

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Zootecnia

Gustavo Soares da Costa Júlio

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E EFEITO DO SUBSTRATO NA
REPRODUÇÃO DE *Hypsolebias flagellatus*

Belo Horizonte
2020

**COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E EFEITO DO SUBSTRATO NA
REPRODUÇÃO DE *Hypsolebias flagellatus***

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

Coorientador:

Dr. Lucas Pedro Gonçalves Junior

Júlio, Gustavo Soares da Costa. 1992–

J94r Comportamento reprodutivo e efeito do substrato na reprodução de *Hypsolebias flagellatus*/
Gustavo Soares da Costa Júlio- 2020.

44f:il

Orientador: Ronald Luz Kennedy

Coorientador: Lucas Pedro Gonçalves Júnior

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de
Minas Gerais

Área de Concentração: Produção Animal.

Bibliografia f. 43 e 45.

1. Peixe ornamental – Criação - Teses - 2. Reprodução - Teses – 3. Produção animal - Teses -
I. Kennedy, Ronald Luz – II. Júnior, Lucas Pedro Gonçalves - III. Universidade Federal de Minas
Gerais, Escola de Veterinária UFMG – IV. Título.

CDD – 636.08

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE
APROVAÇÃO

Comportamento reprodutivo e efeito do substrato na reprodução de *Hypsolebias flagellatus*

GUSTAVO SOARES DA COSTA JÚLIO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dezessete de fevereiro de 2020, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Angélica da Silva Vasconcellos

PUC Minas

Glauber David Almeida Palheta

Universidade Federal Rural do Amazonas

Gisele Cristina Fávero

Universidade Federal de Minas Gerais

Ronald Kennedy Luz - Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por Angela Maria Quintão Lana, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 02/02/2023, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art.5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2059130 e o código CRC E890A29B.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado me abençoando, me iluminando, me dando saúde e forças para continuar e nunca desistir dos meus sonhos.

A minha mãe Anna Lúcia, ao meu pai Clever e a minha avó Nadyr, por estarem sempre ao meu lado, me dando amor, carinho e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz, pelos ensinamentos, paciência, conversas, conselhos e todas as oportunidades que me deu. Um exemplo de docente e pesquisador no qual irei me espelhar sempre. Muito obrigado!

Ao meu coorientador Dr. Lucas Pedro Gonçalves Junior, pela disponibilidade e grande colaboração neste trabalho.

Ao meu amigo e colega de laboratório Fábio Aremil, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus colegas do laboratório de larvicultura, que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – através de uma bolsa de estudo.

Ao Zoológico de Belo Horizonte, pela doação dos animais.

“A persistência é o caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar dois tipos de substrato na produção de ovos de *Hypsolebias flagellatus*, confeccionar um etograma, observar e descrever as ações do macho em relação a fêmea em todo o processo de reprodução. Foram utilizados 10 casais. No experimento I, foram testados dois tipos de substratos, a saber na fase 1: S1 – pó de casca de coco e S2 – lã 100% acrílica na cor marrom. Cada tratamento teve cinco repetições. A reprodução foi acompanhada durante 45 dias. Na fase 2 do experimento I, foram substituídos os ninhos de lã por ninhos com pó de casca de coco e acompanhados por mais 45 dias. Para o experimento II foi instalada uma câmera em cada aquário. Cinco casais de *H. flagellatus* foram utilizados. Em cada aquário foi colocado um ninho com substrato de pó de casca de coco. Após o período de adaptação, deu-se início a fase 1 do experimento II, onde os casais foram observados por quatro dias. No quinto dia deu-se início a fase 2, com a retirada dos ninhos. Os casais foram observados por mais 48 horas. Após este período os ninhos foram recolocados e os casais foram observados por mais quatro dias (fase 3). No experimento I, o uso do substrato de pó de casca de coco apresentou maior produção de ovos na fase 1 ($P < 0,05$). Contudo, na fase 2, quando foi substituído a lã acrílica pelo pó de casca de coco a produção de ovos foi semelhante entre os tratamentos ($P > 0,05$). Quando comparado a produção de ovos ao longo do tempo, verifica-se que para o pó de casca de coco a produção de ovos apresentou variações nas duas fases. Para o substrato 2 na fase 1 e 2, a produção de ovos foi semelhante em todas as coletas. No experimento II foi realizada a confecção do etograma. Não houve diferença significativa na duração de nenhum dos comportamentos analisados nas fases 1 e 3 ($P > 0,05$). Com relação a preferência de machos e fêmeas por um local específico dentro do aquário, foi observada diferença significativa em ambos os sexos que passaram a maior parte do tempo próximo ao ninho ($p < 0,05$). Em ambas as fases 1 e 3, as fêmeas passaram maior tempo fora do ninho, enquanto os machos, na fase 1 passaram maior tempo dentro do ninho e na fase 3 não houve diferença ($P > 0,05$). A frequência de entrada e saída do ninho dos machos foi maior em relação as fêmeas nas duas fases ($P < 0,05$). O substrato de pó de coco apresentou melhor resultado para a reprodução e machos de *H. flagellatus* não demonstram agressividade nos comportamentos reprodutivos.

Palavras chaves: comportamento reprodutivo, killifish anual, etograma, reprodução.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate two types of substrate in the production of *Hypsolebias flagellatus* eggs, to make an ethogram, to observe and describe the actions of the male in relation to the female in the entire reproduction process. Ten couples were used. In experiment I, two types of substrates were tested, namely in phase 1: S1 - coconut shell powder and S2 - 100% acrylic wool in brown color. Each treatment had five repetitions. Reproduction was monitored for 45 days. In phase 2 of experiment I, wool nests were replaced by nests with coconut shell powder and followed for another 45 days. For experiment II, a camera was installed in each aquarium. Five couples of *H. flagellatus* were used. A nest with coconut shell powder substrate was placed in each aquarium. After the adaptation period, phase 1 of experiment II began, where the couples were observed for four days. On the fifth day, phase 2 began, with the removal of the nests. The couples were observed for another 48 hours. After this period, the nests were replaced and the couples were observed for another four days (phase 3). In experiment I, the use of coconut shell powder substrate showed higher egg production in phase 1 ($P < 0.05$). However, in phase 2, when acrylic wool was replaced by coconut shell powder, egg production was similar between treatments ($P > 0.05$). When comparing egg production over time, it appears that for coconut shell powder, egg production varied in both phases. For substrate 2 in phase 1 and 2, egg production was similar in all collections. In experiment II, the ethogram was made. There was no significant difference in the duration of any of the behaviors analyzed in phases 1 and 3 ($P > 0.05$). Regarding the preference of males and females for a specific location within the aquarium, a significant difference was observed in both sexes who spent most of their time close to the nest ($p < 0.05$). In both phases 1 and 3, females spent more time outside the nest, while males in phase 1 spent more time inside the nest and in phase 3 there was no difference ($P > 0.05$). The frequency of entry and exit of the nest of the males was higher in relation to the females in the two phases ($P < 0.05$). The coconut powder substrate showed the best result for reproduction and males of *H. flagellatus* do not show aggressiveness in reproductive behaviors

Keywords: reproductive behavior, annual killifish, ethogram, reproduction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A. Macho de *Hypsolebias flagellatus*. 1B. Fêmea de *Hypsolebias flagellatus*. 26
- Figura 2. Substratos utilizados na reprodução de *Hypsolebias flagellatus* na fase 1 do experimento (S1 – pó de casca de coco e S2 – lã 100% acrílico na cor marrom)..... 27
- Figura 3. Linha vermelha inserida no programa de filmagem Solomon Coder para analisar a proximidade dos animais em relação ao ninho..... 29
- Figura 4. Média (\pm desvio padrão) do tempo de permanência das fêmeas (a) e machos (b) de *Hypsolebias flagellatus* nos dois quadrantes (Q1 = próximo ao ninho; Q2 = distante do ninho)..... 37
- Figura 5. Tempo médio de permanência (\pm desvio padrão) (min.) de fêmeas (a) e machos (b) de *Hypsolebias flagellatus* dentro e fora do ninho 37
- Figura 6. Média (\pm desvio padrão) das frequências de entrada no ninho na fase 1 e fase 3 de machos e fêmeas de *Hypsolebias flagellatus* no período da manhã e tarde. 38
- Figura 7. Médias (\pm desvio padrão) das frequências de entrada no ninho de machos e fêmeas de *Hypsolebias flagellatus* nas duas fases. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Método de observação utilizado	28
Tabela 2. Produção média de ovos (\pm desvio padrão) de <i>Hypsolebias flagellatus</i> nos diferentes substratos (Fase 1) e após a troca de substrato (Fase 2), onde o substrato de lã acrílica foi substituído por pó de coco no tratamento substrato 2.	31
Tabela 3. Reprodutores de <i>Hypsolebias flagellatus</i> que morreram durante o período de 90 dias de reprodução.	32
Tabela 4. Etograma confeccionado para a espécie <i>Hypsolebias flagellatus</i>	34
Tabela 5. Análise de duração dos comportamentos das fêmeas de <i>Hypsolebias flagellatus</i> (Média \pm desvio padrão em segundos) no experimento II.	36
Tabela 6. Análise de duração dos comportamentos dos machos de <i>Hypsolebias flagellatus</i> (Média \pm desvio padrão em segundos) no experimento II.	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Killifishes	13
2.2. Importância do substrato na reprodução de peixes.....	16
2.3. Importância do conhecimento do comportamento reprodutivo de peixes.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
5. ARTIGO: COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E EFEITO DO SUBSTRATO NA REPRODUÇÃO DE <i>Hypsolebias flagellatus</i>	23
6. INTRODUÇÃO	25
7. MATERIAIS E MÉTODOS	26
7.1 Experimento I.....	26
7.2 Experimento II.....	28
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
9. RESULTADOS	30
9.1 Experimento I.....	30
9.2 Experimento II.....	33
10. DISCUSSÃO.....	39
11. CONCLUSÕES	42
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
13. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46

Comportamento reprodutivo e efeito do substrato na reprodução de *Hypsolebias flagellatus*

1. INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos o mercado de animais pet vem crescendo de forma satisfatória em todo mundo. Dentro deste mercado que movimentava bilhões de dólares anualmente, está inserida a comercialização de peixes ornamentais que vem ganhando destaque nas últimas décadas. Atualmente os países asiáticos são os maiores exportadores de peixes ornamentais do mundo. Singapura lidera esse ranking e fatura aproximadamente U\$ 45 milhões com exportação de peixes ornamentais. O Brasil, apesar de possuir 725 espécies liberadas para comercialização, ocupa apenas o 13º lugar no ranking, exportando cerca de U\$ 6,5 milhões por ano.

Mesmo ocupando uma colocação não compatível com a diversidade e potencial de produção do país, o mercado ornamental no Brasil vem crescendo, ganhando maior visibilidade e caindo no gosto popular se tratando de animais pet. Dentre a enorme variedade de espécies nativas brasileiras, estão presentes os rivulídeos, conhecidos popularmente como killifish. Segundo dados do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO), mais 320 espécies de killifishes já foram catalogadas, possuindo ampla variedade de cores e formatos. Os killifishes estão entre as espécies mais comercializadas dentro mercado de peixes ornamentais, não só como animais pet, mas também para fins de pesquisa acadêmicas relacionadas a reprodução e comportamento reprodutivo.

A reprodução de peixes em geral costuma ser um gargalo para a produção comercial, apesar de que em algumas espécies já há informações. No caso dos killifishes, os estudos sobre a reprodução e o comportamento reprodutivo são escassos. Assim, é necessário que haja mais estudos, pois existem muitos gêneros desta espécie e alguns destes estão em extinção e precisam ser reproduzidos em laboratório para que seja feito um programa de repovoamento desses animais na natureza e/ou manutenção de material genético in vivo.

Outro fator importante é a característica dos ovos desta espécie. A diapausa é um processo complexo que precisa ser estudado e descrito totalmente para que os estudos da reprodução sejam eficientes. Um ponto positivo da diapausa é que os ovos podem ser

armazenados por longos períodos em laboratório e quando necessário serem estimulados e eclodidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Killifishes*

Os killifishes são peixes teleósteos que habitam ambientes com intensa variação climática, vivem em lagoas temporárias que secam em determinado período do ano e por isso são caracterizados como animais de ciclo de vida curto, variando entre 10 e 12 meses (Passos et al., 2013). Como consequência, killifishes desenvolveram estratégias reprodutivas diferentes de muitas espécies de peixes.

Esses rivulídeos podem ser classificados de acordo com seu ciclo de vida em anuais e não anuais. Os peixes não anuais apresentam ciclo de vida mais longo, geralmente superior a 1 ano, enquanto os anuais apresentam ciclo de vida curto, pois vivem em ambientes bastante característicos, como lagos, lagoas e outros ambientes aquáticos sazonais (Costa, 2002). Por possuírem um ciclo de vida curto (aproximadamente 10 meses), esses animais atingem a maturidade sexual precocemente (Berois et al., 2012). Os peixes apresentam dimorfismo sexual onde, o macho alcança porte maior, suas nadadeiras e seu corpo possuem coloração mais evidente, diferente da fêmea que apresenta um porte menor e coloração acinzentada (Costa, 2002), sendo por isso os machos de interesse comercial.

Os killifishes se reproduzem rapidamente, sendo as desovas feitas no substrato localizado no fundo dos lagos ou alagados temporários (Berois et al., 2012). Segundo os mesmos autores, estes peixes possuem um impressionante e particular mecanismo para a sobrevivência de sua prole, onde os ovos entram em estado de diapausa, característica fundamental para a sobrevivência da espécie, uma vez que com a chegada do verão, esses ambientes secam gradualmente e toda a população adulta morre.

Existem poucos estudos sobre o comportamento reprodutivo em killifishes. García; Loureiro; Tassino (2008) afirmaram que nesta espécie, os machos se exibem para as fêmeas e a partir daí se inicia o processo de cortejo, sendo que o dimorfismo sexual da espécie facilita a observação, já que os machos são mais coloridos que as fêmeas. Anderson; Podrabsky (2014) sugerem que existem outros fatores sensoriais que

estão diretamente ligados no comportamento reprodutivo de killifish, visto que na maioria dos lagos que a espécie habita, possuem água turva. Portanto, segundo esses autores seriam necessárias outras características sensoriais, que não só a visão dos animais.

Gonçalves; Souza; Volcan (2011) demonstraram que a proporção macho:fêmea também é importante no processo reprodutivo. No estudo com o killifish *Cynopoecilus melanotaenia* foi relatado que em seu habitat natural a proporção era de dois machos para uma fêmea, o que pode representar um declínio na taxa reprodutiva, já que os machos são territorialistas e podem brigar entre si e não conseguem se acasalar com a fêmea. Porém, Belote; Costa (2003) descreveram o comportamento reprodutivo em *Cynolebias albipunctatus* e observaram que diferente do estudo anterior, a proporção macho:fêmea é inversa, ou seja, duas fêmeas estão presentes para se acasalar com um macho. Porém, uma delas se torna a dominante e a outra é excluída de todo o processo de corte e acasalamento e ainda sofre agressões da fêmea dominante com mordidas e perseguições.

Após ocorrer a fecundação, os ovos são depositados no substrato e ficam ali até que todo o processo de desenvolvimento seja realizado (Belote; Costa, 2003).

Para a utilização ideal e correta do substrato é necessário identificar características reprodutivas e dos ovos da espécie escolhida. Neste caso os killifishes possuem uma característica bastante peculiar com relação aos seus ovos (Costa, 2002). Em killifishes anuais, segundo o mesmo autor, os ovos entram em estado de diapausa e essa característica permite aos embriões entrar em parada metabólica e de desenvolvimento que pode ser reversível a qualquer momento quando estimulados pela presença de água. A diapausa pode ser subdividida em três estádios (I, II, III). A diapausa I, na maioria dos casos é descrita como facultativa, ou seja, não ocorre sempre, e quando acontece é no início do desenvolvimento, antes do eixo embrionário se estabelecer. Na diapausa II, o processo ocorre pouco antes da organogênese. Nesse estágio o embrião possui 38 pares de somitos, início do desenvolvimento do sistema nervoso central e um coração funcional tubular, onde é a fase considerada mais crítica do desenvolvimento do embrião, sendo necessário resistir a fatores que causam estresse como anóxia e desidratação. Já, o terceiro e último estágio da diapausa, o estágio III, representa o desenvolvimento total do embrião, esperando apenas o momento ideal para eclodir, já que o habitat natural desta espécie passa por variações constantes e é possível

que em apenas um lote de ovos se observe embriões em vários estádio de diapausa diferentes (Wourms, 1972a, 1972b, 1972c).

Em um estudo realizado por Podrabsky; Garrett; Kohl (2010), foi registrado que o killifish anual *Austrofundulus limnaeus* possui a característica da diapausa, porém os ovos passam apenas pelos estádios II e III, e em seguida, se desenvolvem normalmente. Para esta mesma espécie Anderson; Podrabsky (2014), testaram diferentes concentrações de oxigênio e temperatura no desenvolvimento do embrião e concluíram que diferentemente da maioria dos organismos aquáticos, embriões de *Austrofundulus limnaeus* conseguem se desenvolver em ambientes onde a água possui ampla variação térmica podendo chegar a 30°C e, por consequência, com baixa concentração de oxigênio dissolvido. Porém, esse desenvolvimento embrionário é mais lento quando comparado aos embriões que se desenvolvem em condições ideais para a espécie.

Estudo feito por Volcan et al. (2013) mostraram que a temperatura tem efeito direto na diferenciação fenotípica, reprodução e no desenvolvimento dos ovos do killifish anual *Austrolebias nigrofasciatus*. O estudo avaliou o desenvolvimento e crescimento de juvenis em duas temperaturas distintas (16° e 22° C). Os autores concluíram que o ideal para esta espécie seria manter a temperatura de 22° C, o que garante maior crescimento e maior rapidez na maturação sexual. Porém, outro estudo realizado pelos mesmos autores teve o objetivo de testar três diferentes temperaturas (17, 21 e 25°C). Estas influenciaram na fecundidade desta espécie, sendo que a fecundidade semanal foi mais homogênea nos tratamentos de 17 e 21°C, indicando que essa faixa de temperatura seria a ideal no processo reprodutivo desta espécie.

Além da disputa entre fêmeas ou machos, dependendo da espécie e da circunstância do ambiente, outro fator primordial para o sucesso reprodutivo e eclosão dos ovos são questões de predação. Pinceel et al. (2015) estudaram o processo de eclosão dos ovos de killifish do gênero *Nothobranchius* na presença de possíveis predadores. Os autores concluíram que houve eclosão dos ovos de um mesmo lote em diversos períodos diferentes, inclusive no desenvolvimento da diapausa, mostrando que os ovos, mesmo em estágio de dormência, podem voltar a se desenvolver caso haja algum estímulo do ambiente ou possíveis predadores no local.

Desta forma, verificamos que existem muitas peculiaridades entre as diferentes espécies de killifishes.

2.2. Importância do substrato na reprodução de peixes

A característica reprodutiva dos peixes influencia diretamente na forma de como os animais devem ser manipulados em cativeiro, tendo como o principal fator de importância o substrato (Wendelaar-Bonga, 1997). Nem todas as espécies necessitam de substrato para se reproduzirem, no entanto para aquelas que necessitam, fica inviável realizar a reprodução sem a presença de algum tipo de substrato (Gonçalves de Freitas; Nishida, 1998).

Além da característica reprodutiva, o substrato também influencia de forma direta na alimentação, no comportamento e até mesmo na disputa dos animais pelo território. Webster; Hart (2004) apresentaram um estudo mostrando a preferência da espécie *Gasterosteus aculeatus* por ambientes onde exista a presença de substrato abundante, onde os animais possam se alimentar de micro crustáceos e outras fontes de alimento que ali habitam.

Em espécies de água doce não migradoras, a importância do substrato é ainda maior, já que são animais que possuem cuidado parental com sua prole fazem do substrato não só um ninho para depositar seus ovos, mas também uma barreira física de proteção contra possíveis predadores (Godinho e Godinho, 2003).

É comum observar a agressividade de machos em períodos reprodutivos, onde estabelecem território, buscando as fêmeas para acasalar e ao mesmo tempo defendendo seu ninho de outros machos. Dessa forma, a presença de substrato pode selecionar os machos que conseguem se sobressair em relação aos outros, cuidando de forma integral do substrato, tendo como exemplo os ciclídeos (Galhardo; Almeida; Oliveira, 2009; Medeiros et al., 2005). Estudo realizado com casais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstram a importância da presença do substrato para a reprodução da espécie (Mendonça, 2010). Segundo o autor, em tanques onde havia areia no fundo, os animais apresentaram aumento da produção de 11-ketotestosterona (hormônio reprodutivo em peixe), evidenciando que a presença do substrato para a formação do ninho, estimulou a reprodução, diferentemente dos animais que estavam em tanques sem a presença de substrato.

De maneira geral, os killifishes anuais possuem comportamento reprodutivo semelhante aos ciclídeos, necessitando do substrato para esconder seus ovos, característica essa que é compreendida pelo fato de ser uma espécie cujo habitat natural

onde vivem se modifica de forma rápida, as poças de água secam e dessa forma é necessário que os ovos fiquem protegidos e, posteriormente, iniciem o processo de diapausa e desenvolvimento larval na estação chuvosa subsequente (Belote; Costa, 2003; Costa, 2002).

2.3. Importância do conhecimento do comportamento reprodutivo de peixes

Devido ao grande número de espécies de peixes catalogadas até hoje, estudos sobre o comportamento reprodutivo são escassos e em sua maioria concentrados em grupos onde existe um maior interesse zootécnico, os ciclídeos por exemplo (Teresa; Gonçalves de Freitas, 2011).

Outros grupos de peixes também já possuem estudos sobre o comportamento reprodutivo, e que mesmo sendo grupos distintos, possuem comportamento semelhante no período de reprodução. *Pterophyllum scalare* (Cacho; Yamamoto; Chellappa, 1999; Cacho; Chellappa; Yamamoto, 2007), *Cichlasoma dimerus* (Fiszbein et al., 2010), *Symphysodon aequifasciatus* (Mattos et al., 2016) possuem comportamento reprodutivo parecido, onde o macho escolhe a fêmea para a formação do casal, posteriormente ocorre o acasalamento, a desova e o cuidado biparental da prole. Já, outras espécies possuem um comportamento reprodutivo diferente, onde macho e fêmea só se interagem no momento de acasalar, e posteriormente o cuidado parental só é observado em um dos sexos, como em *Oreochromis* sp. (Akian et al., 2017; Galhardo; Almeida; Oliveira, 2009; Medeiros et al., 2005; Mendonça, 2010).

Nos rivulídeos, a importância do conhecimento do comportamento reprodutivo é fundamental, já que os killifishes anuais possuem o ciclo de vida muito curto, atingindo a maturidade sexual em poucos meses e necessitando de substrato para armazenar os ovos (Hrbek; Larson, 1999). Dessa forma, é imprescindível entender o mecanismo particular de desenvolvimento embrionário desta espécie, denominado diapausa.

Em algumas espécies de killifish anual, como *Cynolebias albipunctatus*, alguns comportamentos reprodutivos observados como a corte do macho com movimentos ondulantes laterais e nadadeiras ímpares expandidas durante os movimentos são semelhantes a outras espécies de peixes anuais, entretanto foram observados movimentos únicos característicos apenas desta espécie (Belote; Costa, 2003). Comportamentos reprodutivos de outras espécies de peixes anuais também foram estudados, *Austrolebias reicherti* (García; Loureiro; Tassino, 2008), *Cynopoecilus melanotaenia* (Gonçalves; Souza; Volcan, 2011), *Austrolebias charrua* (Berois et al.,

2012), *Austrolebias nigrofasciatus* (Volcan et al., 2013). Porém, não existe ainda nenhum registro de estudos de comportamento reprodutivos para a espécie *Hypsolebias flagellatus*, ressaltando a importância de se descrever todo o processo de comportamento do macho e fêmea desta espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a reprodução de *Hypsolebias flagellatus* em diferentes substratos e descrever o comportamento reprodutivo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar dois substratos no sucesso reprodutivo de *Hypsolebias flagellatus*;
- Confeccionar um etograma sobre o comportamento reprodutivo desta espécie;
- Observar e descrever as ações do macho em relação à fêmea no processo de reprodução.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akian, D. D., Yao, K., Clota, F., Lozano, P., Baroiller, J. F., Chatain, B., Bégout, M. L., 2017. Reproductive behaviour of two tilapia species (*Oreochromis niloticus*, Linné, 1758; *Sarotherodon melanotheron*, Rüppel, 1852) in freshwater intra and interspecific pairing context. *App. Anim. Behav. Sci.* 193, 104–113. doi: 10.1016/j.applanim.2017.03.005.
- Anderson, S. N., Podrabsky, J. E., 2014. The effects of hypoxia and temperature on metabolic aspects of embryonic development in the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Comp. Physiol. B.* 184, 355–370. doi: 10.1007/s00360-014-0803-6
- Belote, D. F., Costa, W. J. E., 2003. Reproductive Behavior of the Brazilian Annual Fish *Cynolebias albipunctatus* Costa & Brasil, 1991. *Arq. do Museu Nacional, RJ.* 61, 241–244. ISSN:0365-4508.
- Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G., Clivio, G.A., 2012. Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. *WIREs Dev. Biol.* 1, 595–602. doi: 10.1002/wdev.39
- Cacho, M. S. R. F., Chellappa, S., Yamamoto, M. E., 2007. Efeito da experiência de machos no sucesso reprodutivo em acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Lichtenstein, 1823 (Osteichthyes, Cichlidae). *Rer. Bras. Zoo.* 9, 41–47. ISSN: 1517-6770.
- Cacho, M. S. R. F., Yamamoto, M. E., Chellappa, S., 1999. Comportamento reprodutivo do acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Cuvier & Valenciennes (Osteichthyes, Cichlidae). *Rer. Bras. Zoo.* 16, 653–664. doi:10.1590/S0101-81751999000300006.
- Costa, W. J. E. M., 2002. The *Simpsonichthys flavicaudatus* species group (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 14, 31–60. Doi:
- Fiszbein, A., Cánepa, M., Vázquez, G. R., Maggese, C., Pandolfi, M., 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiol. Behav.* 99, 425–432. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.11.017

- Galhardo, L.; Almeida, O., Oliveira, R. F., 2009. Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *App. Anim. Behav. Sci.* 120, 224–230. doi: 10.1016/j.applanim.2009.07.001.
- García, D., Loureiro, M., Tassino, B., 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neo. Ichthyol.* 6, 243–248. doi: 10.1590/S1679-62252008000200012.
- Godinho, H. P.; Godinho, A. L., 2003 Águas, peixes e pescadores do Rio São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: Puc Minas. 229-274.
- Gonçalves, C. S., Souza, U. P., Volcan, M. V., 2011. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. *Neo. Ichthyol.* 9, 191–200. doi: 10.1590/S1679-62252011000100019
- Gonçalves de Freitas, E., Nishida, S. M., 1998. Sneaking Behaviour of Nile Tilapia. *Boletim Técnico CEPTA.* 11, 71-79.
- Gonçalves Junior, L. P., Mattioli, C. C., Martins, E. F. F., Souza e Silva, W., Ciolete, T. N., Vasconcellos, A. S. Luz, R. K., 2019. Temperature-induced changes in reproductive variables in the teleost fish *Lophiosilurus alexandri*. *J. Therm. Biol.* 80, 133–140. doi: 10.1016/j.jtherbio.2019.01.008.
- Hrbek, T.; Larson, A., 1999. The evolution of diapause in the killifish family rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution.* 53, 1200–1216. doi: 10.1111/j.1558-5646.1999.tb04533.x.
- Mattos, D. C., Screnci-Ribeiro, R., Cardoso, L. D., Junior, M. V. V., 2016. Description of the reproductive behavior of *Symphysodon aequifasciatus* (Cichlidae) in captivity. *Acta Amazonica.* 46, 433–438. doi: 10.1590/1809-4392201600234
- Medeiros, A. P. T., Chellappa, S., Cacho, M. S. R. F., Yamamoto, M. E., 2005. Encontros agonísticos e territorialidade entre machos de híbrido vermelho de tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) x *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) e de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Rer. Bras. Zoo.* 7, 273–284.
- Mendonça, F. Z. Escolha de substrato para a construção de ninho da tilápia-do-nilo: Associação com parâmetros fisiológicos e de bem-estar. [s.l.] UNESP, 2010.
- Passos, C., Reyes, F., Tassino, B., Rosenthal, G. G., González, A., 2013. Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male

- chemical cues. *Ethology*. 119, 891–897. doi: 10.1111/eth.12129.
- Pinceel, T., Vanschoenwinkel, B., Deckers, P., Grégoir, A., Eecke, T. V., Brendonck, L., 2015. Early and late developmental arrest as complementary embryonic bet-hedging strategies in African killifish. *Bio. J. Linn. Soci.* 114, 941–948. doi: 10.1111/bij.12474.
- Podrabsky, J. E.; Garrett, I. D. F.; Kohl, Z. F., 2010. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Bio.* 213, 3280–3288. doi: 10.1242/jeb.045906.
- Teresa, F. B., Gonçalves de Freitas, E., 2011. Reproductive behavior and parental roles of the cichlid fish *Laetacara araguaiaae*. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 355–362. doi: 10.1590/S1679-62252011005000018.
- Volcan, M. V., Sampai, L. A., Bongalhardo, D. C., Robaldo, R. B., 2013. Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. *J. App. Ichthyol.* 29, 648–652. doi: 10.1111/jai.12013.
- Webster, M. M.; Hart, P. J. B., 2004. Substrate discrimination and preference in foraging fish. *Anim. Behav.* 68, 1071–1077. doi: 10.1016/j.anbehav.2004.04.003.
- Wendelaar-Bonga, S., 1997. The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews.* 77, 591– 625. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Wourms, J. P., 1972a. Developmental Biology of Annual Fishes I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *J. Exp. Zoo.* 182, 143–168. doi: 10.1002/jez.1401820202.
- Wourms, J. P., 1972b. Developmental Biology of Annual Fishes II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of annual fish eggs. *J. Exp. Zoo.* 182, 169–200. doi: 10.1002/jez.1401820203
- Wourms, J. P., 1972b. Developmental Biology of Annual Fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zoo.* 182, 389–414. doi: 10.1002/jez.1401820310.

**5. ARTIGO: COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E EFEITO
DO SUBSTRATO NA REPRODUÇÃO DE *Hypsolebias
flagellatus***

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar dois tipos de substrato na produção de ovos de *Hypsolebias flagellatus*, confeccionar um etograma, observar e descrever as ações do macho em relação a fêmea em todo o processo de reprodução. Foram utilizados 10 casais. No experimento I, foram testados dois tipos de substratos, a saber na fase 1: S1 – pó de casca de coco e S2 – lã 100% acrílico na cor marrom. Cada tratamento teve cinco repetições. A reprodução foi acompanhada durante 45 dias. Na fase 2 do experimento I, foram substituídos os ninhos de lã por ninhos com pó de casca de coco e acompanhados por mais 45 dias. Para o experimento II foi instalada uma câmera em cada aquário. Cinco casais de *H. flagellatus* foram utilizados. Em cada aquário foi colocado um ninho com substrato de pó de casca de coco. Após o período de adaptação, deu-se início a fase 1 do experimento II, onde os casais foram observados por quatro dias. No quinto dia deu-se início a fase 2, com a retirada dos ninhos. Os casais foram observados por mais 48 horas. Após este período os ninhos foram recolocados e os casais foram observados por mais quatro dias (fase 3). No experimento I, o uso do substrato de pó de casca coco apresentou maior produção de ovos na fase 1 ($P < 0,05$). Contudo, na fase 2, quando foi substituído a lã acrílica pelo pó de casca de coco a produção de ovos foi semelhante entre os tratamentos ($P > 0,05$). Quando comparado a produção de ovos ao longo do tempo, verifica-se que para o pó de casca de coco a produção de ovos apresentou variações nas duas fases. Para o substrato 2 na fase 1 e 2, a produção de ovos foi semelhante em todas as coletas. No experimento II foi realizada a confecção do etograma. Não houve diferença significativa na duração de nenhum dos comportamentos analisados nas fases 1 e 3 ($P > 0,05$). Com relação a preferência de machos e fêmeas por um local específico dentro do aquário, foi observada diferença significativa em ambos os sexos que passaram a maior parte do tempo próximo ao ninho ($p < 0,05$). Em ambas as fases 1 e 3, as fêmeas passaram maior tempo fora do ninho, enquanto os machos, na fase 1 passaram maior tempo dentro do ninho e na fase 3 não houve diferença ($P > 0,05$). A frequência de entrada e saída do ninho dos machos foi maior em relação as fêmeas nas duas fases ($P < 0,05$). O substrato de pó de coco apresentou melhor resultado para a reprodução e machos de *H. flagellatus* não demonstram agressividade nos comportamentos reprodutivos.

Palavras chave: comportamento reprodutivo, killifish anual, etograma, reprodução.

6. INTRODUÇÃO

Killifish é o nome dado há pequenas espécies de peixes, geralmente medindo entre 3 a 7 cm, que pertencem a ordem cyprinodontiformes e que apresentam grande diversidade de cores e formatos, fato que tem despertando interesse na área ornamental. Atualmente, existem clubes de aquarioria em todo o mundo que estão se especializando, exclusivamente, na criação e reprodução destas espécies. Além disso, cientistas também têm mostrado interesse em estudar os killifishes por diversos fatores, dentre eles sua diversidade e características biológicas particulares (Costa, 2002). Além disso, segundo estudos do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), somente na América do Sul entre México e Argentina, já foram catalogadas mais de 320 espécies válidas de killifishes. Porém, algumas dessas espécies vêm sofrendo com ações antrópicas como, expansão urbana desordenada, implantação de empreendimentos, atividades agrosilvopastoris, sendo já catalogadas, segundo instrução normativa do Ministério do Meio Ambiente de 2004, 52 espécies de rivulídeos ameaçados de extinção no Brasil, o que levou as autoridades a montar um plano de ação para preservar as espécies de killifishes.

Os killifishes podem ser classificados de acordo com seu ciclo de vida em anuais e não anuais. Os peixes não anuais apresentam ciclo de vida mais longo, geralmente superior a 1 ano, enquanto os anuais apresentam ciclo de vida curto, pois vivem em ambientes bastante característicos, como lagos, lagoas e outros ambientes aquáticos sazonais (Costa, 2002). Por possuírem um ciclo de vida curto (aproximadamente 10 meses), esses animais atingem a maturidade sexual precocemente e se reproduzem rapidamente, sendo as desovas feitas no substrato localizado no fundo dos lagos ou alagados temporários (Berois et al., 2012). Contudo, ainda se sabe pouco sobre a reprodução destas espécies em cativeiro.

Desta forma, o substrato é um fator importante na reprodução de várias espécies. O substrato durante para a reprodução pode estar relacionada ao bem estar dos reprodutores de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (Mendonça, 2010) e ao comportamento de agressividade de machos em fêmeas de acará disco (*Symphysodon aequifasciatus*) (Mattos et al., 2016).

Outro aspecto importante para o sucesso reprodutivo é o comportamento dos animais durante esta fase. Segundo García et al. (2008) é imprescindível saber como o casal se comporta na hora da reprodução, sua personalidade, as interações entre os

animais, como ocorre a corte, fertilização e o cuidado parental com os ovos, se é presente ou ausente na espécie. Neste sentido é importante estabelecer o etograma onde são descritos o comportamento que uma determinada espécie exibe (Del-Claro, 2004), e assim poder caracterizar de forma correta o comportamento habitual de machos e fêmeas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar dois tipos de substrato na reprodução e produção de ovos do killifish anual *Hypsolebias flagellatus*, assim como descrever pela primeira vez o comportamento reprodutivo desta espécie.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquacultura da Universidade Federal de Minas Gerais (LAQUA/UFMG), Brasil.

Peixes adultos, identificados por características secundárias, onde o macho apresenta coloração castanho claro no corpo, com barras verticais castanho douradas, nadadeiras dorsal e anal amareladas e pontiagudas (Fig.1A), e a fêmea possui o corpo castanho acinzentado, com barras verticais cinzas, nem sempre muito visíveis e uma ou duas pintas pretas no meio das laterais do corpo, além das nadadeiras dorsal e anal transparentes e arredondadas (Fig.1B), foram utilizados.

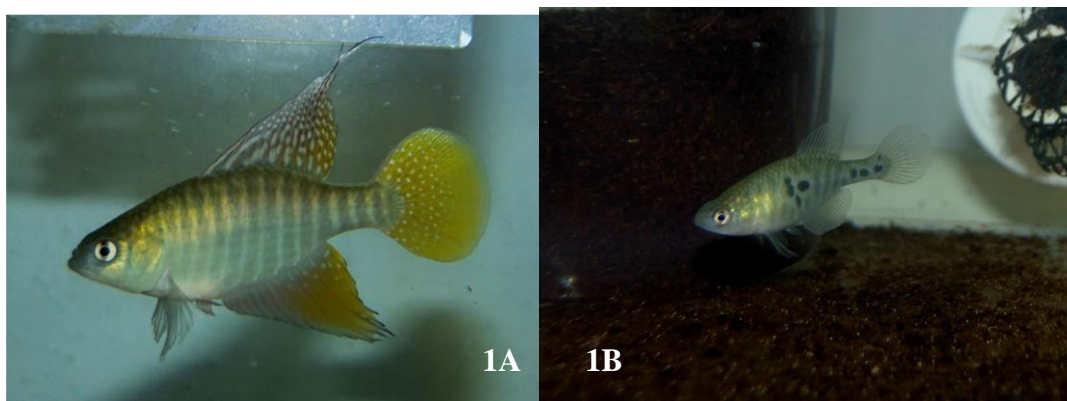


Figura 1. A. Macho de *Hypsolebias flagellatus*. 1B. Fêmea de *Hypsolebias flagellatus*.

7.1 Experimento I

Para a execução do experimento I, ninhos artificiais foram disponibilizados para os casais. Foram utilizados 10 casais que foram estocados individualmente em aquários de 48 L mantidos em sistema de recirculação de água e aeração suplementar com temperatura média de $28,0 \pm 1,0$ °C pH de $7,9 \pm 0,1$ medido diariamente com aparelho

(Hanna Instruments modelo Combo pH&EC). O fotoperíodo foi de 12 horas de luz. Os animais foram alimentados com náuplios de artêmia duas vezes ao dia (9:00 e 17:00 h). Para efeito de cálculo e, considerando um índice de eclosão de 90%, foi utilizado 0,5 gramas de cistos para cada peixe, sendo aproximadamente 80.000 náuplios diariamente.

Para a reprodução, foram testados dois tipos de substratos, a saber, na fase 1 do experimento: S1 – pó de casca de coco e S2 – lã 100% acrílico na cor marrom (Figura 2). Cada tratamento teve cinco repetições. Os ninhos artificiais foram confeccionados em potes de plástico com tampa e volume útil de 2 litros. Na tampa foi feito um furo de 6 cm de diâmetro. Os ninhos foram preenchidos com os substratos de forma que ocupassem 600 ml de seu volume. A reprodução foi acompanhada durante 45 dias.

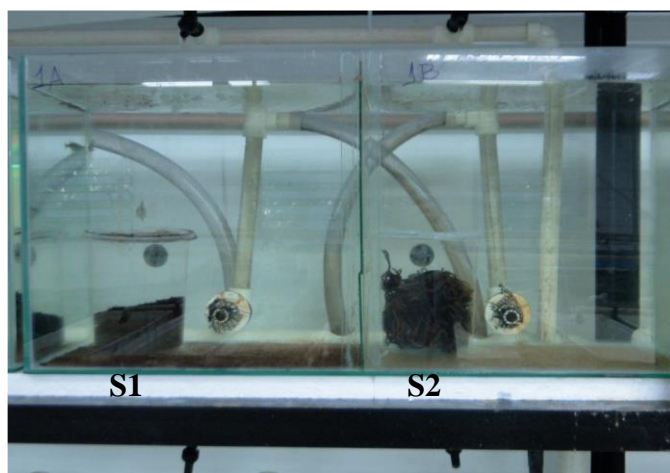


Figura 2. Substratos utilizados na reprodução de *Hypsolebias flagellatus* na fase 1 do experimento (S1 – pó de casca de coco e S2 – lã 100% acrílico na cor marrom).

Na fase 2 desse experimento, no 46^o dia, os ninhos compostos de substrato de lã acrílica foram substituídos por ninhos com pó de casca de coco e a reprodução foi acompanhada por mais 45 dias.

Nas duas fases experimentais, a cada 15 dias, os substratos foram retirados para a coleta e quantificação dos ovos e adicionados novos substratos correspondentes.

Após ser retirado, o substrato de pó de casca coco foi passado através de uma peneira sobre a superfície de um pano que atuava como elemento filtrante, tornando possível assim a retirada do excesso de umidade do substrato. Em seguida o substrato foi enrolado em jornal e permaneceu assim por dois dias até a realização da contagem dos ovos. No substrato composto por lã, era feita somente uma compressão com as mãos para retirar o excesso de água e então os ovos eram contados.

7.2 Experimento II

Para a realização do experimento II foi instalada uma câmera em cada aquário que monitorava os animais 24 horas por dia. Todas as câmeras estavam conectadas a um HD externo para armazenamento dos arquivos.

Foram utilizados cinco casais da espécie *Hypsolebias flagellatus*. Cada casal foi colocado em um aquário com capacidade total de 48 L, mantidos em um sistema de recirculação de água, com temperatura de $28,0 \pm 1,0$ °C e pH $7,9 \pm 0,1$ controlados e monitorados diariamente com o aparelho (Hanna Instruments modelo Combo pH&EC), e com um fotoperíodo de 12 horas de luz.

Com base nos resultados em experimento I, em cada aquário foi introduzido um ninho artificial com pó de casca de coco como descrito anteriormente.

Os cinco primeiros dias foram reservados para adaptação dos animais nos aquários e somente a partir do sexto dia foi dado início as observações de comportamento.

Este experimento foi dividido em três fases. Na primeira fase (fase 1) foi colocado um ninho em cada aquário, e assim observado o comportamento de todos os casais durante quatro dias. No quinto dia deu-se início a fase 2, onde todos os ninhos foram retirados e os casais continuaram a ser observados por mais 48 horas. Posteriormente, os ninhos foram recolocados em todos os aquários, e então deu-se início a fase 3, onde foi observado o comportamento por mais quatro dias.

Por não existir nenhum protocolo estabelecido de observação de comportamento para esta espécie, o método de observação escolhido foi “Ad libitum” (Tabela 1), também conhecido como “à vontade” (Altmann, 1974).

Tabela 1: Método de observação utilizado.

Método de observação social: Método “Ad libitum”

- Feito à vontade, com livre escolha
- Casual
- Utilizado para abordagem inicial (superficial)
- São usados critérios subjetivos de amostragem
- Recomendado para comportamentos esporádicos, porém significativos

Foi definido um padrão de observação de 60 minutos por dia de cada casal, dividido em dois horários, 30 minutos na parte da manhã (6:30 às 7:00 horas) e mais 30 minutos na parte da tarde (17:30 às 18:00 horas). Os horários foram definidos de acordo com um sistema de timer instalado no laboratório que fazia com que o fotoperíodo iniciasse às 6:30, e se encerrava às 18:00 horas. Para definir o etograma as observações foram feitas durante quatro dias seguidos em todos os aquários.

Após a confecção do etograma, foi dado início ao período de observações para a descrição do comportamento reprodutivo. Com os ninhos já dentro dos aquários, os cinco casais (um casal por aquário) foram observados durante quatro dias seguidos. Passado esse período, os ninhos foram retirados dos aquários e durante dois dias seguidos, todos os casais continuaram a ser observados.

Após 48 horas sem o ninho nos aquários, os mesmos foram colocados novamente e por mais quatro dias os casais foram observados. Os aquários foram divididos em dois quadrantes (Q1 e Q2), como demonstrado na figura 3, servindo de parâmetros para analisar a distância e o tempo de permanência dos animais em cada quadrante.

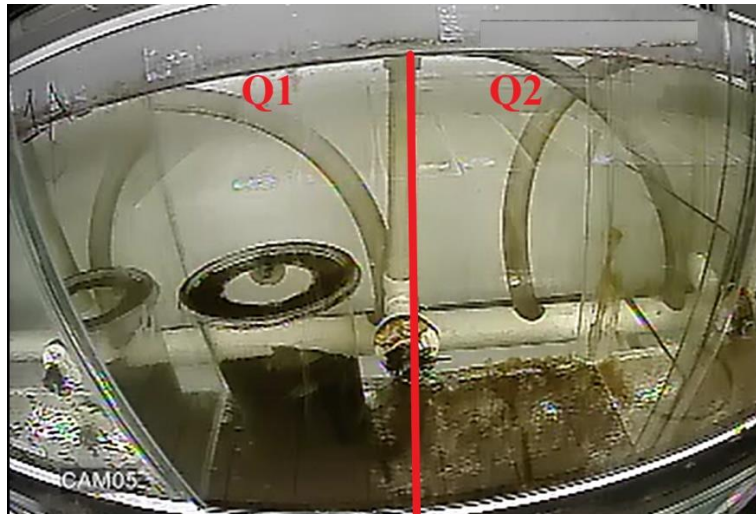


Figura 3. Linha vermelha inserida no programa de filmagem Solomon Coder para analisar a proximidade dos animais em relação ao ninho.

Os dados gerados foram armazenados para futura comparação de comportamento dos animais.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisarmos os dados obtidos no experimento I, foi utilizado o software Assistat 7.7 (2017). Devido a distribuição não-normal dos dados, foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para comparação entre os substratos. No experimento II, os dados foram expressos em média e desvio padrão, as variáveis analisadas foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene. Em seguida os dados foram submetidos ao teste t de Student a 5%. Foi utilizado o software Infostat versão 2018d, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

9. RESULTADOS

9.1 Experimento I

Na fase 1, nas três coletas de ovos, o uso do substrato de pó de coco apresentou maior produção de ovos, comparado a lã acrílica (Tabela 2). Contudo, na fase 2, quando foi substituído a lã acrílica pelo pó de coco a produção de ovos foi semelhante entre os tratamentos.

Quando comparado a produção de ovos em cada substrato, verifica-se que para o substrato 1 (pó de coco) a produção de ovos apresentou variações (números) ao longo do tempo nas duas fases sendo a menor produção na primeira desova e a maior na quinta coleta de ovos (07/07/2018), com 75 dias de experimento. As demais coletas apresentaram produção de ovos intermediários (Tabela 2). Para o substrato 2, a produção de ovos foi semelhante em todas as coletas nas duas fases experimentais. Contudo fica evidente que após a troca da lã acrílica pelo pó de casca coco, há uma maior variação na produção de ovos entre os casais (variando de 3 a 153 ovos).

Tabela 2. Produção média de ovos (\pm desvio padrão) de *Hypsolebias flagellatus* nos diferentes substratos (Fase 1) e após a troca de substrato (Fase 2), onde o substrato de lã acrílica foi substituído por pó de coco no tratamento substrato 2.

Tratamento	Fase 1			Fase 2		
	Coleta da desova	Coleta da desova	Coleta da desova	Coleta da desova	Coleta da desova	Coleta da desova
	06/05/18	20/05/18	02/06/18	17/06/18	07/07/18	28/07/18
Substrato 1*	46,8 \pm 36,8 Ab	106,2 \pm 40,4 Aab	111,4 \pm 51,3 Aab	158,7 \pm 58,1 Aab	316,5 \pm 157,5 Aa	258,0 \pm 221,1 Aab
Substrato 2*	3,4 \pm 2,7 Ba	0,7 \pm 0,9 Ba	2,5 \pm 1,7 Ba	30,3 \pm 27,2 Aa	78 \pm 106,0 Aa	70,5 \pm 44,5 Aa

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam significância estatística ($P < 0,05$), pelo teste Kruskal-Wallis. (ANOVA não paramétrica). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam significância estatística ($P < 0,05$), pelo teste Mann-Whitney. Fase 1: Substrato 1 – pó de coco; Substrato 2 – lã acrílica. Fase 2 - Substrato 1 – pó de coco; Substrato 2 – pó de coco.

Durante o experimento foi verificada a morte de alguns animais, sem possível explicação do ocorrido (Tabela 3). Pode-se verificar que dos 6 animais que morreram durante o experimento, 5 foram do substrato 2, sendo que destes, 3 morreram na fase 1 e dois na fase 2 do experimento. Também foi observado durante o experimento que os reprodutores que tinham o pó de casca de coco como substrato, conseguiam se esconder dentro do recipiente com o substrato, reduzindo às vezes os confrontos entre os animais, o que nos recipientes com lã acrílica não era possível. Porém, por não termos a idade exata dos animais, mortalidade pode ter sido devido ao próprio ciclo de vida.

Tabela 3 – Reprodutores de *Hypsolebias flagellatus* que morreram durante o período de 90 dias de reprodução.

Substrato	Data	Fase experimental	Sexo
2	18/05/2018	1	Macho
1	22/05/2018	1	Fêmea
2	25/05/2018	1	Macho
2	26/05/2018	1	Fêmea
2	10/06/2018	2	Macho
2	19/07/2018	2	Fêmea

Fase 1: Substrato 1 – pó de coco; Substrato 2 – lã acrílica. Fase 2 - Substrato 1 – pó de coco; Substrato 2 – pó de coco.

9.2 Experimento II

Após a observação das filmagens do comportamento dos casais, foi elaborado um etograma (Tabela 4) baseado no comportamento reprodutivo dos casais de *H. flagellatus*.

Tabela 4. Etograma confeccionado para a espécie *Hypsolebias flagellatus*.

Comportamento	Abreviação	Estado/ Evento	Descrição
Inatividade			
Macho Parado	MP	Estado	Macho permanece em posição estacionária por mais de um minuto
Fêmea Parada	FP	Estado	Fêmea permanece em posição estacionária por mais de um minuto
Atividade			
Macho dentro do ninho	MD	Estado	Macho permanece sozinho dentro do ninho nadando de um lado para o outro, as vezes permanece por alguns segundos parado, mas sem a clara intenção de convidar a fêmea para a corte
Fêmea dentro do ninho	FD	Estado	Fêmea permanece sozinha dentro do ninho nadando de um lado para o outro, as vezes permanece por alguns segundos parada
Macho fora do ninho	MF	Estado	Macho permanece nadando fora do ninho de um lado para o outro, às vezes por alguns segundos parado
Fêmea fora do ninho	FF	Estado	Fêmea permanece nadando fora do ninho de um lado para o outro, às vezes por alguns segundos permanece parada
Agressivo			
Perseguição sem mordida	PS	Estado	Macho persegue a fêmea sem efetuar mordida
Perseguição com mordida	PC	Estado	Macho persegue a fêmea efetuando mordida

Reprodutivo			
Exibição	EC	Estado	Macho inicia uma série de movimentos ondulantes com as laterais do corpo ao redor e na frente da fêmea. As cores do macho se intensificam neste momento e as suas nadadeiras ímpares são expandidas.
Fêmea segue o macho	FS	Estado	Após exibição do macho, a fêmea o segue sem, no entanto, encostar o corpo no dele.
Convite para submergir	CS	Estado	Macho posiciona a cabeça no substrato, em um ângulo de aproximadamente 45 graus indicando para a fêmea o local para a submersão. Fica parado por alguns segundos, podendo então submergir junto com a fêmea, caso ela não aceite, submerge sozinho ou então desiste da submersão e retoma as exibições.
Aceite para submergir	AS	Estado	Fêmea nada com o corpo colado lateralmente com o corpo do macho.
Submersão Macho e Fêmea	SC	Estado	O casal encosta lateralmente os seus corpos e cavam o substrato, realizando movimentos vibratórios com o corpo e a nadadeira caudal.
Submersão Macho	SM	Estado	Depois da exibição e convite do macho e a aceitação da fêmea para a submersão, pode ocorrer uma desistência da mesma e o macho então submerge sozinho.
Desova/Fertilização	DF	Estado	Com o casal submerso no substrato o macho pressiona a fêmea lateralmente com seu corpo contra o fundo, ocorrendo a desova e a fertilização.
Emersão do Macho	EM	Estado	Após a desova, o macho permanece submerso durante alguns segundos ou minutos.
Emersão da Fêmea	EF	Estado	Após a desova, a fêmea permanece submersa durante alguns segundos ou minutos.

Após a elaboração do etograma, as filmagens foram novamente observadas através do software Solomon coder® versão: beta 19.08.02, para a medição do tempo em que cada animal executava determinado comportamento. Os resultados dos tempos (segundos) dos comportamentos das fêmeas estão descritos na tabela 5, e dos machos na tabela 6.

Tabela 5. Análise de duração dos comportamentos das fêmeas de *Hypsolebias flagellatus* (Média ± desvio padrão em segundos) no experimento II.

Comportamento	Fase		
	1	3	
Convite para submergir	2,56 ±4,82	0,50±0,51	ns
Aceite para submergir	1,00±1,63	0,52±0,55	ns
Submersão	12,56±8,47	1,75±0,93	ns
Desova/Fertilização	3,81±3,29	2,06±0,90	ns
Inatividade	170,18±267,31	44,78±35,46	ns
Fuga do macho	2,55±4,36	Não observado	ns

Fase 1 – observações logo após ser colocado o ninho nos aquários por quatro dias. Fase 3 – após os peixes ficarem por 48 horas sem o ninho (fase 2), estes foram recolocados e realizadas observações por mais 4 dias (ns= não significativo pelo teste “t” de Student).

Tabela 6. Análise de duração dos comportamentos dos machos de *Hypsolebias flagellatus* (Média ± desvio padrão em segundos) no experimento II.

Comportamento	Fase		
	1	3	
Convite para submergir	3,79±0,07	Não observado	ns
Aceite para submergir	2,36±0,04	Não observado	ns
Submersão	2,46±0,04	7,14±0,01	ns
Desova/Fertilização	5,90±0,03	2,50±0,01	ns
Inatividade	1,86±2,38	1,09±1,34	ns
Perseguição a fêmea	8,03±0,14	1,05±0,02	ns

Fase 1 – observações logo após ser colocado o ninho nos aquários por quatro dias. Fase 3 – após os peixes ficarem por 48 horas sem o ninho (fase 2), estes foram recolocados e realizadas observações por mais 4 dias (ns= não significativo pelo teste “t” de Student).

Após a análise dos tempos dos comportamentos, os resultados mostraram que em relação ao posicionamento preferencial das fêmeas dos casais nos aquários, houve diferença significativa ($p < 0,05$) em ambas as fases, indicando a preferência dessas fêmeas pelo quadrante 1 (próximo ao ninho) (figura 4 a). O mesmo resultado foi registrado para os machos (figura 4 b).

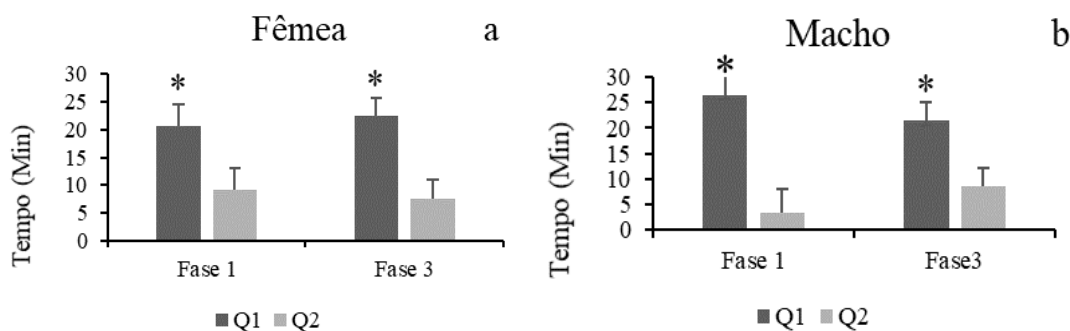


Figura 4. Média (\pm desvio padrão) do tempo de permanência das fêmeas (a) e machos (b) de *Hypsolebias flagellatus* nos dois quadrantes (Q1 = próximo ao ninho; Q2 = distante do ninho). * indica diferença significativa em relação ao quadrante não marcado dentro da mesma fase (“*t*” Student; $p < 0,05$). Fase 1 – observações logo após ser colocado o ninho nos aquários por quatro dias. Fase 3 – após os peixes ficarem por 48 horas sem o ninho (fase 2), estes foram recolocados e realizadas observações por mais 4 dias.

Em ambas as fases, o tempo de permanência das fêmeas fora do ninho foi significativamente maior quando comparado ao tempo de permanência dentro do ninho (Figura 5). Em relação aos machos, o tempo de permanência dentro do ninho na fase 1 foi significativamente maior do que a permanência fora do ninho. Porém, na fase 3 não houve diferença significativa (Figura 5 b).

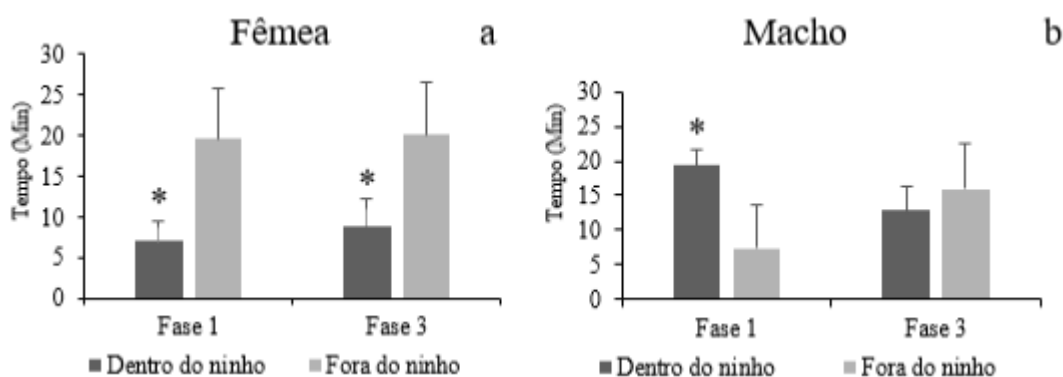


Figura 5. Tempo médio de permanência (\pm desvio padrão) (min.) de fêmeas (a) e machos (b) de *Hypsolebias flagellatus* dentro e fora do ninho. * indica diferença significativa em relação ao quadrante não marcado dentro da mesma fase (“*t*” Student; $p < 0,05$). Fase 1 – observações logo após ser colocado o ninho nos aquários por quatro dias. Fase 3 – após os peixes ficarem por 48 horas sem o ninho (fase 2), estes foram recolocados e realizadas observações por mais 4 dias.

A figura 6 mostra a média da frequência de entrada no ninho de fêmeas e machos durante as fases 1 e 3 do experimento. O número de entradas no ninho dos machos em

ambos as fases e períodos (manhã e tarde), foi significativamente maior, quando comparado as fêmeas.

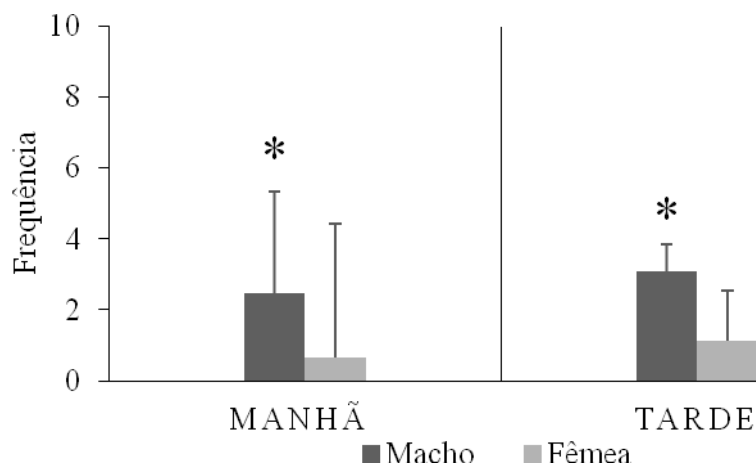


Figura 6. Média (\pm desvio padrão) das frequências de entrada no ninho na fase 1 e fase 3 de machos e fêmeas de *Hypsolebias flagellatus* no período da manhã e tarde. * indica diferença significativa para observações no mesmo período (“*t*” Student; $p < 0,05$). Fase 1 – observações logo após ser colocado o ninho nos aquários por quatro dias. Fase 3 – após os peixes ficarem por 48 horas sem o ninho (fase 2), estes foram recolocados e realizadas observações por mais 4 dias.

Também houve diferença significativa entre a frequência de entrada no ninho entre machos e entre as fêmeas dentro da própria fase observada (Figura 7).

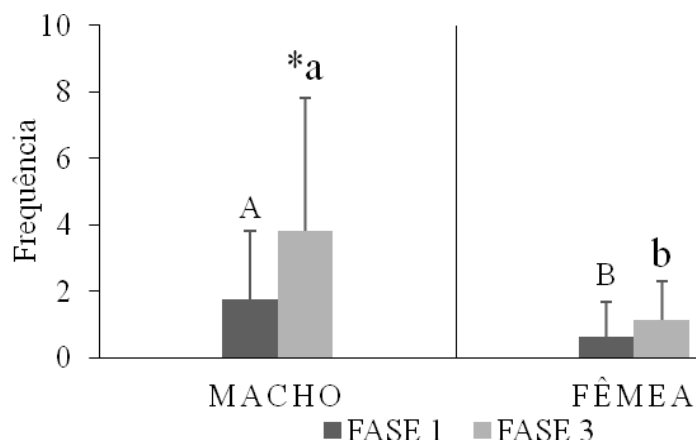


Figura 7. Médias (\pm desvio padrão) das frequências de entrada no ninho de machos e fêmeas de *Hypsolebias flagellatus* nas duas fases. * indica diferença significativa entre a fase 1 e a fase 3 nas observações do macho. Letras maiúsculas representam diferença entre os machos e as fêmeas na fase 1, e as letras minúsculas representam diferenças entre os machos e as fêmeas na fase 3 (“*t*” Student $p < 0,05$)

10. DISCUSSÃO

Durante a reprodução, o substrato de pó de coco apresentou maior produção de ovos na fase 1 e melhorou a produção de ovos na fase 2 dos reprodutores que tinha lã acrílica como substrato e este foi substituído por pó de coco. Para a reprodução de *Lepidomeda copei*, Billman et al. (2008) evidenciaram a importância do uso de substrato semelhante ao do habitat natural para se obter maior número de ovos por desova. Este fato também foi registrado para *Lophiosilurus alexandri*, onde a reprodução em cativeiro foi realizada com sucesso quando do uso da areia como substrato nos tanques dos reprodutores, semelhante ao ambiente natural (Costa et al., 2015; Gonçalves Junior., 2019). Para a reprodução de *Astyanax bimaculatus*, foi testado o aguapé como substrato natural, comparado a lã acrílica (substrato artificial), sendo verificado uma maior taxa de sobrevivência das pós larvas no substrato natural (aguapé), em relação à lã acrílica (Rezende et al., 2005), semelhante ao presente estudo. Desta forma, fica evidente a importância do substrato para diversas espécies como registrado no presente estudo, pois muitas possuem características específicas em seu período reprodutivo, como a corte entre macho e fêmea (Akian et al., 2017), ou algum tipo de ritual (Teresa e Gonçalves de Freitas., 2011). Além disso, de fato, o substrato está diretamente ligado e esta questão, pois pode servir como estratégia reprodutiva e de sobrevivência da desova contra predadores na natureza (Mattos et al., 2016). Além disso, o fato de a lã acrílica não ter sido tão eficiente como substrato para o *H. flagellatus*, pode ser devido ao comportamento do macho de se enterrar o tempo todo no substrato de pó de casca de coco para a reprodução, fato não verificado no substrato de lã.

O substrato 1, de pó de coco, apresentou menor produção (47 ovos) na primeira desova e a maior na quinta coleta (317 ovos), com 75 dias de experimento. Já, a reprodução no tratamento substrato 2 foi semelhante em todas as coletas nas duas fases experimentais. Contudo, após a troca da lã acrílica pelo pó de casca coco, há uma maior variação na produção de ovos entre os casais (variando de 3 a 153 ovos). Este fato pode indicar um processo de adaptação dos animais à troca dos substratos, reforçando a importância do substrato na reprodução desta espécie e de outras espécies. Maan e Taborsky (2008), demonstraram que a presença de um determinado substrato, não sendo

o natural, interferiu na taxa reprodutiva, gerando conflito entre os machos da espécie *Lamprologus callipterus*.

A morte de alguns animais durante o experimento não foi elucidada. A maior mortalidade foi observada no substrato composto por lã acrílica na fase 1. Desta forma, na reprodução desta espécie a lã acrílica não deve ser recomendada. Outro ponto importante verificado com o uso de pó de coco é que este permitiu que os animais se mantivessem separados as vezes pelo recipiente, reduzindo os confrontos entre o casal, o que nos recipientes com lã acrílica não era possível. A preferência por um substrato específico, não é escolha particular dos rivulídeos, outros gêneros de peixes que vivem em ambientes lênticos como os centrarquídeos também possuem essa característica, segundo Allee (2014).

Além disso, por não se ter a idade exata dos animais e por estes terem ciclo de vida curto na natureza, a morte poderia ter ocorrido pela idade dos peixes. Contudo este fato precisa ser melhor elucidado, assim como ser verificado se em condições controladas e adequadas este ciclo de vida poderia ser prolongado, já que a característica evolutiva desta espécie é bastante peculiar dentre os vertebrados (Furness, 2016).

A confecção do etograma do comportamento reprodutivo de machos e fêmeas de *Hypsolebias flagellatus* foi baseada em etogramas já existentes confeccionados por Belote e Costa (2003); García, Loureiro e Tassino (2008) para outras espécies de peixes e permitiu obter dados inéditos comportamentais relacionados à espécie. Este tipo de tabela permite analisar de forma mais objetiva quais os principais comportamentos exibidos por esta espécie.

A primeira descrição comportamental em se tratando de peixes anuais foi feita por Vaz-Ferreira et al. (1964), que descreveu de forma sucinta o comportamento reprodutivo de killifishes do gênero *Austrolebias* sp., a corte do macho, e a inatividade da fêmea, foram comportamentos descritos, e que foram semelhantes aos observados neste estudo. Posteriormente, Vaz-Ferreira e Sierra (1972) descreveram comportamentos ligados ao contexto social e reprodutivo de killifishes do gênero *Cynolebias*, e registraram comportamento de exibição do macho como: convite para submergir, submersão macho/fêmea e fertilização. Todos esses comportamentos também foram identificados em *H. flagellatus* no presente estudo.

Para um bom estudo comportamental, a observação deve ser detalhada, pois dentro de uma mesma classe o comportamento do casal pode ser diferente, como

identificado por Belote e Costa (2003) em casais de *Cynolebias albipunctatus*, onde a fêmea no momento da corte se torna agressiva e persegue o macho, que em alguns casos é mordido pela própria fêmea, comportamento esse que não foi observado em fêmeas de *H. flagellatus*.

Dependendo da característica do animal analisado, pode-se utilizar de uma outra ferramenta metodológica chamada chave dicotômica. Esta chave auxilia na confecção do etograma. Segundo Bolgan et al. (2015), a chave dicotômica é dividida em três subgrupos de comportamentos diferentes, e a partir daí, os animais são inseridos no subgrupo correspondente. Portanto, o desenvolvimento de um etograma para estudos sobre comportamento dos animais é de suma importância, pois dentro de uma mesma espécie, os comportamentos podem ser distintos, e assim influenciar no resultado reprodutivo.

Devido a sua característica reprodutiva, os killifishes anuais necessitam de substrato para se reproduzirem, fecundar e armazenar seus ovos (Costa, 2002), ficando evidente a preferência de permanência na maior parte do tempo do macho e da fêmea por permanecerem perto do ninho. Essa característica também foi registrada em outros gêneros de rivulídeos como em *Simpsonichthys* (Belote, 1998), e *Cynolebias* (Costa, 2001).

A preferência das fêmeas de *H. flagellatus* por passar a maior parte do tempo (60%) fora do ninho em ambas as fases 1 e 3, evidencia um comportamento semelhante e característico em killifishes anuais, como demonstrado por García et al. (2008) em fêmeas de *A. reicherti*, onde a fêmea após ser atraída pelo macho, entra no ninho, ocorre a desova e fertilização, e em seguida sai, deixando o macho dentro no ninho protegendo os ovos fertilizados. Outra espécie de killifish anual que possui característica semelhante é o *C. melanoaenia*, Gonçalves, Souza e Volcan (2011) observaram que após a fecundação dos ovos, a fêmea se retira do ninho, deixando o macho. Esse tipo de comportamento é repetido entre os rivulídeos, inclusive de gêneros distintos.

Por outro lado, os machos são os responsáveis pela proteção dos ovos no ninho, dentre as exhibições de comportamento, é possível observar que momentos antes da corte, o macho cava buracos no ninho, dando cabeçadas no substrato para enterrar os ovos após a fertilização. Há preferência dos machos em permanecer dentro do ninho durante a fase 1 (60% do tempo), fato que evidencia a função dos mesmos em tomar conta dos ovos depositados no substrato. Porém, após a retirada do ninho (fase 2) e recolocado dias depois (fase 3), não houve diferença no tempo em que os machos

passaram dentro e fora do ninho. Esse tipo de comportamento pode ser explicado devido ao fato de as tentativas de corte e desova não terem sido bem sucedidas em comparação com a fase 1.

Na comparação de frequência de entrada e saída do ninho, a frequência dos machos é significativamente maior em relação as fêmeas nas duas fases e nos dois períodos diários observados. Também houve diferença nas frequências de entrada no ninho de machos e fêmeas dentro da própria fase.

As fêmeas de killifish possuem comportamentos semelhantes mesmo sendo de gêneros distintos, e quando comparamos os machos, percebemos comportamentos diferente, como demonstrado por Berois et al. (2012), onde machos de *Austrolebias charrua* permanecem dentro do ninho mesmo não ocorrendo nenhuma fertilização ou desova momentânea.

11. CONCLUSÕES

Com base nesses resultados, o substrato de pó de casca de coco é mais eficiente para o sucesso reprodutivo e machos de *H. flagellatus* não demonstram agressividade para com as fêmeas nos comportamentos reprodutivos, permanecendo mais tempo dentro dos ninhos.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akian, D. D., Yao, K., Clota, F., Lozano, P., Baroiller, J. F., Chatain, B., Bégout, M. L., 2017. Reproductive behaviour of two tilapia species (*Oreochromis niloticus*, Linné, 1758; *Sarotherodon melanotheron*, Rüppel, 1852) in freshwater intra and interspecific pairing context. *App. Anim. Behav. Sci.* 193, 104–113. doi: 10.1016/j.applanim.2017.03.005.

Allee, R. I., 2014. Reproduction and nesting in teleost fish, with a focus on reproduction in Centrarchids and specific analysis of nesting in *Lepomis megalotis*. Dissertação (Graduação em Biologia) – Departamento de Biologia, Butler University, EUA.

Altmann, J., 1974. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour.* 49, 227-267. doi: 10.1163/156853974X00534

Belote, D.F., 1998. Comportamento reprodutivo do gênero *Simpsonichthys* Carvalho (Cyprinodontiformes - Rivulidae). Rio de Janeiro. 65p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Departamento de Ciências Naturais, Universidade do Rio de Janeiro.

Belote, D. F., Costa, W. J. E., 2003. Reproductive Behavior of the Brazilian Annual Fish *Cynolebias albipunctatus* Costa & Brasil, 1991. *Arq. do Museu Nacional*, RJ. 61, 241–244. ISSN: 0365-4508.

Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G., Clivio, G.A., 2012. Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. *WIREs Dev. Biol.* 1, 595–602. doi: 10.1002/wdev.39.

Billman, E. J.; Wagner, E. J.; Arndt, R. E., 2008. Reproductive Ecology and Spawning Substrate Preference of the Northern Leatherside Chub. *North Amer. J. of Aquac.* 70, 273-280. doi: 10.1577/A07-044.1.

Bolgan, M., O'Brien, J., Gammell, M., 2015. The behavioural repertoire of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* (L.)) in captivity: a case study for testing ethogram completeness and reducing observer effects. *Ecol. of Freshw. Fish.* 25, 318-328. doi: 10.1111/eff.12212.

Costa, W.J.E.M., 2001. The neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationship, taxonomic revision, and

biogeography. *Ichthyol. Explor. of Freshwat.* 12, 333-383.

Costa, W. J. E. M., 2002. The *Simpsonichthys flavicaudatus* species group (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 14, 31–60.

Del-Claro, K., 2004. *Comportamento Animal: Uma introdução à ecologia comportamental*. Jundiaí – SP: Livraria Conceito.

Furness, A. I., 2016. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biol. Rev.* 91, 796-812. doi: 10.1111/brv.12194.

García, D., Loureiro, M., Tassino, B., 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neo. Ichthyol.* 6, 243–248. doi: 10.1590/S1679-62252008000200012.

Gonçalves Junior, L. P., Mattioli, C. C., Martins, E. F. F., Souza e Silva, W., Ciolete, T. N., Vasconcellos, A. S. Luz, R. K., 2019. Temperature-induced changes in reproductive variables in the teleost fish *Lophosilurus alexandri*. *J. Therm. Biol.* 80, 133–140. doi: 10.1016/j.jtherbio.2019.01.008.

Icmbio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2013. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção. Brasília. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-rivulideos/sumario-executivo-rivulideos.pdf>>. Acessado em novembro de 2019.

Maan, M. E., Taborsky, M., 2008. Sexual conflict over breeding substrate causes female expulsion and offspring loss in a cichlid fish. *Behav. Ecol.* 19, 302-308. doi: 10.1093/beheco/arm129.

Mattos, D. C., Screnci-Ribeiro, R., Cardoso, L. D., Junior, M. V. V., 2016. Description of the reproductive behavior of *Symphysodon aequifasciatus* (Cichlidae) in captivity. *Acta Amazonica.* 46, 433–438. doi: 10.1590/1809-4392201600234.

Mendonça, F. Z. Escolha de substrato para a construção de ninho da tilápia-do-nilo: Associação com parâmetros fisiológicos e de bem-estar. [s.l.] UNESP, 2010.

Rezende, F. P., Filho, O. P. R., Pereira, M. M., Takabatake, E. Y., Navarro, R. D., Santos, L. C., Silva, R. F., Filho, C. B. C., 2005. Effect different substrata on spawning of lambari tambuí (*Astyanax bimaculatus* linnaeus, 1758). *Rev. Ceres.* 52, 527-533.

Teresa, F. B., Gonçalves de Freitas, E., 2011. Reproductive behavior and parental roles of the cichlid fish *Laetacara araguaiae*. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 355–362. doi: 10.1590/S1679-62252011005000018.

Vaz-Ferreira, R., Sierra, B., Scaglia, S., 1964. Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo. 26, 44-49.

Vaz-Ferreira, R., Sierra, B., 1972. Caracteres etológicos genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay.* 2, 22-35.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem poucos estudos focados em rivulídeos, especialmente com relação ao comportamento reprodutivo de peixes anuais, é necessário que novos estudos sejam realizados, com objetivos de confeccionar etogramas para outras espécies de killifishes que ainda não possuem uma descrição comportamental, para que futuramente mais espécies possam ser comparadas, e um banco de dados de peixes anuais possa ser criado, para que vários gêneros que correm risco de extinção, não desapareçam.