



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDOS NA CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES DO RIO  
SANTO ANTÔNIO, BACIA DO RIO DOCE**

**HATUS DE OLIVEIRA SIQUEIRA**

**Orientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini**

**Coorientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui**

**Coorientador: Dr. Wellington Adriano Moreira Peres**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação Ciências  
Biológicas (Zoologia).

*José Augusto Senhorini*

**BOTUCATU – SP**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Siqueira, Hatus Oliveira.

Estudos na conservação de espécies de peixes do rio Santo Antônio, bacia do rio Doce / Hatus Oliveira Siqueira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Augusto Senhorini

Coorientador: George Shigueki Yasui

Coorientador: Wellington Adriano Moreira Peres

Capes: 20406010

1. Peixe - Conservação. 2. Extinção (Biologia).  
3. Unidades de conservação. 4. Genética animal. 5. Doce, Rio, Bacia (MG e ES).

Palavras-chave: Banco genético; Endemismo; Espécies ameaçadas; Unidades de conservação.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço as essências divinas que vida nos proporciona para continuarmos fortes e alcançar os nossos objetivos nesta fase na Terra.

À minha família, meus pais (Hur e Eliana), meus irmãos (Hur Filho e Luccas).

Ao meu orientador José Augusto Senhorini, que simplesmente não fez somente seu papel de orientador, mas sim de um grande pai e amigo. Gratidão Zé.

Ao meu co-orientador George Shigueki Yasui, por me proporcionar o desenvolvimento do projeto e toda a confiança aplicada em mim para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Wellington Adriano Moreira Peres, por todo apoio e ensinamentos passados com muita dedicação.

Ao meu pai acadêmico e amigo Dr. Célio Bertelli e Madrinha Eliana Velocci, por toda confiança e motivação para seguir esse caminho que foi percorrido com êxito.

Com grande satisfação agradeço ao meu companheiro e amigo de Laboratório Dilberto Ribeiro Arashiro, que além da amizade formada, participou e me incentivou durante os períodos de coletas que foram realizadas.

Aos amigos de Ferros - MG, Despachante e protetor do Rio Santo Antônio Sr. Ronaldo e seu sobrinho Carlos, que nos acompanharam e proporcionaram conhecer melhor essa região maravilhosa.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental, por toda a estrutura, moradia e parceira com o projeto.

Aos servidores públicos do CEPTA e amigos que auxiliaram Noel, Luiz Alberto e Benedito, Márcio Barragana.

Aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia de Peixes que me ensinaram e ajudaram a desenvolver este trabalho, além de tornarem-se uma família para mim durante essa jornada científica: Bruna Machado, Daniela Oliveira, Daiane Niedzielski, Gabriel Marra, Gabriella Braga, Gustavo Shiguemoto, Geovanna Coelho, Juliana Dias, Lucia Lopez, Milena Chaguri, Natália Raissa, Natália Greice, Nivaldo Nascimento, Nycolas Levy, Paulo Monzani, Rafaela Bertolini, Talita Lázaro.

À Universidade Estadual Paulista - UNESP, e ao Instituto de Biociências de Botucatu, na qual estou vinculado e me proporcionou desenvolver o trabalho de mestrado na área de Zoologia.

À Universidade do Vale do Rio Doce – UNIVALE, em especial a Prof. Dr.<sup>a</sup> Eunice Maria Nazareth Nonato por todo apoio e confiança incalculável.

Ao Ministério Público de Minas Gerais – MPMG, pela bolsa concedida e ao Promotor de Justiça Dr. Leonardo Castro Maia, por todo apoio e confiança incalculável para o desenvolvimento do projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	01
LISTA DE TABELAS.....	03
RESUMO.....	04
ABSTRACT.....	05
1. INTRODUÇÃO.....	06
1.1. Bacia do Rio Doce .....	06
1.2. Bacia do Rio Santo Antônio.....	08
1.3. Ictiofauna.....	9
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Expedições de coleta.....	16
3.2 Locais de coleta.....	16
3.3. Coleta e Transporte.....	18
3.4. Sistema de quarentena e Tanques de Alvenaria.....	19
3.5. Alimentação.....	20
3.6. Estudos da biologia reprodutiva básica.....	21
3.6.1. Avaliação de características sexuais secundárias de <i>H. wheatlandii</i> .....	21
3.6.2. Avaliação de características sexuais secundárias de <i>S. doceanum</i> .....	21
3.6.3. Caracterização do sêmen de <i>H. wheatlandii</i> .....	22
3.6.4. Caracterização cariotípica de <i>H. wheatlandii</i> .....	24
3.7. Informações geográficas e delimitação de área de proteção.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Domesticação e formação do banco genético ex situ.....	28
4.2. Biologia reprodutiva básica de <i>H. wheatlandii</i> .....	29
4.3. Análises espermáticas.....	30
4.4. Caracterização cariotípica de <i>H. wheatlandii</i> a partir de cultivo celular.....	32
4.5. Biologia reprodutiva básica de <i>S. doceanum</i> .....	33
4.6. Delimitação de área de proteção.....	35
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	38
6. REFERÊNCIAS.....	39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Remanescentes de vegetação nativa na bacia hidrográfica do rio Santo Antônio; observa-se os biomas Cerrado e Mata Atlântica, cerrado com dominância na Serra do Espinhaço e próximo as nascentes dos rios Preto do Itambé e Tanque. O bioma de Mata Atlântica apresenta distribuído em fragmentos em diversas partes da bacia hidrográfica. **Fonte:** MMA, 2019.....08
- Figura 2.** Tipos de vegetações na bacia do rio Santo Antônio: Domínio de Floresta Estacional Semidecidual com presença de Pecuária; Savana/Floresta Estacional em contato com Pecuária; Savana Gramíneo-Lenhosa sem floresta-de-galeria; Gramíneo-Lenhosa com floresta-de-galeria e Reflorestamentos em Floresta Estacional Semidecidual. **Fonte:** Radam Brasil.....09
- Figura 3.** Exemplar de *H. wheatlandii* coletado no rio Santo Antônio dentro do perímetro urbano, município de Ferros - Minas Gerais. Barra de escala: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.....10
- Figura 4.** Mapa representando os projetos de pequenas centrais hidrelétricas (PCH) e usinas hidrelétricas (UHE) em diferentes etapas de licenciamento ambiental. O rio Santo Antônio possui duas UHE em operação: Porto Estrela e Salto Grande; três DRS: Ouro Fino, Sete Cachoeiras e Ferradura; duas com Projeto Básico Aceito (PB): Ferros e Porcos; e uma Construção não iniciada: Sumidouro. O rio Guanhões possui três PCH em Operação: Funil, Dolores de Guanhões e Senhora do Porto; e uma Construção com Outorga: Jacaré. O rio do Tanque possui uma UHE em Operação: Dona Rita; e duas com Eixo Inventariado: Sapé e Cabeça de Boi. O rio do Peixe possui três com Eixo Inventariado: Santa Rita (km 14,8), Axupé (km 26,2) e São João; duas com a Construção não iniciada: Brejaúba e Monjolo. **Fonte:** ANEEL, 2018.....11
- Figura 5.** *Hypomasticus thayeri*. **Fonte:** Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção Volume VI, 2018.....12
- Figura 6.** Exemplar de *Steindachneridion doceanum*, coletado no rio Santo Antônio, município de Ferros - Minas Gerais. Barra de escala: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.....13
- Figura 7.** Exemplar de *Brycon cf. opalinus*, coletado no rio do Tanque próximo ao rio Santo Antônio, município de Ferros – Minas Gerais. Barra de escala: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.....14
- Figura 8.** Locais de ocorrência do *H. wheatlandii* (andirá), *S. doceanum* (surubim-do-doce), *B. opalinus* (piabanha) e *H. thayeri* (timburé), segundo Vieira, 2006. Locais de amostragem: (1) confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio; (2) Rio do Tanque; (3) perímetro urbano de Ferros – MG; (4) confluência rio do Peixe; (5) confluência rio Preto do Itambé; (6) Rio Preto do Itambé. **Fonte:** ICMBio/CEPTA, 2019.....16
- Figura 9.** (1) confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio; (2) Rio do Tanque; (3) ponto de coleta dentro do Município de Ferros - MG; (4) confluência rio do Peixe com rio Santo Antônio; (5) confluência rio Preto do Itambé com rio Santo Antônio; (6) Rio Preto do Itambé. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.....17
- Figura 10.** A) Uso de tarrafa; B) Coleta no perímetro urbano utilizando vara de fibra com molinete e anzóis; C) Verificação de redes de emalhar; D) Armando varas de espera ao amanhecer; E) Fase larval de Megalóptero, principal isca utilizada durante as coletas; F) Fase larval de Megalóptero conhecido popularmente por lacraia.....18

<b>Figura 11.</b> A) Piscina circular inflável destinada para aclimação dos peixes; B) Peixes coletados e acondicionados em piscina inflável para aclimação; C) Tanque de transporte de peixes com oxigenação.....	19
<b>Figura 12.</b> A) Sistema recirculação de água utilizado para realizar a quarentena dos peixes coletados; B) Tanque de alvenaria empregado para a acondicionar os peixes da bacia do Rio Doce. <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	20
<b>Figura 13.</b> A) Ração extrusada para peixes onívoros com granulometria de 2,6 mm; B) Ração em peletes para peixes carnívoros de fundo. <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	20
<b>Figura 14.</b> A) Ultrassom digital Esaote S. p.a., Mylab 30 Vet, Genova, Itália; B) Realização de exame de ultrassom com transdutor linear multifrequencial em <i>S. doceanum</i> . <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	22
<b>Figura 15.</b> Visão da câmara de Neubauer, para contagem de sêmen. São contabilizados apenas os espermatozoides presentes nos quadrantes externos e o quadrante central (numerados na imagem de 1 a 5). <b>Fonte:</b> Braukaiser.....	23
<b>Figura 16.</b> (1) confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio; (2) Rio do Tanque; (3) ponto de coleta dentro do Município de Ferros - MG; (4) confluência rio do Peixe com rio Santo Antônio; (5) confluência rio Preto do Itambé com rio Santo Antônio; (6) Rio Preto do Itambé. <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	27
<b>Figura 17.</b> A) Diafanização de nadadeira anal de Macho de <i>H. wheatlandii</i> com presença de espículas na nadadeira anal, setas indicando as espículas; B) Diafanização de nadadeira anal de Fêmea de <i>H. wheatlandii</i> sem a presença de espículas na nadadeira anal. Escala dos peixes: 1 cm. <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	29
<b>Figura 18.</b> Imagem gerada pelo plugin CASA descrevendo a trajetória dos espermatozoides de <i>H. wheatlandii</i> , exemplar 1.....	30
<b>Figura 19.</b> Imagem gerada pelo plugin CASA descrevendo a trajetória dos espermatozoides de <i>H. wheatlandii</i> , exemplar 2.....	31
<b>Figura 20.</b> Cariótipo de <i>H. wheatlandii</i> obtidas a partir de cultivo celular. <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	32
<b>Figura 21.</b> A) Macho de <i>S. doceanum</i> com papila urogenital externa; B) Fêmea de <i>S. doceanum</i> sem a presença de papila urogenital externa. Setas indicando a papila. <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	33
<b>Figura 22.</b> Setas indicando ovários desenvolvidos em fêmea de <i>S. doceanum</i> . <b>Fonte:</b> Hatus O. Siqueira, 2018.....	34
<b>Figura 23.</b> Bacia do Rio Santo Antônio. Unidades de conservação atuais de Uso Sustentável e Proteção Integral e proposta de uma nova unidade de conservação ao longo do Rio Santo Antônio. <b>Fonte:</b> ICMBio/CEPTA, 2019.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de peixes ameaçadas de extinção e categorias de ameaças.....	07
<b>Tabela 2.</b> Coordenadas UTM dos locais de amostragem no rio Santo Antônio e seus tributários. Datum SIRGAS 2000, fuso 23 S.....	17
<b>Tabela 3.</b> Valores médios obtidos dos parâmetros espermáticos médios da espécie Andirá ( <i>H. wheatlandii</i> ) .....	30

## RESUMO

Alterações ambientais provocadas por atividades agropecuárias, barramentos, expansão urbana e poluição figuram entre as principais ameaças à conservação da ictiofauna no País. Na bacia do rio Doce, por exemplo, 9 de suas 70 espécies encontram-se listadas na portaria MMA 445/2014. O rompimento da barragem de rejeitos de mineração de Fundão, ocorrido em 2015, pode ter ocasionado uma piora no estado de conservação de algumas dessas espécies, bem como a inclusão de outras nas categorias de ameaças. Assim, torna-se imperativo a realização de estudos e ações para a conservação desses peixes. Entre as áreas reconhecidas como relevantes para a conservação da ictiofauna do rio Doce destaca-se a bacia do rio Santo Antônio. O presente trabalho teve como objetivo realizar estudos focados em biologia básica e reprodutiva para fornecer subsídios a conservação das espécies ameaçadas de extinção endêmicas da bacia do rio Doce. As coletas foram realizadas no rio Santo Antônio no Município de Ferros – MG. Foram coletados espécimes de *Hemichilus wheatlandii*, *Steindachneridion doceanum* e *Brycon opalinus* os quais foram encaminhados ao ICMBio/CEPTA e mantidos em tanques e viveiros com renovação constante de água. Entre as espécies capturadas, *H. wheatlandii* foi a mais abundante com indicativos de possuir uma população saudável. As demais espécies foram menos abundantes e possivelmente podem estar em declínio na região. Os juvenis de *H. wheatlandii* se mostram sensíveis a variações de temperatura e a infestação por *Ichthyophthirius multifiliis*. Por outro lado, os indivíduos adultos das três espécies coletadas se adaptaram rapidamente as condições de cativeiro. No presente estudo foram caracterizados aspectos de diferenciação sexual secundária, motilidade espermática e análise cromossômica das espécies. Além disso, foi elaborado uma proposta de unidade de conservação para proteger os habitats necessários a manutenção de quatro espécies ameaçadas de extinção.

**Palavras-chave:** espécies ameaçadas, banco genético, unidades de conservação, endemismo

## ABSTRACT

Environmental changes caused by agricultural activities, buses, urban sprawl, and pollution are among the main threats to ichthyofauna conservation in the country, as an example, 9 out of 70 species of the Doce river basin are listed in MMA 445/2014 ordinance. The Fundão mining tailings dam rupture of 2015 may have led to aggravation in the conservation status of some of these species, as well as the inclusion of others in higher threat categories. Thus, it is imperative to develop studies and actions for these fish conservation. Among the areas of Doce river basin that are recognized as relevant for ichthyofauna conservation, Santo Antônio river basin takes a place of highlight. Our work aimed to develop studies focused on species basic reproductive biology to provide support for the conservation of endangered endemic species of the Doce river basin. The collections were done in Santo Antônio river, located in Ferros – MG. Specimens collected of *Henochilus wheatlandii*, *Steindachneridion doceanum*, and *Brycon opalinus* were sent to ICMBio / CEPTA and kept in tanks with constant water renewal. Among the species captured, *H. wheatlandii* was the most abundant, with indications of having a healthy population. The other species were less abundant and possibly may be declining in the region. The *H. wheatlandii* juveniles showed to be sensitive to temperature variations and infestation by *Ichthyophthirius multifiliis*. On the other hand, the adults of the other three species adapted quickly to captivity conditions. In our study, we characterized aspects of secondary sexual dimorphism, sperm motility and chromosomal analysis of the species. In addition, a conservation unit proposal was developed to protect the habitats needed for the maintenance of four threatened species.

**Key words:** endangered species, genetic bank,, conservation units, endemism

## 1. INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce da América do Sul é composta por aproximadamente 5.200 espécies descritas, o que a torna a mais diversa da Terra (REIS *et al.*, 2016). Desse número, pelo menos 3.148 ocorrem nos sistemas hidrográficos brasileiros (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018). No entanto, muitas dessas espécies correm o risco de desaparecerem em decorrência de ações humanas.

Na avaliação do estado de conservação conduzida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade foi verificado que 10% das espécies de peixes encontram-se sobre alguma categoria de ameaça de extinção (BRASIL, 2014). As alterações ambientais provocadas por atividades agropecuárias, barramentos, expansão urbana, poluição e pesca, foram relacionados, nessa ordem, como os principais vetores de ameaça à conservação da ictiofauna (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018).

Reduzir ou mitigar esses vetores de ameaça são tarefas desafiadoras que exigem ações políticas, científicas e educacionais, além da definição das melhores estratégias de conservação, com componentes *in situ*, como o estabelecimento de áreas protegidas e corredores ecológicos, e *ex situ*, como o criação de bancos genéticos (REIS *et al.*, 2016).

### ***1.1. Bacia do Rio Doce***

A bacia do rio Doce está localizada na região Sudeste do Brasil com uma área de drenagem de 82.646 Km<sup>2</sup>, sendo 86% do seu território no Estado de Minas Gerais e 14% no Espírito Santo (Fig. 1). É dividida em três porções: Alto rio Doce, da cabeceira até a foz do Rio Matipó, Médio rio Doce, da foz do Rio Matipó até a divisa dos estados MG/ES, e baixo rio Doce, de Baixo Guandu e Aimorés até a foz no povoado de Regência, Linhares/ES (VIEIRA, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

O bioma de Mata Atlântica ocupa cerca de 98% da bacia do rio doce e o restante 2% pertence ao bioma de Cerrado. A vegetação original da bacia era composta principalmente por Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa, com grandes matas ciliares (BORGIO *et al.*, 1996) atualmente, essa vegetação ocupa apenas 7% da área da bacia (ROMEIRO *et al.*, 2012). Embora tenha sido em grande parte destruída é considerada um dos

25 *hotspots* mundiais de biodiversidade, abrigando mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (MYERS *et al.*, 2000).

O Cerrado ocupa cerca de 2% da bacia do rio Doce e destaca-se por uma vegetação com fisionomia e flora típicas, sendo esta uma unidade ecológica característica de zonas tropicais (PINTO, 1994). A área que o bioma abrange é coberta por cerca de 85% de vegetação com fisionomia de savana e densidades variadas. Além dessa vegetação apresenta áreas florestadas de fundo de vale, veredas e manchas de floresta em áreas mais elevadas das bacias hidrográficas (PINTO, 1994).

O principal rio da bacia, o Doce, nasce no município de Ressaquinha, MG, a 1120 m de altitude, tem extensão de 853 quilômetros e estende-se por território mineiro e capixaba (Fig. 1). Em Minas Gerais, tem como principais afluentes os rios Xopotó, Casca, Matipó, Cuieté e Manhuaçu, pela margem direita, e os rios Piracicaba, Santo Antônio, Corrente Grande e Suaçuí Grande, pela margem esquerda. A porção capixaba do rio Doce tem como principais afluentes os rios Pancas, Mutum e São João Grande, pela margem esquerda, e Guandu, Santa Joana e Santa Maria do rio Doce, pela margem direita (VIEIRA, 2010).

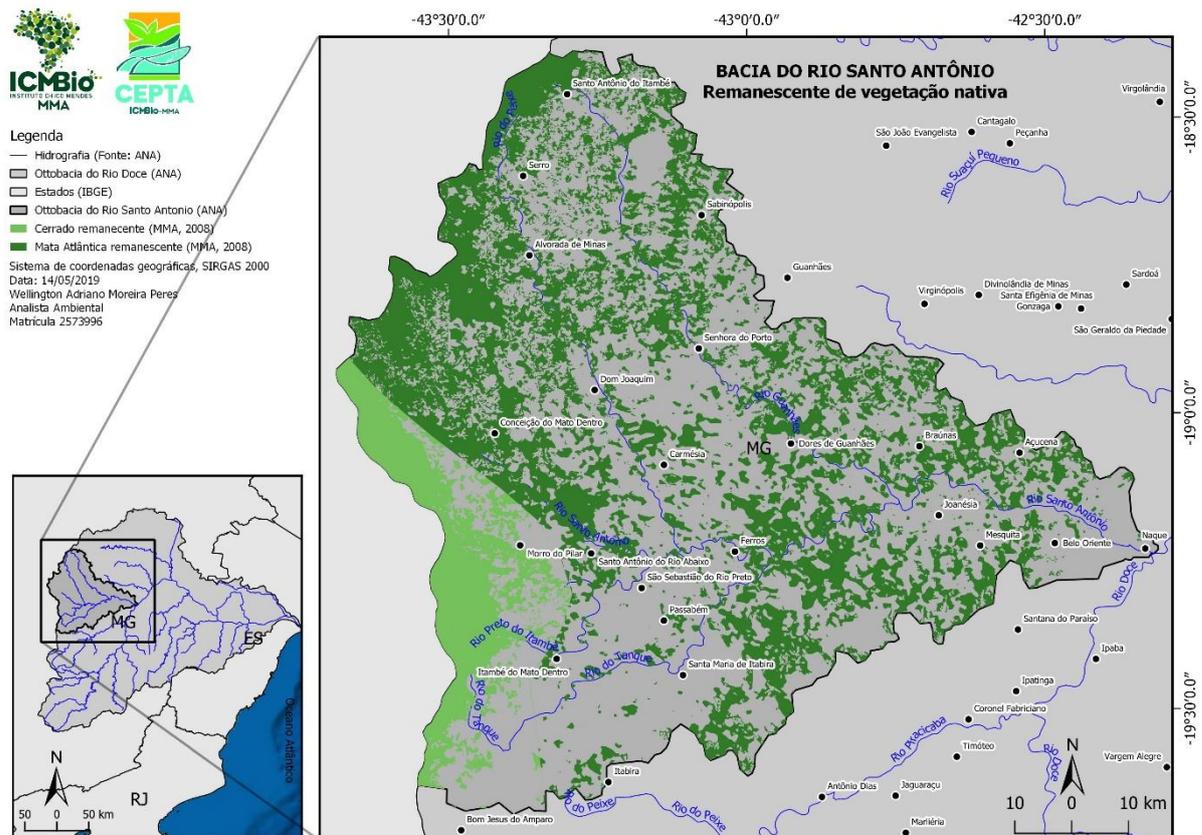
A ictiofauna desse sistema hidrográfico é representada por 71 espécies nativas, sendo 26 Characiformes, três Cyprinodontiformes, dois Gymnotiformes, nove Perciformes, 30 Siluriformes e um Symbranchiformes, além de 28 espécies exóticas (VIEIRA, 2010). Entre as espécies nativas, nove são listadas como ameaçadas de extinção conforme a portaria MMA 445/2014 (BRASIL, 2014) (Tab. 1).

**Tabela 1.** Espécies de peixes ameaçadas de extinção com ocorrência na bacia do Rio Doce. Categorias de ameaças: VU = Vulnerável; EN = Em perigo; CR = Criticamente em perigo; PEX = Potencialmente extinta.

<b>Espécie</b>	<b>Categoria</b>
<i>Brycon dulcis</i> Lima & Vieira	EN
<i>Brycon opalinus</i> (Cuvier, 1819)	VU
<i>Hemichilus wheatlandii</i> Garman 1890	CR
<i>Hypomasticus thayeri</i> (Borodin 1929)	EN
<i>Pareiorhaphis nasuta</i> Pereira, Vieira & Reis 2007	CR
<i>Pareiorhaphis scutula</i> Pereira, Vieira & Reis 2010	EN
<i>Potamarius grandoculis</i> (Steindachner 1877)	CR (PEX)
<i>Prochilodus vimboides</i> Kner 1859	VU
<i>Steindachneridion doceanum</i> (Eigenmann & Eigenmann 1889)	CR

## 1.2. Bacia do Rio Santo Antônio

A bacia hidrográfica do rio Santo Antônio, com área de 10.603,95 km<sup>2</sup>, faz parte do sistema hidrográfico do Rio Doce (Fig. 1). Sua nascente está localizada na Serra do Espinhaço no Município de Conceição do Mato Dentro - MG. O rio Santo Antônio apresenta quatro principais tributários, em sua margem esquerda o rio do Peixe e rio Guanhões, e na margem direita o rio do Tanque e o rio Preto do Itambé, sendo drenada por outros rios de pequeno porte (CBH - SANTO ANTÔNIO, 2019).



**Figura 1.** Remanescentes de vegetação nativa na bacia hidrográfica do rio Santo Antônio; observa-se os biomas Cerrado e Mata Atlântica, cerrado com dominância na Serra do Espinhaço e próximo as nascentes dos rios Preto do Itambé e Tanque. O bioma de Mata Atlântica apresenta distribuído em fragmentos em diversas partes da bacia hidrográfica. **Fonte:** MMA, 2019.

A bacia do rio Santo Antônio está inserida nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, em razão da expansão agropecuária a área da vegetação nativa de Mata Atlântica foi reduzida a menos de 40% do original e a área de Cerrado a cerca de 56% (Fig. 1). Além da redução de área verifica-se que a vegetação nativa foi severamente fragmentada, o que intensifica a degradação e conseqüente redução de biodiversidade. Na área da bacia predomina as fitofisionomias de Floresta Estacional Semidecidual e Savana em contato com Floresta Estacional (Fig. 2).



e alguns de seus principais afluentes, como o rio do Peixe, rio do Tanque e rio Preto do Itambé (VIEIRA, 2006).

Espécie caracterizada como onívora generalista, com diferentes alterações na dentição durante o seu desenvolvimento até a fase adulta. Exemplares em fase juvenil possuem dentes com muitas cúspides pontiagudas, trato digestório comprido medindo quase o tamanho do comprimento padrão e dieta baseada inicialmente em larvas de Chironomidae. Posteriormente, com o aumento do tamanho consequentemente o trato digestório altera e seu comprimento medindo duas vezes mais que o comprimento padrão, alterando a dieta inicialmente para fragmentos de macrófitas ripárias semi-submersas (CASTRO *et al.*, 2004). Na fase adulta seus dentes são espatulados com grande cúspide mediana arredondada distalmente, trato digestório entorno de três vezes maior que comprimento padrão e a dieta sendo constituída por sementes, flores e fragmentos de folhas e caules de podostemáceas (CASTRO *et al.*, 2004). Por serem espécies com essas peculiaridades alimentares, a remoção da vegetação ripária, o assoreamento e a poluição por efluentes doméstico ameaçam a sobrevivência dessa espécie (VIEIRA, F.; CASTRO, R.M.C. & ALVES, 2008; INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018 ).



**Figura 3.** Exemplar de *H. wheatlandii* coletado no rio Santo Antônio dentro do perímetro urbano, município de Ferros - Minas Gerais. Barra de escala: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

Outro importante vetor de ameaça ao *H. wheatlandii* são as barragens de hidrelétricas que afetam diretamente a dinâmica do rio, formando grandes reservatórios e descaracterizando o habitat necessário a sobrevivência da espécie. Os reservatórios ainda propiciam a dominância de espécies exóticas ou alóctones e espécies de ambientes lênticos, o que altera as relações ecológicas entre as espécies, com consequente redução de diversidade (VIEIRA; DOS SANTOS POMPEU, 2001). Na bacia do rio Santo Antônio há atualmente em operação três pequenas centrais hidrelétricas (PCHs), ao longo do rio Guanhões, uma UHE no rio do Tanque



2006; VIEIRA, F.; BIRINDELLI, 2008); e no rio Pardo, afluente do rio Itaperimirim no estado do Espírito Santo (VIEIRA, F.; BIRINDELLI, 2008; VIEIRA; GASPARINI; MACIEIRA, 2014). Na bacia do rio Santo Antônio ocorre também no rio Preto do Itambé em trechos encachoeirados, com fundos rochosos e com vegetação ripária.

A dieta de *H. thayeri* é basicamente composta por invertebrados aquáticos, invertebrados terrestres, algas e sedimentos. É uma espécie porte médio as fêmeas sendo ligeiramente maiores que os machos medindo aproximadamente 26 cm de comprimento total (VIEIRA, 2006). A reprodução da espécie ocorre nos meses chuvosos entre novembro e dezembro, período que são coletados espécimes com as gônadas em desenvolvimento avançando (VIEIRA; GASPARINI; MACIEIRA, 2014).

Os principais vetores de ameaças a *H. thayeri* estão relacionados a descaracterização dos ambientes pela urbanização, exploração agropecuária e construção de barragens para geração de energia. Na bacia do rio Santo Antônio as principais ameaças estão relacionadas aos barramentos (VIEIRA, F.; BIRINDELLI, 2008), e caso todos os empreendimentos previstos para a região sejam implementados a espécie poderá desaparecer na bacia.



Foto: Tiago Casarim Pessali

**Figura 5.** *Hypomasticus thayeri*. **Fonte:** Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção Volume VI, 2018.

### ***Steindachneridion doceanum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889)**

*Steindachneridion doceanum*, cujo denominação popular é surubim-do-doce (Fig. 6), pertence a ordem Siluriformes, família Pimelodidae. São peixes com hábitos noturnos e habitats específicos, ocorrendo em locais de maior profundidade com fortes corredeiras e fundos rochosos (GARAVELLO, 2005; VIEIRA, 2006). De acordo com (GARAVELLO, 2005) foi observado indivíduos com 42 cm de comprimento total e (VIEIRA, 2006) observou indivíduos com até 17 kg, porém não foi mencionado o comprimento total. O hábito alimentar é predominantemente ictiófago, ou seja, alimentam-se principalmente de peixes de pequeno e médio porte (GARAVELLO, 2005; VIEIRA, 2006). Apresenta distribuição na bacia do rio Doce (GARAVELLO, 2005; LUNDBERG, 2003; VIEIRA, F.; CASTRO, R.M.C. & ALVES,

2008; VIEIRA, 2006) e possivelmente na bacia do rio Mucuri (VIEIRA, F.; DOS SANTOS POMPEU; GARAVELLO, J. C. 2008). Informações de distribuição do *S. doceanum* na bacia do rio Doce se resumem apenas em três localidades, todas em Minas Gerais: médio rio Santo Antônio, rio Piranga e no baixo rio Manhuaçu (VIEIRA, 2006).

Encontra-se atualmente, na lista de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção com a categoria (CR) criticamente em perigo (ICMBIO, 2018). As principais ameaças são semelhantes às encontradas por todas as espécies de peixes de ambientes lóticos, sendo a descaracterização da vegetação ripária, que causa o assoreamento de trechos que estas espécies habitam e a redução de alimento para outras espécies de peixes menores, principal fonte alimentar do *S. doceanum*. Outras ameaças são as construções barramentos hidrelétricos que alteram a dinâmica fluvial e descaracteriza as habitats necessários à espécie (VIEIRA, 2006). Da mesma forma a introdução de espécies exóticas e alóctones, tendo como exemplo o híbrido de *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*, que são espécies de surubim de grande porte e alimentam-se dos mesmos recursos alimentares do surubim-do-doce, ameaçam a sobrevivência da espécie (VIEIRA, 2006; INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018).



**Figura 6.** Exemplar de *Steindachneridion doceanum*, coletado no rio Santo Antônio, município de Ferros - Minas Gerais. Barra de escala: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

### ***Brycon opalinus* (Cuvier, 1819)**

*Brycon opalinus*, conhecida popularmente como piabanha (Fig. 7) consta na lista da fauna ameaçada de extinção na categoria vulnerável (VU) junto com outras sete espécies do gênero *Brycon*, é uma espécie de peixe da ordem (Characiformes) e família (Bryconidae) (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018). A *Brycon opalinus*

apresenta comprimento médio dos machos de 17,2 a 28,3 cm e as fêmeas de 17,8 a 35,8 cm (GOMIERO *et al.*, 2007).

Os espécimes do gênero *Brycon* são caracteristicamente diurnos e possuem hábito alimentar onívoro, ocorrendo geralmente em corredeiras abaixo de árvores frutíferas, algumas do gênero *Ficus*, que margeiam ou que entram em contato com a água do rio, tornando-os um dos grandes dispersores de sementes (PRANCE; GOULDING, 1981; HORN, 1997; BANACK; HORN; GAWLICKA, 2002; DREWE *et al.*, 2004).

A espécie apresenta distribuição geográfica nas bacias dos rios Paraíba do Sul e Doce, ocorrendo em drenagens pouco antropizadas próxima as cabeceiras com trechos encachoeirados e vegetação ripária preservada (OYAKAWA *et al.*, 2011). Porém, está restrita à alguns tributários mais preservados, com pouca descaraterização do ambiente (LIMA, 2003).



**Figura 7.** Exemplar de *Brycon*. cf. *opalinus*, coletado no rio do Tanque próximo ao rio Santo Antônio, município de Ferros – Minas Gerais. Barra de escala: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

Os ambientes ripários são importantes para a dinâmica e manutenção dessa espécie em razão do seu hábito alimentar onívoro dependente de frutos, sementes, invertebrados e pequenos vertebrados que habitam a vegetação (VIEIRA, 2006; GOMIERO; MANZATTO; BRAGA, 2008). Assim, o principal vetor de ameaça a *B. opalinus* está ligado a descaraterização dessa vegetação ripária, além dos barramentos, assoreamento e poluição (HILSDORF; PETRERE JR, 2002; INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Identificar um conjunto de estratégias de conservação para peixes ameaçados de extinção da bacia do rio Santo Antônio, Minas Gerais.

### 2.2. Objetivos específicos

- Coletar quatro espécies de peixes ameaçadas de extinção da bacia do rio Santo Antônio, *Hemichilus wheatlandii*, *Steindachneridion doceanum*, *Brycon opalinus* e *Hypomasticus thayeri*.
- Formar um banco genético “*ex situ*” de espécies de peixes ameaçadas da bacia do rio Santo Antônio, *Hemichilus wheatlandii*, *Steindachneridion doceanum*, *Brycon opalinus* e *Hypomasticus thayeri*.
- Realizar estudos da biologia reprodutiva básica das espécies *Hemichilus wheatlandii*, *Steindachneridion doceanum*.
- Propor estratégias de conservação incluindo a delimitação de Unidade de Conservação Fluvial para o rio Santo Antônio.

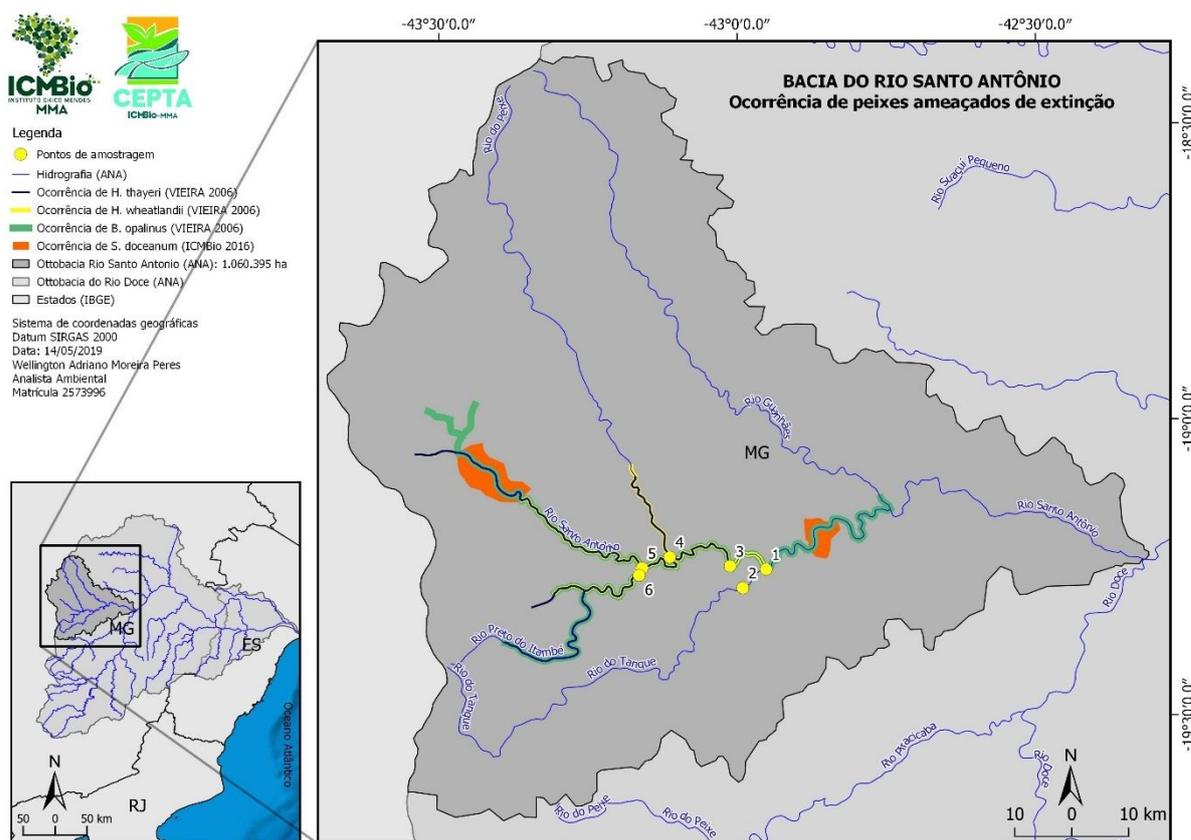
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Expedições de coleta

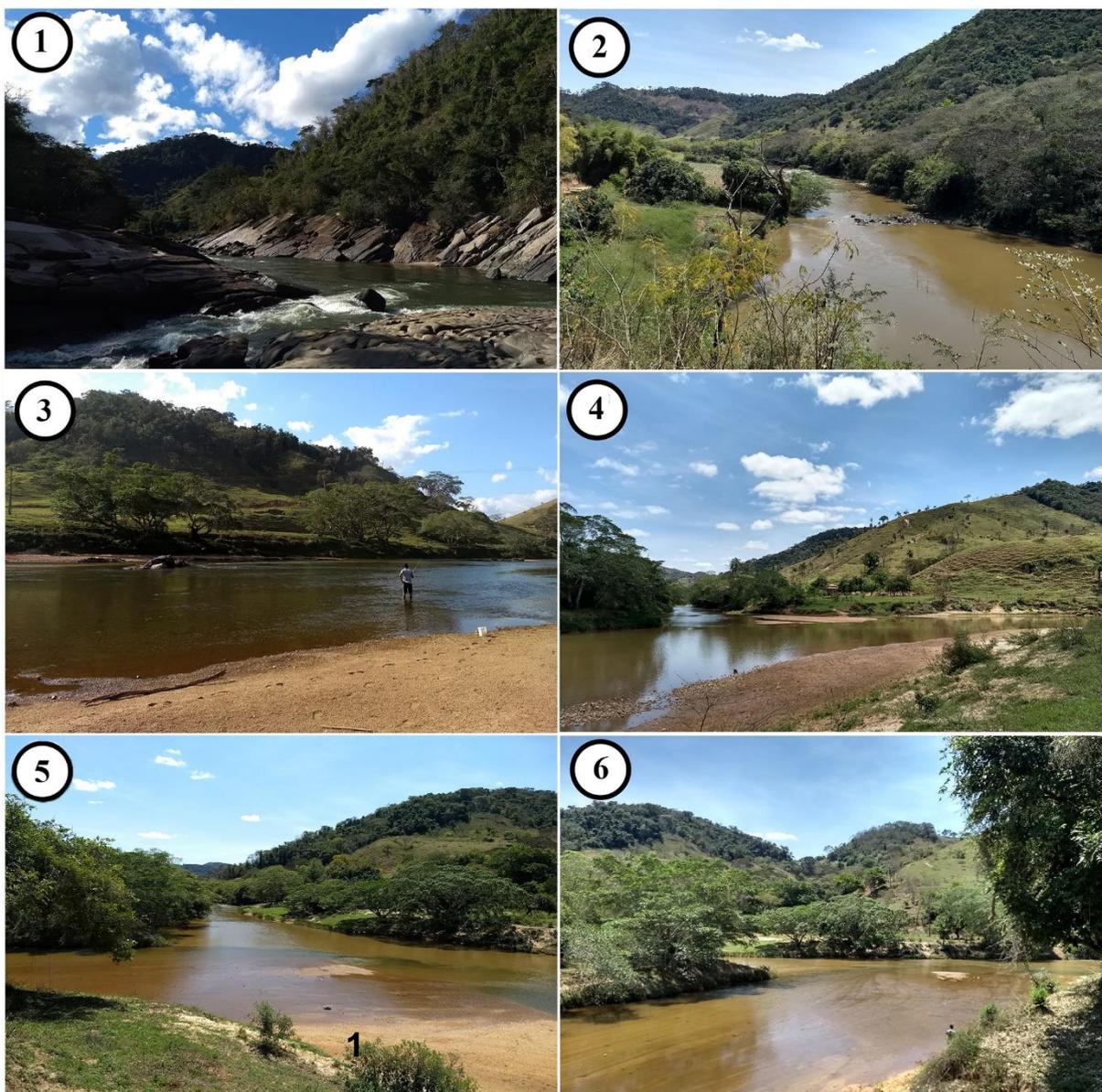
Foram realizadas cinco expedições de coleta, perfazendo-se um esforço amostral de 83 dias, sendo 15 dias (novembro/dezembro/2017), quatro dias (fevereiro de 2018) 20 dias (junho e julho/2018), 29 dias (setembro/outubro de 2018) e 15 dias (novembro de 2018).

#### 3.2 Locais de coleta

Os locais de coleta foram selecionados considerando a distribuição das espécies alvo, segundo Vieira (2006) (Fig. 8). As coletas foram realizadas no rio Santo Antônio, rio do Tanque, rio do Peixe e rio Preto do Itambé (Fig. 8 e 9) e conforme a tabela 2.



**Figura 8.** Locais de ocorrência do *H. wheatlandii* (andirá), *S. doceanum* (surubim-do-doce), *B. opalinus* (piabanha) e *H. thayeri* (timburé), segundo Vieira, 2006. Locais de amostragem: (1) confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio; (2) Rio do Tanque; (3) perímetro urbano de Ferros – MG; (4) confluência rio do Peixe; (5) confluência rio Preto do Itambé; (6) Rio Preto do Itambé. **Fonte:** ICMBio/CEPTA, 2019.



**Figura 9.** (1) confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio; (2) Rio do Tanque; (3) ponto de coleta dentro do Município de Ferros - MG; (4) confluência rio do Peixe com rio Santo Antônio; (5) confluência rio Preto do Itambé com rio Santo Antônio; (6) Rio Preto do Itambé. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

**Tabela 2.** Coordenadas UTM dos locais de amostragem no rio Santo Antônio e seus tributários. Datum SIRGAS 2000, fuso 23 S.

Ponto	X	y
1. Confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio	715308,77	7869757,27
2. Rio Tanque	711172,8	7866339,67
3. Perímetro urbano do Município de Ferros	708976,75	7870436,11
4. Confluência do rio do Peixe	698364	7872205,92
5. Confluência rio Preto do Itambé	693466,39	7870232,41
6. Rio Preto do Itambé	692929,51	7868883,07

### 3.3 Coleta e Transporte

Todos os procedimentos de coletas e transportes foram realizados de acordo com a licença de coleta previamente obtida junto ao ICMBio (Sisbio # 60308-2). As coletas foram realizadas utilizando tarrafas com malhas variando de 2 a 4 cm entre nós oposto, redes de arrasto com malhas de 0,5 cm e varas de fibra de carbono equipadas com carretilha, molinetes, linhas e anzóis de diferentes tamanhos.

Para a coleta de *H. wheatlandii*, *B. opalinus* e *H. thayeri* foram realizadas coletas no período diurno, com a utilização de todos os apetrechos supracitados (Fig. 10). Já para a obtenção de *S. doceanum* foram realizadas coletas nos períodos de 17 h às 22 h e das 4 h às 8 h, sempre com 20 anzóis de espera e varas com molinete, iscados com larvas de insetos, minhocas e pequenos peixes (Fig. 10).



**Figura 10.** A) Uso de tarrafa; B) Coleta no perímetro urbano utilizando vara de fibra com molinete e anzóis; C) Verificação de redes de emalhar; D) Armandando varas de espera ao amanhecer; E) Fase larval de Megalóptero, principal isca utilizada durante as coletas; F) Fase larval de Megalóptero conhecido popularmente por lacraia.

Após a coleta os peixes foram transportados e mantidos em piscina inflável circular com capacidade de 1,4 m<sup>3</sup>, com renovação de água constante (Fig. 11 A, B). Neste período de aclimatação foi fornecido alimento artificial extrusado para peixes onívoros (36% PB e 4800 kcal kg<sup>-1</sup>, NEOVIA<sup>®</sup>) com granulometria de 2,6 mm, pequenos peixes e minhocas duas a três vezes no dia. Para o tratamento profilático foi adicionada a água oxitetraciclina na concentração

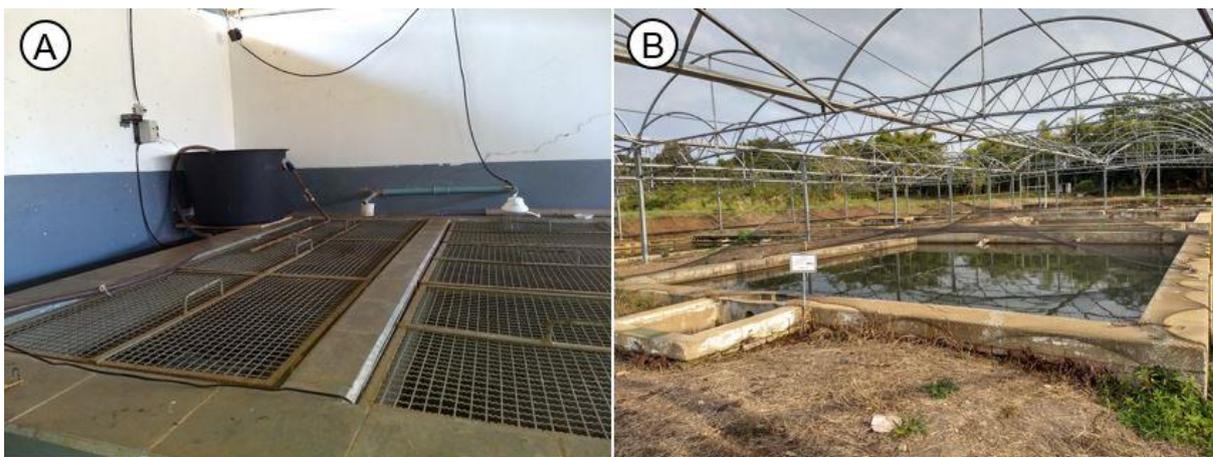
de 3,5 mg/L e sal mineral na concentração de 0,3 g/L por um período de 10 dias. Ao final da expedição, os peixes foram transportados para ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental, ICMBio/CEPTA, localizado em Pirassununga, São Paulo. Para o transporte os peixes foram acondicionados em tanque com capacidade de 1 m<sup>3</sup> de água com oxigenação constante (Fig. 11 C).



**Figura 11.** A) Piscina circular inflável destinada para aclimação dos peixes; B) Peixes coletados e acondicionados em piscina inflável para aclimação; C) Tanque de transporte de peixes com oxigenação.

### ***3.4 Sistema de quarentena e Tanques de Alvenaria***

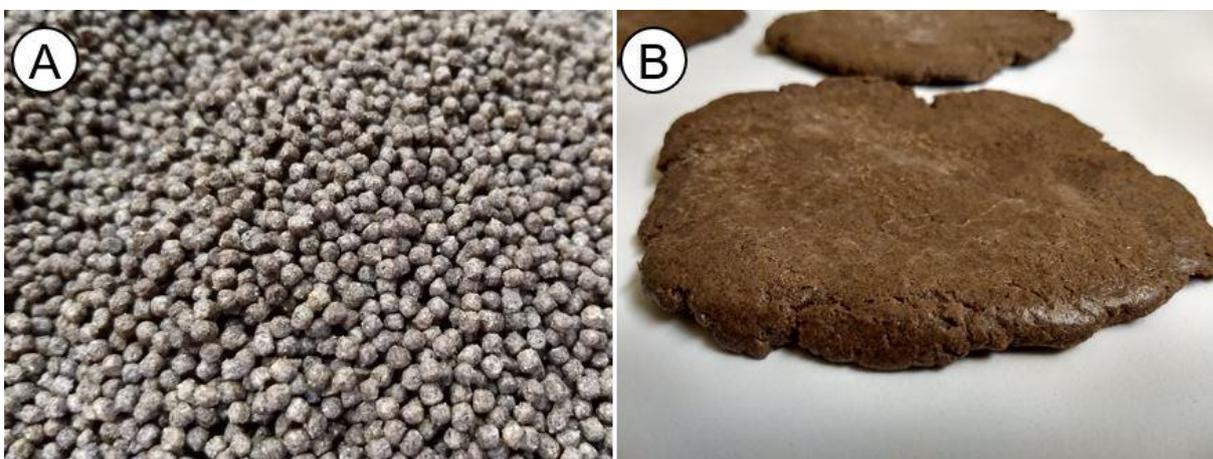
No ICMBio/CEPTA os peixes foram primeiramente mantidos em tanques artificiais com capacidade de 3,5 m<sup>3</sup> em sistema fechado de recirculação de água e controle de temperatura ajustada para 26° C e fotoperíodo de 11 horas/dia (Fig. 12 A). Após o período de quarentena e adaptação os peixes foram transferidos para tanques de alvenaria com 8 m<sup>2</sup> de lâmina d'água e capacidade de 96 m<sup>3</sup>, com renovação constante de água (Fig. 12 B). Esses tanques foram previamente secos e expostos ao sol por um período de dez dias e tratados com cal virgem (de 100 g a 150 g por m<sup>2</sup>) para a desinfecção.



**Figura 12.** A) Sistema recirculação de água utilizado para realizar a quarentena dos peixes coletados; B) Tanque de alvenaria empregado para a acondicionar os peixes da bacia do Rio Doce. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

### 3.5 Alimentação

Para os peixes onívoros foi fornecida duas vezes ao dia ração balanceada extrusada com granulometria de 2,6 mm, 36% de proteína bruta e valor energético de 4800 kcal kg<sup>-1</sup> (NEOVIA®) (Fig. 13 A). Para o *S. doceanum*, que é uma espécie carnívora, foi fornecida ração de fundo com 55% de proteína bruta e valor energético de 810 kcal kg<sup>-1</sup> (NEOVIA®) (Fig. 13 B).



**Figura 13.** A) Ração extrusada para peixes onívoros com granulometria de 2,6 mm; B) Ração em peletes para peixes carnívoros de fundo. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

### **3.6 Estudos da biologia reprodutiva básica**

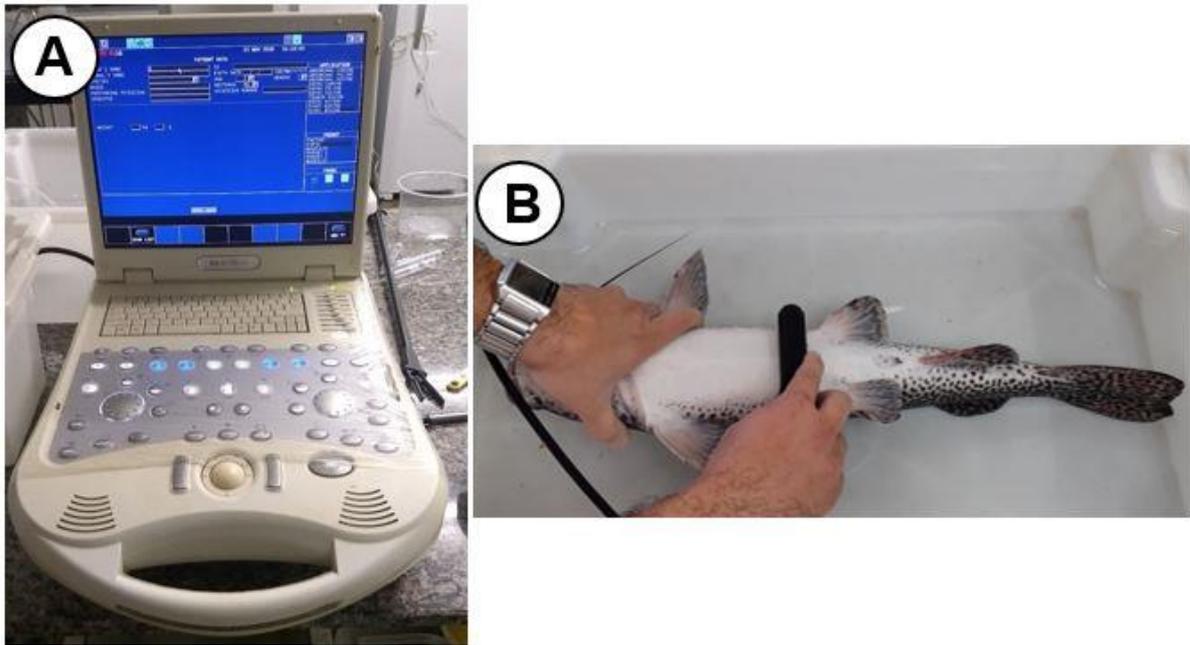
Por se tratar de estudos desenvolvidos em espécies de peixes ameaçadas de extinção, foram utilizados somente procedimentos não letais (ex: ultrassonografia, cultivo celular, etc.), tentando-se obter o máximo de informações sem que fosse necessária a eutanásia dos animais. Procedimentos que envolvem o sacrifício dos animais foram conduzidos apenas a partir de animais que vieram a óbito.

#### **3.6.1. Avaliação de características sexuais secundárias de *H. wheatlandii***

Para evidenciar as espículas sexuais de *H. wheatlandii* foi realizada a diafanização de nadadeiras anais de 19 exemplares. Foi utilizada a metodologia descrita por Pothoff (1984) com adaptações. Após a coleta as nadadeiras foram fixadas em formol a 10% por 24 horas, mantidas em água destilada por 48 horas e mantidas em solução corante de Azul de Alcian (10 mg de azul de alcian, 20 ml de ácido acético e 80 ml de etanol 95%), por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram inseridas em solução de Borato saturada (30 ml solução borato, 70 ml de água destilada e 1 g de tripsina) por 24 horas. Na última etapa da diafanização os ossos foram corados com corante Alizarina (0,5% KOH em solução de vermelho de alizarina) por 24 horas. As nadadeiras já diafanizadas foram preservadas em soluções crescentes de glicerina (Glicerina 25%, 50%, 75% e 100%, diluídas em KOH 0,5%) por 24 horas e em seguida mantidas em Glicerina + Timol.

#### **3.6.2. Avaliação de características sexuais secundárias de *S. doceanum***

Foram observados em espécimes de *S. doceanum* características sexuais secundárias que permitem a diferenciação de machos e fêmeas, através da visualização dos órgãos sexuais, para isso foram observados oito exemplares, sendo três fêmeas e cinco machos. Além de observações externas utilizamos aparelho de ultrassom digital (Esaote S. p.a., Mylab 30 Vet, Genova, Itália) com transdutor linear multifrequencial fixado na frequência de 7,5 e 60mm de largura de campo de feixe (Fig. 14 A, B), todas as imagens foram gravadas em fotos e vídeos.

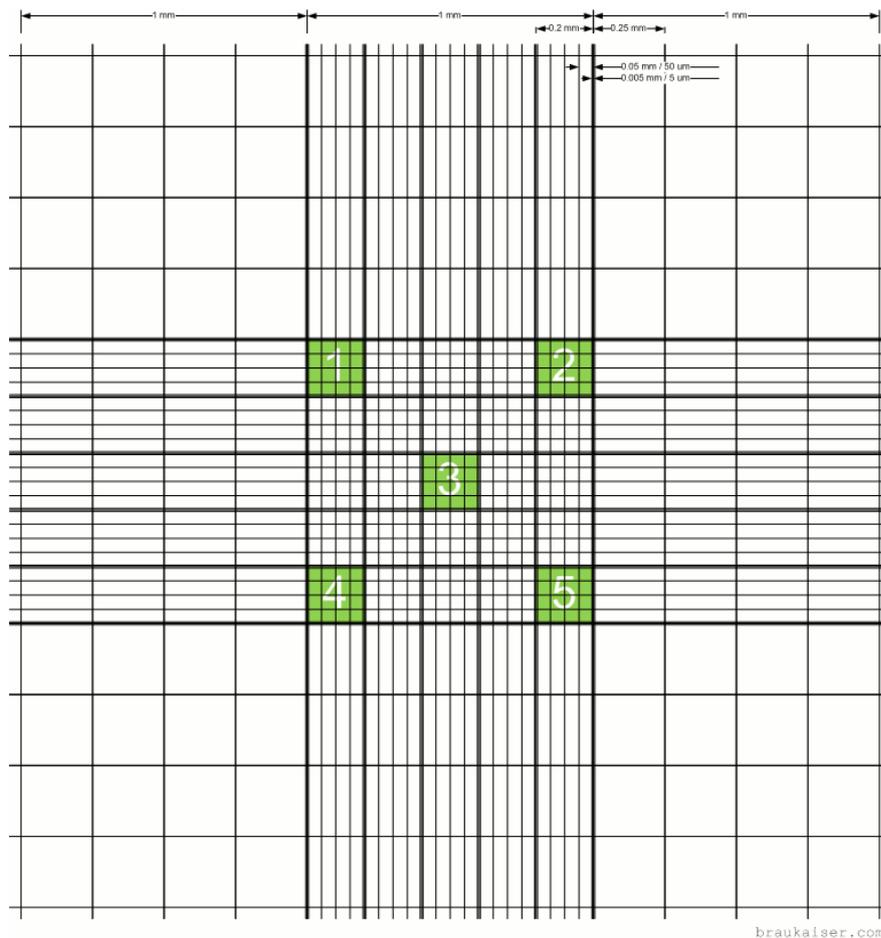


**Figura 14.** A) Ultrassom digital Esaote S. p.a., Mylab 30 Vet, Genova, Itália; B) Realização de exame de ultrassom com transdutor linear multifrequencial em *S. doceanum*. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

### 3.6.3. Caracterização do sêmen de *H. wheatlandii*

Dois machos selecionados receberam dose única de 2,0 mg Extrato Bruto de Hipófise de Carpa/kg de peixe. Após 8 horas da indução hormonal os peixes foram anestesiados em solução de eugenol na concentração de 70 mg/L de acordo com Junior *et al.*, 2014. O sêmen foi extrusado através de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal e coletado em tubo tipo falcon de 15 ml. Posteriormente, o sêmen foi diluído 1000x nas seguintes soluções imobilizadoras de espermatozoides: Ringer Modificada (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,1 mM MgCl<sub>2</sub>) (YASUI *et al.*, 2014); Solução de DPBS – (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma #SLBP5282V); e Solução de MEM – (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma #:021M8316). As soluções foram analisadas para verificar ausência ou presença de espermatozoides ativados (móveis). A solução DPBS apresentou a melhor eficiência na imobilização dos espermatozoides e assim foi escolhida para os demais experimentos.

Para a medida da concentração, o sêmen foi diluído em solução fixadora de formalina tamponada (1mL formalina; 5g NaHCO<sub>3</sub> em 100 mL H<sub>2</sub>O). Em uma diluição de 200x (5:995), em seguida adicionado em câmara de Neubauer (Fig. 15).



**Figura 15.** Visão da câmara de Neubauer, para contagem de sêmen. São contabilizados apenas os espermatozoides presentes nos quadrantes externos e o quadrante central (numerados na imagem de 1 a 5). **Fonte:** Braukaiser.

O cálculo da concentração foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{número total de células} \times 25^* \times 100.000 \times \text{diluição}^{**}$$

\*número total de células = total de espermatozoides nos cinco quadrantes

\*\*diluição = diluição utilizada 200x

Para a análise da motilidade a concentração da suspensão celular foi ajustada para  $3,6 \times 10^{-8}$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Posteriormente,  $1,0 \mu\text{L}$  dessa suspensão foi transferido para uma câmara de Makler (Sefi - Medical Instrument Ltd. Haifa, Israel), onde 0,1% de BSA (albumina bovina sérica) foi previamente aplicada, e logo após, a motilidade foi ativada adicionando-se  $9 \mu\text{L}$  de água destilada. As amostras foram observadas em microscópio óptico (Eclipse Ci, Nikon®, Japão) e seqüências de vídeos capturadas por uma câmera tipo CCD (Nikon DS-F1, Tokyo, Japão) e o software Nis-Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japão). As análises de motilidade foram realizadas através do aplicativo CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) instalado no

software imageJ® e adaptado para a espécie (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007), sendo verificado os seguintes parâmetros: motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de percurso (VAP) e velocidade de linha reta (VSL). Além disso, o tempo de motilidade, quando apenas 5% dos espermatozoides estão móveis desde a ativação, foi determinado pelo método subjetivo.

#### **3.6.4. Caracterização cariotípica de *H. wheatlandii***

Amostras de nadadeira caudal de três indivíduos de *H. wheatlandii* foram coletadas para realizar os cultivos celulares. Após a coleta com material cirúrgico, as nadadeiras foram transferidas para solução de Ringer suplementada com antibiótico e antimicótico. Em seguida as mostras foram transferidas para placas de cultivo celular de 35 mm contendo 1500 µL de meio de cultivo celular. O meio de cultivo utilizado foi Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM alta glicose Gibco #11995-065, suplementado com 10% de soro fetal bovino Gibco #12657-029, 2 mM de glutamina Sigma #G7513), 1 mM de piruvato Sigma #S8636, MEM vitaminas Sigma #M6895, MEM aminoácidos não essenciais Sigma #M7147 e solução de antibiótico e antimicótico Sigma #A5955. As amostras de caudas foram trituradas com auxílio de bisturi em pedaços de aproximadamente 1 mm, estas placas foram submetidas a uma nova tripsinização onde as amostras obtidas foram criopreservadas utilizando o meio de cultivo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma #D4540e 20% de soro fetal bovino (Gibco #12657-029), em alíquotas. Essas placas foram acondicionadas em uma incubadora em 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 30°C, em atmosfera com 100% de umidade. Foi realizada a troca total de meio a cada 3 dias e após as células atingirem 90% de confluência foram submetidas a tripsinização para transferência em placas de cultivo de 60 mm com 3 mL de meio de cultivo. Após atingirem confluência, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e suspensas em solução de criopreservação e alíquotas em criotubos. As amostras foram criopreservadas a -80°C, em CoolCell®LX (Biocision) e depois armazenadas em nitrogênio líquido – 180°C.

Para as análises de citogenética, os cultivos celulares foram realizados até atingirem 80% de confluência e neste estágio, as células foram tratadas com colchicina a 0,0016% e em seguida submetidas a tripsinização. As amostras foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. Os peletes obtidos foram homogeneizados em 5 mL de solução de KCl a 0,075 M e incubados a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionadas cerca de 10 gotas de fixador Carnoy (3:1 álcool metílico e ácido acético) e centrifugados a 500 x g por 10 minutos. O material sobrenadante foi descartado e os peletes foram suspensos em 5

mL de fixador. O último passo foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação as amostras foram homogeneizadas em 1,5 mL de fixador Carnoy e transferidas para microtubos para serem armazenadas em Freezer -20°C. Cerca de 60 µL de cada amostra foi pingada sobre lâminas devidamente limpas e com uma fina camada de fixador a temperatura de aproximadamente 60°C, em seguida estas lâminas foram coradas com Giemsa a 1% por 10 minutos e analisadas em microscópio óptico. As melhores metáfases foram capturadas com auxílio de uma câmera CCD (Ds-F1, Nikon, Tóquio, Japão) acopladas em microscópio óptico (Nikon Ni, Tóquio, Japão).

### ***3.7 Informações geográficas e delimitação de área de proteção***

As coordenadas UTM dos pontos de amostragem foram obtidas por meio do aparelho de GPS marca Garmin, modelo Etrex. A elaboração dos mapas e o processamento de dados espaciais seguiram técnicas usuais de sistema de informação geográfica no programa QGIS 2.18.20, QGIS 3.6.1, Google Earth 7.3.2.5491 e GPS TrackMaker 13.9.

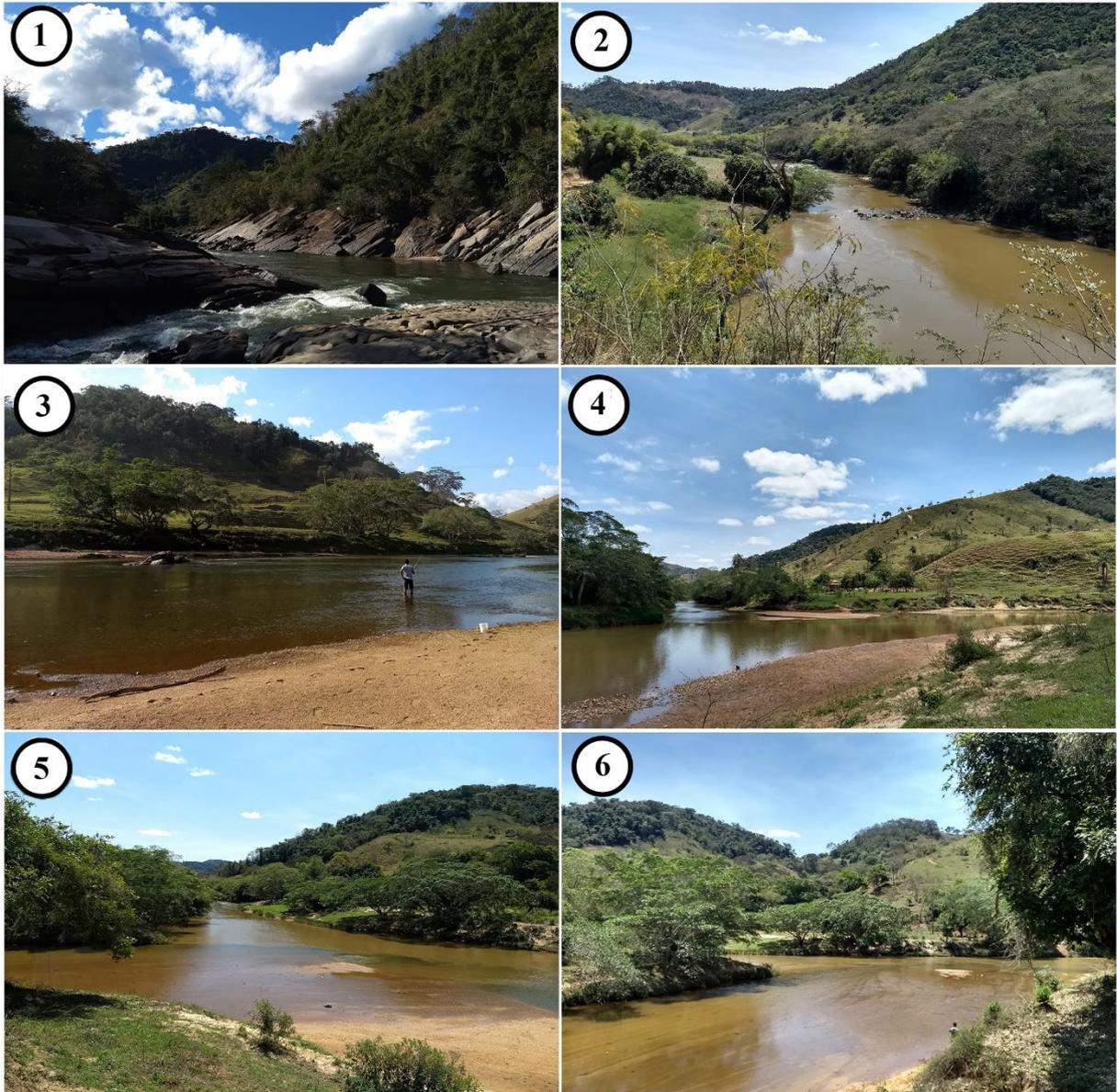
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na expedição de novembro/2017 foram coletados 44 espécimes de *H. wheatlandii*, no ponto 01, próximos as confluências do rio do Tanque com o rio Santo Antônio (Fig. 16 1). Encontramos algumas dificuldades durante esse período na região de Ferros – MG. Tais como: fortes chuvas que ocasionaram a obstrução da estrada de acesso ao ponto de coleta; ausência de energia em um período de sete dias dificultando adaptação dos peixes na piscina inflável. Além disso, durante o período chuvoso o rio estava com o nível alto e águas turvas, reduzindo os pontos de coleta, sendo possível coletar somente em um riacho que estava recebendo água do rio Santo Antônio, que estava com a água mais limpa. No mês de fevereiro/2018 não foi realizada coleta de nenhum espécime devido ao período chuvoso, impossibilitando o acesso aos pontos de coleta.

Em junho e julho/2018 foram coletados 25 espécimes de *H. wheatlandii*, sendo dois no ponto 5 (Fig. 16 5) e um no ponto 6 no rio Preto do Itambé com o rio Santo Antônio (Fig. 16 6) quatro no ponto 4 na confluência do rio do Peixe com o rio Santo Antônio (Fig. 16 4), 13 no ponto 3 dentro do perímetro urbano (Fig. 16 3) e cinco no ponto 2, rio do Tanque (Fig. 16 2). Esses meses foram os melhores para as coletas, com a ausência de chuva, o que facilitou a locomoção, temperaturas mais altas e migração de peixes.

No mês de setembro/2018 foram coletados o total de 13 exemplares de *H. wheatlandii*, todos adultos no ponto 3 (Fig. 16 3), e um exemplar de *S. doceanum* no ponto 1 (Fig. 16 1). Em novembro de 2018 foram coletados 07 espécimes de *S. doceanum* no ponto 1, próximo a confluência do rio Tanque com o rio Santo Antônio, em poções fundos com corredeira (Fig. 16 1).

Foi coletado apenas um espécime de *B. cf. opalinus*. O local da coleta, localizado no rio Tanque, próximo ao rio Santo Antônio, apresenta corredeiras e vegetação ripária conservada em uma de suas margens, formando maciços florestais densos e com pastagem de gramíneas exóticas na outra margem (Fig. 16 2).



**Figura 16.** (1) confluência rio do Tanque com rio Santo Antônio; (2) Rio do Tanque; (3) ponto de coleta dentro do Município de Ferros - MG; (4) confluência rio do Peixe com rio Santo Antônio; (5) confluência rio Preto do Itambé com rio Santo Antônio; (6) Rio Preto do Itambé. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

Embora haja registros do *H. thayeri* nos locais amostrados nenhum exemplar foi coletado durante as expedições. Entretanto, foi coletada uma espécie do mesmo gênero, *H. mormyrops*.

Exemplares de *S. doceanum*, *H. wheatlandii* e *H. mormyrops* foram identificados e depositados no Laboratório de Ictiologia da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto/SP – LIRP/USP, credenciado pelo Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético. O mesmo procedimento ainda não foi realizado para *B. cf. opalinus*, pois foi coletado somente um exemplar.

#### ***4.1. Domesticação e formação do banco genético ex situ***

Os 44 espécimes de *H. wheatlandii* provenientes da primeira coleta (novembro/2017) eram todos juvenis com comprimento padrão variando de 7 cm a 13 cm. Assim, após a quarentena em sistema fechado de circulação de água foram transferidos para um tanque de alvenaria com capacidade de 96 m<sup>3</sup> para se desenvolverem e atingirem a maturidade sexual. Nos primeiros meses a adaptação se deu de modo satisfatório. Entretanto, durante o início do verão, com as constantes variações de temperatura, os peixes começaram a apresentar enfermidades. Análises indicaram infestação pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*, comum em peixes. Assim, foi administrado o *Masoten*® como substância antiprotozoários, e Sal mineral para ação fungicida, para evitar infestações secundárias por fungos. Entretanto, o tratamento não se mostrou eficaz, e após 5 dias, 7 espécimes morreram em decorrência da infestação pelo protozoário e por infestações secundárias por fungos e bactérias. As mortes dos espécimes de *H. wheatlandii* andirá não puderam ser evitada por serem indivíduos juvenis selvagens com baixa resistência ao ambiente artificial, além de oscilações diárias na temperatura nos tanques, com períodos de alta temperatura durante o dia e baixas temperaturas durante a noite.

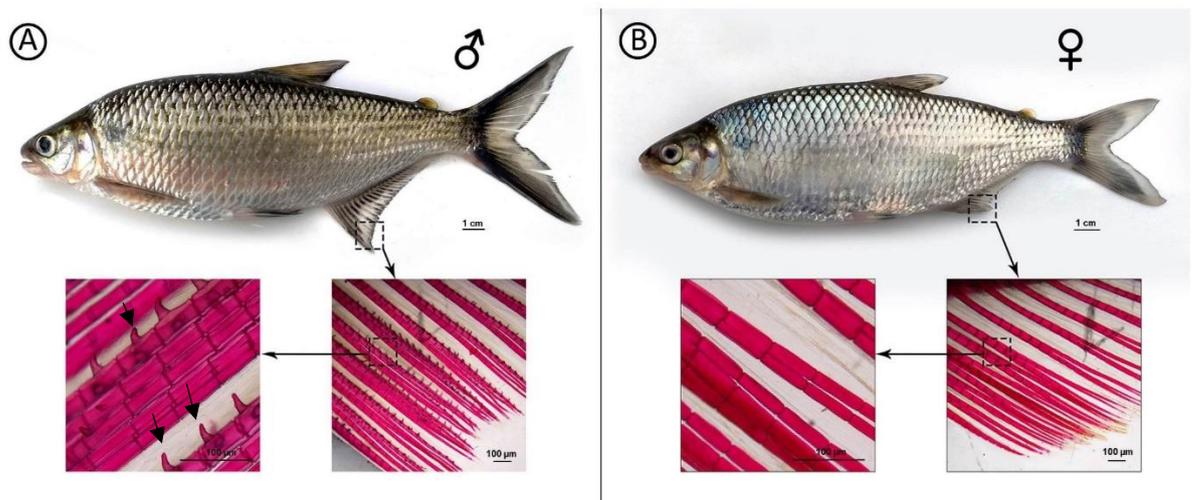
Nas expedições de junho/2018 e setembro/2018 foram coletados o total de 38 exemplares de *H. wheatlandii*, todos adultos. Após passarem por todo procedimento de quarentena e adaptação os peixes foram alocados em tanque de alvenaria com capacidade de 96 m<sup>3</sup> para formação do banco genético. Avaliações periódicas estão sendo realizadas para averiguar sanidade dos exemplares e o desenvolvimento em tanque. Até o momento os peixes têm apresentado condições satisfatórias de saúde e desenvolvimento.

Na expedição realizada em setembro de 2018 foi coletado um exemplar de *S. doceanum*. Em razão da raridade da espécie, esse indivíduo foi mantido em sistema de circulação de água fechado com temperatura e fotoperíodo controlado.

Na expedição realizada em novembro de 2018 foram coletados oito exemplares de *S. doceanum*, com a utilização de vara e anzol. Entretanto, quatro indivíduos morrem logo após a coleta, dois indivíduos morreram na piscina inflável circular e um indivíduo morreu durante a quarentena no ICMBio/CEPTA. Análises indicaram que os espécimes não resistiram aos procedimentos normais de coleta em função de ferimentos causados por anzóis, estresse após coleta e ao transporte.

#### 4.2. *Biologia reprodutiva básica de H. wheatlandii*

Os exemplares machos de *H. wheatlandii* em estágio de maturação avançado apresentaram espículas na nadadeira anal (Fig. 17). A ocorrência de espículas em nadadeiras tem sido relatada em algumas espécies de Characiformes tais como *Salminus brasiliensis* (MORAIS FILHO; SCHUBART, 1955; LIMA; VAL-SELLA; TORQUATO, 1986), *Salminus hilarii* (ANDRADE *et al.*, 2004) e *Astyanax bimaculatus* (ANDRADE; MENIN; RIBEIRO, 1984). A presença de espículas é considerada como característica sexual secundária temporária, que aparece em diversas espécies de peixes (IHERING; AZEVEDO, 1936), *Salminus maxillosus* (MORAIS FILHO; SCHUBART, 1955; LIMA; VAL-SELLA; TORQUATO, 1986) somente no período de reprodução e apenas nos machos, apesar de já ter sido observada em algumas fêmeas (IHERING; AZEVEDO, 1936). Tais características permite diferenciar machos e fêmeas para escolha de futuras matrizes do banco genético (*ex situ in vivo*) que serão utilizadas na reprodução artificial e trabalhos de biotecnologias.



**Figura 17.** A) Diafanização de nadadeira anal de Macho de *H. wheatlandii* com presença de espículas na nadadeira anal, setas indicando as espículas; B) Diafanização de nadadeira anal de Fêmea de *H. wheatlandii* sem a presença de espículas na nadadeira anal. Escala dos peixes: 1 cm. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

### 4.3. Análises espermáticas

Para a análise dos parâmetros espermáticos foram utilizados os valores percentuais médios da motilidade espermática (MOT%), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média de percurso (VAP) e velocidade em linha reta (VLR). As análises de tais parâmetros foram feitas em duplicata, e estão descritas na tabela 3 apresentada abaixo:

**Tabela 3.** Valores médios obtidos dos parâmetros espermáticos médios de *H. wheatlandii*.

	MOT (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VLR ( $\mu\text{m/s}$ )
Andirá	$60,53 \pm 0,07$	$81,72 \pm 7,05$	$68,76 \pm 1,18$	$48,62 \pm 8,05$

Além dos parâmetros espermáticos também foi calculado a concentração espermática que teve como resultado médio o valor de  $2,25 \times 10^8 \pm 7,5 \times 10^7$  espermatozoides/mL.

Após a análise dos parâmetros espermáticos realizadas através do método CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) por meio do método desenvolvido por Wilson-Leedy e Ingermann (2007), foi criada uma sequência de imagens com as quais é possível gerar, por meio do plugin CASA uma imagem que descreve a trajetória dos espermatozoides durante as análises dos dois exemplares de *H. wheatlandii* (Fig. 18 e 19).



**Figura 18.** Imagem gerada pelo plugin CASA descrevendo a trajetória dos espermatozoides de *H. wheatlandii*, exemplar 1.



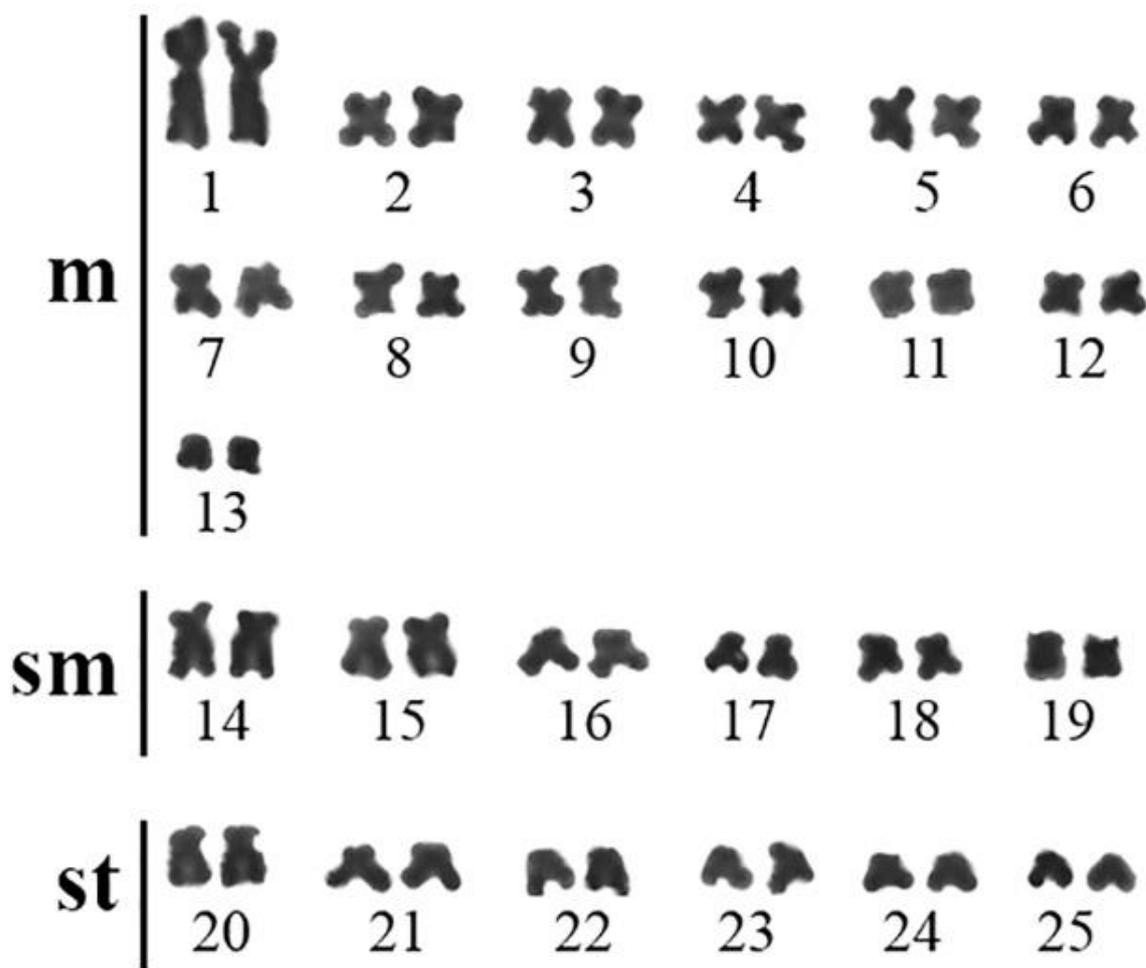
**Figura 19.** Imagem gerada pelo plugin CASA descrevendo a trajetória dos espermatozoides de *H. wheatlandii*, exemplar 2.

O conhecimento dos parâmetros espermáticos é fundamental para a rotina de reprodução artificial em peixe (SOLIS-MURGAS *et al.*, 2011). Neste aspecto, um dos primeiros passos é conhecer a concentração espermática, a qual é importante para adequar a quantidade de material para a fertilização e para o cálculo da dose inseminante (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2017). Nas condições do presente estudo, a concentração espermática obtida foi menor do que o observado para *Brycon vermelha* com concentração de  $4.34 \pm 0.75 \times 10^{10}$  (FAUSTINO *et al.*, 2015), espécie filogeneticamente relacionada a *H. wheatlandii*. A concentração pode variar de acordo com a espécie e ainda dependendo da idade e a época de coleta (SILVA *et al.*, 2009).

E relação à motilidade espermática, os valores são inferiores ao relatado para outras espécies (FAUSTINO *et al.*, 2015). Tal resultado pode ser devido aos machos não estarem aptos a reprodução no momento da análise ou ainda inadequação da solução utilizada, o que deverá ser investigado em futuros estudos. Por outro lado, foi possível fazer a análise de motilidade pelo software CASA utilizando o plugin imageJ, mesmo procedimento empregado para o *Rhamdia quelen* (SANCHES *et al.*, 2010), o que, além de possibilitar mais análises, aumenta a objetividade e a confiabilidade dos resultados.

#### 4.4. Caracterização cariotípica de *H. wheatlandii* a partir de cultivo celular

A metodologia de cultivo celular mostrou-se eficiente para a obtenção de células metafísicas de *H. wheatlandii*. Os dados obtidos demonstraram um número diploide modal de  $2n = 50$  cromossomos, com a seguinte fórmula cariotípica  $26m+12sm+12st$  (Fig. 20), o que corrobora os estudos realizados por Silva *et al.*, 2012, que avaliaram exemplares *H. wheatlandii* coletados no município de Ferros – MG, por meio de Citogenética Clássica.



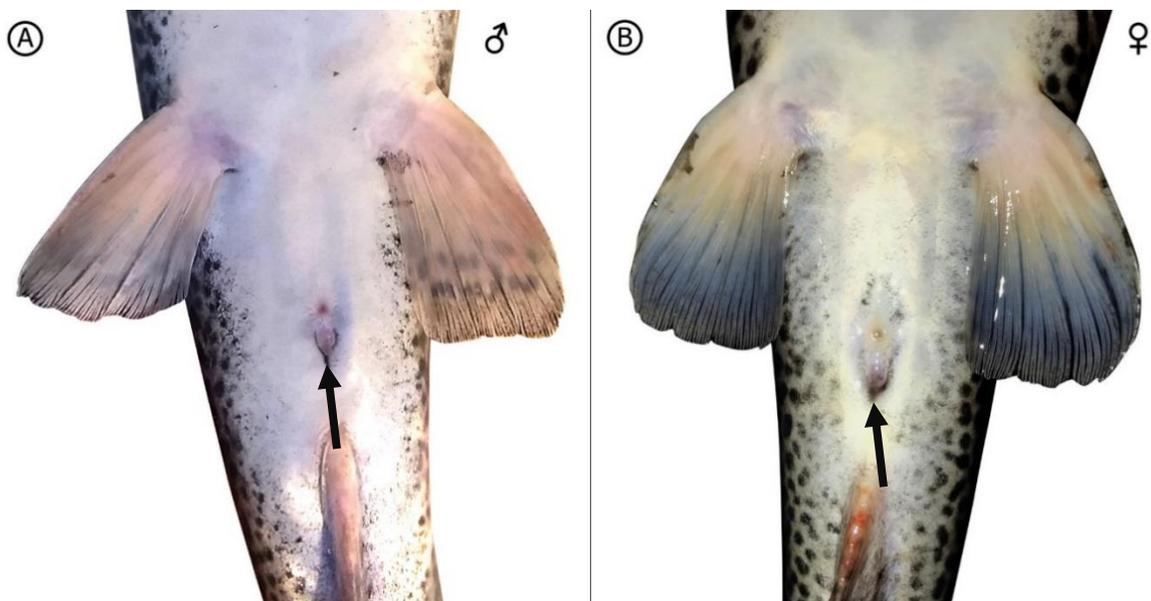
**Figura 20.** Cariótipo de *H. wheatlandii* obtidas a partir de cultivo celular. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

Com essa técnica de cultivo celular é possível obter metáfases de alta qualidade e cromossomos com boa morfologia (AMEMIYA *et al.*, 1984). Desta forma, se mostra como uma alternativa para obtenção de cromossomos mitóticos para a caracterização do cariótipo de espécies ameaçadas de extinção sem a que haja a necessidade de eutanásiar os animais.

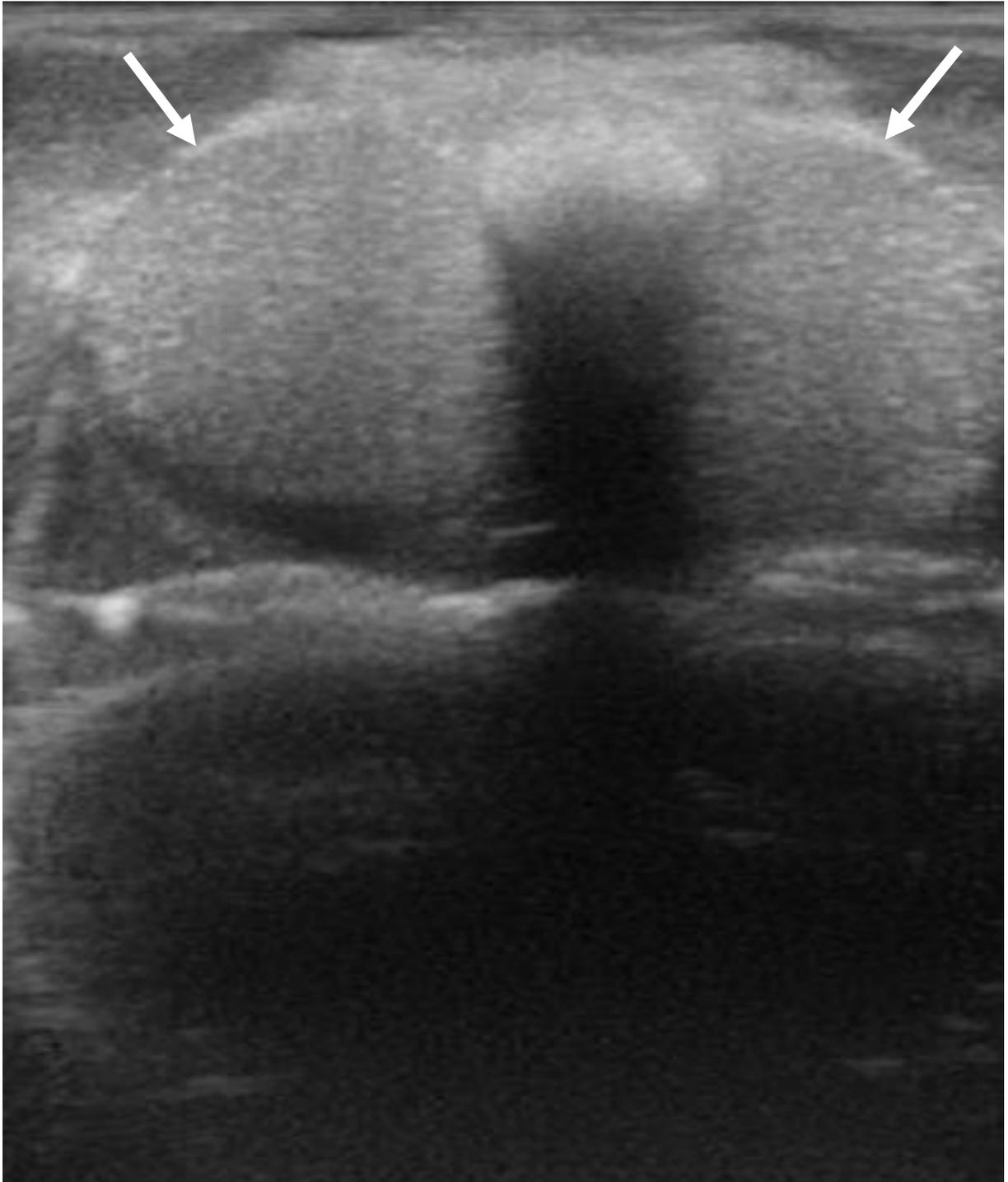
#### 4.5. *Biologia reprodutiva básica de S. doceanum*

Avaliando as características sexuais secundárias externas de *S. doceanum* foi possível diferenciar machos e fêmeas. Os machos apresentam papila urogenital externa alongada e ventre delgado. Por outro lado, as fêmeas apresentam papila urogenital curta e avermelhada e ventre abaulado (Fig. 21). Tais características são comuns em fêmeas de peixes da ordem dos siluriformes durante a estação reprodutiva (ARASHIRO *et al.*, 2018). A utilização de ultrassom digital mostrou-se eficiente para a identificação dos ovários (Fig. 22) e conseqüentemente para a confirmação de sexagem por caracteres externos, sendo uma importante ferramenta não invasiva para a utilização em espécies de peixes ameaçados de extinção.

Para peixes a ultrassonografia é uma técnica pouco utilizada, mas muito importante por não ser invasiva principalmente quando tratamos de espécies ameaçadas de extinção. Em peixes a ultrassonografia é utilizada para avaliar características de carcaça (PERAZZA *et al.*, 2017), e principalmente para avaliar características reprodutivas como o desenvolvimento gonadal (EVANS *et al.*, 2004; BRYAN *et al.*, 2007; DU COLOMBIER *et al.*, 2015; CHIOTTI *et al.*, 2016; NAEVE *et al.*, 2018) e até mesmo realizar sexagem (COLOMBO *et al.*, 2004; (NEWMAN *et al.*, 2008; KOHN *et al.*, 2013) já que nem todas as espécies é possível realizar a sexagem através de características externas.



**Figura 21.** A) Macho de *S. doceanum* com papila urogenital externa; B) Fêmea de *S. doceanum* sem a presença de papila urogenital externa. Setas indicando a papila. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.



**Figura 22.** Setas indicando ovários desenvolvidos em fêmea de *S. doceanum*. **Fonte:** Hatus O. Siqueira, 2018.

#### ***4.6. Delimitação de área de proteção***

A bacia do rio Santo Antônio abriga 90% das espécies de peixes de ocorrência em toda a bacia do rio Doce, o que a torna relevante para a conservação dessa fauna. Atualmente, 46% da área da bacia rio Santo Antônio encontra-se protegida por unidades de conservação. Entretanto, somente 46.848 ha, ou 4,4% da área dessa bacia, encontram-se no interior de unidades de conservação de proteção integral (Fig. 23). Além disso, nenhuma das unidades de conservação da bacia foi criada com o objetivo específico de proteger a ictiofauna.

Os principais vetores de ameaças aos peixes da região estão relacionados a barramentos para geração de energia elétrica, uso inadequado do solo, poluição e introdução de espécies (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018). Nesse sentido, a proteção de *H. wheatlandii*, *S. doceanum*, *B. opalinus* e *H. thayeri* envolve a proteção de seus ambientes de barramentos, a não remoção de vegetação ripária e não lançamento de poluentes, além de ações de controle e prevenção de introdução de espécies exóticas e o estabelecimento de banco genético *ex situ*.

A proteção dos ambientes pode ser atingida por meio da criação de uma unidade de conservação que tenha como objetivo proteger as principais áreas de ocorrência das espécies em questão, incluindo as áreas de vegetação ripária necessárias a manutenção da qualidade ambiental. Assim, considerando a distribuição das espécies, as necessidades ecológicas de cada uma delas, e os projetos de barramentos em operação e previstos, foi definida uma proposta de delimitação de unidade de conservação (Fig. 23).



permitido apenas o uso indireto dos seus recursos naturais. Já as UCs de uso sustentável são criadas para compatibilizar o uso dos recursos naturais com sua preservação.

Tendo em vista os vetores de ameaça as quatro espécies de peixes em questão, verifica-se que a manutenção dos ambientes necessários seria garantida de forma mais satisfatória com a criação de uma UC de proteção integral. A categoria da UC poderia ser um Refúgio de Vida Silvestre, uma vez que essa categoria garante a proteção necessária as espécies e pode ser constituída por áreas particulares.

## 5. CONSIDERAÇÃO GERAIS

O presente estudo possui os registros mais recentes da ocorrência de três espécies de peixes ameaçadas de extinção da bacia do rio Santo Antônio. Entre as espécies capturadas, *H. wheatlandii* foi a mais abundante. Apesar de estar ameaçada de extinção em razão de sua distribuição restrita e pela possibilidade da implantação de novos barramentos, aparenta ter uma população saudável, uma vez que foram coletados exemplares em diferentes fases de desenvolvimento.

As demais espécies objeto do presente estudo foram menos abundantes e mesmo com um intenso esforço de captura foram coletados apenas 08 exemplares de *S. doceanum*, 01 de *B. cf. opalinus* e nenhum de *H. thayeri*. Esses resultados indicam que as populações dessas espécies podem estar em declínio na região e que devem ser adotadas medidas urgentes para que sejam preservadas.

Os juvenis de *H. wheatlandii* em cativeiro se mostram extremamente sensíveis as variações de temperatura e a infestação pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*. Por outro lado, os indivíduos adultos se adaptaram rapidamente as condições de cativeiro e na próxima estação reprodutiva já estarão aptos a serem induzidos a reprodução. Os exemplares de *S. doceanum* e *B. cf. opalinus* também se adaptaram as condições de cativeiro, onde são alimentados com ração.

Os estudos de biologia básica fornecem informações indispensáveis para a implantação de banco genético das espécies (*ex situ*). No presente trabalho foram caracterizados aspectos de diferenciação sexual secundária, mobilidade espermática e cromossômica. Além disso, outros trabalhos vão ser realizados com os exemplares que estão em cativeiro, enfrentamos diversas dificuldades nas coletas de dados devido a localidade de coleta e por se tratar de espécies endêmicas e ameaçadas extinção. Os indivíduos presentes no banco genético *ex situ* e os materiais que foram coletados e não tiveram tempo de serem processados irão proporcionar o avanço na coleta de dados destas espécies e agregar ainda mais acervo científico de espécies tão peculiares e ameaçadas de extinção da bacia do rio Doce.

A conservação *in situ* das espécies em questão envolve, entre outras ações, a criação de áreas protegidas. Nesse sentido, foi apresentada uma proposta de UC com potencial de proteger os habitats requeridos pelas espécies sem afetar o desenvolvimento econômico da região.

## 6. REFERÊNCIAS

AMEMIYA, C. T.; BICKHAM, J. W.; GOLD, J. R. A Cell Culture Technique for Chromosome Preparation in Cyprinid Fishes. **Copeia**, p. 232, 23 fev. 1984.

ANDRADE, D. R.; MENIN, E.; RIBEIRO, S. P. Periodicidade da característica sexual secundária em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) Pisces, Characidae. **Revista Seiva**, v. 44, n. 93, p. 9–12, 1984.

ANDRADE, D. R. DE *et al.* Biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* (Osteichthyes, Characidae) na represa de Três Marias. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 3, p. 123–128, 2004.

ARASHIRO, D. R. *et al.* Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, v. 26, n. 2, p. 135–148, 28 abr. 2018.

BANACK, S. A.; HORN, M. H.; GAWLICKA, A. Disperser- vs. Establishment-Limited Distribution of a Riparian Fig Tree (*Ficus insipida*) in a Costa Rican Tropical Rain Forest1. **Biotropica**, v. 34, n. 2, p. 232–243, jun. 2002.

BORGO, E.; ROSA, L.; PACHECO, R. J. Norte do Espírito Santo: ciclo madeireiro de povoamento. Vitória: Edufes, 178 p. 1996.

BORODIN. Notes on some species and subspecies of the genus *Leporinus Spix*. v. 50, n. 3, p. 269–290, 1929.

BRASIL. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. In: **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: v. VI p. 1232, 2014.

BRYAN, J. L. *et al.* Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, n. 4, p. 411–419, 2007.

BUREAU DU COLOMBIER, S. *et al.* Ultrasonography as a non-invasive tool for sex determination and maturation monitoring in silver eels. **Fisheries Research**, v. 164, p. 50–58, abr. 2015.

CASTRO, R. M. C. *et al.* Phylogenetic Analysis and Redescription of the Genus *Henochilus* (Characiformes: Characidae). **Copeia**, v. 3, p. 496–506, ago. 2004.

CBH - SANTO ANTÔNIO. **A bacia do Rio Santo Antônio**. Disponível em: <<http://www.cbhsantoantonio.org.br/a-bacia>> Acesso em 25 fevereiro 2019.

CHIOTTI, J. A. *et al.* Assigning Sex and Reproductive Stage to Adult Lake Sturgeon using Ultrasonography and Common Morphological Measurements. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 36, n. 1, p. 21–29, 2016.

COLOMBO, R. E.; WILLS, P. S.; GARVEY, J. E. Use of Ultrasound Imaging to Determine Sex of Shovelnose Sturgeon. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 24, n. 1, p. 322–326, 2004.

DREWE, K. E. *et al.* Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rain forest streams. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 4, p. 890–902, abr. 2004.

DRUMMOND, G. M. *et al.* **Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua conservação**. 2005.

EVANS, A. F.; FITZPATRICK, M. S.; SIDDENS, L. K. Use of Ultrasound Imaging and Steroid Concentrations to Identify Maturational Status in Adult Steelhead. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 24, n. 3, p. 967–978, ago. 2004.

FAUSTINO, F. *et al.* Spermatozoon ultrastructure and semen parameters of *Brycon vermelha* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 17–23, jun. 2015.

GARAVELLO, J. C. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 4, p. 607–623, dez. 2005.

GOMIERO, L.; MANZATTO, A.; BRAGA, F. The role of riverine forests for food supply for the omnivorous fish *Brycon opalinus* Cuvier, 1819 (Characidae) in the Serra do Mar, Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 321–328, maio 2008.

GOMIERO, *et al.*, Crescimento e mortalidade de *Brycon opalinus* (Characiformes, Characidae) no Parque Estadual da Serra do Mar, Mata Atlântica, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 21–26, 2007.

HILSDORF, A.; PETRERE JR, M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 180, p. 62–65, 2002.

HORN, M. H. International Association for Ecology Evidence for Dispersal of Fig Seeds by the Fruit-Eating Characid Fish *Brycon guatemalensis* Regan in a Costa Rican Tropical Rain Forest. **Ecology**, v. 109, n. 2, p. 259–264, 1997.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 1232p, 2018.

IHERING, R. VON; AZEVEDO, P. DE. As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 7, p. 75–110, 1936.

KOHN, Y. Y. *et al.* Sex identification in captive hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ultrasound imagery and plasma levels of vitellogenin and sex steroids. **Aquaculture**, v. 384–387, p. 87–93, 2013.

LIMA, F. C. Subfamily Bryconinae, In : Reis, R.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America . EDIPUCRS. 756p. p. 175–184, 2003.

LIMA, R. V; VAL-SELLA, M. V; TORQUATO, V. C. Organização e desenvolvimento das gônadas do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 10, p. 139–154, 1986.

LUNDBERG, J. G. & LITTMANN, M.W. Family Pimelodidae, p.729. In: Reis, R.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, p. 756, 2003.

MORAIS FILHO, M. B. DE; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado: (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**. Brasil., 1955.

MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA & J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-845. 2000.

NAEVE, I. *et al.* Ultrasound as a noninvasive tool for monitoring reproductive physiology in female Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Physiological Reports**, v. 6, n. 9, p. e13640, maio 2018.

NEWMAN, D. M.; JONES, P. L.; INGRAM, B. A. Sexing accuracy and indicators of maturation status in captive Murray cod *Maccullochella peelii peelii* using non-invasive ultrasonic imagery. **Aquaculture**, v. 279, n. 1–4, p. 113–119, 2008.

OYAKAWA, *et al.* Peixes de água doce. In: Bressan, P.M.; Kierulff, M.C.M. & Sugieda, A.M. (eds.). Fauna ameaçada de extinção no E. p. 350–424, 2011.

PERAZZA, C. A. *et al.* Evaluation of ultrasound imaging to predict loin eye area in tambaqui. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. especial, p. 803–809, 2017.

PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Grooves surrounding the micropyle decrease the inseminating dose in fish. **Zygote**, v. 25, n. 6, p. 731–739, 1 dez. 2017.

PINTO, M. N. Introdução. In: PINTO, M. N (Org.). Cerrado: caracterização, ocupação e perspectiva. Brasília, Editora da UNB. p. 11-13, 1994.

PRANCE, G. T.; GOULDING, M. The Fishes and the Forest: Explorations in Amazonian Natural History. **Brittonia**, v. 33, n. 2, p. 257, abr. 1981.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: MOSER, H. G. (Ed.). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. Lawrence, KS, USA: Allen Press, p.35-37, 1984.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.

ROMEIRO *et al.* Relatório técnico: Ocorrência de cianobactérias na bacia hidrográfica do rio Doce. Brasília: ANA, 2012.

SANCHES, E. A. *et al.* Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 1, p. 153–156, dez. 2010.

SILVA, A. M. *et al.* Estado de Conservação da ictiofauna do rio Guandu, afluente do baixo rio Doce, ES. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 4, n. 1, p. 8, 10 jul. 2013.

SILVA, J. M. DE A. *et al.* Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n. 3, p. 668–677, 2009.

SILVA, PRISCILLA C. *et al.* The unique karyotype of *Henochilus wheatlandii*, a

critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil. *PloS one*, v. 7, n. 7, p. e42278, 2012

SOLIS-MURGAS, L. D. *et al.* Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186–191, 2011.

VIEIRA, F.; BIRINDELLI, J. L. *Leporinus thayeri* Borodin 1929. In: Machado A.B.M.; Drummond, G. M.; Paglia, A.P.; (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

VIEIRA, F.; CASTRO, R.M.C. & ALVES, C. B. M. *Henochilus wheatlandii* Garman 1890, p.68–70. In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M. & Paglia, A.P. (eds.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiv. In: **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. p. 68–70. 2008.

VIEIRA. A ictiofauna do Rio Santo Antônio, Bacia do Rio Doce, MG: Proposta de conservação. **Tese (Doutorado)**, p. 100, 2006.

VIEIRA. Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. **Flora**, p. 1–40, 2010.

VIEIRA, F.; DOS SANTOS POMPEU, P. Peixamentos: uma alternativa eficiente? **Ciência Hoje**, p. 28–33, 2001.

VIEIRA, F.; POMPEU, P.S. & GARAVELLO, J.C. *Steindachneridion doceana* (Eigenmann & Eigenmann, 1889), p.234–235. In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M. & Paglia, A.P. (eds.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas. 2008.

VIEIRA, F.; GASPARINI, J. L.; MACIEIRA, R. M. **Guia Ilustrado dos Peixes da Bacia do Rio Benevente - ES**. 2014.

YASUI, G. S. et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 39, n. 11, p. 464–470, 2014.

WILSON-LEEDY, JONAS G.; INGERMANN, Rolf L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, v. 67, n. 3, p. 661-672, 2007.

