D3. Semanalmente foi observada a sobrevivência. Foi registrado o tempo que cada lote precisou para que 50% dos embriões alcançassem cada fase de desenvolvimento. Foram considerados em D2 os embriões que permaneceram por mais de 14 dias na F5, e em D3 os que tinham a cauda sobreposta a cabeça e frequência cardíaca inferior a 20 batimentos/minuto.

Os lotes foram mantidos em ambiente climatizado em 20°C no escuro, sendo expostos à claridade apenas no momento das observações e manutenção. Todos os meios foram renovados semanalmente e no final do experimento foram verificados o

pH (pHmetro digital - precisão de 0,01), amônia (kit colorimétricos Nutrafin®/Hagen/Alemanha - 0,1mg/L) e temperatura.

Para comparação entre médias (com distribuição normal, homocedasticidade e homogeneidade dos dados) 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amônia total e a temperatura não apresentaram variação entre os tratamentos, ficando a amônia com $0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, a temperatura mínima $20,49\pm 0,11^\circ\text{C}$ e máxima $20,81\pm 0,07^\circ\text{C}$. O pH do FC, $6,79\pm 0,04$, foi inferior aos demais tratamentos, $7,12\pm 0,02$, $7,14\pm 0,02$ e $7,12\pm 0,01$ para AP, SY e YP, respectivamente.

A sobrevivência em SY ($92,92\pm 12,25\%$) e YP ($91,67\pm 0,83\%$), foi superior a do FC ($73,75\pm 2,94\%$), já a do AP ($72,5\pm 12,25\%$) não diferiu dos demais. É possível que a fibra tenha facilitado a contaminação do meio, além de não ter impedido a proliferação de fungos. Já a AP demonstrou o que já era observado rotineiramente, quando há ovos mortos, estes são envoltos por fungos que proliferam e acabam por matar outros ovos saudáveis, pois, lotes com fungos, continuam muitos ovos mortos, enquanto aqueles que não tinham fungos geralmente não apresentavam mortalidade. Apenas a AP apresentou proliferação de fungos. Ao contrário do observado no presente estudo, BLAZEK; POLACIK; REICHARD (2013) encontraram taxas inferiores a 30% de sobrevivência utilizando água ou solução de Yamamoto como meio de incubação para espécies de *Nothobranchius*.

Até a F4 não houve diferença entre os tratamentos no tempo para 50% dos embriões atingirem cada uma das fase acompanhadas, a partir da F5 a FC apresentou um atraso no tempo de desenvolvimento em relação aos demais tratamentos, os quais apresentaram tempos semelhantes entre si (Figura 1).

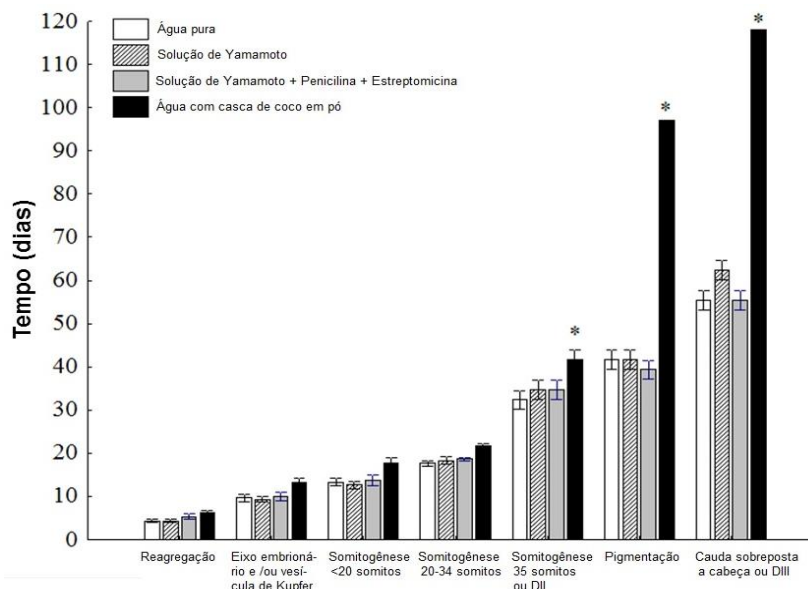


Figura 1 – Tempo necessário para que 50% dos embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* atinjam cada fase do desenvolvimento quando mantidos em diferentes meios de incubação.

A FC foi capaz de induzir uma parcela superior ($80,00\pm 5,77$) de embriões a entrar em D2 em relação a AP ($46,67\pm 3,33$), SY ($30,00\pm 5,77$) e YP ($33,33\pm 3,33$), o que é muito interessante para controlar o manejo de embriões em laboratório,

manipulando a trajetória de desenvolvimento. Segundo PODRABSKY; GARRETT; KOHL (2010), temperaturas elevadas podem levar embriões de *Austrofundulus limnaeus* a escapar da D2, mudando assim a rota de desenvolvimento e alterando o tempo para completar a embriogênese.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados de sobrevivência, conclui-se que a Solução de Yamamoto é o meio ideal para a incubação de embriões de *A. nigrofasciatus*, sem haver a necessidade de adicionar antibióticos. No entanto, para a manipulação em diapausa II, o meio mais interessante pode ser a água com fibra de coco.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AREZO, M. J.; PEREIRO, L.; BEROIS, N. Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. **Journal of Fish Biology**, v.66, p.1357-1370, 2005.

BLAZEK, R.; POLACIK, M.; REICHARD, M. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. **EvoDevo journal**, v.4, n.24, p.1-7, 2013.

ICMBio- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes Rivulídeos ameaçados de extinção**. 2012. Acessado em 29 jul. 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/plano-de-acao/2833-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-dos-rivulideos.html>

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental pollution**, v.157, n.11, p.2893-2902, 2009.

PODRABSKY, J. E.; GARRETT, I. D. F.; KOHL, Z. F. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 3280-3288, 2010.

REICHARD, M.; POLACIK, M. Reproductive isolating barriers between colour-differentiated populations of an African annual killifish, *Nothobranchius korthausae* (Cyprinodontiformes). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.100, p.62-72, 2010.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF: Fundação Biodiversitas, 2008. p.8-285.

VOLCAN, M. V.; FONSECA, A. P.; FIGUEIREDO, M. R. C.; SAMPAIO, L. A.; ROBALDO, R.B. Effect of temperature on growth of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. **Biota Neotropica**, v.12, n.4, p.68-73, 2012.

WOURMS, J. P. Annual Fish Oogenesis. I. Differentiation of the Mature Oocyte and Formation of the Primary Envelope. **Developmental Biology**, v.50, p.338-354, 1876.