CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DO PEIXE ANUAL *Austrolebias wolterstorffi* (CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE) EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Alinca Peres da Fonseca

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

CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DO PEIXE ANUAL *Austrolebias wolterstorffi* (CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE) EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Alinca Peres da Fonseca

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

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

Rio Grande – RS – Brasil
Março de 2011

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA..... iii

AGRADECIMENTOS..... iv

RESUMO..... v

ABSTRACT..... vi

1. INTRODUÇÃO..... 7

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 12

3. RESULTADOS..... 16

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES..... 32

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 41

Dedico este trabalho a família que formei enquanto o realizava: meu companheiro Matheus e nossa princesa Marina.

Agradecimentos

Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao meu companheiro Matheus, pelas idéias e opiniões muito importantes e sábias, pelo auxílio em laboratório e em campo e principalmente por estar ao meu lado, sendo um marido e um pai maravilhoso, o que me dá segurança e força para prosseguir mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha filha Marina que chegou à minha vida ao longo desta caminhada, ficando impossível não desviar a atenção para as novidades e necessidades dela. Assim mesmo, foi ela quem trouxe graça e estímulo para meus dias de trabalho, nunca mais fui ou serei a mesma após sua existência.

Aos meus pais Eliane e Afranio que sempre me incentivaram e acreditaram na minha capacidade, me apoiando, em especial a minha mãe, que passou incontáveis longos dias com a netinha, abdicando das próprias tarefas e muitas vezes até do conforto da própria cama para passar a semana no Cassino me ajudando.

Aos meus irmãos e amigos Lucília e Afrânio, exemplos de dedicação e inteligência que me orgulham e estimulam.

A minha sogra Nadija, vó Eni, vô Elon e cunhados minha família agregada que sempre me apoiou e incentivou.

Muito obrigada às amigas Marilia, Lizi, Bê, Celle, Nessa e Jú, que sempre que puderam estiveram por perto, proporcionando momentos de descontração e alegria.

Ao amigo e orientador Ricardo Robaldo que além de ter sido um elemento determinante na concretização do trabalho foi extraordinariamente compreensivo e paciente nesta jornada que se tornou incomum por envolver o evento mais importante da minha vida, sou muito grata pela confiança e atenção durante este período.

Ao co-orientador Luís André Sampaio.

Aos colegas Bruna e Yuri pelo auxílio e companhia no laboratório.

Ao curso, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

A Romano, Marta e Dani pela contribuição nos ensinamentos e processamento de material histológico.

A Antônio Sérgio e ao Laboratório de Histologia do Instituto de Biociências da FURG pela disponibilidade dos equipamentos para captura de imagens.

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

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

A temperatura é um parâmetro que influencia na dinâmica de fatores bióticos, especialmente nos animais ectotérmicos. O ciclo de vida dos peixes anuais é afetado pela temperatura da água. Devido à fragilidade do habitat destes peixes à ações antrópicas, ameaça de extinção, importância dos mesmos como modelos biológicos e a lacuna no conhecimento da sua biologia, este trabalho tem como objetivo o estudo da influência da temperatura no crescimento e na reprodução de *Austrolebias wolterstorffi*. Logo após a eclosão foi dado início ao ensaio de crescimento em diferentes temperaturas, 16, 20, 24 e 28°C (todas com três repetições), com duração até os 67 dias de vida dos peixes. O presente trabalho evidenciou que a manutenção em 28°C é prejudicial ao crescimento de *A. wolterstorffi* no âmbito do período estudado Dentre as demais temperaturas testadas, foi verificado que a temperatura ótima para o crescimento diminui ao longo da vida, onde no inicio do ciclo, durante a fase juvenil, temperaturas mais elevadas (23,8° C) favorecem o crescimento, enquanto temperaturas intermediárias otimizam o crescimento de fêmeas (20,7°C) e machos (20,1°C) adultos. A temperatura ótima para o crescimento foi sempre ligeiramente inferior para os machos. O comprimento e o peso corporal demonstraram ser mais representativos na diferenciação do que a idade, pois os peixes com crescimento mais lento demoraram mais a diferenciar. Os machos crescem mais rápido que as fêmeas e, portanto, atingem a maturidade antes. Os ensaios de reprodução foram constituídos dos mesmos tratamentos do experimento de crescimento, porém as 12 UE foram dotadas de casais. Foram fornecidos ninhos para postura de ovos. De maneira geral, as fêmeas tratadas a 24°C apresentaram melhores resultados, pois além de manter o fator de condição (K) relativamente elevado, obtiveram altas taxas de fertilidade (FT) e fecundidade (FC). Dados registrados para K, FT, FC, índice gonadossomático e histologia dos testículos evidenciaram que o desempenho reprodutivo foi prejudicado na temperatura mais elevada. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que 24°C é a temperatura mais indicada para manter *A. wolterstorffi* durante todo o ciclo em cativeiro.

Palavras chave: comprimento; peso; fecundidade; fertilidade; histologia

ABSTRACT

Temperature is especially important for the dynamics of biotic factors in poikilothermic animals. Life cycle of annual fish is affected by temperature. These fish inhabit fragile environments, susceptible to antropic actions, and as such some species are threatened with extinction. They are also important as biological models, but information on their bio-ecology is scarce. The aim of this work was to investigate the influence of temperature on growth and reproduction of *Astrolebias wolterstorffi*. Soon after hatching fish were exposed to 16, 20, 24 and 28°C, and their growth was followed for 67 days. Until 18 d.a.h (days after hatching) the growth is hampered at 16°C and do not show difference at 20, 24 and 28°C. Thereafter, the intermediate temperatures favor growth of juveniles, while extremes temperatures are prejudicial. After sexual differentiation, growth was improved for fish reared at 16°C, and reduced at 28°C. There is evidence suggestin that optimal growth temperature decrease with fish age. Juveniles grow faster at high temperature (23,8°C), whereas intermediate ones optimize the growth adults females (20,7°C) and males (20,1°C). Growth of males is higher at slightly lower temperatures than that optimal for growth of females. Maturation onset is defined by length rather than age, and at high temperatures maturation is observed earlier. Also, males mature earlier than females. For the reproduction study, 12 couples (150 d.a.h.) were distributed in 12 tanks at the same temperatures of the growth experiment. Reproduction output was favored when *A. wolterstorffi* were kept at 24°C. Furthermore, fish kept at 28°C presented the worst reproductive parameters, including condition factor, fertility, fecundity, gonadosomatic index, and also histological evidence. The results of the present studies suggest that *A. wolterstorffi* should be reared at 24°C during the whole cycle in captivity.

Key words: length; weight; fecundity, fertility; histology

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos da temperatura sobre os processos bioquímicos e fisiológicos são fundamentais para definir o desempenho de diversos processos nos animais, especialmente nos ectotérmicos como os peixes (Fangue *et al.*, 2006). A variação da temperatura corpórea em peixes influencia várias funções fisiológicas como consumo de oxigênio, alimentação e digestibilidade (Evans, 2006), afetando também aspectos funcionais como o crescimento e a aptidão reprodutiva (Ham *et al.*, 2003; Ostrowski *et al.*, 2011; Imholt *et al*., 2011).

O aumento da temperatura da água pode ter um efeito negativo sobre o crescimento devido ao maior custo energético, mas também um efeito positivo devido à maior eficiência da transformação da energia dos alimentos em energia metabolizável (Árnason *et al.*, 2009). Comumente os peixes nas fases jovens apresentam um ligeiro aumento na taxa de crescimento com o aumento da temperatura, passando por um pico e caindo rapidamente quando a temperatura torna-se adversa. Desta forma, a temperatura ótima para o peixe, representada pelo pico de crescimeto, é espécie específica e varia ao longo da vida (Imsland *et al.*, 1996). Para muitas espécies a temperatura ideal para a conversão alimentar e crescimento diminui a medida que os peixes crescem (Imsland *et al.*, 1996; Árnason *et al.*, 2009).

O crescimento lento pode prolongar os períodos de susceptibilidade aos predadores e as doenças, além de aumentar o risco de mortalidade durante períodos de estresse (Garvey *et al.*, 2004), situações indesejáveis principalmente em condições de cultivo, onde a propagação de doenças e parasitas se torna muito mais rápida e a exposição ao estresse é inevitável. Por outro lado, o rápido crescimento pode levar a maturação sexual precoce e aumento da fecundidade (Utrilla & Lobon-Cervia, 1999). Porém, dependendo do objetivo do cultivo, alcançar a maturidade sexual pode ser prejudicial, por levar a uma diminuição na taxa de crescimento, uma vez que normalmente o organismo diminui o gasto energético com crescimento somático e passa a investir na reprodução (Liu & Walford, 1969).

Existem registros de disfunções gonadais decorrente de temperaturas adversas em peixes (Glasser *et al.*, 2004). As técnicas histológias auxiliam na identificação e reconhecimento destes distúrbios, pois permitem a pesquisa tecidual e celular no interior das gônadas. Além disto, a histologia permite inferir sobre a fecundidade dos

peixes e é uma técnica amplamente utilizada em ambos os casos (Parenti & Grier, 2004; Bapary & Takemura, 2010).

Alguns estudos têm evidenciado a influência da temperatura no ciclo de vida dos peixes anuais (Liu & Walford, 1966; Liu *et al.*, 1975; Errea & Danulat, 2001; Arenzon *et al.*, 2002a; Genade *et al.*, 2005; Vallenzano *et al.*, 2006; Volcan, 2009).

Os peixes anuais são assim conhecidos por habitarem exclusivamente áreas úmidas sazonais, que secam em certos períodos do ano. Neste tipo de ambiente, as espécies encontram-se expostas a condições extremamente variáveis, como ampla flutuação de temperatura e de disponibilidade de oxigênio (Errea & Danulat, 2001; Arenzon *et al.*, 2002b). Por viverem em áreas úmidas que permanecem alagadas por curtos períodos, os peixes anuais apresentam rápido crescimento e precocidade na maturação sexual (Arenzon *et al.*, 1999; Errea & Danulat, 2001; Volcan, 2009). A maioria das espécies enterra seus ovos no substrato, onde permanecem durante a estação de seca em estágio de diapausa até o início das chuvas. Quando as áreas alagam os ovos eclodem e um novo ciclo é iniciado (Wourms, 1972).

A maioria das espécies de peixes anuais sofre ameaça de extinção, por seu habitat ser constantemente descaracterizado pelo uso em atividades humanas (Reis *et al.*, 2003; Rosa & Lima, 2008; Volcan *et al.*, 2009; 2010; 2011). Entre estas atividades estão principalmente a agropecuária e a expansão urbana, formal ou informal, além da falta de fiscalização e cumprimento de leis que protegem estes ambientes, já que os mesmos são áreas de preservação permanente (APP) (Lei Federal n° 4.771 de 1965), portanto, legalmente não é permitida a sua utilização para qualquer fim que não assegure sua estabilidade.

Desde a década de 60 aspectos biológicos de peixes anuais sul-americanos (Liu & Walford, 1969; Liu & Walford, 1970; Liu *et al.*, 1975) e africanos (Markofsky & Perlmutter, 1972; Markofsky, 1976; Markofsky & Matias, 1977; Markofsky & Milstoc, 1979a,b) vinham sendo pesquisados quanto a longevidade, porém, estes peixes como modelos foram abandonados por aproximadamente três décadas e, atualmente, voltaram a ser estudados com este propósito (Genade *et al.*, 2005, Valenzano *et al.*, 2006). Por serem vertebrados e possuírem organismo complexo, as analogias com o ser humano são mais aceitáveis do que as obtidas de estudos com invertebrados. Além disto, os peixes anuais possuem um ciclo de vida curto, possibilitando inferir sobre as taxas de mortalidades extrínsecas e intrínsecas na evolução da senescência em um breve período.

Os peixes anuais têm o ciclo de vida definido em cativeiro e este pode ser modulado pela temperatura da água (Genade *et al.*, 2005).

Além da importância ecológica e científica da conservação de espécies ameaçadas, os peixes anuais são mundialmente apreciados na ornamentação aquática, especialmente pela beleza que a maioria das espécies exibe, mas também pela história de vida e comportamento social e reprodutivo peculiares, inclusive mobilizando grupos de estudo, criadores e admiradores, além de revistas, livros, sites e publicações em geral acerca dos mesmos (Costa, 2008). A exuberância destes peixes de marcante dimorfismo sexual fica por conta principalmente do colorido dos machos, que exibem os mais diversos padrões de cores e contornos característicos de cada espécie.

Em meio aos peixes anuais, *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl 1924) (Figura 1) é uma das espécies de maior porte dentre as suas congêneres. Devido especialmente a esta característica, a espécie já foi incluída no gênero *Megalebias*. Em seu primeiro registro a espécie foi denominada *Cynolebias wolterstorffi* Ahl, 1924 até ser renomeada como *Megalebias wolterstorffi* (Ahl, 1924) em 1998. Posteriormente, o gênero *Megalebias* foi invalidado e todas as suas espécies transferidas para *Austrolebias* (Costa, 2006).

A. wolterstorffi possui distribuição restrita, sendo endêmica do sistema lagunar Patos-Mirim, onde ocorre em pontos isolados do sul do Rio Grande do Sul ao leste do Uruguai (Costa, 2006). O clima desta região é subtropical, caracterizado por estações bem definidas, com sazonalidade térmica e de umidade. No Rio Grande do Sul a temperatura média da água no verão oscila de 16 e 28°C, e no inverno de 14 a 17°C, podendo chegar a 9°C nos meses mais frios (Garcia *et al*., 2008).

Devido à perda e degradação de seu habitat e a sua limitada área de distribuição, a espécie possui elevado interesse de conservação por ser considerada ameaçada de extinção, estando incluída na categoria "Criticamente Ameaçada" nos livros vermelhos da fauna ameaçada de extinção do Rio Grande do Sul e do Brasil (Reis *et al.*, 2003, Rosa & Lima, 2008).

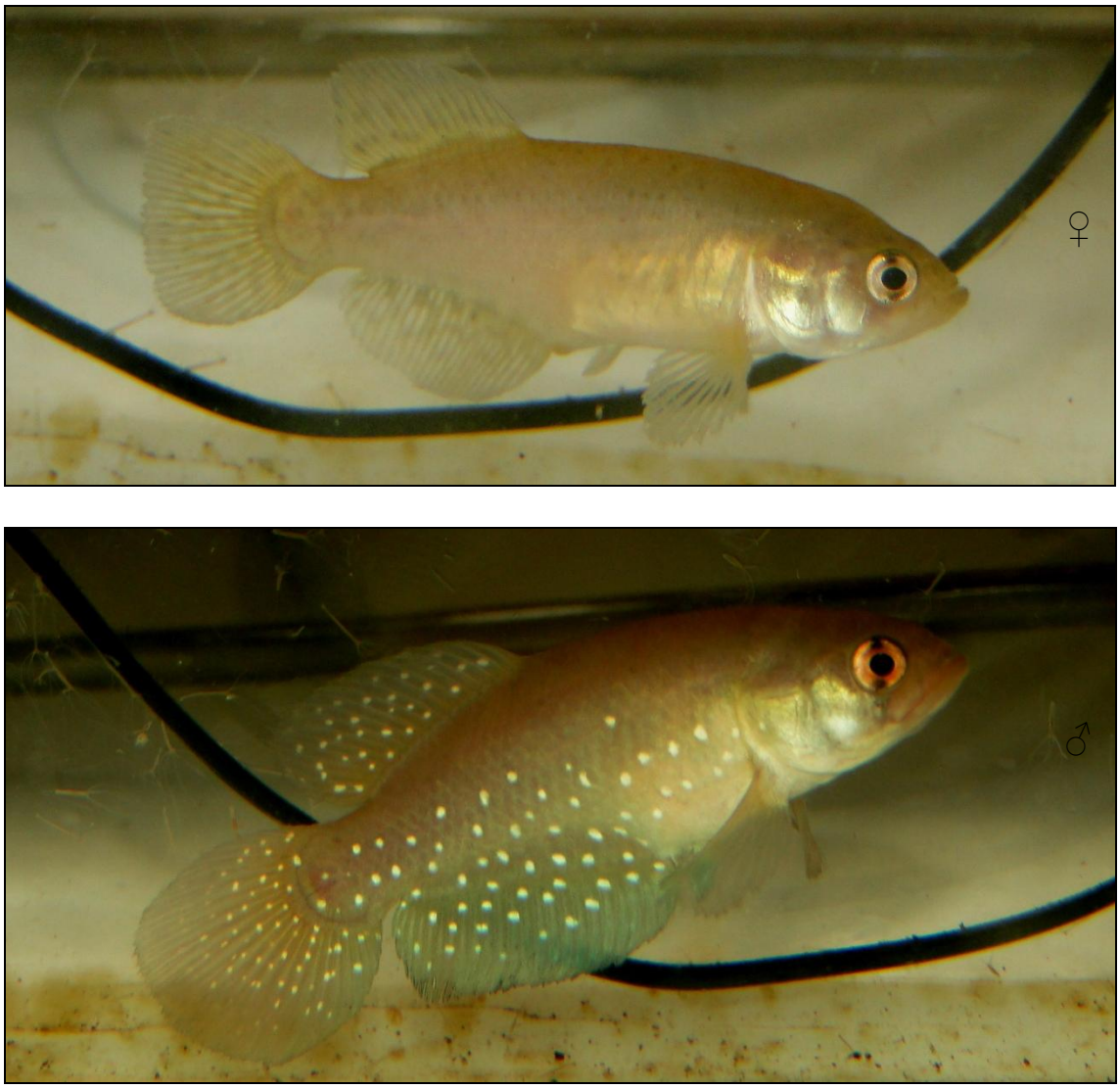

Figura 1. Fêmea (♀) e macho (♂) de *Austrolebias wolterstorffi*.

O estudo da biologia e de técnicas de cultivo de espécies ameaçadas de extinção é muito importante para subsidiar trabalhos de conservação, manejo populacional e repovoamento. Dentre os estudos sobre *A. wolterstorffi*, a maior parte envolve a sua conservação, distribuição e taxonomia (Costa, 2006; Porciuncula *et al.*, 2006; Quintela *et al.*, 2007; Lanés & Maltchik, 2010), enquanto poucos abrangem a biologia e cultivo da espécie (Liu & Walford, 1970; Costa, 2009), além disto, grande parte das publicações sobre reprodução e cultivo de peixes anuais possuem pouco embasamento científico, sendo destinadas principalmente ao aquarismo e criadores.

Tendo em vista a susceptibilidade da espécie devido à descaracterização do seu habitat, a ameaça de extinção, a importância dos peixes anuais como modelos biológicos para estudos de longevidade e a lacuna no conhecimento de aspectos da

biologia destes peixes, o presente trabalho objetivou investigar a influência da temperatura da água de cultivo no crescimento e reprodução de *A. wolterstorffi* em laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aqüicultura da Universidade Federal de Pelotas, no período de abril de 2009 a dezembro de 2010.

Produção e eclosão de ovos

Os reprodutores utilizados para a obtenção dos ovos são oriundos de um banhado localizado no Pontal da Barra (52°13’33” W, 31°46’36” S) na cidade de Pelotas (RS), coletados sob licença do IBAMA/ICMBio, 15108-1.

Quatro trios (oito fêmeas e quatro machos) de *A. wolterstorffi* foram mantidos em um aquário de 300L, dotado de plantas para refúgio dos peixes e ninhos para a postura dos ovos. Após três meses, os ovos foram retirados dos ninhos e mantidos em fibra de coco úmida a temperatura ambiente (18-25°C), no escuro em sacos hermeticamente fechados por mais seis meses. Após este período, para melhor observação do desenvolvimento embrionário, os ovos foram armazenados por dois meses em algodão umedecido, na mesma faixa de temperatura e no escuro até que todos estivessem homogêneos para a eclosão.

Para a eclosão 275 ovos foram colocados no fundo de cinco copos de Beaker de 1L, 55 em cada, cobertos com 10 cm de fibra de coco e imersos em 600mL de água com temperatura controlada em 20°C por 24h.

Manutenção da qualidade da água

Para os ensaios de crescimento e reprodução os aquários foram dotados de aeração constante por soprador com pedra porosa, filtro biológico interno, aquecedor (60W), termostato digital (Aquaterm/FullGauge/0,1°C), e foram mantidos em sala climatizada a temperatura igual ou inferior a 16°C e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro.

A temperatura foi verificada diariamente e o pH (pHmetro digital/Lutron/0,01) e a concentração de oxigênio dissolvido (Oxímetro digital/Lutron/0,1mg/L) foram acompanhados três vezes por semana. Ao término de cada semana foi verificada a

concentração de amônia total (NH_3) (Kit colorimétrico/Nutrafin® - Hagen/0,1mg/L) e foi realizada renovação de 50% do volume de água dos aquários.

Crescimento

Comprimento, peso, relação peso-comprimeto e taxa de crescimento específico

O CP inicial foi medido de 20 exemplares apanhados ao acaso logo após a eclosão. Um total de 120 juvenis recém eclodidos foram divididos aleatoriamente em 12 aquários de 30L (10 por aquário), com temperaturas controladas em 16, 20, 24 e 28°C em triplicata.

Até os 18 DAE os juvenis foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade, a primeira com náuplios recém eclodidos de *Artemia* e a segunda com zooplâncton nativo (selecionando exemplares menores que 500µm). Após este período, os juvenis passaram a ser alimentados apenas com zooplâncton nativo maior que 500 µm duas vezes ao dia.

Para o acompanhamento do crescimento foram realizadas biometrias utilizando paquímetro digital (0,1 mm) para obtenção do comprimento padrão (CP) e balança digital de precisão (0,001g) para o peso (P), que foi registrado apenas a partir dos 46 dias de vida, quinta biometria. A primeira biometria foi realizada 18 dias após a eclosão (DAE), onde foi efetuada uma seleção para excluir exemplares rampantes (sem capacidade natatória normal), permanecendo oito juvenis em cada unidade experimental, as oito biometrias posteriores aconteceram semanalmente, até que todos os exemplares demonstrassem características sexuais secundárias conforme descritas por Costa & Cheffe (2001) e comportamento típico de maturidade sexual. Para definir o momento do término do experimento de crescimento, em todas as biometrias os aquários foram visualizados por cinco minutos cada um e foi registrada a aparência e o comportamento dos peixes.

Para avaliar a relação peso-comprimento (RPC) dos peixes nos experimentos, foi utilizado o P total emmg e o CP em mm. A RPC foi transformada em sua expressão logarítmica: $log\ P = log\ a + b * log\ CP$, onde a é o intercepto e b a inclinação. As relações entre o comprimento e o peso total foram determinadas por regressão linear. Os limites de confiança de 95% para b (IC 95%) foram calculados para determinar se o valor hipotético de isometria estaria entre esses limites (Froese, 2006).

Para o cálculo das taxas de crescimento específico (TCE) referentes ao CP médio (mm) e ao P médio (mg) foram utilizadas as expressões $TCE_{CP} = (log\ n\ CPf - log\ n\ CPi) / t$ e $TCE_P = (log\ n\ Pf - log\ n\ Pi) / t$, respectivamente, onde *log n* representa o logaritmo neperiano, *f* a expressão final, *i* inicial e *t* o intervalo de tempo em dias.

A TCE_{CP} dos juvenis foi calculada para o tempo de 39 DAE, momento em que alguns exemplares já se apresentavam sexualmente diferenciados. Para machos e fêmeas as TCE_{CP} e TCE_P foram calculadas a partir do momento em que pelo menos 80% dos peixes estavam maduros em todos os tratamentos.

Fator de condição (K)

O fator de condição (K) foi obtido pela a razão entre o P (g) e o CP, elevado ao expoente calculado pela RPC, através da equação: $K = (P/CP^x)*100$. Para o cálculo do expoente *x*, que corresponde ao valor da inclinação da relação linear entre o CP e o P (RPC), foram consideradas todas as medidas tomadas dos exemplares em diferentes tempos e estágios de desenvolvimento ao longo do ensaio de crescimento.

Reprodução

Fertilidade

Após o ensaio de crescimento, reprodutores com 150 dias de idade, foram distribuídos em aquários de 30L (volume útil) em seus respectivos tratamentos de origem (16, 20, 24 e 28°C) por 17 dias. Cada aquário recebeu um casal, e foi dotado com ninho constituído de pote cilíndrico de 2 L, 20 cm de diâmetro, com uma camada de 15 cm de altura de lã sintética preta como substrato para postura. Os reprodutores foram alimentados duas vezes ao dia (10 e 16h), até a saciedade, com zooplâncton nativo (cladóceros > 500μm).

Os ninhos foram verificados ao término do ensaio para coleta dos ovos. Os ovos foram medidos em estereomicroscópio com ocular micrométrica e classificados como viáveis aqueles com aspecto normal, ou seja, firmes e translúcidos, e não viáveis aqueles fungados, que ficam tenros e esbranquiçados.

A fertilidade (FT) foi calculada com base no número de ovos postos por dia em relação ao peso da fêmea, seguindo a equação $FT = n/(P*t)$, onde o *n* representa o número de ovos, o *P* foi empregado em gramas e o *t* representa o tempo em dias.

Fecundidade

Para a estimativa da fecundidade (FC), ao término do experimento (17 dias) os reprodutores foram anestesiados em banho de benzocaína (50ppm) e mortos por secção da medula espinhal. Os peixes foram pesados e medidos e as gônadas foram dissecadas para cálculo do IGS.

Após a dissecção os ovários direito e esquerdo foram pesados separadamente e tripartidos nas porções anterior, mediana e posterior para análise macroscópica do padrão de distribuição dos oócitos. Posteriormente, foram imersos em solução de Gilson até que os oócitos se desprendessem das lamelas ovígeras, pela degradação do tecido conjuntivo. Foram avaliados o número e o diâmetro de todos os oócitos maiores que 330 µm. Os oócitos foram medidos com auxílio de lupa e escala ocular micrométrica.

A FC foi calculada com base no número de ovócitos presentes no ovário em relação ao P (g) da fêmea através da fórmula $FC = n/P$, onde n significa o número de ovócitos.

Índice gonadossomático

Após o logo após a dissecção dos casais, gônadas foram pesadas para o cálculo do índice gonadossomático (IGS). O IGS foi calculado através da seguinte fórmula: $IGS = Pg / Pt * 100$ e $IHS = Pf / Pt * 100$, onde Pg representa o peso da gônada (mg), Pt o peso total do peixe (mg).

Histologia dos testículos

Para a análise histológica, cada um dos testículos, direito e esquerdo, dos machos foram fixadas em formalina a 10% por 24h e posteriormente transferidas para álcool etílico 70%, onde permaneceram por sete dias. Após este período as gônadas foram incluídas em parafina e realizados cortes transversais de 5 µm. Os cortes foram montados em lâminas, desidratados, corados com hematoxilina-eosina e diafanizados em xilol para análise em microscópio ótico dotado de sistema de captura de imagens.

Foi verificada a integridade dos tecidos testiculares e a distribuição dos estágios da espermatogênese. Os estágios da espermatogênese foram identificados conforme Parenti & Grier (2004): Espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozóides. O número de cistos com cada estágio de desenvolvimento foi contado sob campos de visão com área conhecida, escolhidos

aleatoriamente nas secções testiculares. As medidas foram calculadas empregando-se o programa de análise de imagens Image Tool® 3.0 (UTHSCSA - 2002).

O número de cistos foi transformado para referenciá-lo a área padrão de 1 mm^2. As secções teciduais analisadas foram procedentes da porção intermediária da gônada direita.

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados no formato de média ± erro padrão. Para verificar diferenças entre os valores médios de crescimento, razão sexual, fator de condição, fertilidade, índice hepatossomático, índice gonadossomático, fecundidade, diâmetro dos ovos e densidade celular das gônadas, entre os diferentes tratamentos, foram testados por análise de variância de uma via (ANOVA), quando atendidos os pressupostos do teste. Variáveis em percentual foram transformadas pela função arco de seno para emprego da ANOVA. Diferenças entre médias foram avaliadas por teste *a posteriori* de Tukey. Foi aplicado teste "t Student" para verificar diferenças no tamanho dos ovários direito e esquerdo dentro de cada tratamento e também no comprimento e peso entre machos e fêmeas a cada biometria nos ensaios de crescimento. Foi utilizada regressão linear (Pearson) para verificar a relação do peso–comprimento (RPC) dos exemplares, e regressão linear múltipla para avaliar a relação da temperatura com o peso e com o comprimento dos peixes ao final do experimento, bem como para a relação do tamanho da fêmea com o tamanho dos ovos e fertilidade. Todos os testes foram realizados sob nível de significância de 95% com auxílio do programa Statistica® 7.0. Para o cálculo do ponto de inflexão das curvas de regressão foi empregado o programa Biostat 5.0.

3. RESULTADOS

Eclosões

As taxas de eclosão foram bastante elevadas, dos 275 ovos hidratados, foram obtidos 257 (93,4 ± 1,4 %) juvenis. Destes peixes, 157 (61,0 ± 3,3 %) nasceram normais e 100 (39,0 ± 3,3 %) apresentaram problemas de natação, sendo incapazes de se manter na coluna d'água, condição em que os peixes são comumente denominados "rampantes", os quais não foram empregados nos experimentos.

Crescimento

Parâmetros de qualidade da água

De modo geral a concentração de oxigênio dissolvido apresentou uma relação inversamente proporcional com a temperatura. As concentrações médias de nitrogênio na forma de amônia total em 16 e 24°C foi mais acentuada em um momento do experimento devido a defeitos em algumas bombas dos filtros biológicos. Apesar da solução imediata do problema, houve diferença significativa entre as médias para este parâmetro, pois a concentração amônia observada para os demais tratamentos foi baixa (Tabela 1). Os valores médios de pH não diferiram entre os tratamentos.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água (média ± erro padrão) encontrados durante o experimento de crescimento de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos em laboratório sob diferentes temperaturas. Letras diferentes representam diferença significativa nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$).

	Temperatura (°C)	pH	O_2 dissolvido (mg/L)	NH_3 total (mg/L)
16°C	16,12 ± 0,06 a	6,61 ± 0,06 a	13,03 ± 0,34 a	0,17 ± 0,05 a
20°C	19,96 ± 0,06 b	6,62 ± 0,05 a	11,34 ± 0,30 b	0,03 ± 0,02 b
24°C	23,90 ± 0,08 c	6,67 ± 0,04 a	10,49 ± 0,35 bc	0,08 ± 0,03 ab
28°C	27,86 ± 0,06 d	6,66 ± 0,04 a	9,35 ± 0,34 c	0,03 ± 0,02 b

Crescimento em comprimento e peso

Logo após a eclosão os juvenis apresentaram 7,10 ± 0,40 mm de CP. Na primeira biometria realizada, aos 18 DAE as médias de CP dos peixes mantidos em 20, 24 e 28°C não diferiram entre si, porém foram significativamente superiores ao obtido pelos peixes do tratamento de 16°C. A partir dos 25 dias de experimento, os resultados

demonstraram que o crescimento passou a ser prejudicado nas temperaturas extremas, e após este período os CPs médios dos peixes de 20 e 24°C mantiveram-se similares entre si e mais elevados que aqueles alcançados em 16 e 28°C que, por sua vez, não apresentaram diferença significativa nas médias de CP (Figura 2).

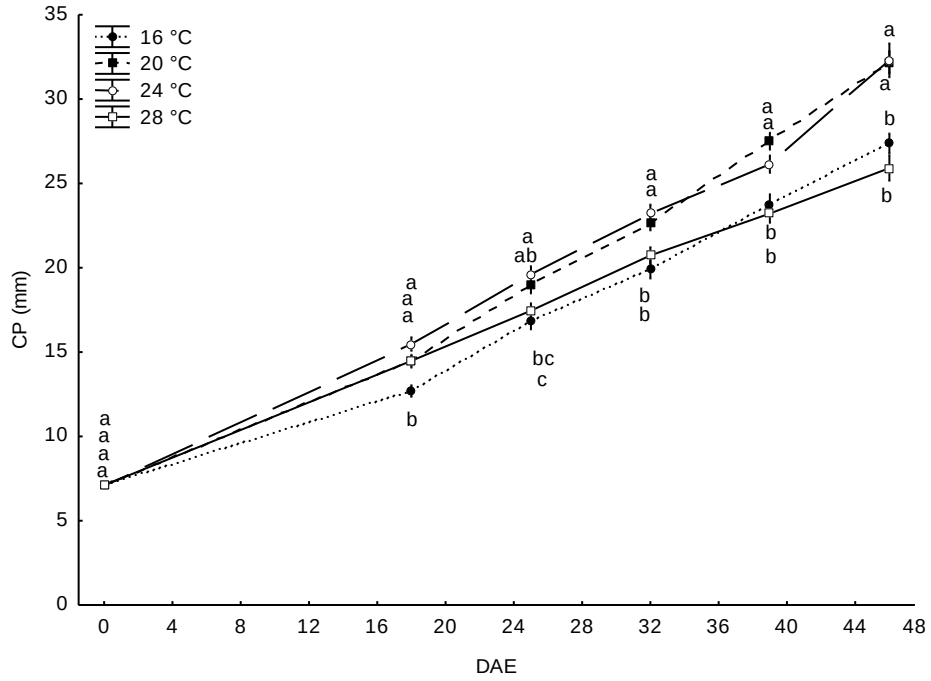

Figura 2. Comprimento padrão (CP) (média ± erro padrão) de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos em laboratório por 46 dias após a eclosão (DAE) sob diferentes temperaturas. Letras diferentes representam diferença significativa nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; $n\geq10$).

Sobrevivência, idade da puberdade e razão sexual

Foi possível verificar características sexuais secundárias que demonstraram a presença de exemplares machos a partir do 39º DAE, já as fêmeas só foram observadas a partir do 53º DAE, com totalidade de dimorfismo sexual fenotípico aos 60 DAE. Em 24°C houve maior proporção de machos em relação a fêmeas, as demais temperaturas não apresentaram diferença na razão sexual (Tabela 2).

Tabela 2. Número de *Austrolebias wolterstoffi* sexualmente diferenciados (♀/♂) observados entre o 39° e 67° dias após a eclosão (DAE), número total de peixes no início (Ni) e no final (Nf) do experimento e percentual de sobrevivência (S) em cada tratamento. Não houve diferença significativa nas médias de sobrevivência e percentual de machos ou fêmeas entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p>0,05$).

Tratamento	39 DAE	46 DAE	53 DAE	60 DAE	67 DAE	Ni	Nf	S (%)
16°C	0/0	0/1	11/10	8/9	12/9	24	21	87,50 ± 7,22
20°C	0/0	0/10	14/9	14/8	14/8	24	22	91,67 ± 8,33
24°C	0/2	0/10	9/11	9/11	9/11	24	20	83,33 ± 4,17
28°C	0/1	0/6	10/10	13/8	12/8	24	20	87,50 ± 12,50

Crescimento nos adultos

Logo após a diferenciação as fêmeas mantidas em 20 e 24°C apresentaram médias de CP significativamente superiores ao das mantidas em 16 e 28°C. Já na última biometria, aos 67 DAE, o CP das fêmeas de 16, 20 e 24°C não diferiram entre si, contudo, foram significativamente superiores ao CP das fêmeas de 28°C (Figura 3 A). A média de peso das fêmeas de 20 e 24°C mantiveram-se mais elevadas que as das de 16 e 28°C durante todo o experimento (Figura 3 B).

Da diferenciação até o final do experimento os machos dos tratamentos de 16, 20 e 24°C apresentaram médias de CP significativamente superiores aos de 28°C e não diferiam entre si (Figura 4 A). As médias de peso dos machos de 20 e 24°C foram mais elevadas que dos mantidos em 28°C. No final do experimento, aos 67 DAE, os machos dos tratamentos de 16, 20 e 24°C não apresentaram diferença no peso e foram significativamente mais pesados que aqueles mantidos em 28°C (Figura 4 B).

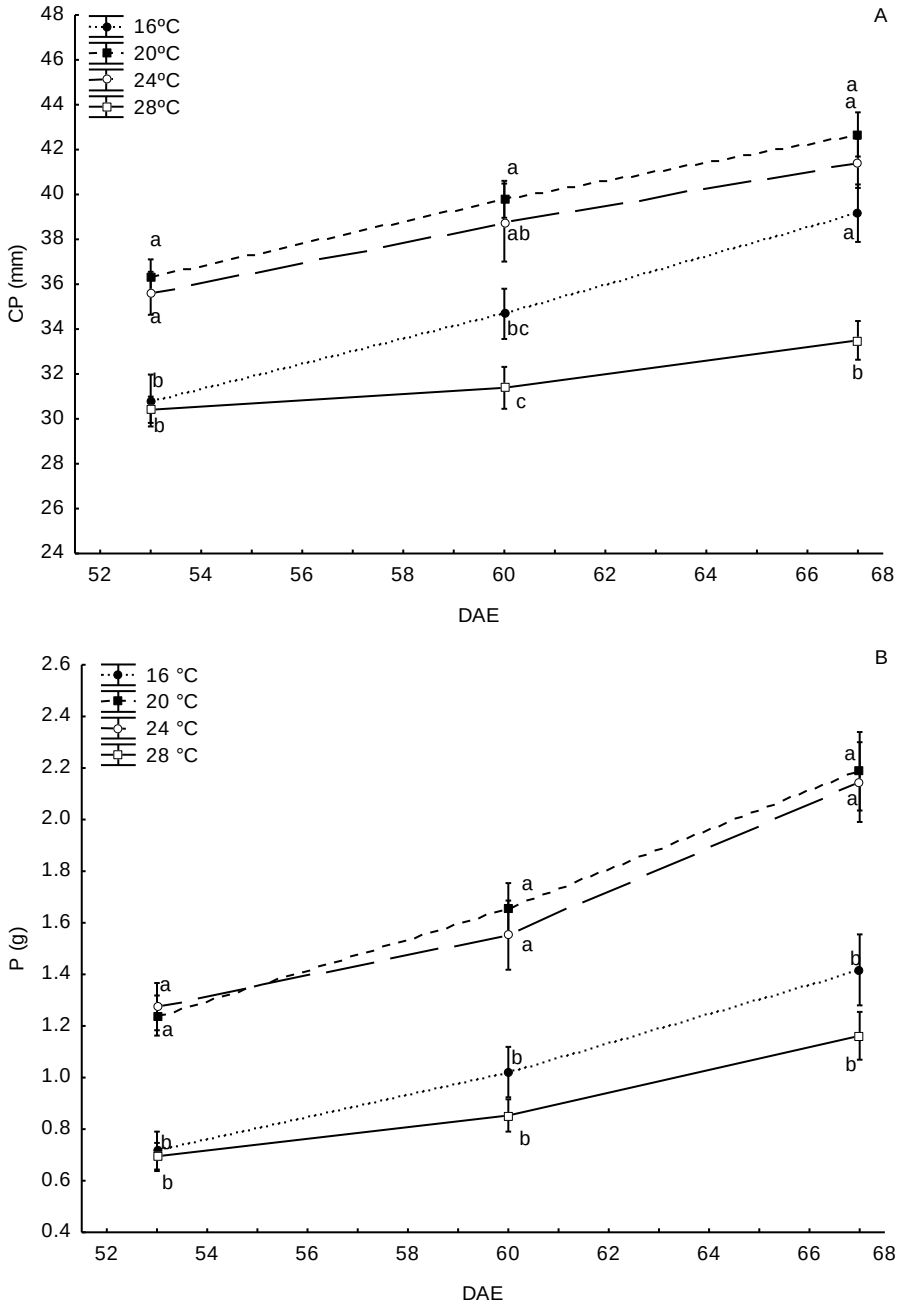

Figura 3. Comprimento padrão (CP) (A) e peso (B) (média ± erro padrão) de fêmeas de *Austrolebias wolterstorffi*, mantidas em laboratório por 67 dias após a eclosão (DAE) sob diferentes temperaturas (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; $n\geq6$).

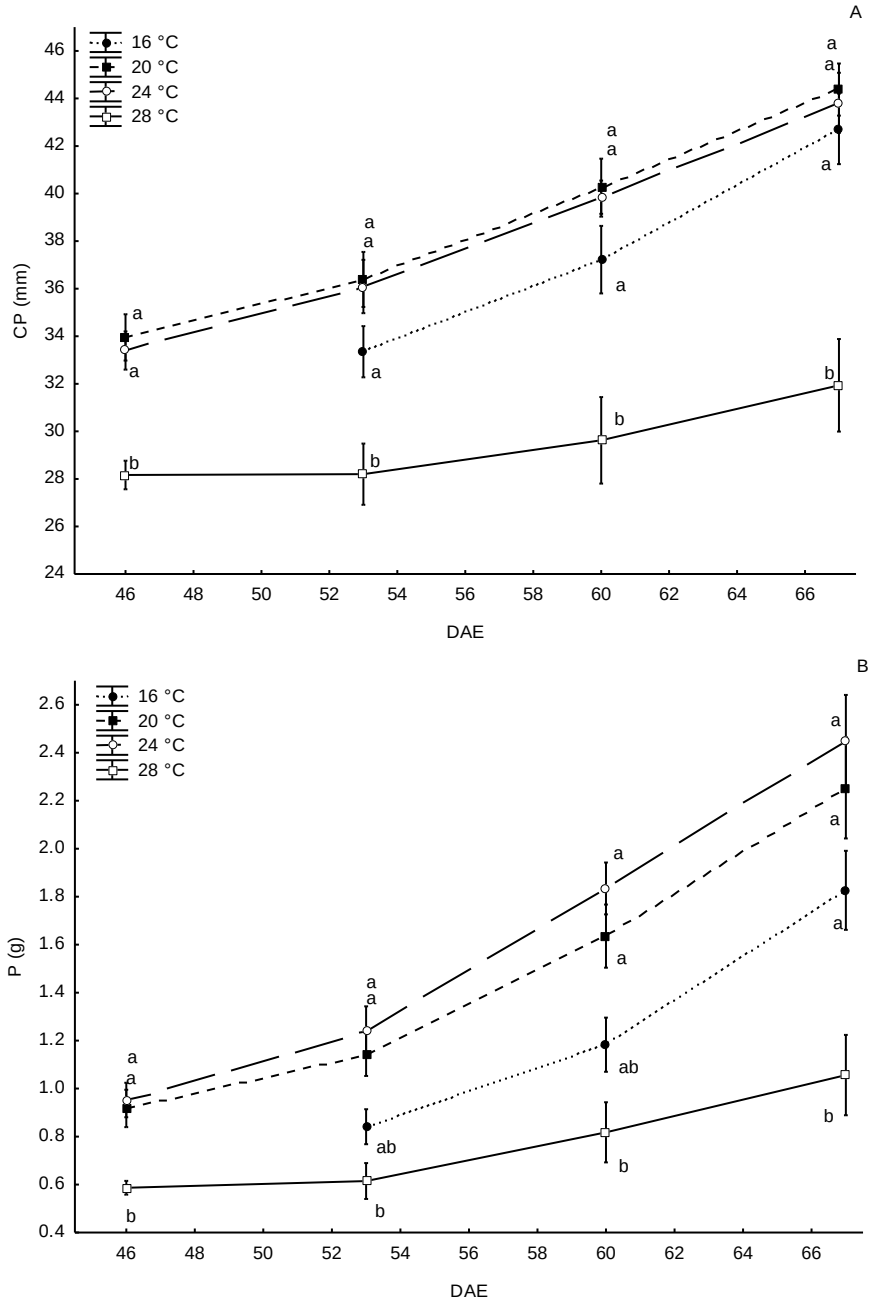

Figura 4. Comprimento padrão (CP) (A) e peso (B) (média ± erro padrão) de machos de *Austrolebias wolterstorffi*, mantidos em laboratório por 67 dias após a eclosão (DAE) sob diferentes temperaturas. Letras diferentes representam diferenças significativas nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; $n\geq9$).

Neste trabalho foi evidenciado que os machos atingem peso e comprimento mais elevados mais rápido que as fêmeas, as quais apresentam diferenciação sexual fenotípica com tamanho semelhante ao observado para a puberdade nos machos (Figura 5).

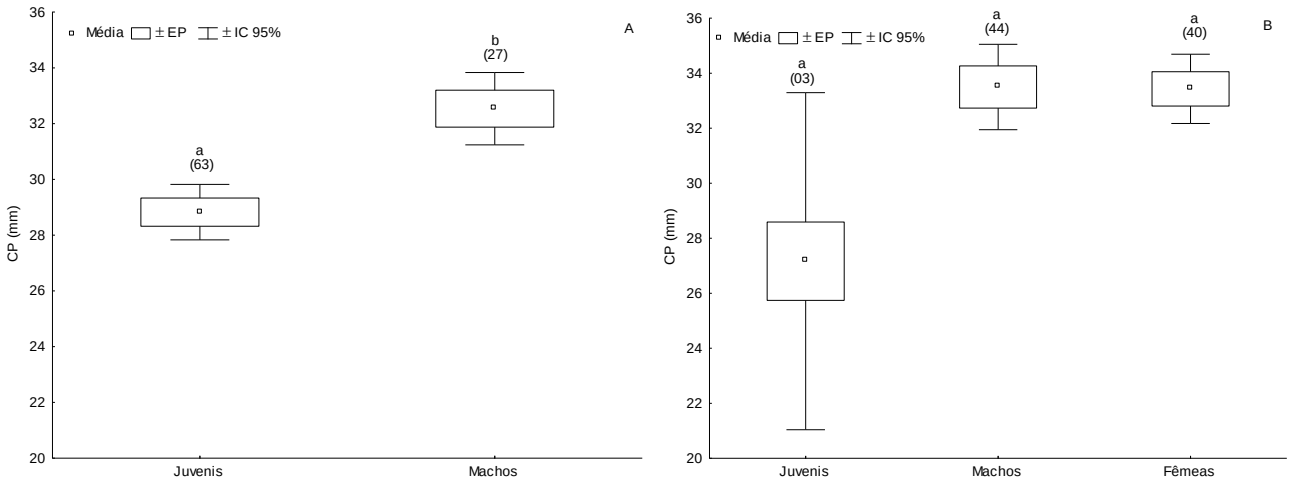

Figura 5. Comprimento de exemplares de *Austrolebias wolterstorffi* fenotipicamente diferenciados (machos e fêmeas) e indiferenciados (juvenis) sexualmente, aos 46 (A) e aos 53 (B) dias após eclosão. Letras diferentes representam diferenças significativas no CP (A: teste *t*; $p<0,05$; B: ANOVA; Tukey; $p>0,05$; (n)).

Efeito da temperatura no desenvolvimento ontogenético

De uma maneira geral, os resultados apontam para um efeito prejudicial ao crescimento dos peixes jovens nas temperaturas extremas testadas. Efeito que parece ser potencializado a 28°C e mitigado a 16°C à medida que os peixes ficam adultos, principalmente entre os machos (Figuras 6 e 7).

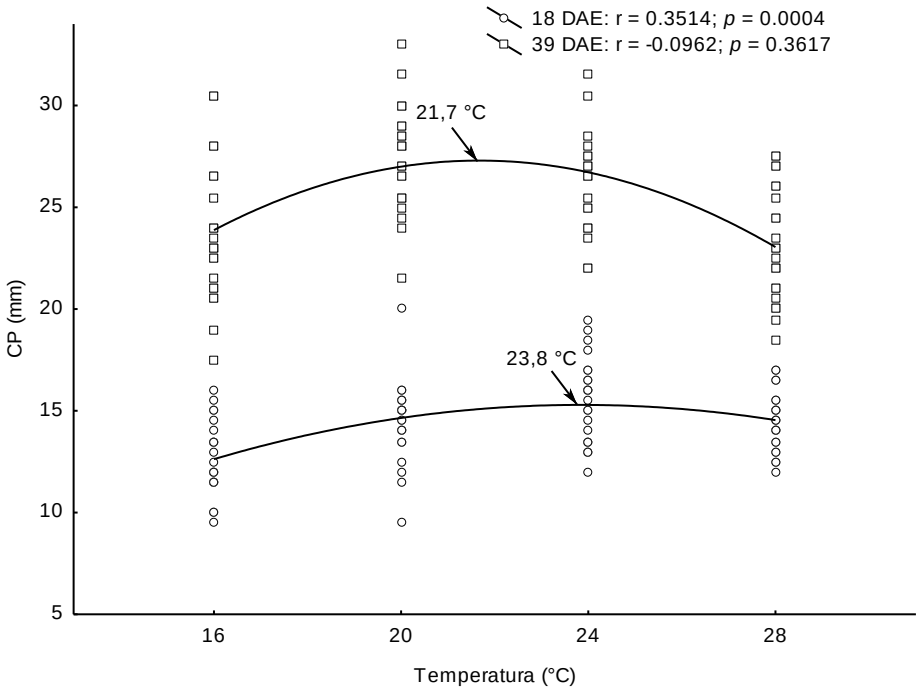

Figura 6. Efeito da temperatura no crescimento em comprimento padrão (CP) de *Austrolebias wolterstorffi* em diferentes idades (DAE = dias após eclosão). As setas indicam os pontos de inflexão das curvas.

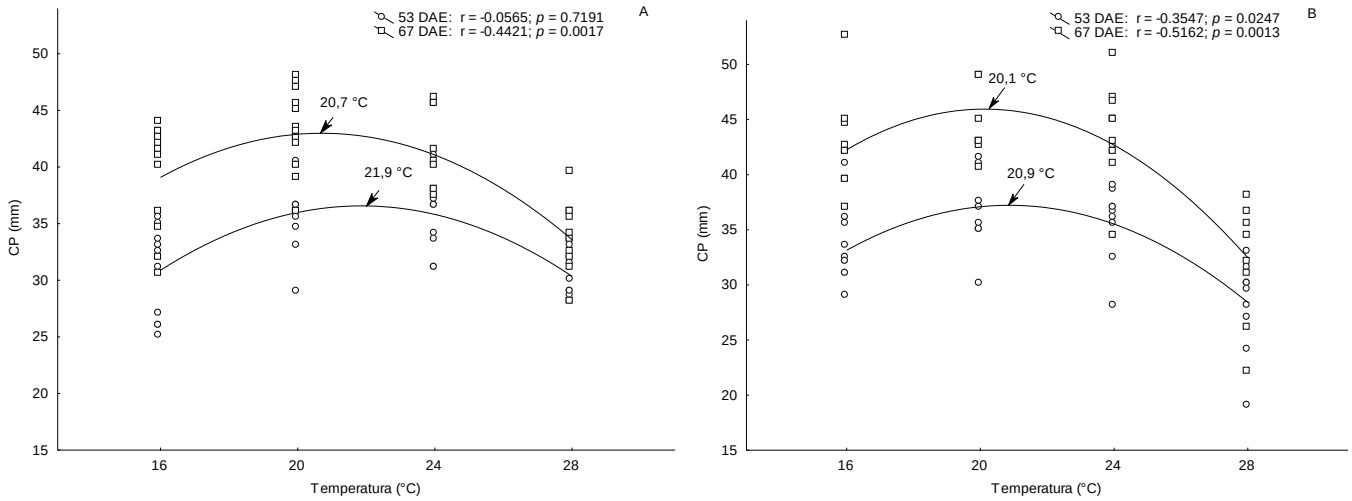

Figura 7. Efeito da temperatura no crescimento em comprimento padrão (CP) de fêmeas (A) e de machos (B) de *Autrolebias wolterstorffi* em diferentes idades (DAE = dias após eclosão). As setas indicam os pontos de inflexão das curvas.

Relação Peso-comprimento(RPC)

Os ganhos de peso e de comprimento ao longo do experimento tiveram uma relação altamente significativa (r=0,96; p<0,000001). No presente estudo o valor estimado da inclinação da reta, considerando juvenis juntamente com exemplares já

diferenciados sexualmente, foi de 3,04. Valores de inclinação próximos a 3 foram também constatados para juvenis, fêmeas e machos quando analisados separadamente, determinando o crescimento dos exemplares como isométrico independente da fase de vida (Tabela 3).

Tabela 3. Relação peso–comprimento (RPC) de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos em laboratório analisados em conjunto (total) e distribuídos em juvenis, fêmeas e machos.

	CP (mm)			Parâmetros da regressão da RPC					
	n	Min	Max	*a*	*b*	95% IC de *a*	95% IC de *b*	r^2	*p*
Total	342	19,0	52,5	-1,65	3,04	-1,78 a -1,53	2,95 a 3,12	0,94	0,0001
Juvenis	66	18,5	37,5	-1,50	2,92	-1,79 a -1,22	2,72 a 3,11	0,93	0,0001
Machos/fêmeas	276	19,0	52,5	-1,53	2,96	-1,70 a -1,37	2,86 a 3,07	0,91	0,0001
Machos	137	19,0	52,5	-1,52	2,95	-1,74 a -1,31	2,82 a 3,09	0,93	0,0001
Fêmeas	139	25,0	51,5	-1,54	2,97	-1,80 a -1,28	2,80 a 3,14	0,90	0,0001

Taxa de crescimento específico (TCE)

Durante o período amostrado não houve diferença significativa nas TCE entre os tratamentos, os valores observados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Taxa de crescimento específico (média ± erro padrão) em relação à média do CP (TCE_{CP}) e do peso (TCE_P) de juvenis (0-39 DAE), machos e fêmeas (53-67 DAE) de *Austrolebias wolterstorffi*. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p>0,05$; $n\geq6$). DAE = dias após a eclosão.

	Juvenis	Machos		Fêmeas	
	TCE_{CP}	TCE_{CP}	TCE_P	TCE_{CP}	TCE_P
16°C	3,04 ± 0,04	1,52 ± 0,14	4,94 ± 0,67	1,75 ± 0,45	4,75 ± 1,29
20°C	3,49 ± 0,03	1,45 ± 0,21	5,28 ± 0,72	0,92 ± 0,17	2,76 ± 0,25
24°C	3,39 ± 0,11	1,42 ± 0,09	4,88 ± 0,22	0,71 ± 0,24	2,78 ± 0,59
28°C	3,05 ± 0,04	0,66 ± 0,38	3,41 ± 0,85	0,58 ± 0,11	2,70 ± 0,56

Fator de condição (K)

O fator de condição (K) dos machos de 20, 24 e 28°C foi significativamente mais alto do que dos de 16°C no final do experimento. Os Ks das fêmeas de 24 e 28°C foram significativamente superiores ao das mantidas em 16°C, e o K das fêmeas de 28°C foi superior ao das de 20°C. Não houve diferença significativa nos resultados finais de CP, peso e K entre machos e fêmeas dentro de cada tratamento nas biometrias realizadas (Tabela 5).

Tabela 5. Valores finais de fator de condição (K) (média ± erro padrão) de machos e fêmeas de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos por 67 dias em laboratório sob diferentes condições térmicas. Letras diferentes indicam diferença significativa na média entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; $n\geq8$).

	K	
	Fêmeas	Machos
16°C	1,99 ± 0,11 a	1,96 ± 0,06 a
20°C	2,17 ± 0,06 ab	2,38 ± 0,08 b
24°C	2,44 ± 0,07 bc	2,58 ± 0,07 b
28°C	2,56 ± 0,11 c	2,62 ± 0,12 b

Aos 53 DAE foi verificado comportamento reprodutivo (machos cortejando fêmeas) por parte de todos os casais e ovoposição, constatada nos tratamentos de 16, 20 e 24°C, pela presença de ovos depositados no fundo dos aquários. No final do experimento, apenas no tratamento de 28°C ainda não havia sido observada a postura de ovos. A determinação do final do experimento de crescimento aos 67 DAE foi devida a ser observada ocorrência de constantes agressões, principalmente entre os machos de todos os aquários.

Reprodução

Parâmetros de qualidade da água

Conforme esperado, foi observada uma relação inversamente proporcional entre a concentração de oxigênio dissolvido e a temperatura de manutenção. Os valores médios de pH e da concentração amônia não diferiram entre os tratamentos. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de qualidade da água (média ± erro padrão) durante o experimento de reprodução de *Austrolebias wolterstorffi* em laboratório. Letras diferentes representam diferença significativa nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$).

	Temperatura (°C)	pH	O_2 dissolvido (mg/L)	NH_3 total (mg/L)
16°C	15,85 ± 0,06 a	6,68 ± 0,04 a	13,29 ± 0,43 a	0,09 ± 0,05 a
20°C	19,55 ± 0,11 b	6,66 ± 0,06 a	11,35 ± 0,52 b	0,00 ± 0,00 a
24°C	23,61 ± 0,16 c	6,70 ± 0,05 a	11,02 ± 0,42 b	0,05 ± 0,04 a
28°C	27,34 ± 0,07 d	6,64 ± 0,04 a	9,67 ± 0,34 b	0,02 ± 0,02 a

Reprodutores

A média do CP final das fêmeas em 16°C foi superior a daquelas mantidas em 28°C, porém ambas foram similares aos tratamentos de 20 e 24°C, os quais apresentaram CPs semelhantes entre si. Já entre os machos não houve diferença significativa nas médias dos CPs entre os tratamentos. Os machos e as fêmeas não apresentaram diferença significativa nas médias de peso entre os tratamentos no início ou no final do experimento. Os Ks de machos e de fêmeas não diferiram entre os tratamentos do início ao final do ensaio (Tabela 7).

Tabela 7. Comprimento padrão (CP) (mm), peso (g) e fator de condição (K) inicial (i) e final (f) (média ± erro padrão) de fêmeas e machos de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos sob diferentes temperaturas. Letras diferentes representam diferença significativa nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$).

		16°C	20°C	24°C	28°C
Fêmeas	CPi	53,17 ± 3,94 a	52,00 ± 3,51 a	49,67 ± 1,45 a	50,33 ± 2,40 a
	CPf	60,50 ± 0,58 a	58,67 ± 1,36 ab	53,33 ± 1,59 b	54,83 ± 1,88 ab
	Pesoi	3,18 ± 0,42 a	3,33 ±0, 38 a	2,53 ± 0,34 a	2,75 ± 0,18 a
	Pesof	3,85 ± 0,38 a	3,34 ± 0,74 a	2,61 ± 0,27 a	3,52 ± 0,69 a
	Ki	3,45 ± 1,23 a	4,54 ± 0,34 a	3,58 ± 0,41 a	3,85 ± 0,12 a
	Kf	4,72 ± 0,43 a	4,20 ± 0,04 a	3,51 ± 0,28 a	4,61 ± 0,80 a
Machos	CPi	65,83 ± 0,17 a	63,33 ± 3,84 a	61,33 ± 0,88 a	57,33 ± 4,26 a
	CPf	73,75 ± 0,75 a	68,67 ± 3,66 a	67,17 ± 1,74 a	63,50 ± 4,65 a
	Pesoi	5,10 ± 0,52 a	6,17 ± 1,09 a	5,47 ± 0,29 a	4,67 ± 0,26 a
	Pesof	5,55 ± 1,66 a	5,94 ± 0,68 a	5,71 ± 0,52 a	4,08 ± 0,34 a
	Ki	5,88 ± 0,60 a	7,23 ± 0,99 a	6,64±0,28 a	5,97 ± 0,08 a
	Kf	5,84 ± 1,70 a	6,59 ± 0,55 a	6,48±0,54 a	4,82 ± 0,15 a

Fertilidade (FT)

Durante o período de 17 dias em que foram disponibilizados ninhos para a postura de ovos foram observadas FTs médias de 0,98 ± 0,07; 0,67 ± 0,16; 1,18 ± 0,49 e 0,01 ± 0,01 ovos/g de fêmea/dia para os peixes dos tratamentos de 16, 20, 24 e 28°C, respectivamente. A FT média de 24°C foi significativamente superior a de 16°C, no entanto ambas apresentaram FTs médias semelhantes às de 16 e 20°C, as quais não apresentaram diferença entre si (Figura 8).

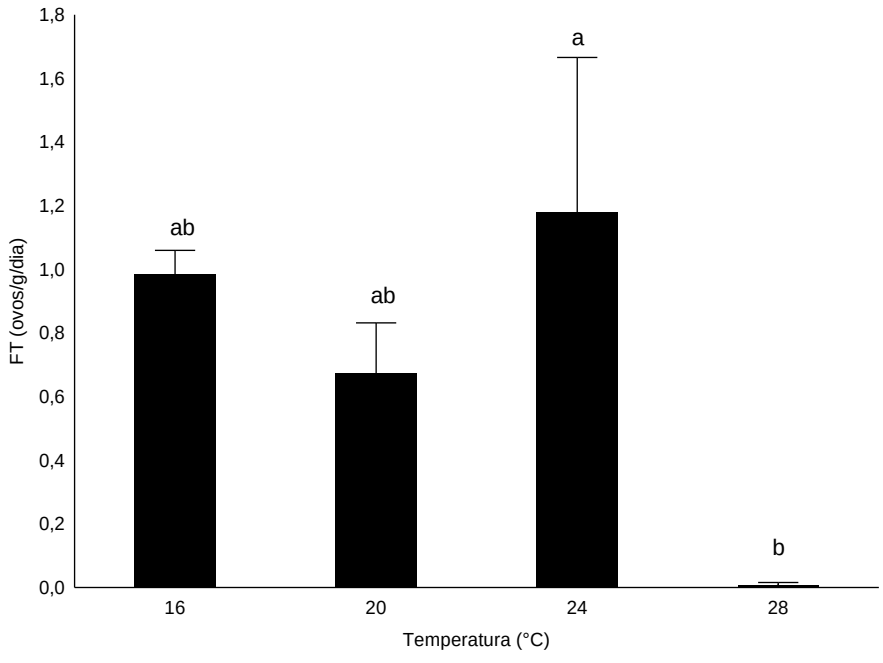

Figura 8. Efeito da temperatura sobre a fertilidade relativa (FT) de *Austrolebias wolterstorffi*. Letras diferentes representam diferença nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; n=3).

O diâmetro dos ovos postos pelos peixes dos tratamentos de 16, 20 e 24°C não diferiram, apresentando médias de 2,09±0,02, 2,14±0,02 e 2,12±0,02 mm, respectivamente. Não foi possível determinar o diâmetro dos ovos postos pelos peixes tratados a 28°C por não ter se obtido ovos viáveis.

Indice gonadossomático

Não houve diferença significativa entre o peso dos ovários ou dos testículos direito e esquerdo em nenhuma das temperaturas estudadas (teste *t*; $p>0,05$), porém o peso dos ovários foi significativamente superior ao peso dos testículos em todos os tratamentos (teste *t*; $p<0,05$). O índice gonadossomático (IGS) foi influenciado pela temperatura em ambos os sexos, os machos mantidos a 16 e 20°C apresentaram IGS significativamente superior aos mantidos a 28°C e o IGS das fêmeas de 16°C foi maior do que o das mantidas em 28°C (Tabela 8).

Tabela 8. Índice gonadossomático (IGS) (média ± erro padrão) de machos e fêmeas de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos laboratório por 170 DAE. Letras diferentes indicam diferença significativa nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; n=3).

	Machos	Fêmeas
16°C	1,30 ± 0,07 a	7,42 ± 0,37 a
20°C	1,21 ± 0,12 a	4,92 ± 1,36 ab
24°C	0,87 ± 0,09 ab	4,75 ± 1,28 ab
28°C	0,61 ± 0,11 b	2,62 ± 0,87 b

Fecundidade (FC)

Os resultados demonstraram que a temperatura elevada prejudicou a FC. Em 16°C (0,25 ± 0,02 oócitos /g fêmea) a FC foi significativamente mais elevada que em 20 e 28°C (0,13 ± 0,03 e 0,03 ± 0,02 oócitos/g fêmea, respectivamente), enquanto que, nas fêmeas de 20 e 24°C (0,18 ± 0,02 oócitos /g fêmea, para 24°C) as FCs não diferiram entre si, mas foram superiores as de 28°C (Figura 9). A distribuição de freqüência de tamanho dos oócitos é mostrada na figura 10.

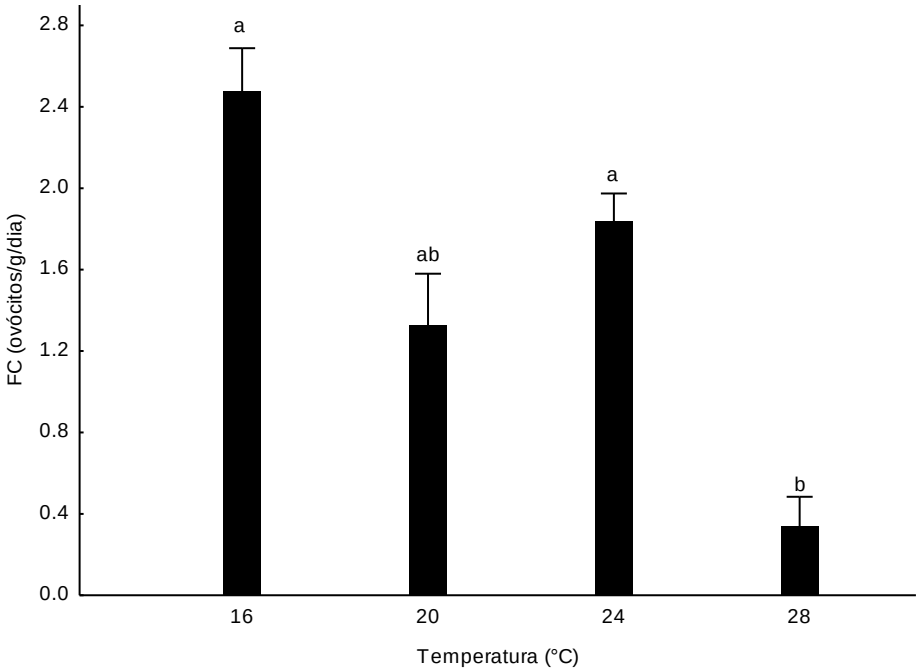

Figura 9. Efeito da temperatura sobre fecundidade relativa (FC) de *Austrolebias wolterstorffi*. Letras diferentes representam diferença nas médias entre os tratamentos (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; n=3).

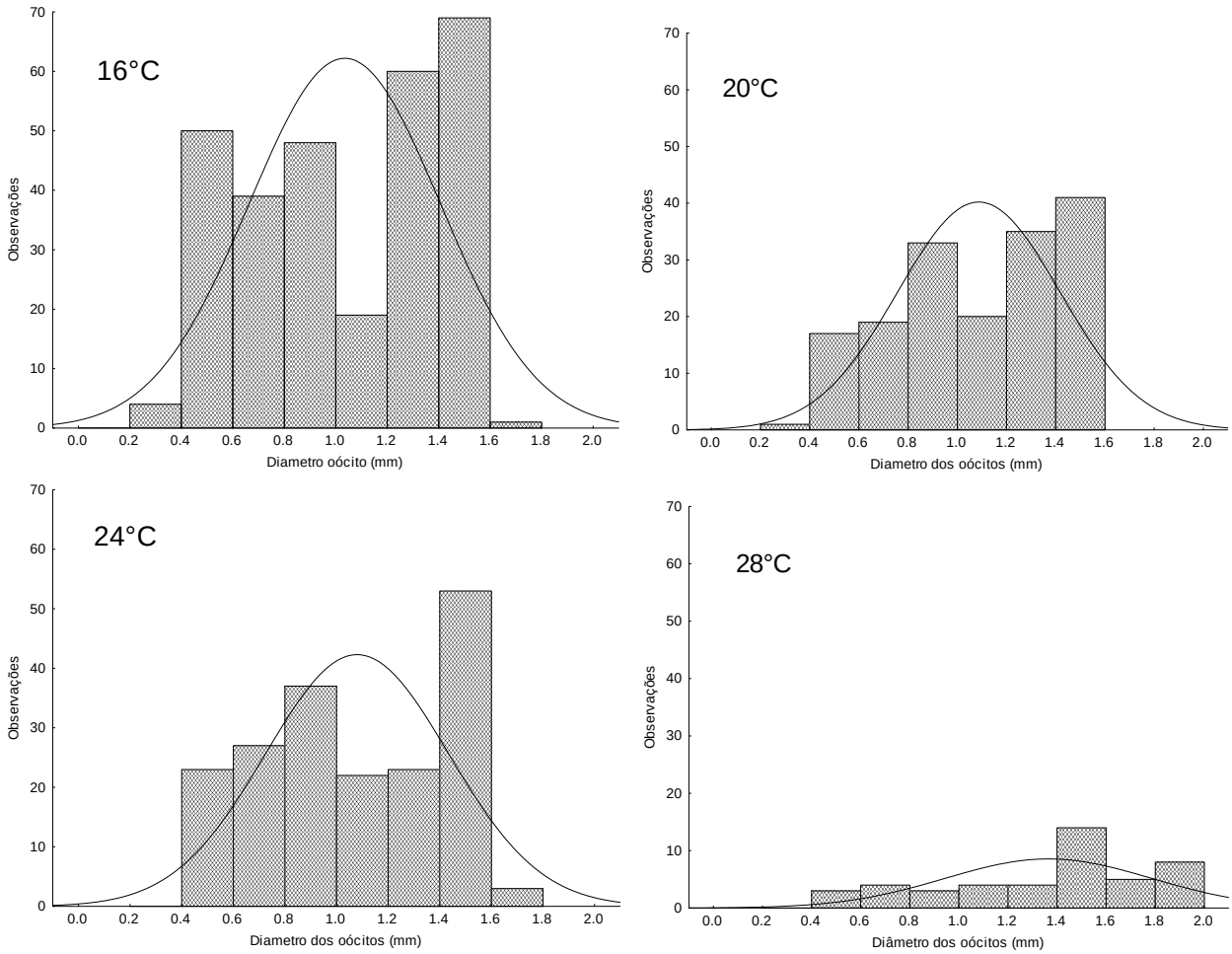

Figura 10. Distribuição de frequência de diâmetros dos oócitos observada em *Austrolebias wolterstorffi* mantidos em laboratório por 170 DAE sob diferentes temperaturas.

Histologia dos testículos

Mediante análise microscópica dos testículos observou-se a distribuição de cistos espermáticos típica de testículos do tipo "restrito", onde os estágios iniciais da espermatogênese estão distribuídos na região periférica da gônada com aumento do grau de desenvolvimento espermatogênico à medida que os cistos se aproximam do lúmen gonadal.

Em todas as temperaturas os testículos apresentaram-se maturos na condição de espermiante. Entretanto, no tratamento de 28°C foi observada uma nítida redução na densidade dos cistos de todos os estágios espermatogênicos. Em praticamente todas as gônadas foram observados espermatócitos primários (EP), espermatócitos secundários (ES), espermátides (ET) e espermatozóides (EZ) (Figura 11). O primeiro tipo celular na linhagem espermatogênica, as espermatogônias, não foram observadas nos cortes de nenhum dos tratamentos.

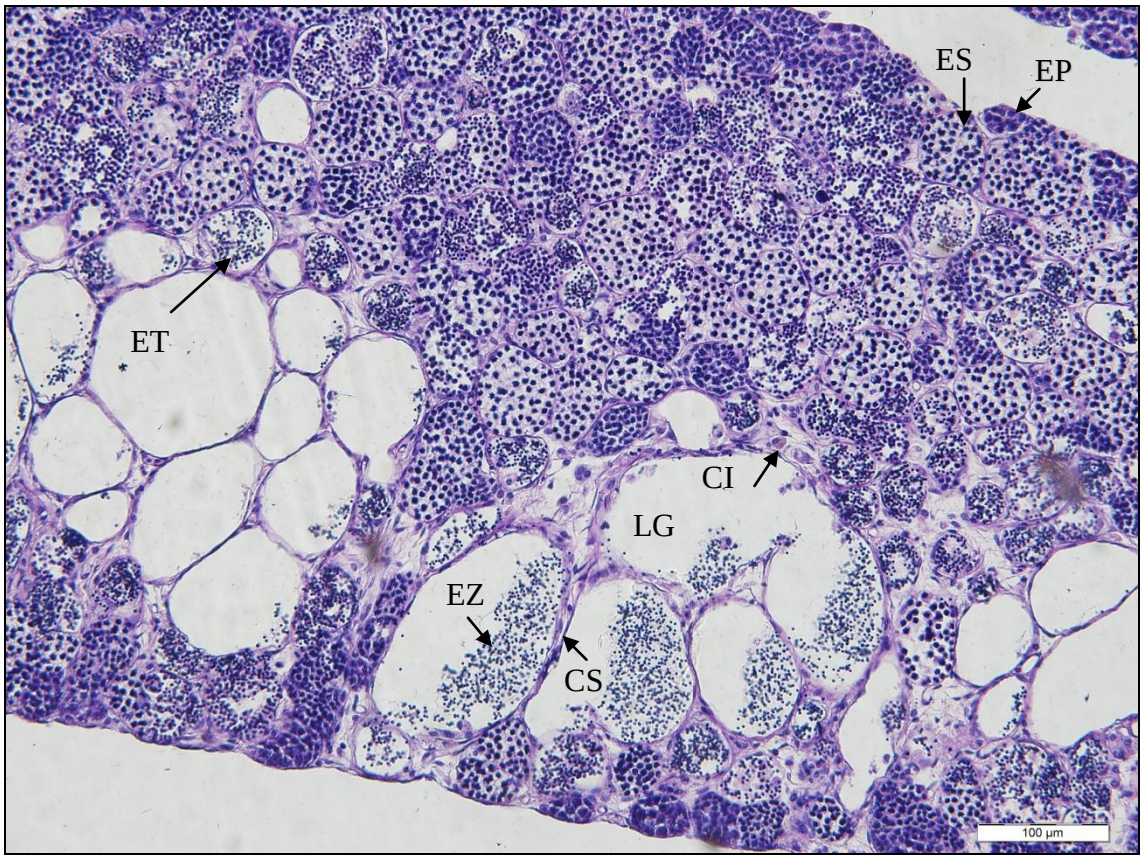

Figura 11. Corte histológico do testículo de *Austrolebias wolterstorffi* mantido em laboratório em 28°C até os 170 DAE. Material corado com hematoxilina/eosina. EP – espermatócito primário; ES – espermatócito secundário; ET – espermátide; EZ – espermatozóides; CS – célula de Sertoli; CI – célula intersticial (cel. Leydig); LG - lúmen gonadal; escala=100µm.

As células somáticas ou de Sertoli (CS) foram evidenciadas junto aos tabiques de tecido conectivo na parede dos cistos. As células intersticiais (CI) ou células de Leydig raramente puderam ser observadas nos interstícios destes tabiques entre os cistos espermáticos.

Na temperatura mais elevada foram encontradas algumas alterações histológicas nos testículos. Foi constatada a ausência de espermatozóides na luz da gônada, e redução da densidade celular nos cistos. Estas alterações não foram encontradas nas demais temperaturas estudadas (Tabela 9, Figura 12).

Tabela 9. Efeito da temperatura no percentual dos tipos de cistos espermáticos (EP – espermatócito primário; ES – espermatócito secundário; ET – espermátide; EZ – espermatozóides) e na densidade (média ± erro padrão) de centros melanomacrofágicos (CMMF) em *Austrolebias wolterstorffi*. Letras maiúsculas e minúsculas representam diferenças quantitativas significativas nos tipos de cistos/mm^2 de testículo entre e dentre as temperaturas, respectivamente (ANOVA; Tukey; $p<0,05$; n=3).

	Cistos/ mm^2				CMMF/ mm^2
	EP	ES	ET	EZ	
16°C	1949 ± 458 A b 13%	4086 ± 838 A ab 27%	5206 ± 610 B a 34%	4144 ± 393 A ab 27%	1698 ± 1097 A
20°C	2548 ± 962 A ab 13%	8609 ± 2469 A a 45%	6142 ± 2186 B a 32%	1880 ± 888 AB b 10%	861 ± 267 A
24°C	3568 ± 1521 A b 11%	10047 ± 3170 A a 32%	10706 ± 1855 A a 34%	7561 ± 3495 A ab 24%	885 ± 394 A
28°C	9176 ± 1491 B a 26%	9988 ± 1590 A a 28%	16078 ± 1758 A b 45%	637 ± 430 B c 2%	974 ± 668 A

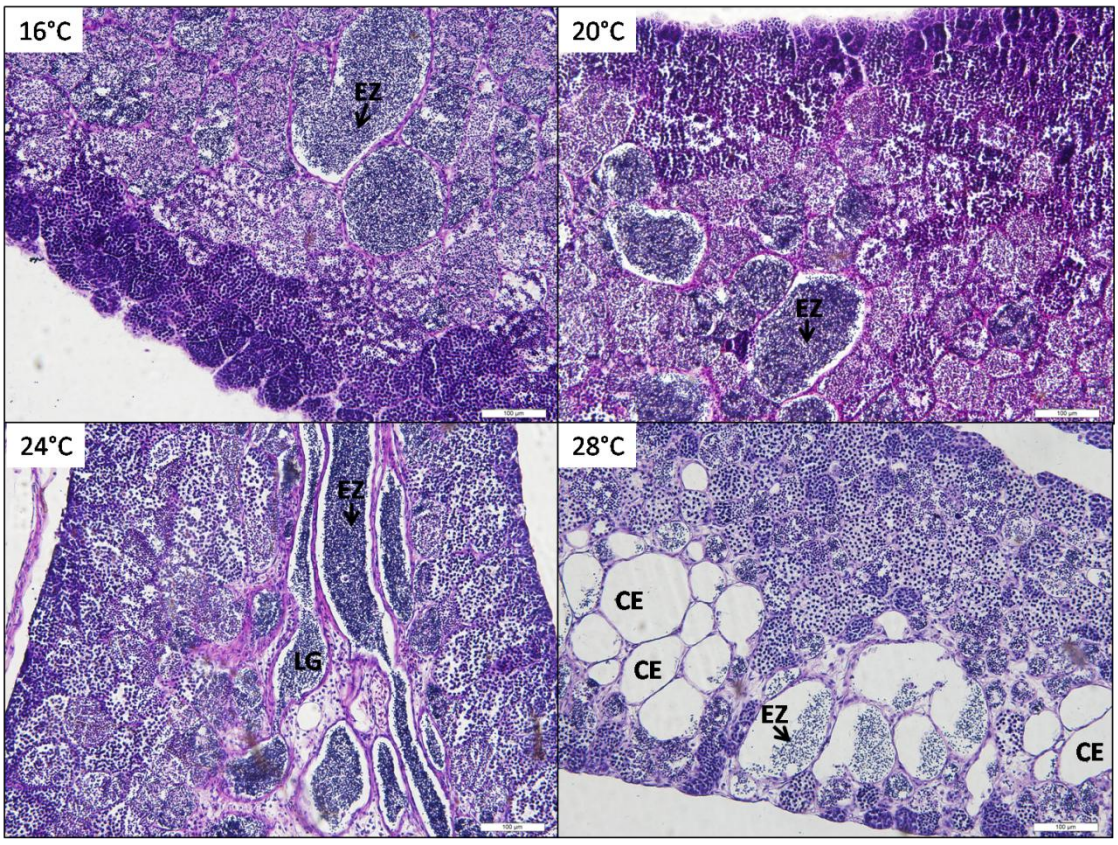

Figura 12. Cortes histológicos de testículos de *Austrolebias wolterstorffi* mantidos em diferentes temperaturas por 170 DAE. Material corado com hematoxilina/eosina. EZ – espermatozóides; CE – cistos espermáticos vazios; LG - lúmen gonadal. Escala = 100µm.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Durante o processo de eclosão dos espécimes empregados nos testes de crescimento e fecundidade, foram obtidas taxas de eclosão superiores a 90%. Estes resultados vão ao encontro dos valores obtidos por Arenzon *et al.* (2002a) com ovos de *Cynopoecilus melanotaenia*. Estes autores obtiveram mais de 97% de eclosão em 24h a 20°C, a mesma temperatura utilizada no presente estudo. No entanto, o contrário foi relatado por Shibatta (2005), que dentre os exemplares que não foram acometidos por fungos, foi obtida eclosão de apenas 30% dos ovos de *Simpsonichthys boitonei*. Entretanto, neste último estudo a temperatura empregada para a eclosão não foi informada, e é conhecido que este fator pode estar associado a efeitos deletérios na incubação e consequentemente na taxa de eclosão, comprimento e peso das larvas recém eclodidas dos peixes anuais (Arenzon *et al.*, 2002a; Brown *et al*., 2011).

A eclosão de larvas incapacitadas de inflar sua vesícula gasosa e se manter na coluna d'água é bastante relatada na reprodução de peixes anuais em cativeiro. Exemplares com esta disfunção têm sido citados como "rampantes" nos países de língua portuguesa e espanhola e como "belly-sliders" na língua inglesa (Podrabsky & Hand, 1999). A causa desta "patologia" ainda é desconhecida. Neste trabalho foi observada uma taxa de 40% de larvas nesta condição. Wourms (1967), para mitigar este problema, sugeriu a hidratação lenta dos embriões, para que se permita a regulação de aparatos fisiológicos e o contato com o ar atmosférico no momento de inflar a vesícula gasosa, todavia Podrabsky & Hand (1999) afirma que a presença de substâncias húmicas na água é responsável por diminuir a taxa de peixes rampantes e que, portanto, o enchimento da bexiga natatória é facilitado por elementos químicos diretos da água e não pela lenta hidratação dos embriões.

Segundo Haas (1976b) o desenvolvimento dos estágios iniciais dos peixes anuais é claramente adaptativo frente às condições ambientais. Neste sentido, Walford & Liu (1965) levantaram a hipótese de que os peixes anuais apresentam preferência térmica diferenciada em função da fase de vida. Podrabsky *et al*. (2008) ressaltaram a importância dos fatores abióticos na biologia dos peixes anuais, demonstrando que *Austrofundulus limnaeus* emprega ajustes comportamentais para a otimização do processo reprodutivo, mesmo frente a variação nictimeral da temperatura.

Volcan (2009) observou que juvenis de *Austrolebias nigrofasciatus* apresentam maior taxa de crescimento em 22°C se comparado a 16°C, enquanto nos reprodutores da

mesma espécie quando mantidos em 25°C houve prejuízo no fator de condição corporal em relação aos mantidos em 17 e 21°C. Corroborando com estes estudos, no presente trabalho ficou evidente que a temperatura que favorece o crescimento em comprimento diminui ao longo da vida, apontando uma inversão no efeito da manutenção a 16°C no momento da puberdade. Porém, o fator de condição corporal apresentou relação direta com a temperatura, nas fases jovens, onde o crescimento é mais acentuado, esta relação pode refletir o metabolismo e atividade mais elevados nas temperaturas mais altas que, dentro da faixa de tolerância térmica pode levar a um maior aporte alimentar e possível acúmulo de reservas (Clarke & Johnston, 1999).

Em estudo realizado por Liu & Walford (1970) com a *A. wolterstorffi* foi evidenciado que o crescimento em comprimento é favorecido em 16°C quando comparado a 22°C nos adultos, segundo os autores é devido à melhor conversão alimentar. Ao contrário, Errea & Danulat (2001) observaram que, para *Austrolebias viarius*, no ambiente natural e no laboratório, a espécie apresenta maior crescimento quando a temperatura é mais elevada, independente da fase da vida.

O presente trabalho demonstrou que as TCEs tenderam a serem mais elevadas em 16°C após a puberdade, tanto para machos como para fêmeas. As TCEs nos adultos demonstraram que em 16°C ocorreu uma compensação no crescimento, levando os peixes deste tratamento a atingirem valores de comprimento e peso semelhantes aos alcançados em 20 e 24°C, temperaturas que favoreceram o crescimento desde as fases mais jovens.

Além do estágio de desenvolvimento ontogenético, existem indícios de que o sexo também pode influenciar na preferência da temperatura nos peixes anuais, com seleção das condições térmicas mais apropriadas para a sobrevivência e sucesso reprodutivo. Podrabsky *et al.* (2008) demonstraram que *A. limnaeus*, quando submetido a um gradiente térmico de 21 a 37°C, é capaz de selecionar com exatidão a temperatura favorável, com divergência na temperatura escolhida por fêmeas e machos. As fêmeas preferem temperaturas que variam de aproximadamente 23 a 26°C e os machos de 25 a 28°C. No presente estudo evidenciou-se que o favorecimento do crescimento na menor temperatura testada foi manifestado com maior intensidade em machos do que em fêmeas, inclusive a faixa de temperatura ótima para o crescimento dos machos (20,1 – 20,9°C) se manteve sempre inferior a das fêmeas (20,7 – 21,9°C) durante o período estudado.

Independente do sexo ou da fase de vida, *A. wolterstorffi* apresentou crescimento isométrico dentro de todo o período estudado, ou seja, as variações do peso e do comprimento possuem uma relação proporcional, enquanto para *A. nigrofasciatus* Volcan (2009) verificou crescimento alométrico negativo, quando o peixe cresce mais em comprimento do que em peso. Já Errea & Danulat (2001) observaram para *A. viarius* crescimento alométrico positivo, onde há maior ganho em peso do que em comprimento.

Para peixes é comum a maturidade sexual ser influenciada pelo comprimento e/ou peso corporal e também pela idade (Osmundson, 2006). Foi evidenciado neste trabalho que o comprimento e o peso são fatores mais representativos na diferenciação sexual do que a idade dos peixes. Portanto, o período que compreende entre a idade de maturação de machos e de fêmeas neste estudo está relacionado ao fato de os machos apresentarem crescimento inicial mais acentuado que as fêmeas, já que as mesmas diferenciam sexualmente com comprimento e peso semelhante aos dos machos porém, com maior idade. De acordo com estes dados está o apontado por Calviño (2005) para *Austrolebias toba* e por Volcan (2009) para *A. nigrofasciatus*, segundo estes autores os machos destas espécies também diferenciam antes das fêmeas.

A diferenciação sexual em teleósteos pode ser determinada pela temperatura ambiental, sendo comum a muitas espécies a predominância de machos em relação a fêmeas em temperaturas extremas (Devlin & Nagahama, 2002; Luckenbach *et al.*, 2003; Strüssmann & Ito, 2005). Volcan (2009) sugere que a manutenção de *A. nigrofasciatus* em 16°C pode determinar uma maior proporção de machos. No presente estudo não foi observada efeito da temperatura de manutenção na razão sexual.

Apesar de a temperatura mais elevada não ter favorecido o crescimento, ocorreu diferenciação antecipada dos machos em 24 e 28°C. Foram os peixes de maior tamanho dentro destes tratamentos que diferenciaram antecipadamente. Volcan (2009) observou exemplares de *A. nigrofasciatus* diferenciados apenas na quarta semana de vida quando mantidos em 16°C, enquanto os peixes mantidos em 22°C diferenciaram com uma semana de antecedência. *A. viarius* em condições de laboratório apresentam diferenciação sexual aos 75 DAE quando mantidos em 25°C, porém em 15°C este fenômeno ocorre apenas aos 119 DAE (Errea & Danulat, 2001).

A maturação precoce é comum em peixes anuais (Liu & Walford, 1970). Em *Nothobranchius guentheri*, organismo que possui o ciclo de vida mais curto entre os vertebrados, Haas (1976a) observou que a maturidade sexual é alcançada em menos de

quatro semanas de idade. Conforme Shibatta (2005), *S. boitonei* leva aproximadamente dois meses para atingir idade adulta. Para *A. nigrofasciatus*, Volcan (2009) observou que os primeiros sinais de maturação sexual aparecem já na terceira semana após a eclosão. No ambiente natural *A. viarius* necessita entre oito e 18 semanas para maturar (Errea & Danulat, 2001). Segundo Arenzon *et al*. (1999) *C. melanotaenia* pode levar três meses para atingir a maturidade sexual. No presente estudo, os primeiros machos apareceram aos 39 DAE em 24 e 28°C, enquanto que a 16°C, aos 46 DAE, quando já havia quase totalidade de diferenciação nos demais tratamentos, apenas um macho havia diferenciado.

Além das fêmeas demorarem mais a atingir o comprimento de diferenciação fenotípica, existe certa dificuldade em identificar a sutil alteração na morfologia externa de um juvenil para uma fêmea púbere. Os pontos iridescentes presentes no corpo e na nadadeira dorsal de machos facilitam a sua identificação. Os machos ainda apresentam o corpo marrom arroxeado e a região opercular, nadadeira anal e caudal com porções azuladas; já as fêmeas apresentam características semelhantes ao padrão dos juvenis, com o corpo castanho rosado e manchas irregulares acinzentadas (Costa, 2008). Apesar da dificuldade de identificação das fêmeas, no presente trabalho foram observadas diferenças nas nadadeiras que auxiliam na distinção sexual com maior exatidão, os machos possuem as nadadeiras dorsal e anal com bases mais longas e bordas escuras.

O início da puberdade é marcado pelo processo de diferenciação sexual fenotípica nas espécies que apresentam dimorfismo, sendo que a primeira maturação pode não coincidir com este fenômeno (Okusawa, 2002). Assim, o comportamento reprodutivo pode traduzir respostas direcionadas pelos esteróides sexuais produzidos em gônadas maturas ou em maturação, demarcando a puberdade (Hermelink *et al*., 2011).

Neste estudo, os primeiros sinais comportamentais de maturação foram a competição entre os machos e a corte dos mesmos para as fêmeas. Estes eventos respaldaram a decisão da transferência de exemplares considerados maturos aos experimentos de reprodução.

Belote & Costa (2004) e García *et al.* (2008) afirmaram que os movimentos de cortejo são altamente conservados dentre as espécies do gênero *Austrolebias*. As observações em laboratório demonstraram que o comportamento reprodutivo dos casais de *A. wolterstorffi* se assemelhou ao descrito pelos autores. Segundo os mesmos, frequentemente é observada a exibição lateral dos machos para as fêmeas, além disto, os

machos vibram as nadadeiras, dorsal e anal, e ondulam o corpo, o que sugere que os sinais mecânicos podem ter influência na atração das fêmeas.

A puberdade dos peixes na aqüicultura, muitas vezes constitui um fator limitante por promover o declínio do crescimento em função do gasto de energia desviado para a reprodução (Podrabsky *et al.*, 2008). No caso de espécies ameaçadas de extinção, em que o cultivo não visa o aproveitamento de carcaça e ganho em massa, a capacidade reprodutiva em cativeiro torna-se mais importante do que o crescimento. Muitas espécies de peixes durante o período de reprodução diminuem a taxa de ingesta ou entram em jejum. Dependendo das condições de alimentação e do desenvolvimento das gônadas, para algumas espécies o fator de condição pode indicar o período de desova (Gomiero & Braga, 2005).

Os peixes anuais alimentam-se constantemente mesmo durante o período em que estão reproduzindo, pois após atingirem a maturidade sexual desovam diariamente até a senilidade ou morte (Worms, 1972; Haas, 1976a). Os valores semelhantes de K encontrados para os reprodutores de todos os tratamentos podem estar associados a esta característica, pois todos os peixes, mesmo os que apresentaram altas taxas de fertilidade, mantiveram a alimentação. Possivelmente em 28°C houve investimento energético para o crescimento somático enquanto em 16, 20 e 24°C este aporte deve ter sido mais direcionado para as gônadas, uma vez que o IGS foi reduzido para ambos os sexos na maior temperatura.

A alta fertilidade é comum de peixes anuais (Worms, 1972; Haas, 1976a). No presente trabalho isto foi evidenciado através dos valores de IGS, fecundidade e fertilidade encontrados. Os valores mais elevados de IGS das fêmeas mantidas em 16°C não corresponderam aos valores de fertilidade e fecundidade similar aqueles obtidos em 20 e 24ºC, o que pode estar associado então à reabsorção de oócitos. Já em 28°C foi evidenciado por meio de todos os parâmetros estudados que houve prejuízo na reprodução.

Não obstante, o presente trabalho encontrou uma alta taxa de fertilidade nas temperaturas mais baixas, porém não houve relação entre o tamanho das fêmeas e a produção de ovos. Segundo Podrabsky & Hand (1999), é comum a fertilidade demonstrar estreita relação com o tamanho da fêmea. Gonçalves *et al.* (2011) observaram relação direta entre o comprimento das fêmeas de *C. melanotaenia* e a fecundidade no ambiente natural. Da mesma forma que no presente estudo, Volcan (2009) não observou esta relação para *A. nigrofasciatus*, neste último a fertilidade

semanal foi bastante variável e oscilou dentro de cada tratamento, o que pode, estatisticamente, ter mascarado o efeito do tamanho da fêmea nestes estudos.

No presente estudo *A. wolterstorffi* apresentou fertilidade média semanal máxima, correspondente ao tratamento de 24°C, de aproximadamente 15 ovos/g, já para *A. nigrofasciatus*, Volcan (2009) encontrou posturas de até 38 ovos/g semanalmente. Apesar desta diferença no montante de ovos, ao considerar o porte dos peixes em questão, o número médio de ovos postos por semana é muito semelhante, de aproximadamente 50 ovos para ambas as espécies. É importante ressaltar que os ovos de *A. wolterstorffi* (diâmetro médio de 2,12 mm) são maiores que os de *A. nigrofasciatus* (1,51 mm de diâmetroe) (Volcan *et al.*, 2011).

Para *A. charrua* foram observados todos os estágios de desenvolvimento de oócitos e de cistos espermáticos nas gônadas maduras durante todo o período de reprodução, demonstrando que a espécie possui desova assíncrona, ou seja, a desova é parcelada e os oócitos são recrutados por lotes ao longo do ciclo reprodutivo (Arezo *et al.*, 2007). Já no presente estudo a primeira fase da espermatogênese para ambos os sexos foi ausente em todos os tratamentos, o que pode demonstrar um recrutamento total dos gametas no início do ciclo. Porém, observou-se todas as demais fases de oócitos e houve comportamento reprodutivo constante desde a diferenciação até o término do estudo, confirmando a desova parcelada. Segundo Gonçalves *et al.* (2011) *C. melanotaenia* apresenta diversas classes de diâmetro de oócitos nos ovários maduros, determinando a espécie como desovante parcelada.

Arenzon *et al.* (2002a) observaram que juvenis de *C. melanotaenia* oriundos de ovos de exemplares mantidos em temperaturas elevadas (25°C) constantemente apresentaram altas taxas de má-formações. Neste sentido, Genade *et al.* (2005) afirmam que os peixes anuais têm uma vida útil definida em cativeiro e que esta pode ser modulada pela temperatura da água, pois os peixes desenvolvem degenerações histológicas em uma ampla gama de órgãos como olhos, rins, fígado e timo em diferentes períodos de tempo dependendo da temperatura a que são submetidos.

Em 28°C, além de praticamente não ter havido ovoposição, na histologia foram observadas alterações nos testículos indicando de que esta temperatura prejudica a espermiogênese. Apesar de haver espermatozóides em alguns cistos, a produção destes em 28°C pareceu estar sendo lenta ou insuficiente para tornar estes peixes férteis. Inferiu-se que o problema deva ocorrer durante a maturação final dos gametas, já que os

demais estágios da espermatogênese ocorreram de forma plena, com exceção das espermatogônias, conforme citado anteriormente.

Não são raros estudos que comprovam o efeito adverso de temperaturas extremas no desenvolvimento gonadal de teleósteos. Alguns estudos têm demonstrado que peixes desenvolvem degeneração das células germinativas primárias quando expostos por períodos extensos a temperaturas elevadas subletais, podendo levar até a condição de esterilidade, mais frequentemente observada nos machos (Strüssmann *et al.*, 1998; Strüssmann *et al.*, 2010).

De acordo com Bapary e Takemura (2010) a exposição contínua de *Chrysiptera cyanea* a temperatura elevada (30°C) causam regressão na atividade gonadal, ocorrendo reabsorção de ovócitos vitelogênicos. Glasser *et al.* (2004) observaram para *Ctenopharyngodon idella* que a partir de 28°C ocorre um bloqueio na maturação dos oócitos e na ovulação porque a atividade das gonadotropinas é interrompida nesta condição. Segundo esses autores o impedimento deve ocorrer a nível dos receptores gonadais do hormônio luteinizante (LH), já que esta gonadotropina está presente na circulação em níveis até mais elevados que em temperaturas inferiores.

Para os machos do peixe-rei *Odonthestes bonariensis*, Ito *et al.* (2003) demonstraram que temperaturas elevadas (29ºC), embora acelerem o processo de diferenciação e desenvolvimento gonadal, promovem aumento acentuado da frequência de células germinativas anormais para ambos os sexos, com reabsorção destas células e redução da fertilidade da espécie.

Singh *et al.* (2010) estudaram histologicamente o processo de regressão gonadal no teleósteo asiático *Channa punctatus*, e verficaram que temperaturas elevadas (24 e 29ºC) induzem degeneração das células germinativas, com o aparecimento de massa coloidal e células sanguíneas no interior dos cistos espermáticos, tanto na condição de repouso como durante o período reprodutivo da espécie.

No presente estudo, não foram observadas células germinativas alteradas, apenas a redução acentuada de cistos dotados com espermatozóides, com todos os demais estágios de desenvolvimento espermático normalmente representados na gônada. Esta condição aponta para uma provável disfunção hormonal a 29°C.

No salmão do Atlântico temperaturas elevadas impedem a maturação e ovulação em fêmeas através da desregulação endócrina com redução da atividade da enzima citocromo P450 aromatase e consequente redução dos níveis séricos de estradiol e aumento dos níveis de testosterona (Pankhurst & King, 2010).

Volcan (2009) observou para *A. nigrofasciatus* que a fertilidade tendeu a ser mais elevada em 25°C, porém diminuiu bastante ao longo das cinco semanas de estudo, enquanto dentro deste período em 17 e 21°C não foi observada esta redução da fertilidade. Possivelmente este resultado demonstra a regressão gonadal antecipada em função da temperatura elevada. Dentre as temperaturas testadas no presente trabalho, não foram verificados sinais de regressão gonadal dentro do período estudado, porém em 28°C foi evidenciada diminuição da concentração de cistos de todos os estágios da espermatogênese e presença de cistos de espermatozóides vazios ou com densidade muito baixa, demonstrando que esta temperatura causa um bloqueio no desenvolvimento e maturação testicular da espécie.

No presente estudo, evidentemente a manutenção em 28°C prejudicou a reprodução e as demais temperaturas não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de reprodução investigados, porém, houve indícios na histologia que apontam a possibilidade de haver prejuízo dos testículos nas temperaturas de 16 e 20°C. Nestas temperaturas houve diminuição na concentração de cistos de espermátides, além de uma tendência a apresentar uma maior concentração de CMMFs em 16°C.

Entende-se que nos teleósteos os CMMFs podem representar estrutras análogas aos centros germinativos dos linfonodos nas aves e mamíferos. Nos vertebrados ectotérmicos, como os peixes, os CMMFs são encontrados principalmente no estroma de tecidos hematopoiéticos. A hematopoiese nos teleósteos é realizada em especial no baço e no rim, mas os CMMFs podem ocorrer também no fígado, intestino e timo. Ainda, a melanização em teleósteos pode estar presente em casos especiais nas brânquias, no cérebro e nas gônadas. Em teleósteos os CMMFs são comumente associados a lesões inflamatórias crônicas e doenças senis (Agius & Roberts, 2003).

Os CMMFs são agregados pigmentados contendo linfócitos e macrófagos que pertencem ao sistema imune inespecífico e atuam no sequestro de produtos de degradação celular e materiais potencialmente tóxicos aos tecidos (Agius & Roberts, 2003). Os CMMFs, portanto, podem ser utilizados como marcadores de qualidade ambiental e condição dos peixes. Louiz *et al.* (2009) associam ocorrência de CMMFs no tecido testicular do gobídeo *Gobius niger* à lesões teciduais por poluição química da água. A tendência de aumento da occorrência dos CMMFs nas tempearturas extremas neste trabalho podem refletir processos de reabsorção de células espermatogênicas lesadas pela condição térmica.

Além dos problemas reprodutivos em adultos quando mantidos em temperturas elevadas, Liu & Walford (1970) observaram para alguns peixes anuais, entre eles *A. wolterstorffi*, que em temperaturas em torno de 20°C ocorre mortalidade de 50% dos exemplares entre 11 e 15 meses, já quando a temperatura fica na faixa dos 15°C o evento pode levar aproximadamente o dobro do tempo para ocorrer. Esta influência da temperatura na longevidade não pode ser associada as taxas de mortalidade observadas no presente estudo pois não abrangeu esta faixa de idade dos peixes. As mortalidades observadas não tiveram relação com aos tratamentos.

O presente trabalho evidenciou que a manutenção em 28°C é prejudicial ao crescimento e a reprodução de *A. wolterstorffi*. Dentre as demais temperaturas testadas, foi verificado que a temperatura ótima para o crescimento diminui ao longo da vida, onde no inicio do ciclo, durante a fase juvenil, temperaturas mais elevadas favorecem o crescimento, enquanto temperaturas intermediárias otimizam o crescimento de adultos. Porém, a reprodução não responde paralelamente ao crescimento nesta fase, apontando melhores resultados em temperaturas elevadas.

Compreendendo o objetivo almejado por este trabalho a fim de fornecer subsídios à manipulação do ciclo de vida de *A. wolterstorffi* de maneira simples e eficiente, conclui-se que para manter e reproduzir este peixe anual em cativeiro, a temperatura da água ideal é de 24°C, por favorecer o crescimento inicial, manter uma alta condição corporal dos peixes até a fase de reprodutores e por otimizar a sua fecundidade e fertilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agius, C. & R. J. Roberts. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. Journal of Fish Diseases. 26: 499–509.

Arenzon, A., A. C. Peret & M. B. C. Bohrer. 1999. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus maelanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. Hydrobiologia 411: 65-70.

Arenzon, A., 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.

Arezo, M. J., D'Alessandro, S., Papa, N., Sá, R. & N. Berois. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Tissue and Cell. 39: 89-98.

Árnason, T., B. Björnsson, A. Steinarsson & M. Oddgeirsson. 2009. Effects of temperature and body weight on growth rate and feed conversion ratio in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture. 295:218–225.

Bapary, M. A. J. & A. Takemura,. 2010. Effect of temperature and photoperiod on the reproductive condition and performance of a tropical damselfish *Chrysiptera cyanea* during different phases of the reproductive season. Fisheries Science. 76: 769–776.

Belote, 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.

Brown, C. A., Gothreaux, C. T. & C. C. Green. 2011. Effects of temperature and salinity during incubation on hatching and yolk utilization of Gulf killifish *Fundulus grandis* embryos. Aquaculture. 315: 335–339.

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. & 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. adloffi* (Ahl) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS 14 (2): 179-200.

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. 127p.

Costa, W. J. E. M. 2009. Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters. 20(2):179-191.

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.

Evans, D.H. & J. B. Claiborne. 2006. The Physiology of Fishes. Editors 3rd ed. CRC Press: Boca Raton. 601p.

Fangue, N. A., Hofmeister, M. & P. M. Schulte. 2006. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. The Journal of Experimental Biology 209: 2859-2872.

Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. J. Appl. Ichthyol. 22, 241–253.

García, D., Loureiro, M. & B. Tassino. 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Neotropical Ichthyology 6(2): 243-248.

Garvey, J. E., K. G. Ostrand & D. H. Wahl. 2004. Energetics, predation, and ration affectsize-dependent growth and mortality of fish during winter. Ecology. 85(10): 2860–2871.

Genade, T., M. Benedetti, E. Terzibasi, P. Roncaglia, D. R. Valenzano, A. Cattaneo & A. Cellerino. 2005. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. Aging Cell 4:223-233.

Glasser, F., Mikolajczyk, T., Jalabert, B., Baroiller, J. F. & B. Breton. 2004. Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). General and Comparative Endocrinology. 136:171-179.

Gomiero, L. M. & F. M. S. Braga. 2005. The condition factor of fishes from two river basins in São Paulo state, Southeast of Brazil. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 27(1): 73-78.

Gonçalves, C. S., Souza, U. P. & Matheus Vieira Volcan. 2011. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. Neotropical Ichthyology. 9: 191-200.

Haas, R. 1976a. Selection in *Nothobranchius guentheri* (Pisces: cyprinodontidae). Evolution 30(3):614-622.

Haas, R. 1976b. Behavioral biology of the annual killifish, *Nothobranchius guentheri*. Copéia 1: 80-91.

Ham, E. H. V., M. H.G. Berntssen , A. K. Imsland ,A. C. Parpoura , S. E. W. Bonga & S. O. Stefansson. 2003. The influence of temperature and ration on growth, feed conversion, body composition and nutrient retention of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 217: 547–558.

Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W. & C. Schulz. 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca.* General and Comparative Endocrinology. 172: 282–292.

Imholt, C., Malcolm, I. A., Bacon, P. J., Gibbins, C. N., Soulsby, C., Miles, M. & R. J. Fryer. 2011. Does diurnal temperature variability affect growth in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar*? Journal of Fish Biology. 78(2): 436–448.

Imsland, A. K., L. M. Sunde, A. Folkvord & S. O. Stefansson. 1996. The interaction of temperature and fish size on growth of juvenile turbot. Journal of Fish Biology 49: 926–940.

Ito, L. S., Yamashita, M. & C. A. Strüssmann. 2003. Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae and juveniles during exposure to warm water. Journal of Experimental Zoology, Part A: Comparative Experimental Biology. 297(2): 169–179.

Lanés, L. E. K. & L. Maltchik. 2010. Discovery of the critically endangered annual killifish, *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924) (Rivulidae: Cyprinodontiformes) in

Lagoa do Peixe National Park, Rio Grande do Sul, southern Brazil. Journal of Threatened Taxa 2(11): 1282-1285.

Liu, R. K. & R. L. Walford. 1966, Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish *Cynolebias adloffi*. 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. & R. L. Walford 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. & R. L. Walford. 1975. Effect of temperature transfer on growth of laboratory populations of a south American annual fish *Cynolebias bellotti*. Growth 39: 337-343.

Louiz, I., Ben-Attia, M. & O. A. Ben-Hassine. 2009. Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. Fisheries Research. 100: 266–273.

Luckenbach, J. A., Godwin, J., Daniels, H. V. & R. J. Borsky. 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Aquaculture. 216: 315–327.

Markofsky, J.1976. Longitudinal and cross-sectional observations of growth and body composition with age in laboratory populations of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. Experimental Gerontology 11:171–177.

Markofsky J. & J. Matias. 1977. The effects of temperature and season collection on the onset and duration of diapause in embryos of the annual fish, *Nothobranchius guentheri*. Journal of Experimental Zoology 202:49–56.

Markofsky, J. & M. Milstoc. 1979a. Aging changes in the liver of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. Experimental Gerontology 14:11–20.

Markofsky, J. & M. Milstoc. 1979b. Histopathological observations of the kidney during aging of the male annual fish *Nothobranchius guentheri*. Experimental Gerontology 14:149–155.

Markofsky, J. & A. Perlmutter. 1972. Age at sexual maturity and its relationship to longevity in the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. Experimental Gerontology 17:131–135.

Okuzawa, K., 2002. Puberty in teleosts. Fish Physiol. Biochem. 26, 31–41.

Osmundson, D. B. 2006. Proximate causes of sexual size dimorphism in Colorado pikeminnow, a long-lived cyprinid. Journal of Fish Biology 68: 1563–1588.

Ostrowski, A. D., Watanabe, W. O., Montgomery, F. P., Rezek, T. C., Shafer, T. H. & J. A. Morris. 2011. Effects of salinity and temperature on the growth, survival, whole body osmolality, and expression of Na+/K+ ATPase mRNA in red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae. Aquaculture. 314(1-4):193-201.

Pankhurst, N. W. & H. R. King. 2010. Temperature and salmonid reproduction: implications for aquaculture. Journal of Fish Biology. 76(1): 69–85.

Parenti, L. R. & H. J. Grier. 2004. Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. Integrative and Comparative Biology 44:333–348.

Podrabsky, J. E. & S. Hand. 1999. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. The Journal of Experimental Biology 202: 2567-2580.

Podrabsky, J. E., Clelen, D. & L. I. Crawshaw. 2008. Temperature preference and reproductive fitness of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* exposed to constant and fluctuating temperatures. Journal of Comparative Physiology. 194:385–393.

Porciuncula, R. A., Quintela, F. M. & D. Loebmann. 2006. Pisces, Cyprinodontiformes, Rivulidae, *Austrolebias minuano* Costa & Cheffe, 2001 and *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924): new species records at Rio Grande city, Rio Grande do Sul state, Brazil. Check List. 2(2):44-46.

Quintela, F. M., Porciuncula, R. A., Condini, M. V. L., Vieira, J. P. & Loebmann, D. 2007. Composição da ictiofauna durante o período de alagamento em uma mata paludosa da planície costeira do Rio Grande do sul, Brasil. Panamjas. 2(3):191-198.

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. 632p.

Rosa, R. S. & F. C. T. Lima. 2008. Peixes. Pp. 9-285. In: Machado, A. B. M., G. M. Drummond & A. P. Paglia (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 906p.

Sakakura, Y. , K. Soyano, D. L. G. Noakes & A. Hagiwara. 2006. Gonadal morphology in the self-fertilizing mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. Ichthyology Research 53: 427–430.

Singh, R., Chaturvedi, S. K. & Abhinav. 2010. Effect of photoperiod and temperature on testicular regression in *Channa punctatus*. Journal of Environmental Biology. 31(3): 307-310.

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.

Strüssmann, C. A. & L. S. Ito. 2005. Where Does Gonadal Sex Differentiation Begin? Gradient of Histological Sex Differentiation in the Gonads of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). Journal of Morfology. 265:190–196.

Utrilla, C. G. & J. Lobo'n-Cervia. Life-history patterns in a southern population of Atlantic salmon. Journal of Fish Biology 55:68–83.

Valenzano, D. R., E. Terzibasi, A. Cattaneo, L. Domenici & A. Cellerino. 2006. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. Aging Cell 5: 275-278.

Volcan, M. V., L. E. K. Lanés & A. C. Gonçalves. 2010. Threatened fishes of the world: *Austrolebias univentripinnis* Costa and Cheffe 2005 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Environ Biol Fish 87(4): 319-320.

Volcan, M. V. 2009. Crescimento e fecundidade do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) sob condições de laboratório. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande – FURG. 59p. (Dissertação – Mestrado em Aquicultura).

Volcan, M. V., Fonseca, A. P. & R. B. Robaldo. 2011. Reproduction of the threatened Annual Killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), confined in a natural environment. Journal of Threatened Taxa. 3(6): 1864-1867.

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

Wourms, J.P. 1967. Annual fishes. *In*: F.H. Wilt & N.K. Wessells. Methods in developmental Biology. Thomas Y. Crowell Co. New York. p. 123–137.

Wourms, J. P. 1972. The development Biology of annual fishes III. Pre-embrionic and embrionic diapause variable duration in the eggs of the annual fishes. Journal of Experimental Zoology 182: 389-414.