



MINISTÉRIO 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 Final
Ciclo 2021-2022

**AVALIAÇÃO DO BANCO DE OVOS DO PEIXE-ANUAL
HYPSOLEBIAS AURATUS (CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE),
UMA ESPÉCIE CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Nome da estudante de IC: Talita Andrade Regiani Carleti

Orientadora: Dra. Carla Natacha Marcolino Polaz

Coorientadora: Ms. Izabel Corrêa Boock de Garcia

Instituição da coorientadora: ICMBio/CEPTA

**São Paulo
Agosto/2022**

ATENÇÃO | Esclarecimentos aos revisores: o Plano de Pesquisa da aluna Talita Carleti foi completamente alterado após o envio do Relatório Parcial de Acompanhamento, em fevereiro de 2022. O trabalho originalmente proposto envolvia a captura de outra espécie anual de rivulídeo, *Campellolebias dorsimaculatus*, que ocorre na região litorânea do Estado de São Paulo. Infelizmente, por questões climáticas do atual período hidrológico, a espécie não foi coletada a tempo de ser possível realizar o experimento original em laboratório, pois as poças estavam totalmente secas. Sendo assim, uma nova proposta de pesquisa foi submetida à Coordenação do PIBIC e aprovada para realização a partir de março deste ano, com outra espécie: *Hypsolebias auratus*. Todas as atividades realizadas pela aluna no período de agosto de 2021 a fevereiro de 2022 estão descritas no Relatório Parcial e não serão repetidas aqui.

Resumo

O rivulídeo *Hypsolebias auratus* possui distribuição restrita, em poças temporárias da bacia do rio São Francisco. Está ameaçado de extinção na categoria “Críticamente em Perigo” (CR), portanto, ações de manejo *ex situ* são uma estratégia importante para sua conservação. O projeto objetiva medir a taxa de eclosão de ovos de *H. auratus* armazenados em ninhos artificiais. A avaliação da viabilidade do banco foi realizada em cinco etapas: a) contagem prévia da quantidade de ovos por ninho; b) determinação do estágio de desenvolvimento embrionário dos ovos (diapausa I, II ou III); c) molhagem dos ninhos para indução dos nascimentos; d) quantificação dos peixes nascidos; e) estocagem da turfa com ovos não eclodidos. Para determinar as taxas de eclosão, os ninhos foram colocados em aquários por 72 horas e avaliados a cada 24 horas. Dos 236 ovos contabilizados em 113 ninhos formadores do banco (199 em DI, 3 em DII e 34 em DIII), 44 eclodiram (18,6%). O número de nascimentos foi maior nas primeiras 24 horas, com 35 nascimentos (79,5%); 6 nascimentos após 48h (13,6%) e apenas 3 nascimentos em 72h (6,9%). Alguns fatores podem ter contribuído para a baixa taxa de eclosão observada: a) a heterogeneidade temporal do banco de ovos; b) a temperatura do ar, mantida abaixo do ótimo para a espécie; c) o substrato utilizado; d) molhagens anteriores; e) endogamia. Os resultados obtidos sinalizam que é necessário avaliar o banco de ovos com maior frequência e realizar novas pesquisas visando o aprimoramento do manejo da espécie em cativeiro.

Palavras-chave: rivulídeos, cativeiro, conservação *ex-situ*.

Abstract

The killifish *Hypsolebias auratus* is restrictedly distributed to temporary pools in the São Francisco River basin. It is on the Red List as "Critically Endangered" (CR), therefore, *ex situ* management actions are an important strategy for its conservation. The project aims to measure the hatching rate of *H. auratus* eggs stored in artificial nests. The viability of the bank was evaluated in five stages: a) previous counting of the number of eggs per nest; b) determination of the stage of embryonic development of the eggs (diapause I, II or III); c) wetting the nests to induce hatching; d) quantification of the fry; e) storage of the peat with non-hatched eggs. To determine hatching rates, nests were placed in tanks for 72 hours and assessed every 24 hours. Of the 236 eggs counted in 113 nests forming the bank (199 in DI, 3 in DII, and 34 in DIII), 44 hatched (18,6%). The number of fry was highest in the first 24 hours, with 34 fry (79.5%); 6 fry after 48 h (13.6%) and only 3 fry within 72 h (6.9%). Some factors may have contributed to the low hatching rate observed: a) the temporal heterogeneity of the egg bank; b) the air temperature, kept below the optimum for the species; c) the substrate used; d) previous wetting of the nests; e) inbreeding. The results obtained indicate that it is necessary to evaluate the egg bank more frequently and conduct other studies to enhance the management of the species in captivity.

Key-words: Rivulidae, captivity, *ex situ* conservation.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Macho (A) e fêmea (B) da espécie de peixe rivulídeo *Hypsolebias auratus* (Costa & Nielsen, 2000). Fonte: Davi H. Oliveira, 2021.....09
- Figura 2.** Localidade-tipo: poça temporária de água doce, nas proximidades do rio Taboca, um tributário do rio Paracatu, bacia do rio São Francisco, município de Lagoa Grande, Minas Gerais. Fonte: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção ICMBio (2018).....10
- Figura 3.** Contagem da quantidade de ovos por ninho (à esquerda) e ovo localizado em meio à turfa (à direita mostrado na seta amarela). Fonte: arquivo pessoal, 2022.....13
- Figura 4.** Estágios embrionários dos ovos de *Hypsolebias auratus* observados em lupa. Da esquerda para a direita são mostrados os estágios de diapausa DI, DII e DIII. Os ovos possuem menos do que 1 mm de tamanho. Fonte: arquivo pessoal, 2022.....13
- Figura 5.** Distribuição dos ninhos nos aquários e potes (acima) do Laboratório de Ictiologia do ICMBio/CEPTA, em Pirassununga/SP e posterior molhagem (abaixo). Fonte: arquivo pessoal, 2022.....14
- Figura 6.** Avaliação da eclosão dos ovos de *Hypsolebias auratus* em larvas no Laboratório de Ictiologia do ICMBio/CEPTA, em Pirassununga/SP. Fonte: arquivo pessoal, 2022.....15
- Figura 7.** Número de nascimentos a cada 24 horas durante as 72 horas de duração do experimento.....16

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estágios de diapausa e nascimentos em 24, 48 e 72 horas dos ovos de *Hypsolebias auratus* em ninhos armazenados no banco de ovos do ICMBio/CEPTA em diferentes períodos. Data de molhagem dos 113 ninhos submetidos ao presente experimento: 16/05/2022. Obs: a tabela apresenta somente os ninhos com nascimentos. Células mescladas indicam ninhos que foram agrupados num mesmo aquário. ID = número atribuído ao ninho no início do experimento.....17

Siglas e Símbolos

CEPTA - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

MMA - Ministério do Meio Ambiente

PAN - Plano de Ação Nacional para Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção

PIBIC - Programa de Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Sumário

Introdução.....	08
Objetivos.....	11
Material e Métodos	11
Resultados	15
Discussão e Conclusões	19
Recomendações para o manejo	22
Agradecimentos	22
Referências bibliográficas.....	23

1. Introdução

A região Neotropical abriga a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, com cerca de 50% da fauna conhecida (REIS *et al.*, 2003). O Brasil comporta grande parte desses peixes, com aproximadamente 43% das espécies (BUCKUP *et al.*, 2007). Um dos grupos com maior diversidade de espécies é composto pelos peixes da família Rivulidae, com 471 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2022).

No Brasil, esses peixes, também chamados de rivulídeos, peixes-anuais ou peixes-das-nuvens, ocorrem em todos os biomas e regiões geográficas. São espécies muito peculiares devido ao seu ciclo de vida, que está relacionado à dinâmica temporal das áreas úmidas temporárias onde vivem (LANÉS, 2011). Conforme as poças se estabelecem, os indivíduos adultos se reproduzem e depositam seus ovos no substrato, morrendo quando ocorre o secamento completo do ambiente (VAZ-FERREIRA *et al.*, 1966; COSTA, 1998). Durante a fase seca, os ovos dos peixes anuais permanecem em um processo de dormência, chamado de diapausa, e apenas iniciam seu desenvolvimento com uma nova inundação das poças, durante o período chuvoso seguinte (COSTA, 1998, 2010; LOUREIRO & DE SÁ, 1998). Após a eclosão dos ovos, os alevinos têm desenvolvimento rápido e alcançam a maturidade sexual dentro de um ou dois meses (LIU & WALFORD, 1966, 1969; ERREA & DANULAT, 2001; VOLCAN, 2021).

Dentre as 291 espécies de peixes continentais constantes no anexo da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (Portaria MMA n. 148/2022), 130 são da família Rivulidae, o que corresponde a 44% da fauna de peixes de água doce brasileira ameaçada. Dessas, 56 espécies estão classificadas como Criticamente em Perigo (CR), 40 Em Perigo (EN) e 34 Vulneráveis (VU) (BRASIL, 2014; 2022; ICMBio, 2022a). De acordo com Lanés (2011), estudos demonstram que peixes de água doce são os mais vulneráveis à extinção e que as espécies que apresentam pequeno porte, como os peixes-anuais, estão especialmente suscetíveis a desaparecer. Por estas razões, este grupo de peixes possui um Plano de Ação Nacional (PAN) específico, que está em seu 2º ciclo (ICMBio, 2022b).

Por ocuparem alagados temporários, normalmente localizados fora de Unidades de Conservação (UCs), a maior ameaça aos rivulídeos é a perda ou destruição dos seus ambientes. Muitos brejos e lagoas temporárias têm sido drasticamente destruídos, tanto em áreas agropecuárias como em áreas em processo de urbanização, por meio de desmatamentos,

drenagens e aterros. Diversas espécies são bastante sensíveis a ligeiras alterações da qualidade da água ou perda da cobertura vegetal original circundante, e para agravar a situação, a grande maioria possui reduzidíssima área de distribuição, caracterizando grandes especificidades ao tipo de ambiente de ocorrência e a distribuição espacial das espécies (ICMBio, 2013). As principais atividades humanas registradas como causadoras da perda de habitat dos rivulídeos são drenagens, aterros, desmatamento, construção de açudes, agropecuária, expansão imobiliária/urbana, ferrovias, mineração, queimadas que, juntos, correspondem a 77% das ameaças às espécies; extração direta dos indivíduos da natureza por captura e tráfico corresponde a 15% e a introdução de espécies invasoras/exóticas a 3% (ICMBio, 2013; VOLCAN, 2021).

A espécie *Hypsolebias auratus* (Figura 1) representa um desses casos de distribuição extremamente restrita, tendo sido registrada até o momento somente nos arredores de sua localidade-tipo, em poças temporárias nas proximidades do rio Taboca, um tributário do rio Paracatu, bacia do rio São Francisco, localizada no município de Lagoa Grande, no oeste do estado de Minas Gerais (COSTA, 2002; ICMBio, 2018) (Figura 2).



Figura 1. Macho (A) e fêmea (B) da espécie de peixe rivulídeo *Hypsolebias auratus* (Costa & Nielsen, 2000).
Fonte: Davi H. Oliveira, 2021.



Figura 2. Localidade-tipo: poça temporária de água doce, nas proximidades do rio Taboca, um tributário do rio Paracatu, bacia do rio São Francisco, município de Lagoa Grande, Minas Gerais. Fonte: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção ICMBio (2018).

Quanto às características morfológicas, a espécie possui dimorfismo sexual, os machos são maiores, mais coloridos e suas nadadeiras são mais longas. O comportamento reprodutivo em espécies de peixes anuais é extraordinariamente complexo, com etapas nupciais elaboradas, machos demonstram padrões de corte distintos conforme a espécie. Os machos também são territorialistas e rondam individualmente uma área com sítios propícios à desova. Assim que uma ou mais fêmeas são percebidas, um aprimorado comportamento de corte é iniciado. Seguida a primeira aproximação, intensificam-se as cores do macho e o mesmo faz movimentos ondulatórios do corpo, segue para o substrato junto de uma fêmea; ambos se apresentam lado a lado, com suas nadadeiras dorsal e anal (abraço nupcial) o macho envolve a fêmea (COSTA, 2009, pág. 14).

Hypsolebias auratus é uma das espécies contempladas no PAN Rivulídeos, que tem como objetivo geral consolidar e ampliar estratégias de conservação dos peixes rivulídeos ameaçados de extinção e dos seus ambientes em cinco anos. A ação 1.3 deste PAN, a qual fazemos destaque, é: “Promover estudos voltados para taxonomia, genética, biologia, ecologia e limites de distribuição geográfica para conservação dos peixes rivulídeos ameaçados de extinção”.

2. Objetivos

Este projeto tem como **objetivo geral** medir a taxa de eclosão de ovos armazenados em ninhos artificiais no banco de ovos da espécie de peixe-anual *Hypsolebias auratus*. Dessa forma, pretendemos reunir mais informações sobre o ciclo de vida dessa espécie e, assim, traçar melhores estratégias de manejo e conservação em cativeiro.

Dentre os **objetivos específicos** podemos citar:

- Proporcionar a continuidade dos estudos em cativeiro com objetivos conservacionistas, avaliando a viabilidade do banco de ovos de rivulídeos mantido no CEPTA.
- Aprimorar o manejo e a conservação dessa e de outras espécies em diferentes situações: em campo, em laboratório, em virtude de material apreendido, dentre outros.
- Contribuir para que o CEPTA se torne referência em pesquisa de rivulídeos, com foco em ações de manejo conservacionista para espécies ameaçadas de extinção.

3. Material e Métodos

3.1. *Origem do banco de ovos de Hypsolebias auratus*

O banco de ovos de *H. auratus* do Laboratório de Ictiologia do CEPTA originou-se a partir do recebimento de material biológico apreendido pelo IBAMA e Polícia Federal em 2019, que continha ovos acondicionados em embalagens plásticas com fibra de coco, e estavam sendo transportados pelos Correios, somando um total de 113 ovos. Esses ovos foram molhados e 36 deles eclodiram, sendo que 6 chegaram à fase adulta (4 fêmeas e 2 machos) e foram mantidos para reprodução. Em 2020 o banco de ovos proveniente da primeira geração no laboratório do CEPTA foi molhado e 153 indivíduos eclodiram, sendo que 27 chegaram à fase adulta (11 machos e 16 fêmeas). Com três meses de vida, estes indivíduos foram separados para reprodução.

Dos 27 indivíduos adultos disponíveis, 6 machos e 9 fêmeas foram utilizados pelo ex-aluno do Programa ICMBio/PIBIC Davi Hinncands de Oliveira (ciclo 2020/2021), que desenvolveu os estudos iniciais de ecologia reprodutiva de *H. auratus*, investigando as suas principais estratégias reprodutivas, taxas de oviposição e eclosão de casais e trisais (2 fêmeas e

1 macho) em cativeiro. Os demais peixes adultos, que não fizeram parte do estudo, foram mantidos para reprodução. Ao todo, entre os meses de janeiro e dezembro de 2021, 119 ovos foram obtidos do experimento de Oliveira *et al.* (em fase de elaboração) e 226 ovos do restante do plantel de reprodutores, somando 345 ovos distribuídos em 113 ninhos, que foram armazenados em sacos plásticos contendo um substrato conhecido como turfa (fibra de coco).

A finalidade de um banco de ovos, dentre muitas, é proporcionar a continuidade dos estudos em cativeiro com objetivos conservacionistas, uma vez que eles são a fonte geradora das matrizes dos peixes utilizados em experimentos futuros. Por isso, avaliar a viabilidade desse banco de ovos é uma etapa fundamental dos estudos e o objetivo central deste plano de trabalho. Além disso, tais informações podem oferecer subsídios à conservação e ao manejo de diferentes espécies da família Rivulidae, tanto em ambientes naturais como mantidas em laboratório.

3.2. *Montagem do experimento e avaliação do banco de ovos de Hypsolebias auratus*

A equipe de avaliação foi composta por: a aluna Talita Andrade Regiani Carleti, graduanda de medicina veterinária e bolsista do PIBIC 2021/2022; a orientadora Dra. Carla Natacha Marcolino Polaz e a coorientadora Ms. Izabel Correa Boock de Garcia, ambas analistas ambientais do CEPTA e pelo biólogo e técnico de laboratório Davi Hinncands de Oliveira.

A avaliação da viabilidade do banco de ovos foi realizada em cinco etapas: a) contagem prévia da quantidade de ovos por ninho (Figura 3); b) determinação do estágio de desenvolvimento embrionário (Diapausa I, DII ou DIII) dos ovos encontrados (Figura 4) em acordo com as características descritas por Wourms (1972); c) molhagem dos ninhos para indução dos nascimentos (Figura 5); d) quantificação dos peixes nascidos (Figura 6); e) nova estocagem da turfa contendo os ovos não eclodidos.



Figura 3. Contagem da quantidade de ovos por ninho (à esquerda) e ovo localizado em meio à turfa (à direita mostrado na seta amarela). Fonte: arquivo pessoal, 2022.

Para a análise dos diferentes estágios de desenvolvimento, os ovos foram manualmente separados da turfa com auxílio de um pincel (Figura 3) e colocados em uma placa de Petri para serem avaliados individualmente através de uma lupa estereoscópica (Figura 4).

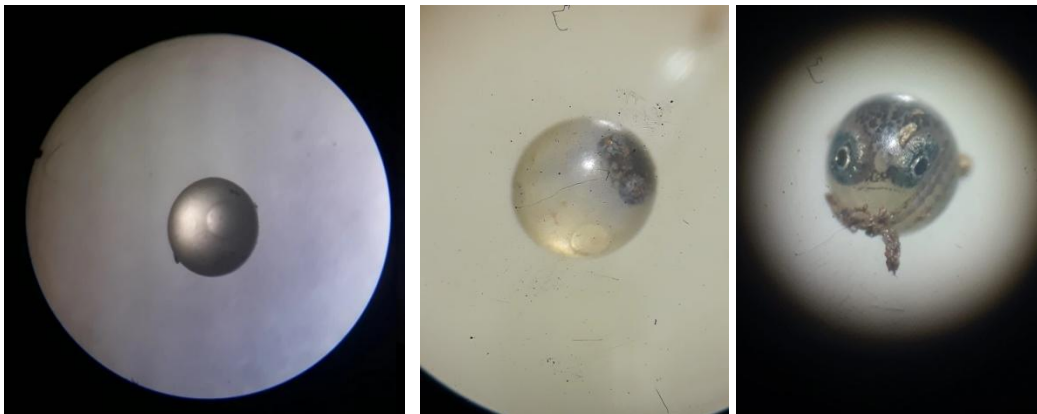


Figura 4. Estágios embrionários dos ovos de *Hypsolebias auratus* observados em lupa. Da esquerda para a direita são mostrados os estágios de diapausa DI, DII e DIII. Os ovos possuem menos do que 1 mm de tamanho. Fonte: arquivo pessoal, 2022.

A fase seguinte envolveu a preparação dos ninhos e dos aquários para a molhagem dos ovos. Não havendo 113 aquários à disposição para que cada ninho fosse molhado individualmente, seguimos os seguintes critérios de agrupamento de ninhos: i) por data de secagem (ninhos estocados na mesma data poderiam ser agrupados), ii) ninhos com mais de 10 ovos deveriam ser molhados em aquários individuais; iii) quando o ninho continha menos do que 10 ovos, eles poderiam ser agrupados. Por fim, um total de 37 aquários, de diferentes

tamanhos, foram utilizados. Os aquários maiores foram destinados aos ninhos com maior número de ovos contados.

Para determinar as taxas de eclosão, os ninhos de turfa foram colocados em aquários com água desclorada, que ficaram parcialmente inclinados (Figura 5), mantidos em temperatura controlada a 22 °C (\pm), por 72 horas e foram avaliados a cada 24 horas.



Figura 5. Distribuição dos ninhos nos aquários e potes (acima) do Laboratório de Ictiologia do ICMBio/CEPTA, em Pirassununga/SP e posterior molhagem (abaixo). Fonte: arquivo pessoal, 2022.

A cada 24 horas, após a avaliação de eclosão (Figura 6), as larvas recém-eclodidas foram transferidas para um aquário de 20 litros e, após 72 horas, a turfa foi seca e acondicionada novamente em sacos plásticos hermeticamente fechados, para garantir a viabilidade futura dos ovos não eclodidos, isto é, que provavelmente permaneceram em diapausas I e II.



Figura 6. Avaliação da eclosão dos ovos de *Hypsolebias auratus* em larvas no Laboratório de Ictiologia do ICMBio/CEPTA, em Pirassununga/SP. Fonte: arquivo pessoal, 2022.

Após a obtenção dos resultados experimentais, foi calculada a taxa de eclosão média dos ovos, correlacionando-se a quantidade de nascimentos com o número de ovos observados por ninho ao tempo de armazenamento. Além disso, foi calculada uma taxa de eclosão parcial, descartando-se os ninhos sem nascimentos.

4. Resultados

A contagem prévia da quantidade de ovos por ninho, correspondente à primeira etapa do experimento, indicou a presença de 236 ovos. Este valor é 35% menor do que a contagem anterior, de 2021, quando 345 ovos foram contabilizados e armazenados (ver item 3.1). A maior perda foi observada nos ovos provenientes do experimento de Oliveira *et al.* (em fase de elaboração), com uma redução de 91%, tendo sido contabilizados apenas 10 ovos, dos 119 armazenados; provavelmente, 109 ovos se degradaram durante o período de estocagem.

Dos 236 ovos (100%) contabilizados em 113 ninhos do banco de ovos submetido a este experimento, apenas 44 eclodiram, o que representa 18,6% de taxa de eclosão total. Dois peixes apresentaram dificuldades em encher a bexiga natatória (denominados rampantes), fato comum entre os peixes-anuais. O número de nascimentos foi maior nas primeiras 24 horas, com 35 nascimentos, que corresponderam a 79,5%; 6 nascimentos após 48h, correspondendo a 13,6% e apenas 3 nascimentos em 72h, ou 6,9%. A Figura 7 apresenta um histograma do número de ovos eclodidos nas 72 horas de duração do experimento.

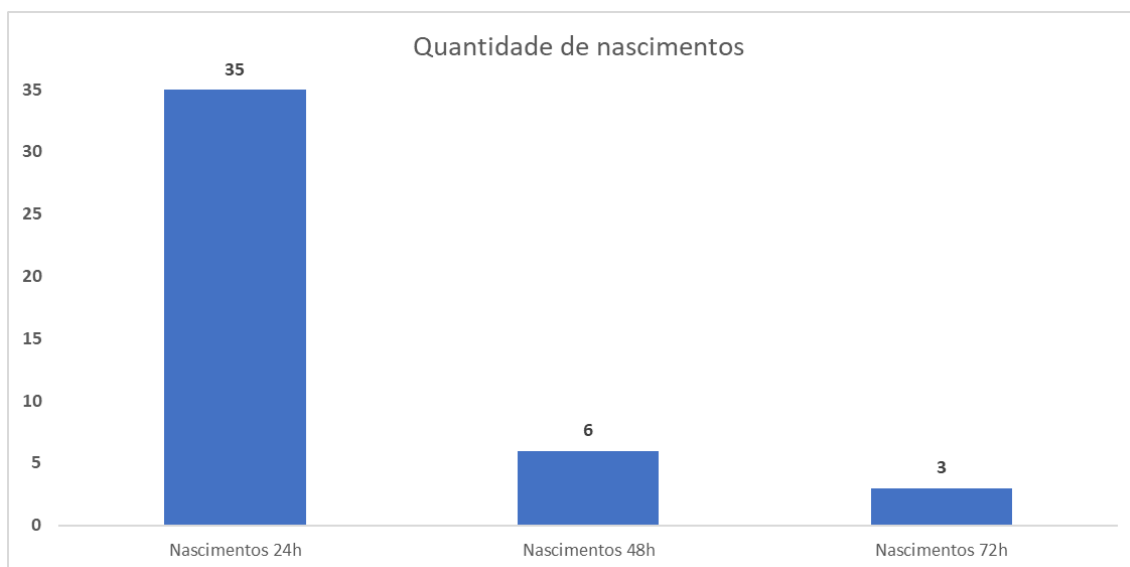


Figura 7. Número de nascimentos de *Hypsolebias auratus* a cada 24 horas durante as 72 horas de duração do experimento.

Em relação às fases de diapausa, dos 236 ovos, 199 (84,3%) foram classificados em DI, 3 (1,3%) em DII e 34 ovos (14,4%) em DIII. Os ovos em DIII são aqueles esperados que eclodam mais rapidamente. Como pudemos observar, apesar de apenas 34 ovos terem sido classificados em DIII, nas primeiras 24 horas do experimento eclodiram 35 ovos e 44 ovos eclodiram em 72 horas. Isto é uma evidência de que ovos que estavam “mais atrasados” nos estágios de diapausa (DI ou DII) cumpriram as demais fases de diapausa até a eclosão em um curto espaço de tempo (72 horas).

Uma taxa de eclosão parcial pode ser calculada ao descartar os ninhos sem ovos eclodidos. Dos 113 ninhos armazenados no banco de ovos antes da molhagem, em somente 36 (cerca de 32%) houve nascimentos em algum período do experimento. Nesses 36 ninhos, foram contados 135 ovos (Tabela 1). Portanto, 44 ovos efetivamente nasceram de um total de 135 ovos contabilizados, resultando em uma taxa de eclosão parcial superior à taxa de eclosão total: 32,6% contra 18,6% (em números arredondados).

Tabela 1. Estágios de diapausa e nascimentos em 24, 48 e 72 horas dos ovos de *Hypsolebias auratus* em ninhos armazenados no banco de ovos do ICMBio/CEPTA em diferentes períodos. Data de molhagem dos 113 ninhos submetidos ao presente experimento: 16/05/2022. Obs: a tabela apresenta somente os ninhos com nascimentos. Células mescladas indicam ninhos que foram agrupados num mesmo aquário. ID = número atribuído ao ninho no início do experimento.

ID	Data de secagem	Quantidade de ovos	DI	DII	DIII	Nascimentos 24h	Nascimentos 48h	Nascimentos 72h
22	03/05/2021	0	0	0	0	-	-	1
23	03/05/2021	0	0	0	0			
24	03/05/2021	0	0	0	0			
25	03/05/2021	0	0	0	0			
26	03/05/2021	0	0	0	0			
27	03/05/2021	0	0	0	0			
28	03/05/2021	0	0	0	0			
29	03/05/2021	0	0	0	0			
30	03/05/2021	0	0	0	0			
31	03/05/2021	1	1	0	0			
33	25/05/2021	0	0	0	0	-	-	1
34	25/05/2021	5	5	0	0			
35	25/05/2021	3	3	0	0			
36	25/05/2021	0	0	0	0			
37	25/05/2021	0	0	0	0			
38	25/05/2021	0	0	0	0			

41	17/06/2021	11	11	0	0	1	2	1
47	17/06/2021	0	0	0	0	1	-	-
48	17/06/2021	0	0	0	0			
49	17/06/2021	1	0	0	1			
50	17/06/2021	0	0	0	0			
55	12/07/2021	18	17	0	1			
57	13/08/2021	0	0	0	0	5	-	-
58	13/08/2021	0	0	0	0			
59	13/08/2021	0	0	0	0			
60	13/08/2021	2	2	0	0			
61	13/08/2021	4	2	0	2			
62	13/08/2021	7	7	0	0			
63	13/08/2021	2	2	0	0			
66	23/09/2021	16	13	0	3	4	-	-
67	23/09/2021	27	25	1	1	5	-	-
68	23/09/2021	13	11	0	2	2	-	-
69	23/09/2021	3	3	0	0	1	-	-
73	21/10/2021	5	5	0	0	4	1	-
74	21/10/2021	13	10	0	3	5	-	-
75	03/12/2021	3	3	0	0	5	3	-

s/n	22/06/2021	1	0	0	1	1	-	-
		135	120	1	14	35	6	3

Ao se comparar esse novo cenário de dados (apenas ninhos com nascimentos) novamente com os três estágios de diapausa, dos 135 ovos em ninhos com nascimentos, 120 (88,9%) foram classificados em DI, 1 (0,7%) em DII e 14 (10,4%) em DIII. A alta porcentagem de ovos em DI se manteve nas novas porcentagens calculadas, como era de se esperar.

Sobre o tempo de armazenamento dos ninhos, nenhuma inferência conclusiva pode ser estabelecida até o momento. No experimento, foram molhados ninhos armazenados de janeiro/2021 (mais antigos) a dezembro/2021 (mais novos). Portanto, os ninhos mais antigos estavam guardados há 16 meses e os mais novos há apenas 5 meses. Os nascimentos, por sua vez, ocorreram em ninhos armazenados de maio/2021 (12-13 meses de estocagem) a dezembro/2021 (5 meses de estocagem). Pelos resultados obtidos, não houve nascimentos em ninhos com mais de 13 meses de estocagem e a maior parte dos nascimentos se concentrou em ninhos armazenados a partir de junho/2021, ou seja, dentro de um intervalo de tempo inferior a 12 meses de estocagem.

5. Discussão e Conclusões

O rivulídeo *Hypsolebias auratus*, a exemplo da maior parte das espécies de peixes- anuais da família, possui distribuição extremamente restrita, tendo sido registrada até o momento somente nos arredores de sua localidade-tipo, inserida no bioma Cerrado (COSTA, 2002; ICMBio, 2018).

As características atribuídas a esses ambientes aquáticos, principalmente em regiões subtropicais, onde a variação sazonal é mais evidente, contribuem para a alta diversidade de espécies, em especial a de peixes (HORNE & GOLDMAN, 1994, *apud* FONSECA *et al.*, 2015). Entretanto, alterações climáticas e ambientais refletem diretamente no habitat da espécie em questão e em sua população, trazendo consigo consequências desastrosas, que podem levar à sua extinção.

A taxa de eclosão - número de ovos que nasceram - do banco de ovos de *H. auratus* armazenados em ninhos artificiais disponíveis no Laboratório de Ictiologia do ICMBio/CEPTA

foi de 18,6%. Outros trabalhos que analisaram a taxa de eclosão em rivulídeos, em diferentes condições experimentais, obtiveram taxas entre 15,4 e 93,4%, denotando a enorme variabilidade dos dados (SHIBATTA., 2005; FONSECA., 2011; FONSECA *et al.*, 2015). Em um estudo com *Simpsonichthys boitonei*, Shibatta (2005) acompanhou o desenvolvimento embrionário de 84 embriões mantidos incubados no laboratório por meio de outra metodologia, sob pequenos frascos de 80 ml de capacidade, contendo água do aquário de origem e um bactericida-fungicida a base de sulfanilamida, azul de metileno e formaldeído, entre 55 e 100 dias. Nesse período, o autor observou o desenvolvimento completo e a eclosão de 12 ovos (15,4%), enquanto 46% iniciaram o desenvolvimento e 38,6% permaneceram estacionados e não se desenvolveram.

Ao contrário do resultado de Shibatta (2015) e do que observamos em nosso trabalho, outros autores observaram altas taxas de eclosão com outras espécies de rivulídeos em laboratório; no entanto, nesses experimentos, apenas embriões em diapausa III foram submetidos à eclosão. Fonseca *et al.* (2015) avaliaram 300 embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* e obtiveram uma taxa de eclosão de 41% dos ovos. Já Fonseca (2011) obteve a maior taxa de eclosão de ovos em seu estudo com *Austrolebias wolterstorffi*, em que verificou a taxa de eclosão de 93,4% entre os 275 ovos que foram avaliados.

Alguns fatores podem ter contribuído para a baixa taxa de eclosão observada no presente trabalho: a) a heterogeneidade do banco de ovos (ovos com períodos de estocagem variando entre 5 e 16 meses), com maior quantidade de ovos em DI (84,3%); b) a temperatura do ar: embora tenhamos feito a tentativa inicial de controlar a temperatura em torno de 25°C durante todo o experimento com a utilização de aquecedores elétricos, ela variou entre 18°C e 22°C, aferidas 3x ao dia, às 08:30, 13:00 e 17:00, o que pode ser considerada abaixo do ótimo para a espécie; c) o substrato utilizado: o composto de fibra de coco, usado com o intuito de reproduzir as características do meio natural e manter certa umidade, pode ter interferido na estagnação dos estágios de diapausas e conseqüentemente na eclosão dos ovos. A exposição dos ovos à hipóxia, causada pela compactação do substrato e decomposição da matéria orgânica é um fator importante para a manutenção de ovos de algumas espécies de peixes-anuais em diapausa I (WOURMS, 1972; FONSECA, 2015).

A observação da eclosão de um número maior de larvas do que ovos contabilizados e classificados em DIII (34 ovos em DIII e 44 nascimentos em 72 horas), é uma evidência de que ovos que estavam “mais atrasados” nos estágios de diapausa (principalmente em DI) cumpriram as demais fases de diapausa até a eclosão em um curto espaço de tempo (considerado aqui um

intervalo de 72 horas). Ou seja, são peixes que exibem um rápido desenvolvimento ontogenético e estão completamente adaptados a períodos de latência, podendo inclusive pular algumas fases da diapausa (PODRABSKY *et al.*, 2015).

Outro aspecto a se discutir em relação à classificação dos estágios da diapausa é a dificuldade de se determinar principalmente a fase DII sob a lupa. Em apenas três ovos, um deles mostrado na Figura 4 (imagem do centro), não houve dúvidas de se tratar do estágio DII. Ovos em DIII, ao contrário, são facilmente distinguíveis, restando poucas dúvidas dessa fase de diapausa, pois já é possível observar inclusive movimentos corporais do peixinho, além dos olhos, que são bem evidentes (ver imagem à direita na Figura 4). Portanto, é possível que tenha havido alguma mistura entre as fases DI e DII, que precisam ser mais bem investigadas em trabalhos futuros com o auxílio de microscópios ao invés de lupas.

Os resultados obtidos indicam que não houve nascimentos em ninhos com mais de 13 meses de estocagem; ainda assim, não podemos concluir que ovos com mais de 13 meses armazenados sejam inviáveis. No entanto, é possível sugerir que, no manejo do banco de ovos, ao menos dessa espécie, pode haver maiores chances de nascimentos em ninhos mais jovens. Novas investigações serão necessárias e feitas no futuro, incluindo novas molhagens desses mesmos ninhos.

Com relação ao banco de ovos, a perda de 109 ovos entre a contagens de 2021 (n = 345) e 2022 (n = 236) pode ser explicada pelo (a) tempo de armazenamento, que variou de 5 a 16 meses, ou (b) pela molhagem frequente dos mesmos. Isto porque a maior perda (91%) foi observada nos ninhos que haviam sido molhados duas vezes, em maio e em junho de 2021 (OLIVEIRA *et al.*, em fase de elaboração), enquanto os demais ninhos foram molhados pela primeira vez durante este experimento. Ovos armazenados por muito tempo podem desidratar, enquanto aqueles que estão expostos à umidade mais constante podem ser contaminados por fungos. Nas duas situações, os ovos podem se degradar e se tornam imperceptíveis à contagem (PAPA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019). Ambas as situações podem ter acontecido com os ovos de *H. auratus* armazenados no banco do CEPTA.

De modo geral, observa-se uma baixa sobrevivência das larvas e juvenis no laboratório. O número de peixes adultos, aptos à reprodução, pode ser considerado pequeno para a manutenção da espécie em condição *ex situ* a longo prazo. O fato de que o banco de ovos de *H. auratus* é proveniente de apenas 6 peixes pode também exercer influência nas taxas de eclosão, pois a endogamia ao longo de várias gerações pode reduzir a viabilidade da prole, diminuir a fecundidade e a produção de ovos (ALA-HONKOLA, 2009; PAPA *et al.*, 2015).

Considerando a dificuldade encontrada até o momento em manter um número razoável de peixes no laboratório, é necessário dar continuidade aos estudos de reprodução, aumentar a frequência de verificação do banco de ovos e eventualmente, adicionar novos reprodutores ao plantel, provenientes de ambiente natural ou de outras instituições de pesquisa. Ainda assim, as informações obtidas neste trabalho são valiosas e úteis para melhorar o manejo conservacionista do banco de ovos de rivulídeos do CEPTA, contribuindo não apenas para a manutenção em cativeiro de *H. auratus*, mas também de outras espécies igualmente ameaçadas de extinção.

6. Recomendações para o manejo

Hypsolebias auratus consta na lista de espécies ameaçadas de extinção na categoria de mais alto risco de extinção. Essas espécies, listadas como “Criticamente em Perigo” (CR) pela classificação da IUCN, deveriam ser as primeiras a receber ações de conservação e com a máxima urgência. Por isso, ações de conservação *in situ* e *ex situ* devem ser combinadas para garantir maiores chances de sucesso na preservação e perpetuação dessas espécies.

Nesse sentido, é importante a continuidade dos estudos técnicos e científicos que vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Ictiologia do CEPTA, em especial aqueles com foco no desenvolvimento de protocolos de manejo do banco de ovos. Os resultados aqui obtidos, por exemplo, sinalizam que é necessário avaliar o banco de ovos com maior frequência, desta e das demais espécies acondicionadas no CEPTA, para que ele possa se tornar uma ferramenta de conservação *ex situ* de fato. Melhorar o manejo do banco de ovos significa assegurar a possibilidade de obtenção de rivulídeos em cativeiro para fins conservacionistas.

7. Agradecimentos

Agradeço à orientadora Dra. Carla Natacha Marcolino Polaz (Analista Ambiental do ICMBio/CEPTA); à coorientadora Ms. Izabel Correa Boock de Garcia (Analista Ambiental, ICMBio/CEPTA); e ao biólogo e técnico de laboratório Davi Hinncands de Oliveira, pela competência, disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e paciência. A todos os funcionários do ICMBio/CEPTA, em Pirassununga, pelo acolhimento. Ao CNPq, ICMBio/CEPTA pelo incentivo e suporte à pesquisa.

8. Referências bibliográficas

ALA-HONKOLA, O. *et al.* Strong inbreeding depression in male mating behaviour in a poeciliid fish. **J. Evol. Biol.**, v. 22, p. 1396–1406, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n° 445 de 17 de dezembro de 2014. Reconhece como espécies de peixes e invertebrados aquáticos da fauna brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da "Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos". **Diário Oficial da União**, n. 245, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2014. Seção 1, p. 126-130, 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n° 148 de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria n° 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria n° 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria n° 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, n. 108, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de junho de 2022. Seção 1, p. 74, 2022.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. & GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 2007.

Costa, W. J. E. M. 2002. **Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação**. Curitiba: Editora UFPR. 17p.

COSTA, W. J. E. M. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). **Journal of Comparative Biology**, v. 3(1), p. 33-92, 1998.

_____. Historical biogeography of Cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-
vicariance analysis. **Journal of Biogeography**. 37 (10), p. 1995-2004, 2010.

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

FRICKE R, Eschmeyer W. N., Fong J. D. 2022. **Eschmeyer's Catalog of Fishes: Species by Family/Subfamily.** Disponível em:

<<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>.

Acesso em: 17/08/2022.

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

FONSECA, A. P. **Reprodução e desenvolvimento do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Chefe, 2001 em laboratório.** 2015. 74 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio.** 4162 p, 2018.

ICMBio. **Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção.** Brasília: ICMBio, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-rivulideos/1-ciclo/pan-rivulideos-sumario.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2021.

ICMBio. **Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE.** Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/salve/>. Acesso em: 26 de Aug. de 2022, 2022a.

ICMBio. Portaria ICMBio n. 553/2022, de 11 de julho de 2022. Aprova o 2º ciclo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção - PAN Rivulídeos, contemplando 130 táxons nacionalmente ameaçados de extinção, estabelecendo seu objetivo geral, objetivos específicos, prazo de execução, formas de implementação, supervisão e revisão. **Diário Oficial da União**, n. 129, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de julho de 2022. Seção 1, p. 63, 2022b.

LANÉS, L. E. K. **Dinâmica e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe.** 2011. 69 p. Dissertação (Mestrado em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2011.

LIU, R. K. & WALFORD, R. L. Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish, *Cynolebias adloffi*. **Nature** 212 (5067): 1277–1278, 1966.

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

LOUREIRO M, DE SÁ R.O. Osteological analysis of the killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **J. Morphol.** 238:109–262, 1998.

OLIVEIRA, D. H., *et al.* Ecologia reprodutiva do peixe-anual *Hypsolebias auratus* (Costa & Nielsen, 2000) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Em fase de elaboração.

PAPA, N. G. *et al.* **Husbandry, Reproduction, and Embryo Culture of Annual Fishes under Laboratory Conditions.** In: BEROIS, N. *et al*, Eds.. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Nova Iorque: CRC Press Taylor & Francis group. pp. 99-107. 2015.

PODRABSKY, J. E. *et al.* **Alternative Developmental Pathways.** In: BEROIS, N. *et al*, Eds.. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Nova Iorque: CRC Press Taylor & Francis group. pp. 63-73. 2015.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. & FERRARIS JR, C. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

SHIBATTA, O. A. 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**, v. 22, n. 4, 1146-1151, 2005.

SILVA, G.G. *et al.* Killifish eggs can disperse via gut passage through waterfowl. **Ecology** 100(11):e02774. 2019.

VAZ-FERREIRA, R.; SIERRA DE SORIANO, B.; SEÑORANS J. S. Integración de la fauna de vertebrados en algunas masas de agua dulcetemporales del Uruguay. **Compendios de Trabajo del Departamento de Zoología Vertebrados de la Facultad de Humanidades y Ciencias**, 25: 1-16, 1966.

VOLCAN, M. V. Palestras da Universidade Federal de Pelotas/RS: **Peixes-Anuais - Políticas Públicas, Pesquisa e Educação Brasil afora. Aspectos regionais: pesquisa e conservação de espécies de peixes rivulídeos no Rio Grande do Sul.** Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=95sAZ61-ivM>. Acesso em: 06 de maio de 2021.

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