

## Influência da temperatura no desenvolvimento embrionário e sobrevivência de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

DANIELI GUTERRES<sup>1</sup>; ALINCA PERES DA FONSECA<sup>1,2</sup>; RICARDO BERTEAUX ROBALDO<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura – [guterresdn@gmail.com](mailto:guterresdn@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – [alincaf@gmail.com](mailto:alincaf@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia – [ricardorobaldoufpel@gmail.com](mailto:ricardorobaldoufpel@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A temperatura ambiental exerce efeitos sobre a maioria dos processos biológicos, tendo influência principalmente nas taxas metabólicas dos organismos ectotérmicos (BRAGA; LIMA, 2001). Alguns estudos demonstram os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento embrionário (ARENZON et al., 2002), crescimento (FONSECA et al., 2013; VOLCAN et al., 2012), diferenciação sexual (HARRINGTON, 1968) reprodução (ARENZON et al., 2002; VOLCAN et al. 2012) e longevidade (LIU; WALFORD, 1966) de peixes anuais Rivulidae. Ao aumentar a temperatura o crescimento de peixes anuais geralmente é acelerado, entretanto, temperaturas elevadas podem levar a más formações, com consequente inviabilidade das larvas, e até a efeitos deletérios em gônadas (ARENZON et al. 1999; FONSECA, 2011; VOLCAN et al., 2012).

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 (NASCIMENTO et al., 2012). Por viverem nesse tipo de ambiente os peixes anuais apresentam características fisiológicas e comportamentais estratégicas para sua sobrevivência (BEROIS et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012).

No Brasil, os peixes anuais 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 e da constante destruição das áreas úmidas por assoreamento, desmatamento, poluição e drenagens, recentemente foi implantado o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção, o qual inclui, em suas estratégias, a criação de técnicas para a manutenção dos peixes em laboratório aplicadas a sua conservação (ICMBio, 2012).

Dentre as espécies avaliadas no referido Plano de Ação, *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 é uma espécie de pequeno porte, endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim (COSTA, 2006) e está incluída na lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, na categoria “Em Perigo” (ICMBio, 2012; ROSA; LIMA, 2008). Portanto, estudos que definam condições apropriadas para a manutenção desta espécie em laboratório são necessários para auxiliar no seu manejo e conservação.

Diante das evidências da influência da temperatura nos processos biológicos de peixes anuais, a hipótese do estudo foi que o aumento da temperatura deve acelerar o desenvolvimento inicial até o “preferendum” térmico da espécie, a partir do qual pode ocorrer aumento da incidência de más formações e inviabilidade dos embriões. Diante disto, o presente estudo teve

como objetivo avaliar a influência de diferentes temperaturas sobre o desenvolvimento embrionário e sobrevivência do peixe anual *A. nigrofasciatus* em condições de laboratório.

## 2. METODOLOGIA

Os reprodutores foram coletados com auxílio de puçá, com malha de 5mm, em áreas úmidas localizadas na várzea do Canal São Gonçalo, sob licença do IBAMA/ICMBio, nº 41713-1. Após a coleta, os reprodutores foram mantidos em aquário com aeração constante, musgo de Java como esconderijo, e ninho com fibra de 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.

De 900 ovos fertilizados em estágio inferior ao de reagregação dos blastômeros, foram formados 30 lotes com 30 unidades cada, acondicionados em coletor universal de 80mL com 40mL de solução de Yamamoto. Os lotes foram distribuídos em cinco tratamentos de diferentes temperaturas: 16°C, 20°C, 24°C, 28°C e temperatura ambiente (TA), com seis repetições de cada. Com exceção do TA, mantido em temperatura ambiente variável com termômetro de máxima e mínima, os lotes foram mantidos em banho-maria, termostatizados e com sistema de homogeneização da água. Os ovos permaneceram no escuro, sendo expostos à claridade apenas no momento das observações e manutenção.

Para a manutenção da qualidade das condições físicas e químicas dos meios de incubação, a temperatura foi medida diariamente, o pH (pHmetro digital - precisão de 0,01) e amônia (kit colorimétricos Nutrafin®/Hagen/Alemanha - 0,1mg/L) foram medidos uma vez por semana, previamente a renovação total do meio de incubação de cada lote, com solução de Yamamoto na mesma condição térmica, juntamente com o registro e retirada dos ovos mortos. Semanalmente foi observada a fase de desenvolvimento em que os embriões de cada tratamento se encontravam: 1 – pré-pigmentação; 2 - pigmentação; 3 – cauda sobreposta a cabeça; 4 – eclosão.

Todos os lotes foram verificados diariamente para registrar as eclosões. Ao eclodirem as larvas foram anestesiadas com Benzocaína (0,5%) e medidas com paquímetro (0,001mm) em seu comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), comprimento do saco vitelínico (CSV), largura do saco vitelínico (LSV) e diâmetro da gota de lipídeo (DG).

Para comparação entre médias foi empregada ANOVA (uma via), seguida do teste de Tukey, sob nível de significância de 95%, através do programa "Statística 7.0". Para análises em percentual os dados foram transformados pela função arco de seno.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amônia total não variou entre os tratamentos, permanecendo entre 0,00083±0,000058ppm e 0,00104±0,000110ppm durante o período estudado, enquanto o pH variou de 6,34±0,02 a 6,49±0,04. As médias das temperaturas foram de: 16°C - 16,04±0,04°C; 20°C - 20,12±0,17°C; 24°C - 23,88±0,13°C; 28°C - 27,88±0,06°C; TA - 24,49±0,38°C, variando entre 19°C e 34°C.

Os embriões mantidos em 20°C, 24°C e 28°C atingiram a fase 2 na terceira semana, enquanto 16°C e TA ainda se encontravam na fase 1, atingindo a fase 2 apenas na 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> semana, respectivamente. Os primeiros registros de eclosão para o tratamento de 24°C ocorreram na sétima semana de experimento, enquanto em 20°C, 28°C e TA as primeiras eclosões foram registradas durante a décima semana de experimento, já o tratamento de 16°C não apresentou eclosões durante as 14 semanas de experimento, o que demonstra que as temperaturas intermediárias favorecem o desenvolvimento, enquanto as extremas atrasam. Neste sentido, PODRABSKY et al. (2010) estudando a influência da temperatura no desenvolvimento e padrões de diapausas para *A. limnaeus*, observaram que temperaturas elevadas podem acelerar o desenvolvimento embrionário por induzir os embriões a escaparem da diapausa II, com isso, entende-se que a temperatura de incubação pode alterar diretamente a trajetória de desenvolvimento de um embrião. Corroborando com os resultados do presente estudo, FONSECA et al. (2013) mostraram que em temperatura semelhante ao tratamento de 24°C (23,8°C) favorece o crescimento inicial da espécie *A. wolterstorffi*, enquanto 16°C demonstrou ser prejudicial ao crescimento nesta fase.

Durante o período experimental, foi observada diferença nas taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões entre os tratamentos, onde os maiores percentuais foram registrados para o tratamento de 20°C, que ficaram em 42,22±8,50% e 98,88±0,70% e os menores para o tratamento de 28°C, 4,44±1,64% e 90,00±1,92%, respectivamente.

As médias de CT e CP variaram entre os tratamentos, sendo as menores médias registradas para 28°C, 4,95±0,21mm e 4,24±0,22mm, respectivamente, e as maiores para 20°C, 5,61±0,04mm e 4,80±0,03mm, respectivamente. A média do DG foi superior no tratamento de TA, 0,41±0,02mm, em relação aos demais tratamentos, os quais permaneceram entre 0,22±0,03mm e 0,41±0,02mm. Não houve diferença do CSV e LSV entre os tratamentos.

Foram observadas más formações dos embriões nos tratamentos de 24°C (0,55±0,55%), 28°C (2,77±1,02%) e TA (9,44±2,18%), sendo observada diferença estatística entre o tratamento de TA quando comparado aos de 16°C e 20°C. ARENZON et al. (2002) observaram que ao manter *Cynopoecilus multipapilatus* a partir de 25°C os embriões apresentam más formações morfológicas que inviabilizam sua sobrevivência. No presente estudo, observou-se um aumento na incidência de más formações com o aumento da temperatura, com as maiores taxas registradas para o tratamento TA, onde as médias de temperaturas nas semanas que antecedem os registros de más formações foram superiores às dos tratamentos com temperatura controlada.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante da ausência de más formações, do maior comprimento ao eclodir e da alta taxa de sobrevivência, podemos concluir com os resultados obtidos até o momento que a temperatura de 20°C é a indicada para manter a espécie durante o período de incubação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENZON, A.; CARVALHO, A. P.; BOHRER, M. B. C. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan, 1912) in a temporary water body in Rio Grande do Sul, Brazil (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Hydrobiologia**, v.411, p.65–70, 1999.

- ARENZON, A.; LEMOS, C. A.; BOHRER, M. B. C. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Brazilian Journal of Biology**. v.62, n.4, p.743-747, 2002.
- BEROIS, N.; AREZO M. J. ; PAPA, N. G.; CLIVIO, G. A. Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. **WIREs Developmental Biology**, v.1, n.4, p.595-602, 2012.
- BRAGA, L. G. T.; LIMA, S. L. Influência da Temperatura Ambiente no Desempenho da Rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na Fase de Recria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1659-1663, 2001.
- COSTA, W. J. E. M. The South American annual Killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae ): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. **Zootaxa**. v.1213, p.1-162, 2006.
- FONSECA, A. P. **Crescimento e reprodução do peixe anual *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) em diferentes temperaturas**. 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Fundação Universidade do Rio Grande.
- FONSECA, A. P.; VOLCAN, M. V.; SAMPAIO, L. A., ROMANO, L. A.; ROBALDO, R. B. Growth of Critically Endangered annual fish *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) at different temperatures. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.4, p.837-844, 2013.
- HARRINGTON, R.W., Jr. Delimitation of the thermolabile phenol-critical period of sex determination and differentiation in the ontogeny of the normally hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. **Physiological Zoology**, v.41, n.4, p.447-460, 1968.
- 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>
- LIU, R. K.; WALFORD, R. L. Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish *Cynolebias adloffii*. **Nature**, v.212, p.1277-1278, 1966.
- NASCIMENTO, W. S.; YAMAMOTO, M. E.; SATHYABAMA, C. Proporção Sexual e Relação Peso-Comprimento do Peixe Anual *Hypsolebias antenori* (Cyprinodontiformes : Rivulidae) de Poças Temporárias da Região Semiárida do Brasil. **Biota Amazônica**. v.2, n.1, p.37-44, 2012.
- 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.
- ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (eds). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2008. p.9-285.
- 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.