

**MISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA
CONTINENTAL**

**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Chico
Mendes de Conservação da Biodiversidade- PIBIC/ICMBio**

Relatório de Final

(2014-2015)

**REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE ESPÉCIES
DE RIVULLIDAE AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

**Bolsista: Matheus Tonetti Galeni
Orientador: Dr. José Augusto Senhorini**

**PIRASSUNUNGA-SP
AGOSTO/2015**

RESUMO

Entre as espécies nativas de peixes tropicais, os Rivulídeos, peixes anuais destacam-se entre os mais ameaçados a extinção devido a diversos fatores, entre os quais as ações antrópicas, como expansão e ocupação de áreas alagadas, desmatamento e construção de barragens, despontam como um dos principais agentes agressores. Desta forma, o presente estudo objetivou conhecer a reprodução da espécie em ambiente de laboratório, bem como descrever o desenvolvimento embrionário de duas espécies de Rivulídeos anuais, obtendo dados para o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies e implementação de técnicas de conservação e propagação mediada. Foram utilizadas duas espécies de Rivullidae, três casais da espécie *Hypsolebias janaubensis*, e sete casais da espécie *Hypsolebias sertanejo*. O comportamento reprodutivo foi observado em ambiente com temperatura controlada (27 – 30°C), contendo substrato de areia para depósito de ovos. Desta forma, foi possível realizar um levantamento quantitativo e qualitativo das desovas, acompanhar o comportamento reprodutivo por filmagens e descrever os estágios do desenvolvimento embrionário nos processos de diapausa (1, 2 e 3). Os resultados apontam que, embora estas espécies apresentem picos de desova, as taxas de sobrevivência e eclosão são muito baixas (inferiores a 30%). A observação da etologia reprodutiva evidenciou um comportamento evidente de corte e desova até a deposição dos ovócitos no substrato. Quanto ao desenvolvimento embrionário, foram observados os estágios de zigoto, clivagem, blástula (diapausa I), segmentação inicial (diapausa II) e tardia (diapausa III) e eclosão. Os resultados permitiram conhecer o processo reprodutivo e gerar dados para uso como ferramentas da biotecnologia aplicada.

Palavras-chave: Rivulídeos; Peixes Anuais, reprodução, embriogênese.

ABSTRACT

Among the native species of annual tropical fish, the Rivulídeos stand out among the most threatened to a scenario of extinction due to several factors, including human actions, such as expansion and occupation of wetlands, deforestation and dam construction, they emerge as one of the main agents. Thus, this study was conducted in order to establish the artificial breeding protocols of species in a laboratory environment, and to describe the embryonic development of annual Rivulídeos, in order to generate a baseline study for the improvement of conservation techniques and mediated spread of these species. We used two species of Rivullidae, three couples of the species *Hypsolebias janaubensis*, and seven couples of the species *Hypsolebias sertanejo*. The reproductive behavior was observed in controlled temperature environment (27 ± 30°C), containing sand substrate for spawning tank and embryos. This way, it was possible to conduct a quantitative and qualitative survey of spawning in captivity, to monitor the reproductive behavior by filming and describe the stages of embryonic development in the diapause process (1, 2 and 3). The results show that although these species have spawning peaks, survival and hatching rates are very low (below 30%). The observation of reproductive ethology showed an obvious behavior of cut and spawning until the deposition of oocytes in the substrate. As for the embryonic development, were observed stages of zygote, cleavage, blastocyst (diapause I), initial (diapause II) and late segmentation (diapause III) and hatching. These results will serve as tools for the applied biotechnology

Keywords: Rivulídeos; Annual Fish; Reproduction; Embryogenesis.

SIGLAS

CEPTA Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática
Continental

ICMBIO Instituto Chico Mendes de Conservação Da Biodiversidade

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PIBIC Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

LISTA DE FIGURAS

FIG. 1 – Fêmea de *Hypsolebias* utilizada durante os experimentos _____ Pág. 8

FIG. 2 – Macho de *Hypsolebias* utilizado durante os experimentos _____ Pág. 8

FIG. 3 – Fotos mostrando a sequência da etologia reprodutiva da espécie ____ Pág. 20

FIG. 4- Fotos sequenciando o desenvolvimento embrionário da espécie *Hypsolebias* _
____Pág. 20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de desovas obtidas para cada espécie _____ Pág. 17;18;19

1. INTRODUÇÃO

Em peixes, principalmente entre as espécies nativas neotropicais, aspectos relacionados à reprodução, morfologia e embriogênese representam conhecimentos de grande importância para o fortalecimento da aquicultura nacional e também para o desenvolvimento de técnicas e estratégias de conservação. No entanto, essas informações são escassas ou inexistentes para muitas espécies nacionais, inclusive entre as mais ameaçadas, cujo conhecimento básico da biologia reprodutiva muitas vezes poderia servir como ferramenta para sua propagação mediada e conservação.

Entre essas espécies ameaçadas, podem-se destacar as chamadas anuais (Cyprinodontiformes, Rivulidae), assim conhecidas por habitarem unicamente áreas úmidas sazonais, que passam por seca em determinados períodos do ano (ARENZON *et al.*, 2002). A principal fonte de ameaça a estas espécies é a destruição ou descaracterização do seu habitat pelas atividades humanas, entre elas a agropecuária e a expansão urbana (ROSA & LIMA, 2008; VOLCAN, 2011). Um agravante ainda maior é o fato de que esses ambientes específicos são protegidos por lei, devido ao fato de, na maioria dos casos, representarem áreas de preservação permanente (APPs) (Lei Federal nº. 4.771 de 1965).

Nas espécies de peixes anuais do Cerrado brasileiro, os principais fatores que impõem sérios riscos de extinção são a proliferação de vastas plantações de soja e outras monoculturas, acarretando desmatamentos, erosão e drenagem de áreas inundadas, e o grande número de barragens implementadas nestes biomas, que provocam o alagamento de grandes áreas onde se concentram as maiores diversidades de peixes anuais. Atividades de pecuária também tendem a reduzir a cobertura arbórea destas regiões, acelerando o processo de secagem e introduzindo animais que consomem grandes quantidades de água e compactam o solo, fatores que também reduzem a área propícia para a desova (COSTA, 2009).

Além do apelo conservacionista, estas espécies representam importantes modelos laboratoriais para pesquisa científica, devido a características de sua biologia básica, a destacar: os aspectos relacionados à diapausa nos embriões, a facilidade de locação e manejo, além da fácil adaptação aos variados sistemas de tratamento, e o tempo de vida curto, possibilitando um estudo detalhado sobre taxas de mortalidade, sobrevivência e reprodução, com resultados claros em um breve período (GENADE, *et al.*, 2005).

Por viverem em áreas úmidas que permanecem alagadas por curtos períodos, os peixes anuais apresentam rápido crescimento e precocidade na maturação sexual. 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;VOLCAN, 2009).

Estudos das décadas de 60 e 70 apontam a diapausa nos peixes rivulídeos como um processo que ocorre em três fases distintas. Na primeira fase, também conhecida como diapausa I, que ocorre no início do desenvolvimento, observa-se um processo único entre os peixes anuais, caracterizado como uma dispersão e reagregação de blastômeros durante a embriogênese. Esta etapa da diapausa pode ser induzida por condições ambientais desfavoráveis (WOURMS, 1972).

A segunda etapa, ou diapausa II, ocorre em embriões no estágio de segmentação, com 38 a 40 somitos, coração funcional e sistema nervoso central em formação. Finalmente, na diapausa III, o processo ocorre imediatamente antes da eclosão. O embrião já está totalmente desenvolvido e pode eclodir a qualquer momento de acordo com a sinalização favorável do ambiente, no caso, a incidência de chuvas e fim do período de seca. Durante este período, Wourms (1972) relata que o consumo de vitelo parece parar consideravelmente, e observa-se também uma diminuição na frequência cardíaca dos embriões em pré-eclosão.

Todo o processo é extremamente delicado e está intimamente relacionado com as condições externas do ambiente, como índices de chuva, temperatura, incidência de luz e características físico-químicas da água. Não são totalmente conhecidos todos os mecanismos que interferem induzindo e cessando o processo de diapausa nessas espécies de peixes, o que evidencia um processo evolutivo muito complexo e individual. Conhecer e descrever todos estes mecanismos entre as espécies anuais é muito necessário como ferramentas de conservação e propagação destes grupos, que já possuem muitas espécies em risco real de extinção.

Desta forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de descrever a biologia reprodutiva e o desenvolvimento embrionário das espécies de peixes anuais Rivulidae sob condições controladas em laboratório, a fim de levantar informações detalhadas sobre estas espécies ameaçadas que possam servir como base em estudos de biotecnologia aplicada à conservação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental– CEPTA – ICMBio, localizado a 21°55'48" latitude sul, 47°22'28,1" longitude oeste, no município de Pirassununga, estado de São Paulo.

Foram utilizadas duas espécies de Rivullidae, *Hypsolebias janaubensis*, 3 casais, e a segunda espécie *Hypsolebias sertanejo*, sendo utilizados 7 casais, todos aptos a reprodução. Ambas as espécies foram colocadas em aquários capacidade de 30 L, com 20 litros de água, aeração constante e temperatura controlada (27-30 °C), sendo colocado um casal por aquário totalizando dez aquários

Para os experimentos com reprodução, desova, filmagem do comportamento reprodutivo (etologia) e avaliar aspectos quantitativos e qualitativos das desovas, foram colocados substratos de areia em cada aquário, formando um “ninho”, Figs 1 e 2.



Fig 1 Fêmea de *Hypsolebias* utilizada durante os experimentos



Fig 2 Macho de *Hypsolebias* utilizada durante os experimentos.

Experimento 1: Avaliação dos aspectos quantitativos e qualitativos das desovas.

Após se verificar que estava ocorrendo comportamento reprodutivo, o substrato de desova (areia) passou a ser filtrado diariamente, passando por uma peneira malha 300 micras para que os ovos fossem separados, e logo em seguida eram contados e colocados em placas de Petri. Posteriormente, os ovos foram analisados em estereomicroscópio, verificando-se quais estavam fertilizados e colocados em outras placas de Petri contendo fibras de côco, para

evitar umidade e mantidos em estufa tipo B.O.D a 26°C por 30 dias para que ocorresse a secagem.

Passado esse período, os ovos eram retirados da fibra de côco, hidratados em placas de petri para quebra da diapausa, e em seguida colocados em potes plásticos com água até a eclosão.

Nesse experimento foram avaliados os seguintes parâmetros:

- 1) quantidade de ovos coletados do substrato (areia);
- 2) porcentagem de ovos fertilizados;
- 3) quantidade de ovos recuperados do substrato (fibras de côco) e;
- 4) porcentagem de ovos eclodidos.

Experimento 2: Acompanhamento da etologia reprodutiva.

Neste experimento foram feitas análises com o auxílio de filmagem dessas espécies de Rivulídeos, verificando-se o comportamento de cortejo e como esses ovos eram depositados no substrato, e tinha a filmagem a duração de 6 horas diárias.

Experimento 3: Desenvolvimento embrionário.

Nesta etapa os peixes foram acompanhados para se verificar o exato momento em que os ovos eram depositados ao substrato, em seguida, os mesmos foram coletados e levados até um estereomicroscópio, e lá fotografados em cada etapa do desenvolvimento embrionário (clivagem, blástula, gástrula, somito e eclosão). Os embriões foram observados diariamente até a eclosão.

3. RESULTADOS

Aspectos quantitativos e qualitativos das desovas

Os resultados parciais do experimento 1 indicam que embora essas espécies apresentem picos de desova, podendo chegar até 60 ovos diários em uma única fêmea, a taxa de eclosão é bem baixa e na maioria das vezes zero. A Tabela 1 demonstra o número de desovas obtidas para cada espécie analisada, bem como a viabilidade de cada uma. Na espécie *Janaubensis*, foi possível obter um número maior de desovas, com boa qualidade devido ao fato de terem sido obtidas em sistema artificial.

Etologia reprodutiva

Na figura 3 é apresentado o comportamento reprodutivo da espécie, o qual em A temos a fêmea esperando para ser pareada com o macho; em B o início do cortejo; em C o início do posicionamento para enterrar os ovos ao substrato; em D-E-F os ovos estão sendo enterrados e fertilizados pelo macho; em G-H-I termina-se o comportamento reprodutivo.

Desenvolvimento embrionário

Durante o desenvolvimento embrionário foram observados cinco estágios (clivagem, blástula – momento da diapausa I, somito – momento da diapausa II e III, e eclosão). Após a fertilização os ovos iniciaram as clivagens, sendo observado o estágio de quatro células (Figura 4A). Com a continuidade das divisões celulares, os ovos atingiram a fase de blástula, a qual é caracterizada pela formação da blastoderme (Figura 4B). Posteriormente, foi observado o estágio de somito (Figura 4C), o qual faz parte do processo de organogênese. Durante deste evento, as larvas começaram a apresentar movimentos ativos, o que culminou na saída do córion, momento da eclosão (Figura 4D). Logo após a eclosão as larvas apresentavam alimentação exógena (náuplios de *Artemia sp.*), o que permitiu o rápido desenvolvimento das mesmas (Figura 4E). O estágio de gástrula (após a blástula) não foi

verificado, pois os ovos entraram em diapausa e as observações só possibilitaram a verificação do próximo estágio (somito).

4. DISCUSSÃO

Os dados parciais desta pesquisa destacam dois importantes aspectos relacionados à reprodução das espécies de peixes anuais. O primeiro deles trata da quantidade e qualidade das desovas obtidas por duas dessas espécies sob condições de laboratório, em sistemas artificiais de criação. O segundo descreve os padrões de comportamento reprodutivo destas espécies, tão característico que o torna imprescindível para o entendimento, manejo e manipulação dos padrões reprodutivos destes animais.

Quanto à quantidade e qualidade das desovas obtidas sob condições experimentais de laboratório, Wourms (1972), em um dos trabalhos mais clássicos realizados com as espécies anuais de peixes sobre aspectos reprodutivos, destaca que no processo de embriogênese destes animais, a diapausa I ocorre na fase de dispersão de células, previamente à sua reagregação. O processo de dispersão – reagregação é considerado um mecanismo de controle básico na formação da massa de células crítica para a continuação da embriogênese. O autor destaca ainda que, submeter os ovos após a desova a condições não ideais durante a fase de dispersão impede a reagregação e atrasa a embriogênese, comprometendo seriamente a qualidade e os índices de sobrevivência ao longo do desenvolvimento. A existência da diapausa I, entre outros aspectos, permite que a embriogênese seja postergada até que o ambiente apresente condições adequadas à sua continuidade, em uma clara estratégia de sobrevivência e propagação da espécie.

No presente trabalho, o desenvolvimento embrionário e os fatores que o modulam e influenciam serão abordados na segunda etapa da pesquisa, mas os primeiros estágios de desenvolvimento pós fertilização em desovas semi artificiais em laboratório já puderam ser

observados durante a execução da primeira etapa do trabalho, apresentando padrões muito semelhante aos já descritos para outras espécies de peixes anuais na literatura.

Com relação aos aspectos relacionados aos processos de diapausa que ocorrem durante a embriogênese normal destes peixes, Podrabsky (1999) destaca que é possível que a longa duração das secas e a relativa instabilidade e imprevisibilidade dos efêmeros biótopos possam ter favorecido o processo de diapausa em detrimento ao “atraso na eclosão”. As condições ambientais que regulam o fim da diapausa continuam obscuras em toda literatura indexada sobre este aspecto, o que sugere claramente que estes fatores são multivariados.

Durante as desovas observadas em laboratório na presente pesquisa, foi possível observar claramente o padrão de três estágios de diapausa, influenciados por essa série de fatores ambientais e biológicos específicos que não são totalmente conhecidos mas que, a princípio, estão diretamente relacionados aos índices pluviométricos e conseqüentemente ao volume d'água. Ovos com morfologia adequada e aparentemente viáveis entravam em diapausa I nas condições experimentais e continuavam o seu desenvolvimento normal dias após o repouso quando se adicionava água ao ambiente criado com fibras. Muitos chegavam à eclosão com taxas satisfatórias de sobrevivência, como será apresentado posteriormente na segunda etapa desta pesquisa.

Outro aspecto muito abordado na literatura sobre fatores ambientais modulando a qualidade da desova de peixes anuais é a questão da influência da temperatura sobre os ovócitos e o desenvolvimento embrionário. Arenzon, Lemos e Bohrer (2002), abordando os aspectos da influência da temperatura sobre o desenvolvimento da espécie *Cynopoecihus melanotaenia*, constataram que o efeito de duas faixas distintas de temperatura, 20°C e 25°C e de uma outra variável (16-25°C), afetavam diretamente o tempo de desenvolvimento dos embriões da espécie, modulando a velocidade de ocorrência dos estágios normais da embriogênese. Os autores destacam que foi necessário menor período de incubação para

completar o desenvolvimento a 25°C, temperatura mais elevada. Entretanto, todos os embriões mantidos sob essa faixa chegaram a eclosão, apresentando más formações morfológicas que inviabilizariam sua posterior sobrevivência. O trabalho deixa clara a influência exercida por mais um fator ambiental – temperatura – sobre a qualidade e sobrevivência das desovas e embriões e larvas das espécies anuais.

Quanto à segunda etapa realizada e descrita no presente relatório parcial, foi possível observar e estabelecer alguns padrões do comportamento reprodutivo das espécies de peixes anuais estudadas.

Informações acerca dos mecanismos de isolamento reprodutivo, incluindo uma análise detalhada dos sinais de cortejo, são escassas entre esses peixes na literatura indexada. O comportamento reprodutivo de *Austrolebias reicherti*, uma outra espécie também anual, foi observado e descrito por García, Loureiro e Tassino (2008). Os autores destacam que, entre os machos da espécie, o padrão de comportamento foi à chamada “exibição lateral”, onde características espécie – específicas da morfologia e colorido são destacados e exibidos à fêmea durante o comportamento de corte.

O trabalho destaca, ainda, que entre as fêmeas, foi observado um comportamento reprodutivo de “quietude”, o que indica que o mesmo poderia desempenhar um papel avaliativo durante o cortejo. Os autores também chamam a atenção pelo fato de que, além dos sinais visuais envolvidos no cortejo das espécies anuais, os machos também vibram as nadadeiras dorsal e anal e ondulam o corpo, indicando que os sinais mecânicos também poderiam ter influência na atração das fêmeas. Os movimentos de cortejo altamente conservados dentro de *Austrolebias* indicam que o reconhecimento específico e a barreira à hibridização poderiam não ocorrer nesta etapa, a menos que se encontrem diferenças quantitativas e de frequência nestes sinais comportamentais.

Quanto ao desenvolvimento embrionário, observado nas etapas finais do presente relatório, os padrões de embriogênese e diapausa foram bem característicos para espécies de rivulídeos tropicais. O primeiro plano da clivagem na presente espécie dá origem a dois blastômeros com tamanho idêntico, característica semelhante à identificada para outras espécies, como *Oryzias latipes* (IWAMATSU, 2004), e *Gadus morhua* (HALL et al., 2004). No estágio de blástula, o padrão de desenvolvimento embrionário observado pode ser comparado ao descrito por Iwamatsu (2004) para o medaka e por Kimmel *et al.* (1995) para o “zebrafish”. As células movem-se de forma convergente para formar o eixo embrionário. Não foi possível observar os eventos correspondentes ao estágio de gástrula nesta espécie, visto que os embriões entraram em diapausa após a blástula. Na segmentação, momento em que se multiplicam os primeiros somitos, o número total observado gradualmente pode ser empregado para definir o estágio de desenvolvimento durante a segmentação (GORODILOV, 2004). No entanto, este padrão não pode ser seguido sem adaptações, porque o número de somitos e os intervalos de seu desenvolvimento são espécie-específico.

5. CONCLUSÃO

Os padrões observados neste trabalho, de uma forma geral, foram muito semelhantes aos descritos na presente pesquisa para as duas espécies observadas: um comportamento de corte muito específico e de grande duração entre os adultos das respectivas espécies aptos à reprodução, sem uma clara evidência de barreira à formação de híbridos, mas com padrões bem estabelecidos de comportamento e frequência deste comportamento até o ato de desova e fertilização.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Augusto Senhorini pela paciência, pela amizade, pela orientação e pelo conhecimento aprendido.

Ao Nivaldo Ferreira do Nascimento, Matheus Pereira dos Santos, Rafaela Bertolini, Regiane Cristina, Paulo André de Andrade Santos, Lucas Piva, Leticia Dragone e George Shigueki Yasui pela colaboração e pelo aprendizado durante este período.

Ao CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA CONTINENTAL CEPTA/ICMBio pela estrutura oferecida para a realização do meu projeto e por me receber sempre de portas abertas

Agradeço ao CNPq/PIBIC pela concessão da bolsa.

7. REFERÊNCIAS

ARENZON, A., C. A. LEMOS & M. B. C. BOHRER. **The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).** Brazilian Journal of Biology 62(4B): 743-747. 2002.

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

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

GENADE, T., M. BENEDETTI, E. TERZIBASI, P. RONCAGLIA, D. R. VALENZANO, A. CATTANEO & A. CELLERINO. **Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research.** Aging Cell 4:223-233. 2005.

GORODILOV, Y. N. **Studies of temporal and spatial peculiarities of somitogenesis in fish embryos.** Russ J Dev Biol 35: 92-105. 2004.

HALL, T. E.; SMITH, P., JOHNSTON, I. A. **Stages of embryonic development in the Atlantic Cod *Gadus morhua*.** Journal of Morphology. 259:255-270. 2004.

IWAMTSU, T. **Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*.** Mech. Dev. 121:605-618. 2004.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B., SCHILLING, T. F. **Stages of embryonic development of the zebrafish.** Dev. Dyn 203:253-310. 1995.

PODRABSKY, J. E.; HAND, S. C. **The bioenergetics of embryonic diapause in an annual killifish, *Austrofundulus limnaeu*.** The Journal of Experimental Biology 202, 2567–2580. 1999.

PODRABSKY, J. E. **Husbandry of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* with special emphasis on the collection and rearing of embryos.** Environmental Biology of Fishes. V. 54, n. 4, p. 421 – 431, 1999.

ROSA, R. S. & F. C. T. LIMA. **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. 2008.

VOLCAN, M. V. **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). 2009.

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

WOURMS, J. P. **Developmental biology of annual fishes. I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl.** J. Exp. Zool. 182, 143–168. 1972.

FIGURAS E TABELAS

TABELA 1 – Número de desovas obtidas para cada espécie, durante o desenvolvimento experimental (47 dias de observações).

<i>Sertanejus</i>			<i>Janaubensis</i>	
Desova	Ovos viáveis	Ovos inviáveis	Ovos viáveis	Ovos inviáveis
1	120	34	47	0
2	70	44	57	6
3	112	49	38	3
4	115	19	24	0
5	106	21	22	1
6	95	17	28	3
7	88	9	1	0
8	133	20	8	3
9	41	23	2	7
10	49	10	4	5
11	10	2	1	7

12	12	5	12	13
13	13	5	20	80
14	9	34	18	16
15	6	4	17	39
16	28	23	31	34
17	25	10	8	4
18	2	1	19	3
19	5	3	11	24
20	14	21	10	16
21	11	5	18	34
22	15	2	2	0
23	8	14	10	0
24	5	14	4	0
25			25	6
26			19	5
27			12	0
28			14	21
29			24	2
30			11	5
31			15	2
32			13	0
33			24	0
34			8	14
35			5	14

36	3	2
37	15	11
38	3	2
39	4	1
40	9	3
41	8	2
42	6	1
43	8	1
44	15	3
45	2	0
46	9	0
47	8	1

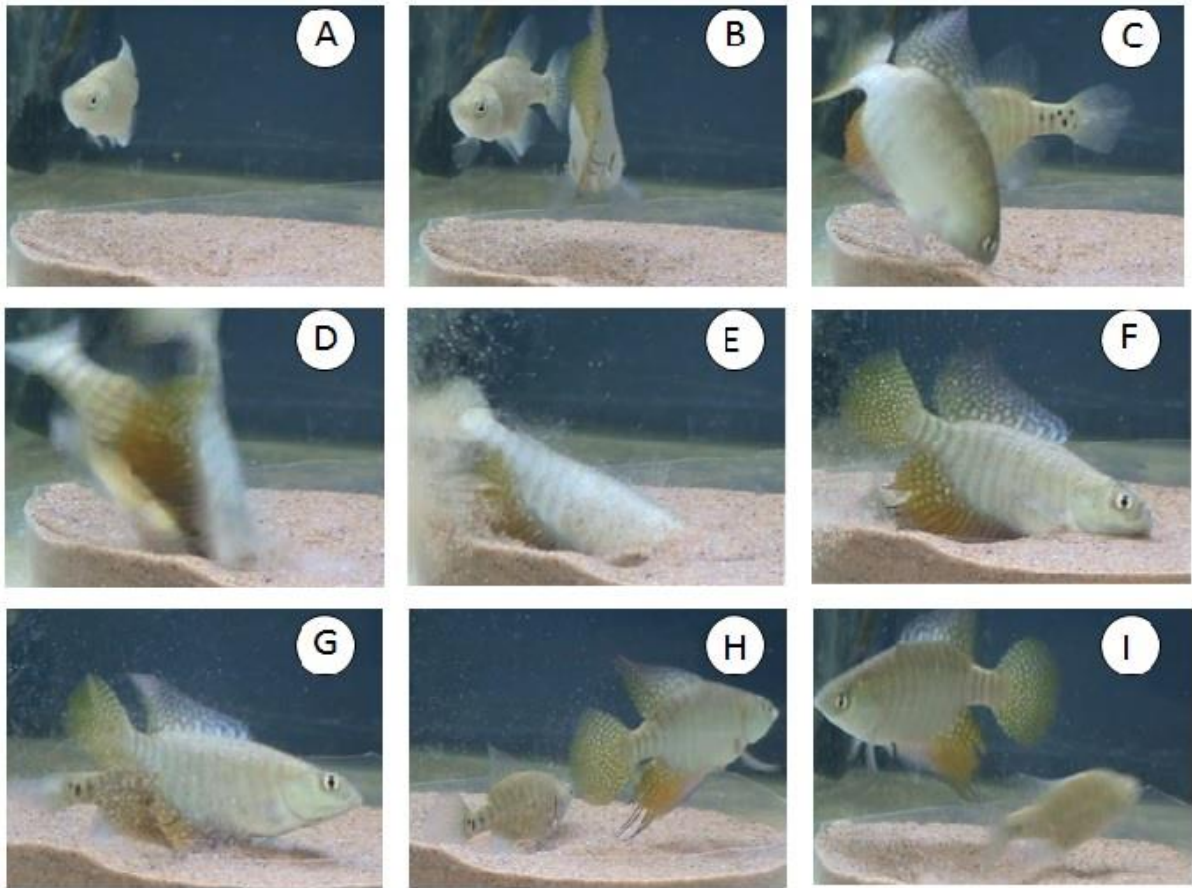
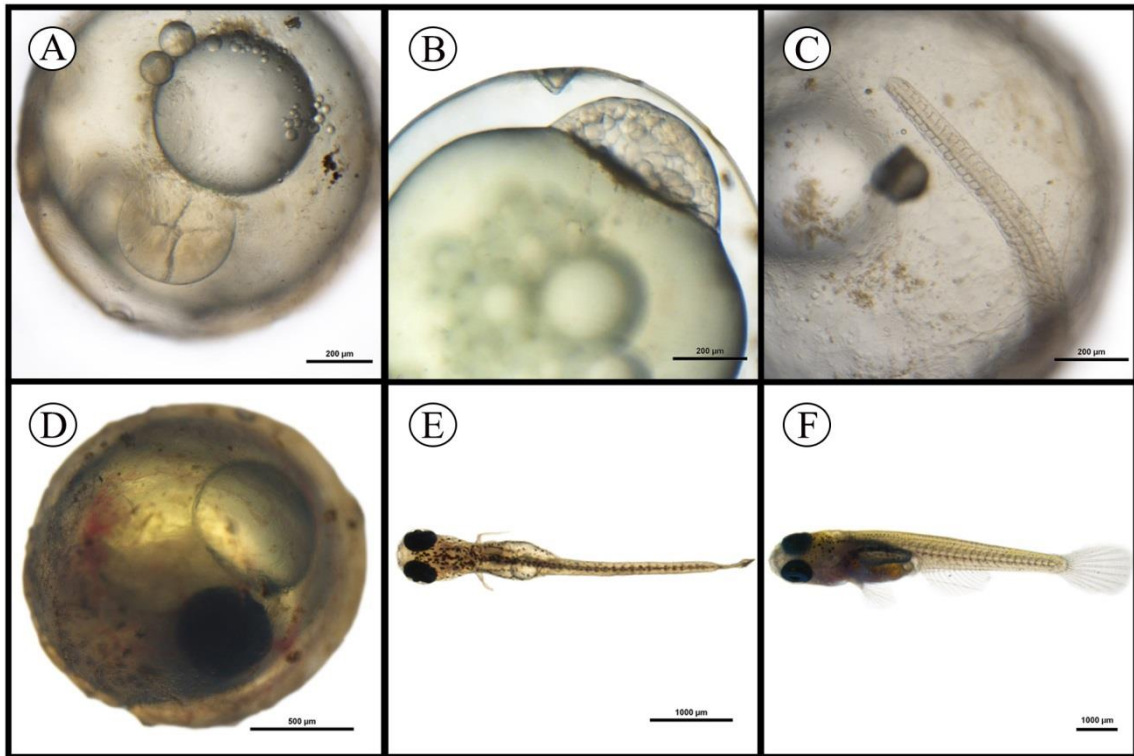


FIG. 3 – Sequência da etologia reprodutiva da espécie **QUAL ESPECIES**



A- Estágio de clivagem (4 blastômeros); B- Estágio de blástula (diapausa I); C- Estágio de segmentação (diapausa II); D- Estágio de segmentação tardia (diapausa III); E- Larva (1 dia de eclosão); F- Larva (4 dias de eclosão).

FIG. 4- Sequencia do desenvolvimento embrionário da espécie *Hypsolebias*. **QUALLLL?**