

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

Influência da temperatura de incubação na embriogênese de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

Danieli Guterres

Pelotas, 2014

Danieli Guterres

Influência da temperatura de incubação na embriogênese de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: M.Sc. Alinca Peres da Fonseca

Co-orientador: Dr. Ricardo Berteaux Robaldo

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

G983i Guterres, Danieli
Influência da temperatura de incubação na embriogênese de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae) / Danieli Guterres. – 35f. il. – Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientadora Alinca Peres da Fonseca ; coorientador Ricardo Berteaux Robaldo.

1.Biologia. 2.Peixes anuais. 3.Proporção sexual.
4.Embriões. 5.Desenvolvimento. 6.Sobrevivência. 7.Má
Formação morfológica. I.Fonseca, Alinca Peres da.
II.Robaldo, Ricardo Berteaux. III.Título.

CDD:597.07

Danieli Guterres

Influência da temperatura de incubação na embriogênese de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas em Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12 de Novembro de 2014.

Banca examinadora:

M.Sc. Alinca Peres da Fonseca
Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande

M.Sc. Matheus Vieira Volcan
Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard
Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos meus pais, que movem montanhas para realizar
os meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, a qual é responsável por quem sou hoje. Aos meus pais, Armando e Ida, que sempre acreditaram na minha capacidade e não mediram esforços para que eu chegasse a esta etapa da minha vida. Pai, mãe, vocês são a motivação para eu seguir em frente. A minha irmã Silvia, meu exemplo de garra e competência, por todo o apoio e incentivo aos meus objetivos. Mana, tu és meu porto seguro. Aos três, obrigada por todo amor incondicional que dedicam a mim.

Ao meu namorado Alex, pelo seu carinho, amor e paciência, pelo seu apoio e companheirismo, por ouvir minhas teorias e lamentações. Obrigada por me ensinar a ver felicidade nos momentos mais simples. Você e o Spyke foram os melhores presentes que ganhei, obrigada por tornarem minha vida mais feliz.

A Kika, meu anjo, por ter sido a melhor amiga de quatro patas. A saudade que eu sinto é inexplicável e será infinita. A Mel, por ser tão carinhosa sempre.

A minha melhor amiga, Susi, por todos esses anos de amizade sincera. Obrigada por tudo que já vivemos, por nunca me abandonar e, mesmo com a distância, estar sempre pronta para me ouvir e dar seu apoio.

Aos meus amigos e colegas, Juliana, Cristiane, Felipe, Lucas e Fabiano, por todo o coleguismo durante esses cinco anos da graduação. Sentirei saudades dos nossos estudos, reflexões e, principalmente, das boas rizadas. Lembranças que eu guardarei com carinho.

A amiga e orientadora, Alinca, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pelo auxílio em laboratório, pela paciência na orientação e incentivo. Sua participação e contribuições foram fundamentais para a conclusão desta monografia e para minha formação como bióloga. Obrigada por tudo.

Ao co-orientador Ricardo Robaldo, obrigada por todas as contribuições a este trabalho, pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão, pelos puxões de orelha e por mostrar a diferença em ser mais do que um orientador, um amigo. Vou lembrar para sempre de seus ensinamentos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e para minha formação como bióloga, muito obrigada.

Resumo

GUTERRES, Danieli. **Influência da temperatura de incubação na embriogênese de *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae)**. 2014. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Os peixes anuais são Cyprinodontiformes que vivem em ambientes sazonais e apresentam características fisiológicas e comportamentais estratégicas para sua sobrevivência. Acredita-se que a temperatura possa suplantar a diferenciação sexual genotípica de peixes anuais, levando a adultos com fenótipo diferente do genótipo, além de influenciar no desenvolvimento embrionário e sobrevivência. Neste sentido, e diante da necessidade de se obter técnicas para manutenção da espécie em laboratório, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência de diferentes temperaturas sobre a determinação do sexo e embriogênese do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus*. 30 lotes com 30 ovos cada foram distribuídos em cinco tratamentos: 16°C, 20°C, 24°C, 28°C e TA – temperatura ambiente variável. Para a diferenciação sexual realizou-se histologia das larvas recém-eclodidas dos tratamentos de 20°C, 24°C, TA e dos ovos do tratamento de 16°C. Com os resultados obtidos, pode-se observar influência da temperatura no tempo de desenvolvimento embrionário, onde temperaturas intermediárias favoreceram e temperaturas extremas atrasaram o desenvolvimento. Além disso, foi observada diferença nas taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões entre os tratamentos e os tratamentos de 20°C e 24°C apresentaram as maiores médias para o CP das larvas recém-eclodidas. Foi possível identificar um aumento no índice de más formações com o aumento da temperatura, havendo diferença entre os tratamentos de 16°C e 20°C em relação aos de 28°C e TA. Com os resultados até o momento, o tratamento de 16°C apresentou maior número de fêmeas por machos em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si. Pode-se concluir que a incubação de ovos de *A. nigrofasciatus* entre as temperaturas de 20°C e 24°C favorece o desenvolvimento embrionário, promove aumento do tamanho e da sobrevivência das larvas, com reduzido percentual de más formações.

Palavras-chave: peixes anuais; embriões; desenvolvimento; sobrevivência; má formação morfológica; proporção sexual.

Abstract

GUTERRES, Danieli. **Incubation temperature influence on embryogenesis *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes, Rivulidae)**. 2014. 35f. Completion of course work in Biological Sciences Undergraduate - Bachelors, Institute of Biology - Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

The annual fish are Cyprinodontiformes living in seasonal environments, and strategic physiological and behavioral characteristics for survival. It is believed that the temperature can overcome the genotypic sex differentiation annual fish, leading to adults with different phenotype, genotype, as well influence on embryo development and survival. In this sense, and considering the need to obtain techniques for species maintenance in the laboratory, this study aims to evaluate the influence of different temperatures on sex determination and embryogenesis of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. 30 lots with 30 eggs each were allotted to five treatments: 16°C, 20°C, 24°C, 28°C and TA - room temperature variable. For the sexual differentiation was performed histology of newly hatched larvae treatments 20°C, 24°C, RT and treatment of the eggs 16°C. With the results obtained, it can be observed influence of temperature on embryonic development time where intermediate temperatures favored and extreme temperatures delayed development. Moreover, it was observed difference in hatching rates and survival of embryos between treatments and treatments of 20°C and 24°C showed highest values for the CP of the newly hatched larvae. It was possible to identify an increase in the rate of malformations with increasing temperature, with significant differences between treatments 16°C and 20°C compared to 28°C and TA. With the results to date, treatment of 16°C had a higher number of males by females compared to other treatments, which did not differ. It can be concluded that incubation of eggs *A. nigrofasciatus* between 20°C and 24°C favors embryonic development, promotes an increase in the size and survival of larvae with low percentage of malformations.

Keywords: annual fish; embryos; development; survival; bad morphological training; sex ratio.

Lista de figuras

- Figura 1 Variação térmica durante a incubação de ovos de *Austrolebias nigrofasciatus* em temperatura ambiente (TA), durante 30 semanas. (média \pm erro padrão)..... 21
- Figura 2 Etapas do desenvolvimento embrionário de *Austrolebias nigrofasciatus*. Fase 1 – presença de eixo embrionário e/ou vesícula de Kupffer; Fase 2 - somitogênese; Fase 3 – pigmentação; Fase 4 – cauda sobreposta à cabeça; Fase 5 – eclosão..... 22
- Figura 3 Tempo para o primeiro registro de cada fase do desenvolvimento (A) e tempo para 50% dos embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* chegar a cada fase do desenvolvimento (B), mantidos em diferentes temperaturas (1 – presença de eixo embrionário e/ou vesícula de Kupffer; 2 - somitogênese; 3 – pigmentação; 4 – cauda sobreposta à cabeça; 5 – eclosão) (média \pm erro padrão; ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) TA – temperatura ambiente.)..... 23
- Figura 4 Más formações em embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos. TA – temperatura ambiente (média \pm erro padrão; Kruskal Wallis, $p < 0,05$)..... 25
- Figura 5 Más formações morfológicas em embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação.... 25
- Figura 6 Lâmina histológica de larva de *Austrolebias nigrofasciatus* recém-eclodida, (A) parâmetro geral da larva (B) ovário bem desenvolvido; Seta: ovócito..... 26

Lista de Tabelas

- Tabela 1 Temperatura, pH e amônia total dos meios de incubação de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos sob diferentes condições térmicas (média \pm erro padrão). Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos (Kruskal Wallis, Dunn, $p < 0,05$). TA-temperatura ambiente..... 20
- Tabela 2 Taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação (média \pm erro padrão). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos. TA – temperatura ambiente (Kruskal Wallis, Dunn, $p < 0,05$)..... 24
- Tabela 3 Medidas morfológicas das larvas de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação (CT- comprimento total; CP- comprimento padrão; CSV- comprimento do saco vitelínico; LSV largura do saco vitelínico e DG- diâmetro da gota de lipídeo). Letras distintas representam diferenças significativas entre as médias. TA – temperatura ambiente (média \pm erro padrão; ANOVA; Tukey; Kruskal Wallis, Dunn; $p < 0,05$)..... 24
- Tabela 4 Proporção sexual (nº de fêmeas/nº de machos) de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação (média \pm erro padrão). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$)..... 26

Sumário

1	Introdução.....	10
1.1	Objetivo.....	13
1.1.1	Objetivo geral.....	13
1.1.2	Objetivos específicos.....	13
2	Revisão da literatura.....	14
3	Material e Métodos.....	17
3.1	Coleta dos reprodutores.....	17
3.2	Produção dos ovos.....	17
3.3	Exposição dos ovos.....	17
3.4	Manutenção das condições físicas e químicas.....	18
3.5	Desenvolvimento embrionário.....	18
3.6	Medidas morfológicas das larvas.....	18
3.7	Análise histológica.....	18
3.8	Análise estatística.....	19
4	Resultados.....	20
4.1	Temperatura e parâmetros de qualidade dos meios de incubação.....	20
4.2	Desenvolvimento embrionário.....	22
4.3	Taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões.....	24
4.4	Medidas morfológicas das larvas.....	24
4.5	Más formações.....	25
4.6	Proporção Sexual.....	26
5	Discussão.....	27
6	Conclusão.....	30
	Referências.....	31

1 Introdução

Os peixes anuais são Cyprinodontiformes que vivem em ambientes sazonais localizados na América do Sul e nas savanas e desertos da África (BEROIS et al., 2012; COSTA, 2008; MYERS, 1942; WOURMS, 1972). Estes ambientes 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; YAMAMOTO; SATHYABAMA, 2012).

Por viverem em habitats que estão sujeitos a estresse hídrico, baixos níveis de oxigênio, grande variação de temperatura e de disponibilidade de alimento, os peixes anuais apresentam características fisiológicas e comportamentais estratégicas para sua sobrevivência (BEROIS et al., 2012; ERREA; DANULAT, 2001; NASCIMENTO; YAMAMOTO; SATHYABAMA, 2012), como a maturação sexual precoce, desova parcelada, grande capacidade reprodutiva e ovos resistentes a dessecação (ERREA; DANULAT, 2001; GARCIA; LOUREIRO; TASSINO, 2008; GONÇALVES; SOUZA; VOLCAN, 2011).

Durante o período de seca, todos os indivíduos adultos morrem, porém os ovos depositados no substrato permanecem vivos em estado de diapausa, podendo sobreviver por até 18 meses (BEROIS et al., 2012; PODRABSKY; GARRETT; KOHL, 2010; PODRABSKY; HAND, 1999; WOURMS, 1972). A diapausa é uma particularidade destes peixes, sendo caracterizada pela queda brusca do metabolismo do embrião, permitindo que os ovos permaneçam enterrados aguardando a próxima estação de chuvas quando irão eclodir e originar uma nova população (ARENZON; CARVALHO; BOHRER, 1999; BEROIS et al., 2012; VOLCAN et al., 2013; WOURMS, 1972). No entanto, apesar destas estratégias permitirem a sobrevivência dos peixes, não os impede de sofrer os impactos aos quais estes ambientes estão sujeitos (COSTA, 2002).

No Brasil, todos os gêneros registrados de peixes anuais pertencem à 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).

Dentro de Rivulidae, o gênero *Austrolebias* Costa 1998 habita áreas úmidas de regiões temperadas no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina, distribuídos na bacia do Paraná-Prata e no complexo lagunar Patos-Mirim (COSTA, 2006). Atualmente o gênero inclui 39 espécies, sendo 65% delas descritas nos últimos 25 anos (LOUREIRO; DUARTE; ZARUCKI, 2011). Dentre as espécies avaliadas no referido Plano de Ação está *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001 que 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). É apontada como uma espécie focal dentro de seu grupo, devido à sua distribuição e a relação com as demais espécies que utilizam o mesmo nicho.

Em contraste com outros teleósteos, os peixes anuais exibem um exclusivo padrão de desenvolvimento (MYERS, 1952). A epibolia é temporalmente e espacialmente separada da organogênese e os embriões passam por um ou mais estágios de diapausas reversíveis (BEROIS et al., 2012; WOURMS, 1972). Estas adaptações de desenvolvimento estão intimamente relacionadas com o seu ciclo de vida e os tornam bons modelos para estudar diversos temas em biologia do desenvolvimento através de uma abordagem comparativa e evolutiva (BEROIS et al., 2012).

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 espécies de família Rivulidae relacionados ao desenvolvimento embrionário (ARENZON; LEMOS; BOHRER, 2002), crescimento (ERREA; DANULAT, 2001; FONSECA et al., 2013; LIU; WALFORD, 1966, 1969; VOLCAN et al., 2012; WALFORD; LIU, 1965), diferenciação sexual (HARRINGTON, 1968; VOLCAN et al. 2012) reprodução (ARENZON; CARVALHO; BOHRER, 1999; ARENZON; LEMOS; BOHRER, 2002; VOLCAN et al. 2012, 2013), sobrevivência (ERREA; DANULAT, 2001) e longevidade (LIU; WALFORD, 1966, 1970).

A determinação do sexo define a razão sexual, um parâmetro demográfico crucial para a viabilidade da população (OSPINA-ÁLVAREZ; PIFERRER, 2008). Frequentemente pode ser observada a determinação do sexo fenotípico de vertebrados sendo influenciada por características ambientais, especialmente a temperatura, sendo este fenômeno comum para muitos teleósteos (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

A diferenciação celular de peixes anuais possivelmente ocorre após a diapausa I e reagregação dos blastômeros, quando o eixo embrionário surge em meio às células reagregadas (BEROIS et al., 2012). Embora não se conheça o momento exato, sabe-se que a diferenciação sexual de espécies de *Austrolebias* ocorre ainda na fase embrionária, como demonstrado por análise histológica em Arezo et al. (2007).

Atualmente têm aumentado os estudos com peixes anuais nas Américas, porém poucos trabalhos abrangem a biologia e manejo de Rivulidae em laboratório (FONSECA et al., 2013; MOURABIT; KUDOH, 2012; PASSOS et al., 2013; VOLCAN et al., 2012, 2013). Desta forma, estudos que definam condições ambientais apropriadas para a manutenção de *Austrolebias* em laboratório são necessários para auxiliar na conservação das espécies.

De acordo com alguns estudos acredita-se que a temperatura possa influenciar no desenvolvimento embrionário, sobrevivência, taxa de eclosão, ocorrência de más formações e diferenciação sexual de algumas espécies de peixes anuais (HARRINGTON, 1968; VOLCAN et al., 2012). Desta forma, no presente estudo serão testadas as hipóteses de que a incubação de *A. nigrofasciatus* em temperaturas extremas deva alterar o tempo de desenvolvimento, que pode ser atrasado em baixas temperaturas e acelerado em temperaturas elevadas, e ainda promover o desvio na proporção sexual, esperando que temperaturas elevadas sejam favoráveis a fêmeas e baixas temperaturas sejam favoráveis a machos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a influência de diferentes temperaturas de incubação na embriogênese do peixe anual *A. nigrofasciatus* em condições de laboratório.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Verificar o tempo de desenvolvimento em diferentes temperaturas;
- b) Avaliar o efeito da temperatura na sobrevivência dos embriões;
- c) Verificar a taxa de eclosão nas diferentes temperaturas;
- d) Avaliar o efeito da temperatura na ocorrência de más formações;
- e) Analisar a influência da temperatura na razão sexual.

2 Revisão da literatura

A expressão do sexo depende da determinação do sexo genético (genotípico) e da diferenciação sexual celular, responsável pelo desenvolvimento das gônadas (sexo gonadal ou fenotípico). A interação desses dois eventos resulta nos fenótipos macho ou fêmea, seja morfológico, comportamental, ou funcional (PIFERRER, 2001). No entanto, como apontado por Adkins-Regan (1987), para alguns animais ectotérmicos, a diferenciação sexual pode ser influenciada por fatores ambientais ao ponto de o sexo fenotípico resultante diferir do sexo genético. Nos últimos anos, diversos estudos mostraram que a diferenciação sexual em peixes pode ser influenciada pela temperatura em que eles se desenvolvem (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999), abrindo assim a possibilidade para o controle eficaz da determinação sexual pela manipulação ambiental (PIFERRER, 2001).

Os estudos iniciais sobre a diferenciação sexual e gametogênese em peixes anuais foram relatados para *A. charrua* Costa & Cheffe, 2001, onde a diferenciação sexual ocorre primeiramente nas fêmeas, ainda na fase embrionária, como demonstrado por análise histológica em Arezo et al. (2007). Esta é uma diferença significativa em relação às espécies de peixes não anuais, pois a diferenciação sexual na maioria dos teleósteos gonocóricos parece ocorrer em diferentes estágios posteriores à eclosão, mais precocemente em fêmeas do que em machos (NAKAMURA et al., 1998; STRÜSSMANN; NAKAMURA, 2002).

A determinação sexual dependente da temperatura (TSD) tem sido motivo de diversos estudos ao longo das últimas décadas, em uma variedade de répteis (WIBBELS; COWAN; LEBOEUF, 1998), anfíbios (BRAGA; LIMA, 2001) e outros vertebrados. Entre os peixes teleósteos, a Tilápia do Nilo é modelo de trabalhos que visam analisar os efeitos da temperatura no desenvolvimento e reprodução. Um dos trabalhos pioneiros foi realizado por Baroiller et al. (1995), analisando a diferenciação sexual por temperatura em *Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758 com tratamento a 36°C, constatando que o sexo desta espécie é determinado por fatores genéticos, nível de temperatura e interações genótipo-temperatura.

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de responder as questões de desenvolvimento e diferenciação do sexo fenotípico em peixes anuais. Neste sentido, Harrington (1968) sugere uma possível influência da temperatura na determinação do sexo em juvenis de *Kryptolebias marmoratus* (Poey, 1880). Ao mantê-los a 19°C (temperatura mais baixa do que no meio ambiente natural) obteve uma população com 100% de machos, quando em populações naturais da Flórida a proporção é de apenas 1% de machos.

Para *A. nigrofasciatus*, Volcan et al. (2012) estudou os efeitos da temperatura sobre a sobrevivência, crescimento inicial e diferenciação sexual fenotípica expondo juvenis a duas diferentes temperaturas, observando maior proporção de machos quando mantidos a 16°C que a 22°C, sugerindo assim um possível papel da temperatura na determinação do sexo fenotípico da espécie. Além disso, observou um crescimento rápido inicial, o que resultou na maturação precoce e dimorfismo sexual na temperatura de 22°C, comparado com 16°C. Quanto à sobrevivência, não foi registrada mortalidade associada aos tratamentos.

Além de influenciar na diferenciação fenotípica do sexo de peixes anuais, a temperatura pode influenciar no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos peixes anuais. Neste sentido, Walford e Liu (1965) relataram resultados sobre o tempo de vida e a taxa de crescimento de *Cynolebias adloffii* (Ahl, 1922) mantida no laboratório em 16°C e 22°C e observaram um aumento da taxa de crescimento à temperatura mais baixa. Complementando esse resultado, Liu e Walford (1969) afirmam que, para peixes anuais, 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 dos reprodutores.

Outro exemplo da influência da temperatura no crescimento é apresentado por Errea e Danulat (2001), pois observaram que a taxa de crescimento ao longo do ciclo de vida do peixe anual *A. viarius* (Vaz-Ferreira, Sierra de Soriano & Scaglia de Paulet, 1965) no seu habitat natural, está relacionada com fatores climáticos, como temperatura do ar e precipitação, e as características físicas e químicas do ambiente.

Mais recentemente, Fonseca et al. (2013) estudando o crescimento de *A. wolterstorffi* (Ahl, 1924) em diferentes temperaturas (16, 20, 24 e 28°C) observou

que a manutenção a 28°C é prejudicial ao crescimento da espécie. Verificou também que a temperatura ótima para o crescimento diminui ao longo da vida, onde no início do ciclo, durante a fase juvenil, temperaturas mais elevadas (23,8°C) favorecem o crescimento, enquanto temperaturas mais baixas favorecem o crescimento após a maturação, sendo a temperatura ótima para o crescimento ligeiramente superior para as fêmeas (20,7°C) que para os machos (20,1°C) adultos. Além disso, com ensaios de reprodução nas mesmas temperaturas do estudo de crescimento, Fonseca et al. (2013) observou que as fêmeas mantidas a 24°C apresentaram melhores resultados, obtendo altas taxas de fertilidade e fecundidade. Sugerindo assim que 24°C é a temperatura mais indicada para manter *A. wolterstorffi* durante todo o ciclo em cativeiro.

Mantendo embriões de *Cynopoecilus multipapilatus* Costa, 2002 em diferentes temperaturas, Arenzon; Lemos e Bohrer (2002) verificaram o tempo requerido para completarem o desenvolvimento, o efeito da temperatura sobre os estágios de desenvolvimento embrionário e na taxa de eclosão. Os ovos mantidos a duas temperaturas constantes (20 e 25°C) e a uma temperatura variável (16-25°C) foram observados diariamente e foram descritos 13 estágios de desenvolvimento. Como resultados tiveram um menor período de incubação para completar o desenvolvimento a 25°C. Entretanto, os embriões mantidos a essa temperatura eclodiram apresentando más formações morfológicas que inviabilizavam sua sobrevivência.

Estudando a influência da temperatura no desenvolvimento e padrões de diapausas, Podrabsky; Garrett e Kohl (2010) observaram que o aumento da temperatura de incubação de embriões de *Austrofundulus limnaeus* (Schultz, 1949) induz uma maior proporção de embriões que escapam da diapausa II. Quando incubados a 20 ou 25°C, uma pequena percentagem de embriões não passou pela diapausa, enquanto que a incubação a 30°C, 100% dos embriões escapa desta diapausa. Com isso entende-se que a temperatura de incubação pode alterar diretamente a trajetória de desenvolvimento de um embrião.

Como apontado por Volcan et al. (2012, 2013), estudos futuros sobre a influência da temperatura sobre o ciclo de vida de Rivulidae são importantes para a compreensão da biologia e conservação dessas espécies, principalmente aqueles cujo objetivo é manter populações no seu habitat ou em condições de laboratório.

3 Material e Métodos

3.1 Coleta dos reprodutores

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.

3.2 Produção dos ovos

Após a coleta, os reprodutores foram mantidos em aquário 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 (copépodes e cladóceros), diariamente *ad libitum*.

O ninho foi mantido por sete dias no aquário. Após este período, a fibra foi removida e triada para a coleta dos ovos, os quais foram observados com auxílio de estereomicroscópio, em aumento de 45x, para confirmação da fertilização. A fertilização foi confirmada pela presença de espaço perivitelínico e a fase do desenvolvimento embrionário não ultrapassou a fase de reagregação inicial dos blastômeros. Os ovos que não apresentaram o espaço perivitelínico foram descartados do experimento.

3.3 Exposição dos ovos

De 900 ovos fertilizados, 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), definidas com base em outros trabalhos realizados para a espécie em laboratório, na tentativa de atingir uma faixa de variação térmica existente no ambiente natural desta espécie (Fonseca et al., 2013). Ao total foram distribuídos seis lotes de 30 ovos para cada tratamento. Com exceção do TA, mantido em temperatura ambiente variável, os lotes foram mantidos em banho-maria em local climatizado, com temperatura igual ou inferior a dos tratamentos, termostatizados e com bomba submersa para a homogeneização da

temperatura. Os ovos permaneceram no escuro, sendo expostos à claridade apenas no momento das observações e manutenção.

3.4 Manutenção das condições físicas e químicas

Para a manutenção da qualidade das condições físicas e químicas dos lotes de ovos, a temperatura foi medida diariamente, enquanto o pH (com precisão de 0,01) e amônia, com kits colorimétricos (0,1mg/L - Nutrafin®/Hagen/Alemanha), foram medidos uma vez por semana. Semanalmente realizou-se a renovação do meio de incubação de cada lote, com solução de Yamamoto previamente mantida na mesma condição térmica, juntamente com o registro e retirada dos ovos mortos.

3.5 Desenvolvimento embrionário

Semanalmente foi observada a fase de desenvolvimento em que os embriões de cada tratamento se encontravam. As fases consideradas para as análises foram 1 – presença de eixo embrionário e/ou vesícula de Kupffer; 2 - somitogênese; 3 – pigmentação; 4 – cauda sobreposta à cabeça; 5 – eclosão.

3.6 Medidas morfológicas das larvas

Os embriões de cada tratamento foram observados diariamente para realizar o registro das eclosões e medidas morfológicas das larvas. Ao eclodirem as larvas foram anestesiadas com Benzocaína (50ppm) e medidas com auxílio de 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).

3.7 Análise histológica

Para a análise histológica e diferenciação sexual, as larvas foram fixadas em formol 10%. Posteriormente conservadas em álcool etílico 70%, até processamento de acordo com a técnica clássica de hematoxilina-eosina e diafanizados em xilol para análise em microscópio ótico, para identificar os ovários ou os testículos presuntivos de cada espécime (AREZO et al., 2007). Devido ao atraso no desenvolvimento dos embriões mantidos em 16°C, foi realizada a análise histológica dos ovos com embriões na fase 4 de desenvolvimento, os quais foram processados

da mesma forma que as larvas. Nos demais tratamentos, as larvas analisadas foram apanhadas aleatoriamente quanto ao tempo de eclosão.

3.8 Análise estatística

A comparação entre médias foi realizada por ANOVA, seguida de teste de Tukey desde que respeitadas as pressuposições da análise paramétrica (distribuição normal e homogeneidade da variância), e por análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida do teste de Dunn, quando os pressupostos da análise paramétrica não foram atendidos. Em todos os testes foi considerado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 7.0.

4 Resultados

4.1 Temperatura e parâmetros de qualidade dos meios de incubação

Os parâmetros referentes a qualidade dos meios de incubação são apresentados na tabela 1. As médias das temperaturas testadas diferiram e permaneceram dentro da faixa nominal planejada. Apenas a média da TA não diferiu da média calculada para o tratamento de 20°C. A variação térmica do tratamento TA, durante o período de 30 semanas, é apresentada na figura 1. A concentração média de amônia total e os níveis de pH não diferiram entre os tratamentos.

Tabela 1 – Temperatura, pH e amônia total dos meios de incubação de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos sob diferentes condições térmicas (média ± erro padrão). Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos (Kruskal Wallis, Dunn, $p < 0,05$). TA- temperatura ambiente.

Tratamento	Temperatura (°C)	pH	Amônia total (ppm)
16°C	16,07±0,04 a	6,41±0,04 a	0,00088±0,00004 a
20°C	19,82±0,17 b	6,31±0,03 a	0,00093±0,00006 a
24°C	23,81±0,10 c	6,32±0,02 a	0,00118±0,00010 a
28°C	27,91±0,06 d	6,34±0,02 a	0,00157±0,00017 a
TA	20,10±0,35 b	6,40±0,03 a	0,00109±0,00009 a

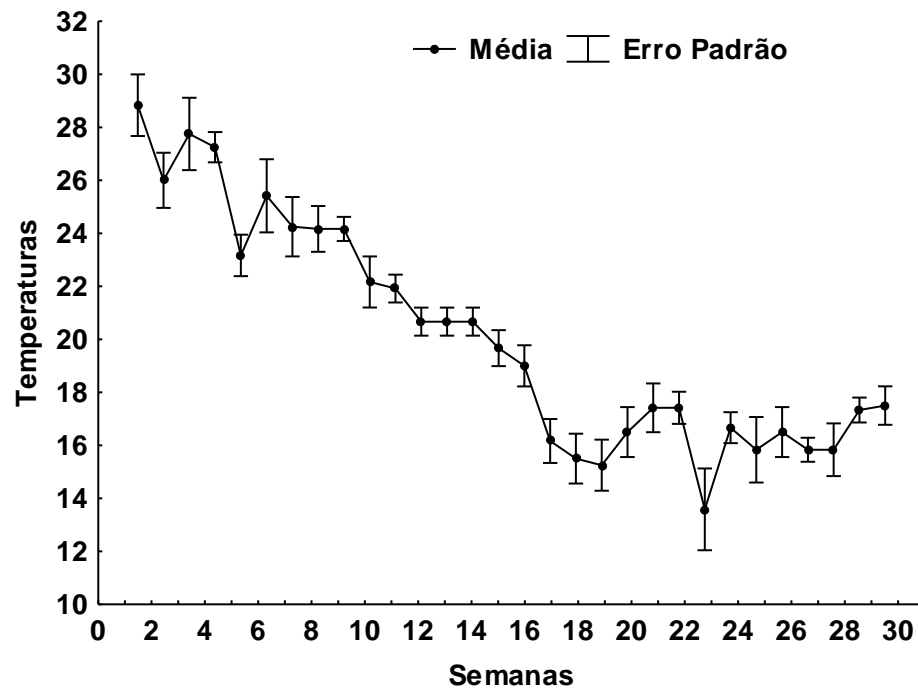


Figura 1 – Variação térmica durante a incubação de ovos de *Austrolebias nigrofasciatus* em temperatura ambiente (TA), durante 30 semanas (média \pm erro padrão).

4.2 Desenvolvimento embrionário

Analisando o desenvolvimento embrionário foi possível identificar diferenças no tempo em que os embriões levaram, nas diferentes temperaturas, para alcançar cada etapa de desenvolvimento (figura 2). Aos 22 dias de experimento haviam embriões iniciando a pigmentação nos tratamentos de 20°C, 24°C e 28°C, sendo que, entre eles, o tratamento de 24°C se mostrou mais adiantado em relação ao número de embriões pigmentados, ultrapassando os 50% (figura 3 a e b).



Figura 2 - Etapas do desenvolvimento embrionário de *Austrolebias nigrofasciatus*. Fase 1 – presença de eixo embrionário e/ou vesícula de Kupffer; Fase 2 - somitogênese; Fase 3 – pigmentação; Fase 4 – cauda sobreposta à cabeça; Fase 5 – eclosão.

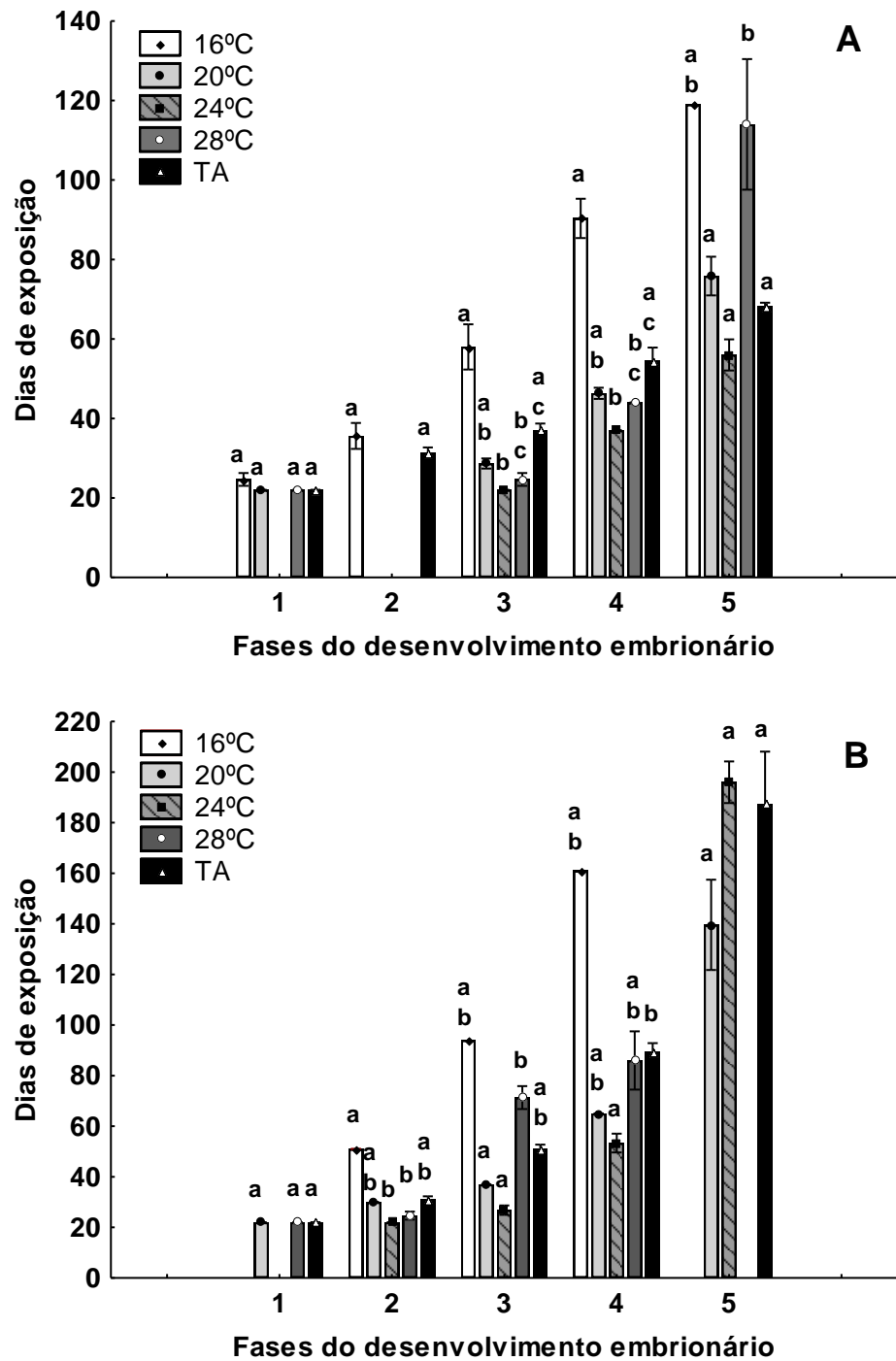


Figura 3 – Tempo para o primeiro registro de cada fase do desenvolvimento (A) e tempo para 50% dos embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* chegar a cada fase do desenvolvimento (B), mantidos em diferentes temperaturas (1 – presença de eixo embrionário e/ou vesícula de Kupffer; 2 - somitogênese; 3 – pigmentação; 4 – cauda sobreposta à cabeça; 5 – eclusão) (média \pm erro padrão; ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) TA – temperatura ambiente.

4.3 Taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões

Durante o período experimental, foi observada diferença nas taxas de eclosão entre o tratamento de 24°C comparado aos tratamentos de 16°C e 28°C, e sobrevivência dos embriões entre o tratamento de 28°C, que apresentou taxa menor, comparado aos tratamentos de 16°C e 20°C. Os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação (média \pm erro padrão). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos. TA – temperatura ambiente (Kruskal Wallis, Dunn, $p < 0,05$).

Tratamento	Eclosão (%)	Sobrevivência (%)
16°C	00,56 a	96,67 \pm 0,86 a
20°C	59,44 \pm 6,85 bc	92,22 \pm 3,51 a
24°C	61,67 \pm 7,97 c	79,44 \pm 6,41 ab
28°C	07,78 \pm 2,81 ab	34,44 \pm 4,61 b
TA	46,67 \pm 7,55 bc	83,89 \pm 5,54 ab

4.4 Medidas morfológicas das larvas

As medidas morfológicas das larvas recém-eclodidas são apresentadas na tabela 2. Ao analisar os resultados pode-se notar diferença na média do CT do tratamento de 20°C em relação aos de 28°C e TA, e entre o tratamento de 24°C e 28°C. Houve diferença nas médias de CP dos tratamentos, apenas os tratamentos de 28°C e TA não diferiram entre si. Houve diferença estatística do DG entre os tratamentos de 20°C e TA e do CSV de 28°C para os demais tratamentos. Não houve diferença da LSV entre os tratamentos.

Tabela 3– Medidas morfológicas das larvas de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação (CT- comprimento total; CP- comprimento padrão; CSV- comprimento do saco vitelínico; LSV largura do saco vitelínico e DG- diâmetro da gota de lipídeo). Letras distintas representam diferenças significativas entre as médias. TA – temperatura ambiente (média \pm erro padrão; ANOVA; Tukey; Kruskal Wallis, Dunn; $p < 0,05$).

Tratamento	CT (mm)	CP (mm)	CSV (mm)	LSV (mm)	DG(mm)
20°C	5,64 \pm 0,04 a	4,89 \pm 0,03 a	1,36 \pm 0,02 a	1,79 \pm 0,88 a	0,33 \pm 0,01 a
24°C	5,52 \pm 0,03 ac	4,76 \pm 0,03 b	1,31 \pm 0,03 a	0,83 \pm 0,01 a	0,35 \pm 0,03 ab
28°C	5,03 \pm 0,13 b	4,31 \pm 0,14 c	1,18 \pm 0,04 b	0,92 \pm 0,05 a	0,40 \pm 0,08 ab
TA	5,37 \pm 0,05 bc	4,58 \pm 0,04 c	1,31 \pm 0,02 a	0,81 \pm 0,03 a	0,40 \pm 0,02 b

4.5 Más formações

Houve diferença estatística no percentual de más formações entre os embriões dos tratamentos de 16°C (0,00%) e 20°C (0,00%) em relação aos de 28°C (10,56±2,00) e TA (15,56±3,41). O tratamento de 24°C (2,22±1,11) não diferiu dos demais tratamentos em relação às más formações. Os resultados são apresentados na figura 4, exemplos de más formações encontradas são apresentados na figura 5.

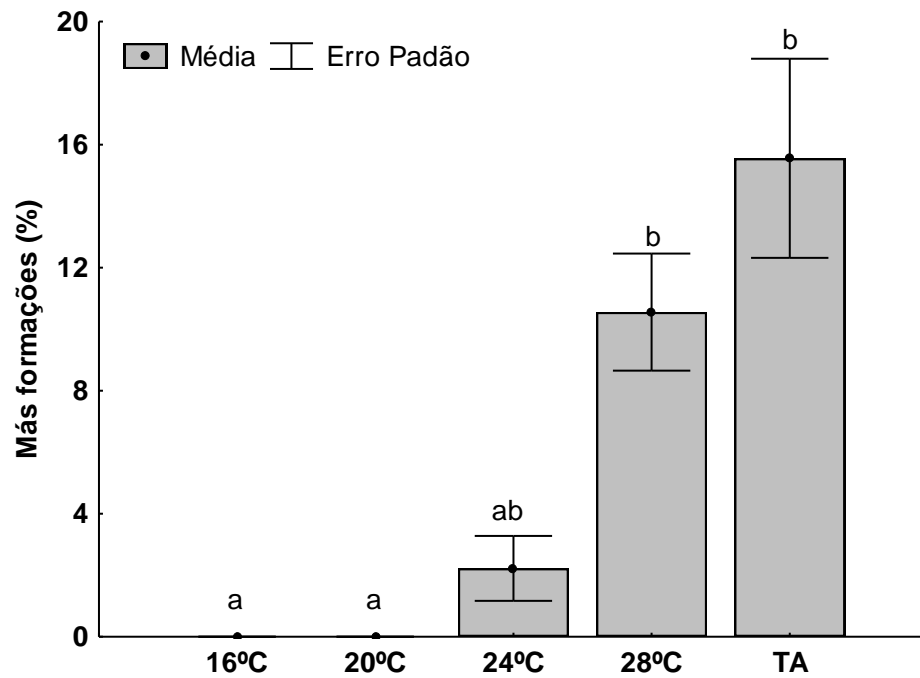
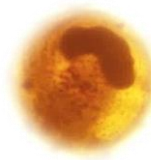


Figura 4 - Más formações em embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos. TA – temperatura ambiente (média ± erro padrão; Kruskal Wallis, $p < 0,05$).



Ausência de olhos



Deformação nos olhos



Gêmeos



Deformação na mandíbula e coluna

Figura 5 - Más formações morfológicas em embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação.

4.6 Proporção Sexual

O tratamento de 16°C apresentou maior número de fêmeas por machos em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si. Estes resultados são apresentados na tabela 4. A figura 5 mostra a lâmina histológica de uma larva recém-eclodida, a gônada feminina pode ser observada já em um estágio bem desenvolvido de diferenciação. Os embriões de 28°C não alcançaram um número suficiente na fase 4 para realizar a análise de proporção sexual.

Tabela 4 – Proporção sexual (nº de fêmeas/nº de machos) de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* mantidos em diferentes temperaturas de incubação (média ± erro padrão). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos. (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$).

Tratamento	Proporção Sexual
16°C	1,88±0,19 a
20°C	0,91±0,05 b
24°C	0,67±0,24 b
TA	1,04±0,16 b

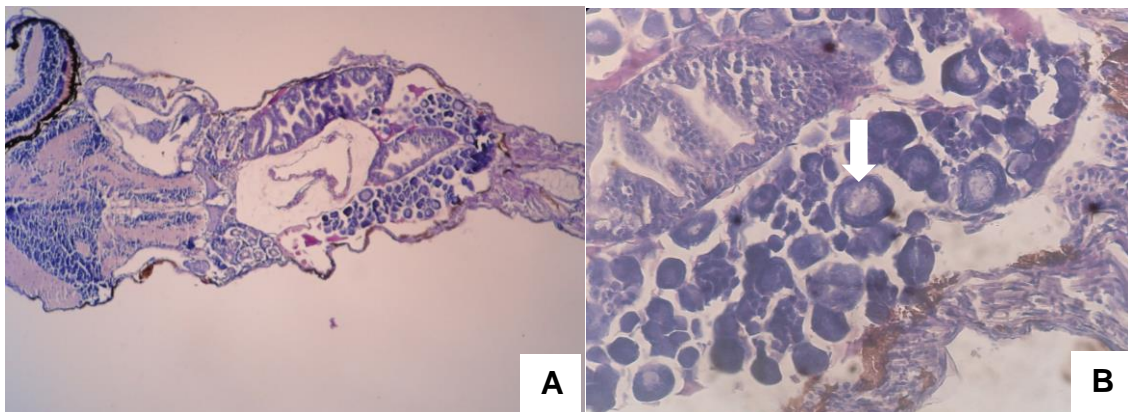


Figura 6 - Lâmina histológica de larva de *Austrolebias nigrofasciatus* recém-eclodida. (A) Parâmetro geral da larva, (B) ovário bem desenvolvido, seta: ovócito.

5 Discussão

Em peixes é comum utilizar o controle da temperatura como um fator para a manipulação das proporções sexuais de uma população, visando produção e conservação das espécies (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999; BAROILLER et al., 1995). Para peixes anuais, já foram levantadas algumas suposições sobre a influência da temperatura na diferenciação sexual (HARRINGTON, 1968; VOLCAN et al. 2012), além de estudos que observaram seu efeito no desenvolvimento embrionário (ARENZON; LEMOS; BOHRER, 2002; ; PODRABSKY; GARRETT; KOHL, 2010), sobrevivência (ERREA; DANULAT, 2001) e ocorrência de más formações (ARENZON; LEMOS; BOHRER, 2002).

De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, foram observados embriões pigmentados desde a terceira semana de exposição, porém, somente no tratamento de 24°C já haviam 50% dos embriões na fase 3 no período de três semanas, tratamento em que ocorreram também, precocemente, as primeiras eclosões. Para *A. wolterstorffi*, Fonseca et al. (2013) demonstrou que temperaturas mais elevadas (23,8°C) favorecem o crescimento durante a fase juvenil, enquanto em 16°C o crescimento inicial é prejudicado. Neste estudo o desenvolvimento embrionário foi atrasado em 16°C, sendo que nesta condição foi observada apenas uma eclosão durante todo o tempo de observação. Corroborando com estes resultados, Podrabsky; Garrett e Kohl (2010), ao estudar a influência da temperatura no desenvolvimento e padrões de diapausas em *A. limnaeus*, mostram que temperaturas elevadas aceleram o desenvolvimento embrionário da espécie, 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.

Os resultados do presente estudo indicam que as temperaturas intermediárias tendem a acelerar o desenvolvimento embrionário, enquanto temperaturas extremas podem prolongar o tempo de desenvolvimento dos embriões. Arenzon; Lemos e Bohrer (2002), encontraram resultados semelhantes para *C. multipapilatus*, onde a maior temperatura estudada, 25°C, exigiu um menor período de incubação para

completar o desenvolvimento da espécie. Entretanto, os embriões mantidos nesta temperatura apresentaram más formações morfológicas que inviabilizavam a sobrevivência. No presente estudo, observou-se um aumento na incidência de más formações com o aumento da temperatura, sendo as maiores taxas de embriões mal formados registrados para o tratamento em TA. Esclarecendo este resultado, as médias de temperaturas do tratamento TA nas semanas que antecedem os registros de más formações, ficaram entre as maiores temperaturas ou superiores às dos tratamentos com temperatura controlada. Com isto, pode-se inferir que a determinação destas más formações embrionárias ocorre antes da sexta semana de exposição, pois nesse período foi possível identificar a ocorrência destas e que o aumento da temperatura favorece o surgimento das mesmas.

Analisando os resultados de sobrevivência, observou-se uma alta taxa de sobrevivência para os tratamentos de 16 (96%) e 20°C (92%), além disso, ambos os tratamentos não apresentaram registro de má formação durante o período de observações. Corroborando com estes resultados, Volcan et al. (2012), não registraram mortalidade associada aos tratamentos com os juvenis de *A. nigrofasciatus* em temperaturas semelhantes (16°C e 22°C).

Para o tratamento de 28°C houve baixo índice de eclosões e alto índice de mortalidade, comparado aos tratamentos de 20°C, 24°C e TA, além do alto índice de más formações relatadas. Resultados semelhantes são apresentados para outras espécies de Rivulidae. Arenzon; Lemos e Bohrer (2002), relataram baixo índice de sobrevivência em temperatura de 25°C para *C. multipapilatus*, sugerindo que a causa tenha sido as más formações morfológicas que inviabilizaram a sobrevivência nesta temperatura.

Ao analisar as medidas morfológicas das larvas recém-eclodidas, pode-se notar que as maiores médias de CT, CP, CSV e LSV foram registradas para os tratamentos de 20°C e 24°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Fonseca et al. (2013) para *A. wolterstorffi*, onde o crescimento foi a ser prejudicado nas temperaturas extremas e o CP dos juvenis em tratamentos de 20°C e 24°C se mantiveram superiores aos alcançados em 16°C e 28°C.

Acredita-se que temperaturas elevadas afetam de forma negativa as funções fisiológicas de peixes anuais de tal forma que os embriões não conseguem chegar aos estágios mais avançados do desenvolvimento e a eclosão (ARENZON; LEMOS; BOHRER, 2002). Pode-se notar que o tratamento de 28°C não foi favorável para a

incubação dos embriões, pois apresentou mortalidade significativa, muitas vezes associada às más formações observadas, sendo considerado prejudicial para a embriogênese da espécie. Além do impacto sobre o desenvolvimento, a temperatura elevada pode prejudicar funções reprodutivas, conforme relatado por Fonseca, 2011. De acordo com esses autores a manutenção de reprodutores de *A. wolterstorffi* a 28°C inibiu a produção de espermatozoides e inviabilizou a reprodução nesta condição. Desta forma, entende-se que temperaturas muito elevadas são desfavoráveis para manter rivulídeos em cativeiro.

Quanto à proporção sexual, foi observada maior razão de fêmeas por machos no tratamento de 16°C em relação aos de 20°C, 24°C e TA. Ao contrário do que foi demonstrado por Harrington (1968) para *K. marmoratus*, onde, em 19°C, obteve 100% de machos, e por Volcan et al. (2012), que encontrou maior proporção de machos expondo juvenis de *A. nigrofasciatus* a 16°C quando comparado a 22°C.

Apesar de observado maior proporção de fêmeas em 16°C, é importante ressaltar que os embriões utilizados neste tratamento foram os primeiros a atingir a fase de desenvolvimento necessária para a realização das análises, portanto, se a espécie possui tempos diferentes de desenvolvimento entre fêmeas e machos para completar o desenvolvimento, isto pode ter influenciado nos resultados obtidos. Segundo Passos et al. (2014) as fêmeas atingem maturidade sexual antes dos machos, no entanto, vários estudos indicam que os machos crescem mais rápido que as fêmeas (VOLCAN et al., 2012; FONSECA et al., 2013), portanto, seria necessário aguardar o desenvolvimento completo dos embriões em 16°C para realização de análises complementares.

Os resultados obtidos até o momento, sozinhos, não sustentam a hipótese de que 16°C induz a inclinação da proporção sexual a favor das fêmeas. Devido a ausência de eclosões em 16°C realizou-se a histologia de todos os ovos com embriões na fase 4 de desenvolvimento (pigmentados e com cauda sobreposta a cabeça). Com a sequencia do trabalho e posterior análise do restante dos embriões, este resultado poderá ser melhor explicado.

6 Conclusão

A incubação de ovos de *Austrolebias nigrofasciatus* entre as temperaturas de 20°C e 24°C, favorece o desenvolvimento embrionário, promove aumento do tamanho e da sobrevivência das larvas, com reduzido percentual de más formações.

Referências

ADKINS-REGAN, Elizabeth. Hormones and sexual differentiation. In: NORRIS D. O., JONES R. E., (eds). **Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles**. New York: Plenum Press, 1987. p. 1–29.

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.

AREZO M. J.; D’ALESSANDRO, S.; PAPA, N.; SÁ, R.; BEROIS, N. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Tissue and Cell**, v. 39, n. 2, p. 89–98, 2007.

BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouth brooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 273, n. 3, p. 216–223, 1995.

BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 910-931, 1999.

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, Wilson. J. E. M. **Catalog of Aplocheiloid killifishes of the world**. Rio de Janeiro: ed. UFRJ, 2008. 127 p.

COSTA, Wilson. J. E. M. **Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação**. Curitiba: ed. UFPR, 2002. 238 p.

COSTA, Wilson. 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.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3-4, p. 191-364, 2002.

ERREA, A.; DANULAT, E. Growth of the anual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. **Environmental Biology of Fishes**, v. 61, n. 3, p. 261-268, 2001.

FONSECA, A. P. **Crescimento e reprodução do peixe anual *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) em diferentes temperaturas**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

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.

GARCIA D.; LOUREIRO, M.; TASSINO, B. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 2, p. 243-248, 2008.

GONÇALVES C. S; SOUZA U. P; VOLCAN, M. V. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 191-200, 2011.

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. 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>> Acesso em dez. 2013.

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.

LIU, R. K.; WALFORD, R. L. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish *Cynolebias bellottii* Steindachner. **Zoologica**, v. 54, p. 1-16, 1969.

LIU, R. K.; WALFORD, R. L. Observations on the lifespans several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. **Experimental Gerontology**, v. 5, n. 3, p. 241-246, 1970.

LOUREIRO, M., DUARTE, A., ZARUCKI, A. A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 2, p. 335-342, 2011.

MOURABIT, S.; KUDOH, T. Manipulation and Imaging of *Kryptolebias marmoratus* Embryos. **Integrative and Comparative Biology**, v. 52, n. 6, p. 761-768, 2012.

MYERS, George S. Annual fishes. **Aquarium Journal**, v. 23, p. 125-141, 1952.

MYERS, George S. Studies on South American freshwater fishes I. **Stanford Ichthyology Bulletin** v. 2, n. 4, p. 89-114, 1942.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X-T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**. v. 281, n. 5, p. 362-372, 1998.

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.

OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. **Plos One**, v. 3, n. 7, p. 1-11, 2008.

PASSOS, C.; TASSINO, B.; LOUREIRO, M.; ROSENTHAL, G. G. Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. **Behavioural Processes**, v. 96, p. 20-26, 2013.

PIFERRER, Francisc. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 229–281, 2001.

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, n. 19, p. 3280-3288, 2010.

PODRABSKY, J. E.; HAND, S. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 2567-2580, 1999.

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.

STRÜSSMANN, C. A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 13-29, 2002.

VOLCAN, M. V., SAMPAIO, L. A.; BONGALHARDO, D. C.; ROBALDO, R. B. Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 3, p. 648-652, 2013.

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 Neotropical**. v. 12, n. 4, p. 68-73, 2012.

WALFORD, R. L.; LIU, R. K. Husbandry, life-span and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adloffii*. **Experimental Gerontology**, v. 1, n. 2, p. 161-171, 1965.

WIBBELS, T.; COWAN, J.; LEBOEUF, R. Temperature-Dependent Sex Determination in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys scripta*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 281, n. 5, p. 409-416, 1998.

WOURMS, John P. The development Biology of annual fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause variable duration in the eggs of the annual fishes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 182, n. 3, p. 389-414, 1972.