

**Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira**

**ISIS RIBEIRO EVANGELISTA**

**Efeitos de variáveis ambientais sobre a simetria bilateral de larvas de peixes  
de cultivo marinho: uma abordagem experimental**

**Arraial do Cabo  
2018**

EFEITOS DE VARIÁVEIS AMBIENTAIS SOBRE A SIMETRIA  
BILATERAL DE LARVAS DE PEIXES DE CULTIVO MARINHO: UMA  
ABORDAGEM EXPERIMENTAL

**Isis Ribeiro Evangelista**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia  
Marinha, como requisito parcial para  
obtenção de Título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Alejandra Filippo Gonzalez Neves dos Santos

Co-orientador: Luciano Neves dos Santos

Arraial do Cabo

2018

**Efeitos de variáveis ambientais sobre a simetria bilateral de larvas de peixes  
de cultivo marinho: uma abordagem experimental**

**Isis Ribeiro Evangelista**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia Marinha como  
requisito parcial para obtenção de Título de Mestre

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Alejandra Filippo Gonzalez Neves dos Santos – Orientadora  
Universidade Federal Fluminense - UFF

---

Prof. Dr. Eduardo Barros Fagundes Netto  
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM

---

Prof. Dr. Leonardo Rocha Vidal Ramos  
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM

---

Prof. Dr. Ricardo Coutinho  
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM

Arraial do Cabo

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Evangelista, Isis Ribeiro

Efeitos de variáveis ambientais sobre a simetria bilateral de larvas de peixes de cultivo marinho: uma abordagem experimental.

Páginas, 11 Figuras, 2 Tabelas.

Orientadora: Alejandra Filippo Gonzalez Neves dos Santos

Co-orientador: Luciano Neves dos Santos

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Marinha) –

1. Larvicultura de peixes marinhos; 2. Assimetria flutuante; 3. Gerridae; 4. Pomacentridae; 5. Diâmetro dos olhos.

I. Santos, Alejandra Filippo Gonzalez Neves. II. Universidade Federal Fluminense. III. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, IEAPM/UFF.

**AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho aos meus pais José Evangelista e Sandra Pereira Ribeiro Evangelista, por todo o apoio e incentivo.

À Deus e todas as forças positivas que me auxiliaram a concluir esta etapa.

Aos meus pais José e Sandra e meu irmão Igor pelo apoio incondicional.

Aos meus cães por tornarem meus dias melhores.

Aos professores, pesquisadores e colegas que ao compartilharem seus conhecimentos e opiniões, muito contribuíram para a minha formação acadêmica e amadurecimento.

Ao IEAPM/UFF pela oportunidade de fazer o curso.

Aos professores Alejandra e Luciano, e a minha “guia acadêmica” Luana por todas as oportunidades, conselhos e apoio.

A todos os amigos do IEAPM, da UFF, UFRJ, UNIRIO e da vida que participaram direta ou indiretamente, dessa conquista.

Ao Professor Edu (IEAPM), a Professora Cris (UNIRIO) e aos funcionários e pesquisadores do LAREMAR, NEL e AQUASMART por disponibilizarem laboratório, pessoal e as larvas dos peixes, sem vocês não teria sido possível realizar este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Aplicada pelo companheirismo.

Ao Bruno e a Ni, pela amizade, companheirismo, hospedagem e por tudo que fizeram e fazem por mim, sou grata por dividir com eles cada etapa desta experiência, e não teria chegado aqui sem eles.

A Dayse, irmã que o IEAPM me deu, por dividir comigo a vida, as cachorras, comida, trabalhos, os sorrisos e as lágrimas. Foi fundamental nessa reta final, torço muito por você.

Á minha tia Marlene (*in memoriam*) pelo carinho materno que dedicou a mim desde a graduação e todo o incentivo.

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pela bolsa de estudos que foi fundamental para a realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
REVISÃO DE LITERATURA.....	1
Larvicultura de peixes marinhos.....	1
Morfologia e Assimetria em Larvas de Peixes.....	2
Carapeba – <i>Eugerres brasilianus</i> .....	3
Peixe palhaço – <i>Amphiprion ocellaris</i> .....	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
APRESENTAÇÃO .....	9

**Capítulo 1** - Efeitos de variáveis ambientais sobre a simetria bilateral de larvas de Carapeba, *Eugerres brasilianus*: uma abordagem experimental.

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivo específico .....	14
3. HIPÓTESE.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Obtenção de larvas.....	14
4.2 Experimento 1.....	15
4.3 Experimento 2.....	15
4.4 Assimetria flutuante.....	16

4.5 Tratamento dos dados e Análises Estatísticas.....	16
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSSÃO.....	20
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
<b>Capítulo 2 - Efeito de variáveis ambientais sobre a assimetria bilateral de larvas de peixe palhaço <i>Amphirion ocellaris</i>.</b>	
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivo específico .....	34
3. HIPÓTESE.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Aquisição das larvas.....	35
4.2 Experimento 1.....	35
4.3 Experimento 2.....	35
4.4 Experimento 3.....	36
4.5 Assimetria flutuante.....	36
4.6 Tratamento dos dados e Análises Estatísticas.....	37
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1:** PERMANOVA dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *E. brasiliensis* nos tratamentos com diferentes temperaturas e salinidades. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ). C = 20°C, S=25°, W=30°C.

### Capítulo II

**Tabela 1:** PERMANOVA dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *A. ocellaris* nos tratamentos com diferentes temperaturas, salinidades e fotoperíodos.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

**Figura 1:** Foto ilustrativa da Carapeba, *Eugerres brasilianus*. Fonte: Menezes & Figueiredo (1980).

**Figura 2:** Ilustração de exemplar adulto de *Amphiprion ocellaris*. Fonte: WPClipart (Public Domain).

### Capítulo I

**Figura 1:** Larva de *E. brasilianus*. DO = diâmetro dos olhos (mm); CT = comprimento total (mm).

**Figura 2:** Histograma da frequência de diferenças entre os lados direito e esquerdo para o diâmetro dos olhos em *E. brasilianus*.

**Figura 3:** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *E. brasilianus* nos tratamentos com diferentes temperaturas. Cor branca = FA1; cinza = FA2; e preto = FA5.

**Figura 4:** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *E. brasilianus* nos tratamentos com diferentes salinidades. Cor branca = FA1; cinza = FA2; e preto = FA5.

### Capítulo II

**Figura 1:** Larva de *A. ocellaris*. DO = diâmetro dos olhos (mm); CT = comprimento total (mm).

**Figura 2:** Histograma de frequência de diferenças entre o lado direito e esquerdo para o diâmetro dos olhos em *A. ocellaris*.

**Figura 3:** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *A. ocellaris* nos tratamentos com diferentes salinidades. Cor branca = FA1; cinza = FA2; e preto = FA5.

**Figura 4:** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *A. ocellaris* nos tratamentos com diferentes temperaturas. Cor branca = FA1; cinza = FA2; e preto = FA5.

**Figura 5:** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *A. ocellaris* nos tratamentos com diferentes fotoperíodos. Cor branca = FA1; cinza = FA2; e preto = FA5.

## INTRODUÇÃO

A produção de peixes e produtos aquícolas constitui uma importante fonte alimentar e de renda em comunidades em todo o mundo. Os peixes são fontes primárias de proteínas e nutrientes essenciais, portanto, uma alimentação rica em peixes pode trazer benefícios a saúde humana (Hilpe, 2014). Diante do colapso das capturas de peixes e dos altos impactos da agricultura baseada em terra, tem-se construído um olhar sobre a aquicultura marinha para atender à demanda crescente de proteína (Gentry et al., 2017). Segundo o relatório da FAO de 2016, o Brasil deve registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura em 2025. O aumento na produção brasileira será o maior registrado na região, seguido de México (54,2%) e Argentina (53,9%) durante a próxima década. O crescimento no país se deve aos investimentos feitos no setor nos últimos anos.

Ainda com pouca relevância, a piscicultura marinha de corte tem crescido no Brasil. Com o estabelecimento dos protocolos de reprodução e larvicultura de espécies comerciais, é possível alcançar o mercado. Algumas iniciativas já existem, porém são pequenas e pontuais. O Brasil ainda não possui dados estatísticos sobre este tipo de produção (Cavalli, 2009; FAO 2016).

A piscicultura ornamental também está em crescimento no Brasil. No entanto, existem poucos protocolos de reprodução e larvicultura estabelecidos, e o extrativismo é a forma utilizada para obtenção dos peixes (Ramos, 2015). O Brasil, conhecido pela riqueza da sua biodiversidade, apresenta organismos com diversas formas, cores e características que despertam a atenção de aquaristas do mundo inteiro (Sampaio & Nottingham, 2008), e está entre os cinco maiores exportadores do mundo. Muitas espécies tem sido estudadas quanto a sua produção. Entre as exóticas destacam-se os peixes-palhaços do gênero *Amphiprion*. Para as espécies nativas temos o cavalo-marinho *Hippocampus reidi* e o neon gobi *Elacatinus fígaro*. Que já possuem protocolos de produção estabelecidos, embora ainda seja necessário muito aprimoramento (Rodrigues, 2017). Por serem animais de pequeno porte, peixes ornamentais se adaptam bem a pequenos sistemas e a maior parte da produção é realizada em sistemas de recirculação.

A carapeba (*Eugerres brasilianus* – Cuvier, 1830) e o peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris* - Cuvier, 1830), foram selecionados para este estudo e possuem situações bem diferentes no mercado hoje. O *A. ocellaris*, possui protocolo bem desenvolvido, e é bem comercializado no Brasil e no mundo. Já o *E. brasilianus*, está em fase de elaboração de protocolo reprodutivo e

larval, e enfrenta alguns desafios na larvicultura. Ao estudar as possíveis alterações morfológicas causadas devido as condições ambientais a que estes animais são submetidos, buscamos obter dados que possibilitem aprimorar os protocolos existentes e beneficiar o desempenho zootécnico dos mesmos. Para observar estas alterações foi utilizada a Assimetria Flutuante, que devido à baixa herdabilidade e o custo-benefício é indicada para relacionar sua ocorrência a fatores extrínsecos ao organismo, isto é, estresses ambientais que causam instabilidade no desenvolvimento (Beasley Et Al., 2013).

O presente estudo foi realizado com experimentos em microcosmos na formulação da hipótese de que as larvas de peixes de cultivo marinho submetidas a testes experimentais com diferentes variações ambientais apresentam maiores incidências de assimetria flutuante nos caracteres testados. A abordagem experimental adotada analisou a assimetria flutuante no diâmetro dos olhos das larvas de carapeba e do peixe-palhaço sob diferentes temperaturas, salinidades e fotoperíodo.

A carapeba e o peixe-palhaço foram escolhidos para a realização deste trabalho por sua importância econômica e por estarem disponíveis em centros de pesquisas e empresas próximas ao estado do Rio de Janeiro.

A dissertação foi composta por dois artigos que serão submetidos ao periódico *Aquaculture*.

Espera-se que o presente estudo venha a contribuir em protocolos de manejo na larvicultura de peixes marinhos, visando promover maior avanço na piscicultura.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Larvicultura de Peixes Marinhos**

A larvicultura dos peixes marinhos ainda é um gargalo para a produção. A fase larval dos peixes teleósteos é considerada a que mais sofre com estressores ambientais e doenças (Berlinsky et al., 2004); e alimentação, sendo esta crucial para o desenvolvimento e a sobrevivência das larvas (Feiden et al., 2006). Segundo Sanches et al., (2013) durante a larvicultura, os peixes marinhos passam por mudanças morfológicas como malformações de esqueleto, como: escoliose, lordose, coluna vertebral encaracolada, perda de raios de nadadeiras ou o surgimento de nadadeiras adicionais, malformação do opérculo ou da

mandíbula; e mudanças funcionais, que podem ter seu desenvolvimento normal alterado por diferentes fatores (Cahu et al., 2003). O uso de vacinas, por exemplo, não é eficaz na larvicultura e pode ser necessário o uso de antibióticos para o controle de possíveis doenças, o que resulta em uma séria preocupação com o desenvolvimento da resistência antibiótica bacteriana e sua transferência para bactérias patogênicas humanas (Tan & Middelboe, 2014).

Na Ásia a Piscicultura Marinha é muito desenvolvida. Em destaque, o Vietnã cultiva pelo menos 14 espécies de peixes marinhos, no entanto, a produção de alevinos em larga escala e a engorda se concentra em cinco principais espécies: o beijupirá *Rachycentron canadum*; as garoupas *Epinephelus* spp.; o barramundi ou robalo asiático *Lates calcarifer*; e o pampo *Trachinotus blochii*. Os alevinos são produzidos em cativeiro por dezenas de pequenos laboratórios privados ou por institutos de pesquisa do governo. Neste cenário, a participação governamental na produção de alevinos de peixes marinhos tem permitido a disseminação de tecnologias para o cultivo com novas espécies e a capacitação de técnicos qualificados na área de reprodução, larvicultura e alevinagem (Nunes & Madrid, 2013).

No Brasil a dificuldade de obtenção de juvenis de peixes marinhos era um problema, no entanto, segundo Gonçalves et al., (2016), algumas espécies já possuem protocolos de reprodução e/ou de larvicultura bem estabelecidos, tais como o robalo-peva *Centropomus parallelus* (Alvarez-Lajonchère & Tsuzuki, 2008), a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Sanches et al., 2009), o ariocó *Lutjanus synagris* (Sanches & Cerqueira, 2010) e a cioba *Lutjanus analis* (Sanches et al., 2013a). A partir destes protocolos, o cultivo em larga escala já é possível, no entanto, ainda é raro encontrar produtores focados na larvicultura, panorama que vem mudando aos poucos no Brasil. Desta forma, concentrar esforços na larvicultura de peixes pode ser fundamental para o desenvolvimento da piscicultura marinha nacional.

### **Morfologia e Assimetria em Larvas de Peixes**

Malformações nas fases embrionárias e larvais são frequentes em peixes cultivados e representam um grande desafio para a cadeia produtiva (Cahu et al., 2003, Takle et al., 2005). Segundo Boglione et al., (2009) e Kayim et al., (2010), 50 a 60% das formas jovens de peixes marinhos produzidas por laboratórios europeus apresentam diferentes tipos de malformações esqueléticas, afetando a rentabilidade destes empreendimentos. Há cada vez mais evidências, que as condições ambientais no início da ontogenia podem afetar o desempenho subsequente dos indivíduos (Koumoundouros et al., 1997; Pechenic et al., 1998; Relyea & Hoverman,

2003). Múltiplos fatores são relatados como prováveis causas dessas alterações morfológicas, sendo os mais importantes os ambientais: temperatura, fotoperíodo, qualidade da água; manejo: métodos de criação; nutricionais: deficiência de vitaminas; e genéticos: poliploidia, reprodução seletiva e consanguinidade (Lall & Lewis-McCrea 2007; Fjellidal et al., 2012; Boglione et al., 2013).

Segundo Russo et al., (2011) critérios morfológicos podem ser utilizados para avaliação de malformações esqueléticas, pois estão diretamente ligados à performance de produção dos organismos. No entanto, estudos sobre os efeitos das anormalidades esqueléticas na performance biológica de peixes são escassas, sendo as poucas informações existentes coletadas secundariamente, durante estudos de ontogenia e anatomia (Boglione et al., 2013). Uma forma de avaliar a presença de estresse em um organismo é observar a ocorrência de desvios da manutenção do eixo da simetria bilateral (Palmer, 1994; Somarakis et al., 1997; Ottaviano & Scapini, 2010), pois pressupõe-se que caracteres pareados deveriam ser simétricos em organismos com este tipo de simetria, já que são produtos do mesmo genoma.

São conhecidos três tipos de desvios da simetria bilateral dos organismos: assimetria flutuante, assimetria direcional e antissimetria, as quais podem ocorrer isoladamente ou em conjunto em um mesmo carácter (Van Valen, 1962). A antissimetria é a forma menos comum, ocorre quando a assimetria é normalmente presente, mas o lado que possui maior desenvolvimento é variável, como nos indivíduos canhotos e destros em uma população (Sanseverino & Nessimian, 2008). A assimetria direcional ocorre quando há normalmente um maior desenvolvimento de um carácter em um ou mais lados do plano de simetria do que do outro, como no coração dos mamíferos (Van Valen, 1962). Além destas, existe ainda a assimetria flutuante, que está relacionada com o grau de adaptação as condições do ambiente (i.e. *fitness*), a capacidade de resistir a perturbações ambientais, ou seja, ao nível de estresse de uma população (Savage & Hogarth, 1999).

Entre as técnicas usualmente aplicadas para a indicação do estresse ambiental sobre o fenótipo dos indivíduos, a assimetria flutuante (AF) desponta como uma ferramenta importante como indicador do desempenho de peixes. A AF é definida como pequenas alterações percebíveis entre os planos de simetria bilateral dos organismos e alguns trabalhos já foram realizados utilizando AF em larvicultura de peixes. Somarakis et al., (1997) verificaram a variação da AF em otólitos de larvas de *Engraulis encrasicolus*, nascidas em

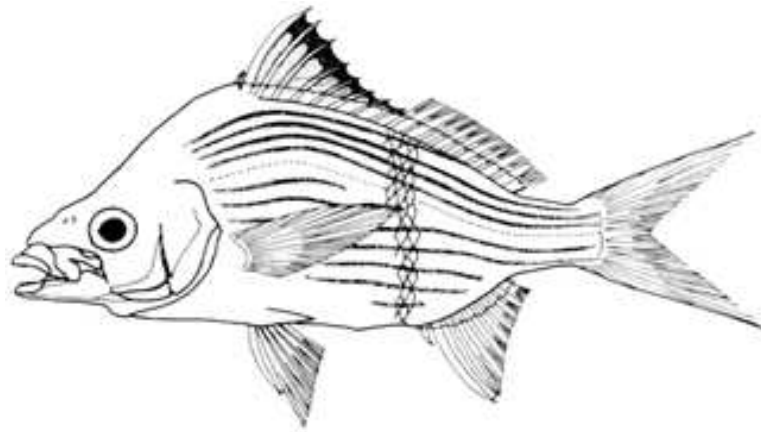
períodos diferentes. Em um estudo mais recente, Gronkjaer & Sand (2010), observaram o nível de AF em larvas de *Gadus morhua* submetidas a diferentes ofertas de alimentação e observaram um maior nível para as larvas que não receberam alimento, confirmando a viabilidade da utilização da AF em estágios larvais de peixes.

### **Carapeba – *Eugerres brasilianus***

Os Gerreidae estão distribuídos desde o Caribe até o sul do Brasil, onde ocupam lagoas costeiras (Costa et al., 2012). Possuem hábitos marinhos e estuarinos, além de alguns representantes restritos a água doce (Figueiredo & Menezes, 1980). São onívoros e possuem uma boca prostrátil, que é utilizada para capturar pequenos organismos, poliquetas e pequenos crustáceos, no substrato (Eiras-Stofella & Charvet-Almeida, 2000).

Conhecida popularmente como carapeba, caratinga ou mojarra, o *Eugerres brasilianus*, Cuvier, 1830 (Figura 1) é o maior integrante de comprimento da família Gerreidae, podendo alcançar até 50 cm (Froese & Pauly, 2015; 2017) ela é encontrada em todo o litoral brasileiro, sendo mais abundante na região Sudeste e Nordeste (Figueiredo & Menezes, 1980) onde possui uma importância econômica para a pesca artesanal (Alvarez-Lajonchere et al., 1996). Esta espécie apresenta um alto potencial para a piscicultura marinha (Cavalli et al. 2011), devido a sua demanda em mercados de algumas regiões do Brasil, crescimento rápido, hábito onívoro e sua característica eurihalina (Eskinazi, 1972; Franco et al., 2012).





**Figura 1.** Foto ilustrativa da Carapeba, *Eugerres brasiliensis*. Fonte: Menezes & Figueiredo (1980).

Estudos experimentais têm sido realizados para aprimorar a produção de carapebas em cativeiro na América Latina. O estudo realizado por Alvarez-Lajonchere et al., (1996) em Cuba, sobre a produção em massa de juvenis desta espécie, gerou resultados de reprodução artificial, densidade de estocagem e larvicultura. No Brasil, Passini et al., (2013), buscando aprimorar a reprodução destes peixes em cativeiro estudou sua reprodução, e concluiu que o uso de 15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  do hormônio LHRHa é suficiente para obter a maturação final e a desova de reprodutores de *E. brasiliensis*. Passini et al., (2013) estudaram o efeito positivo na sobrevivência e resistência a stress ao incluir náuplios de copépodos na dieta da larvicultura. SOARES et al., (2016) analisaram a dieta, reprodução e o manejo da carapeva em sistemas de recirculação e concluíram que a espécie tem grande potencial de criação, mas que alguns gargalos na larvicultura ainda devem ser estudados.

Apesar do potencial o cultivo de carapeba, o mesmo ainda não é explorado comercialmente no Brasil. Pesquisadores no Sul (UFSC), Nordeste (UFAL, UFPE, UFRPE) e Sudeste (FIPERJ) do Brasil, tem realizado o cultivo em laboratório e testado metodologias para realizar a produção em grande escala. Não existe produção comercial desta espécie no exterior.

### **Peixe palhaço - *Amphiprion ocellaris***

Os peixes palhaço são peixes recifais que ocorrem em águas tropicais no oceano Índico, mar vermelho e regiões centrais, sul e oeste do Oceano Pacífico (Figura 2). Pertencem

à subfamília Amphiprioninae que está classificada dentro da família Pomacentridae (Fautin & Allen, 1992). Nesta família ocorrem dois gêneros: Amphiprion com 29 espécies identificadas e Premnas apresentando uma espécie (Thornhill, 2012).



**Figura 2.** Ilustração de exemplar adulto de *Amphiprion ocellaris*. Fonte: Aquasmart - Peixe Palhaço Ocellaris – NEMO.

*Amphiprion ocellaris* são peixes recifais, ovíparos, de tamanho pequeno e coloração viva. Atingem um tamanho médio de 11 cm e as fêmeas são maiores que os machos. Nestes peixes ocorre o hermafroditismo sequencial protândrico, ou seja, eles nascem machos e podem se tornar fêmeas quando adultos. São territorialistas e vivem associados a anêmonas, onde ocorrem formam casais monogâmicos. A desova destes animais é demersal e adesiva, o macho cuida do ninho até a eclosão, mantendo os ovos aerados e protegidos. Peixes palhaço são reprodutores contínuos, e fazem posturas durante todo o ano (Maison & Graham, 2016).

Dentre os peixes ornamentais marinhos mais populares no mundo, encontram-se os peixes-palhaço. Estima-se que anualmente cerca de 400.000 indivíduos da espécie *Amphiprion ocellaris*, sejam importados para os Estados Unidos (Rhyne et al., 2012). Esta espécie sozinha foi responsável por 25% da quantidade total peixes marinhos ornamentais no mundo (Wabnitz, et al., 2003) e é uma das cinco espécies mais importadas pelos Estados Unidos da América (Rhyne et al., 2015). O sucesso na comercialização deste peixe se dá pela facilidade de reprodução, adaptação e alto valor de mercado (Wittenrich 2007; Kodama, et al., 2011). Além disso, com o lançamento do filme “Procurando Nemo” em 2003, estes peixes tonaram-se ainda mais desejados e valorizados. Este fato trouxe a necessidade de utilizar a reprodução em cativeiro, e assim poder preservar os estoques naturais e investir em um comércio saudável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez Lajonchère, L., Sánchez, L. P., Molejón, O. G., Gómez, E. T. 1996. Mass production of striped patao *Eugerres brasilianus* juveniles in Cuba. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 27, n. 3, p. 347-352,
- Alvarez-Lajonchère, L., Tsuzuki, M.Y. 2008. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research*, v.39, p.684-700,
- Berlinsky, D. L., Taylor, J. C., Howell, R. A., Bradley, T. M., Smith, T. I. 2004. The effects of temperature and salinity on early life stages of black sea bass *Centropristis striata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 35, n. 3, p. 335-344.
- Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., De Marzi, P., Cataudella, S. 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture*, v. 29, n. 1, p. 48-60.
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., E Witten, P., Moren, M., Fontagné, S., Koumoundouros, G. 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, v. 5, n. s1.
- Cahu, C., Infante, J. Z., Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, v. 227, n. 1, p. 245-258,
- Cavalli, R.O., Domínguez E.C., Hamilton, S. 2011. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. *Rev. Bras. Zool.*, v. 40, p. 155-164.
- Costa, M. R. D., Albieri, R. J., Neves, L. M., Santos, A. B. L., Araujo, F. G. 2012. Distribution and size of the mojarra *Diapterus rhombeus* (Cuvier) (Actinopterygii, Gerreidae) in a Southeastern Brazilian bay. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 60, n. 2, p. 199-207.
- Eiras-Stofella, D. R., Charvet-Almeida, 2000. P. Gills scanning images of the seawater fish *Eugerres brasilianus* (Gerreidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 43, n. 4, p. 0-0.
- Eskinazi, A. M. 1972. Peixes do Canal de Santa Cruz-Pernambuco-Brasil. *Tropical Oceanography*, v. 13, p. 283-302, n. 1.
- Fautin, D. G., Allen, G. R. 1992. Field guide to anemonefishes and their host sea anemones.
- Feiden, A., Hayashi, C., Boscolo, W. R. 2006. Desenvolvimento de larvas de surubim-do-iguçu (*Steindachneridion melanodermatum*) submetidas a diferentes dietas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 6, p. 2203-2210.

- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Universidade de São Paulo, Museu de Zoologia.
- Fjellidal, P. G., Hansen, T., Breck, O., Ørnstrud, R., Lock, E. J., Waagbø, R. & Eckhard Witten, P. 2012. Vertebral deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) etiology and pathology. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 28, n. 3, p. 433-440.
- Franco, T. P., Neves, L. M., Teixeira, T. P., & Araújo, F. G. 2012. Patterns of spatial distribution of five species of mojarras (Actinopterygii: Gerreidae) in a small tropical estuary in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 92, n. 5, p. 1217-1225.
- Froese, R., Pauly, D. FishBase. World Wide Web electronic publication. Available at: <http://www.fishbase.org> (accessed 22 october 2017).
- Gonçalves, E. L. T., Sanches, E. G., Martins, M. L., Tsuzuki, M. 2016. Detection, control, and prevention of photobacteriosis in cobia culture in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 5, p. 465-472.
- Grønkjær, P., Sand, M. K. 2003. Fluctuating asymmetry and nutritional condition of Baltic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Marine Biology*, v. 143, n. 1, p. 191-197.
- Kayim, M., Can, E., Güner, Y. 2010. Is it possible to transform hatchery-reared abnormal juveniles of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) into normal individuals. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 5, n. 1, p. 327-338.
- Kodama, G., Annuniação, W. F., Sanches, E. G., Gomes, C. H. A. M., Tsuzuki, M. Y. Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação, 2011. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 1, n. 37, p.61-72.
- Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M. 1997. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, v. 149, n. 3-4, p. 215-226,
- Lall S., H. P., Lewis-McCrea, Leah M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish—an overview. *Aquaculture*, v. 267, n. 1-4, p. 3-19.
- Maison, K. A., Graham, Krista S. 2016. Status review report: orange clownfish (*Amphiprion percula*). Pacific Islands Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, US Department of Commerce.
- Nunes, J. P. A., Madrid, M. R. Desmistificando a piscicultura marinha: a experiência do Vietnã. *Panorama da Aquicultura*. 2013. Disponível em

- <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=1474>>. Data de acesso: 14/08/2017.
- Passini, G., De Carvalho, C. V. A., De Melo Costa, W., Cerqueira, V. R. 2013. Indução hormonal da desova da carapeva, *Eugerres brasilianus* em cativeiro. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 433-438.
- Relyea, R. A., Hoverman, J. T. 2003. The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia*, v. 134, n. 4, p. 596-604.
- Rhyne, A. L., Tlusty, M. F., Schofield, P. J., Kaufman, L. E. S., Morris Jr, J. A., Bruckner, A. W. 2012. Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: the volume and biodiversity of fish imported into the United States. *PLoS One*, v. 7, n. 5,
- Rhyne, A. L., Tlusty, M. F., Szczebak, J., Holmberg, R. J. 2015. When one code = 2,300 species: Expanding our understanding of the trade in aquatic marine wildlife. *PeerJ PrePrints*, v. 3.
- Russo, T., Scardi, M., Boglione, C., Cataudella, S. 2011. Application of the Self-Organizing Map to the study of skeletal anomalies in aquaculture: The case of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe, 1834) juveniles reared under different rearing conditions. *Aquaculture*, v. 315, n. 1-2, p. 69-77.
- Sanches, E.G., Cerqueira, V. R. 2010. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.36, p.293-305.
- Sanches, E. G., Mello, G. L., Junior, H. A. 2013. Primeira ocorrência de malformação na coluna vertebral em juvenis de robalo-flecha. *Bol. Inst Pesca, São Paulo*, v. 39, n. 1, p. 77-83.
- Sanches, E.G., Oliveira, I. Da R., Serralheiro, P.C.S. 2009. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, v.35, p.389-399.
- Sanches, E.G.; Oliveira, I.R.; Serralheiro, P. C. S.; Cerqueira, V.R. 2013a. Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.85, p.1083-1091.
- Soares, E. C., Guimarães-Paiva, A., Lima-Santos, E., Moreira-Pereira, S., Santana-Santos, E., Almeida, E. O., Silva, T. J. 2016. Potential of carapeba (*Eugerres brasilianus*) for aquaculture production. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 44, n. 4, p. 718-725.

- Somarakis, S., Kostikas, I., Tsimenides, N. 1997. Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval fish as an indicator of condition: conceptual and methodological aspects. *Journal of Fish Biology*, v. 51, p. 30-38.
- Takle, H., Baeverfjord, G., Lunde, M., Kolstad, K., Andersen, O. 2005. The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, v. 249, n. 1, p. 515-524.
- Tan, D., Gram, L., Middelboe, M. 2014. Vibriophages and their interactions with the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 10, p. 3128-3140.
- Thornhill, D. J. 2012. Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade. *Defenders of Wildlife*, v. 187.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T. 2003. From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamentals. Cambridge, UK: UNEP World Conservation Monitoring Centre.
- Wittenrich, M. L. 2007. *The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes: Mating, Spawning & Rearing Methods for Over 90 Species*. TFH Publications, Incorporated.

## Capítulo I

---

## **Efeitos de variáveis ambientais sobre a simetria bilateral de larvas de Carapeba, *Eugerres brasilianus*: uma abordagem experimental.**

### **RESUMO**

No Brasil, a piscicultura marinha de corte tem pouca participação no setor econômico, mas algumas espécies têm mostrado grande potencial, como a carapeba, *Eugerres brasilianus*. Porém, a larvicultura ainda é um gargalo devido a raridade de protocolos que auxiliem na sobrevivência e desempenho das larvas, fazendo necessário identificar agentes estressores sobre o fenótipo dos peixes na larvicultura. A Assimetria Flutuante (AF) desponta como

ferramenta indicadora do desempenho de peixes, e pode ser utilizada para estes estudos. Objetivou-se no presente estudo observar a ocorrência de AF e a sobrevivência das larvas de *E. brasiliensis* submetidas a diferentes temperaturas (20°C, 25° e 30°) e salinidades (25, 30 e 35). Usou-se o diâmetro dos olhos para calcular os níveis de AF em três índices individuais: FA1 = |D-E|; FA2 = |D- E|÷[(D+E) ÷2]; e FA5 = (D-E)<sup>2</sup>, como proposto por Palmer (1994), onde: D = lado direito; e E = lado esquerdo. Foram analisadas 95 larvas. Foi aplicada PERMANOVA para verificar diferenças entre os tratamentos e a AF. O teste t-student validou a existência de AF nas larvas de carapeba (p=0,53). A sobrevivência das larvas não diferiu significativamente sob diferentes temperaturas (PERMANOVA; F=0,57; p=0,58) e salinidades (PERMANOVA; F=0,42; p=0,68). Houve diferenças significativas na AF nos experimentos com diferentes temperaturas (PERMANOVA; F=20,85; p=0,0001), mas não foram nas diferentes salinidades (PERMANOVA; F=0,25; p=0,77). A ausência de relação significativa da AF com a sobrevivência possivelmente ocorreu, devido às larvas não terem absorvido seu saco vitelínico, o que justifica a baixa mortalidade registrada. A carapeba é uma espécie eurihalina, e como os tratamentos não chegaram a níveis críticos, a salinidade testada não foi considerada estressora para a espécie, e sim as menores temperaturas (20°C). Neste contexto, a AF no diâmetro dos olhos em temperaturas mais baixas pode reduzir a aptidão dos indivíduos afetando a capacidade visual da espécie e seu desempenho zootécnico, sendo um problema econômico em pisciculturas.

Palavras-chave: Piscicultura marinha; Assimetria flutuante; Gerridae; Morfometria; Larvicultura.

## ABSTRACT

In Brazil, marine fisheries have little participation in the economic sector. However, some species have a great potential, as a carapeba, *Eugerres brasiliensis*. The larviculture is still a bottleneck due to a rarity of protocols that aid in the survival and performance of larvae, requiring identifying the stressing agents on the fish phenotype in larviculture. Fluctuating Asymmetry (FA) emerges as a performance indicator builder, and can be used for these studies. This study aimed to assess the occurrence of FA in larvae of *E. brasiliensis* at



different temperatures and salinities. The diameter of the eyes was used to calculate the AF levels in three individual indexes:  $FA1 = |D - E|$ ;  $FA2 = |D - E| \div [(D + E) \div 2]$ ; and  $FA5 = (D - E)^2$ , as proposed by PALMER (1994), where: D = right side; and E = left side. A total of 95 larvae were analyzed. The t-student test validated the presence of FA in carapeba larvae ( $p=0.53$ ). The larvae survival did not differ significantly under different temperatures (PERMANOVA,  $F=0.57$ ,  $p = 0.58$ ) and salinities (PERMANOVA;  $F=0.42$ ,  $p =0.68$ ). Significant differences were found in FA indexes for experiments with different temperatures (PERMANOVA;  $F =20.85$ ;  $p = 0.0001$ ), but were not in the different salinities (PERMANOVA;  $F=0.25$ ;  $p=0.77$ ). The absence of a significant relationship between FA and survival possibly occurred because larvae did not absorb their yolk sac, which justifies the low mortality rate. Carapeba is an euryhaline species, and as the treatments did not reach critical levels, the salinity tested was not considered stressful for the species, but the lowest temperatures (20°C). In this context, the AF in the diameter of the eyes at lower temperatures can reduce the aptitude of the individuals affecting the visual capacity of the species and its zootechnical performance, being an economic problem in fish farms.

**Keywords:** Marine fish farming; Fluctuating asymmetry; Gerridae; Morphometry; Larviculture.

## 1. INTRODUÇÃO

Na Aquicultura, controlar as características ambientais é essencial para a manutenção dos organismos. Alterações nessas variáveis podem gerar animais doentes e alta mortalidade. Aspectos como a quantidade de oxigênio dissolvido na água, a faixa de salinidade, a quantidade de amônia, variações na temperatura da água, densidade de estocagem e intensidade luminosa são considerados pontos críticos na produção dos robalos (Cerqueira & Bügger, 2001; Cerqueira, 2005; Ostini et al., 2007; Tsuzuki & Berestias, 2008).

Malformações nas fases embrionárias e larvais são freqüentes em peixes cultivados e representam um grande desafio para a cadeia produtiva (Takle et al., 2005). Há cada vez mais evidências, que as condições ambientais no início da ontogenia podem afetar o desempenho dos indivíduos (Pechenic et al., 1998;. Relyea & Hoverman, 2003). A utilização do saco vitelínico tem base genética, e é fortemente influenciada por fatores ambientais, em particular por temperatura, salinidade e interações subseqüentes (Lim & Webster, 2006). Aprimorar os conhecimentos sobre essa fase é fundamental para a elaboração de protocolos que auxiliem a elevar a taxa de sobrevivência das larvas nesse período crucial do desenvolvimento. Esta fase é rápida, com duração média de 48h em larvas em geral com média de 2mm de comprimento total. Por isso, a busca de ferramentas e tecnologias sensíveis o suficiente para perceber alterações nessa fase são importantes (Lim & Webster, 2006).

Entre as técnicas usualmente aplicadas para a indicação do estresse ambiental sobre o fenótipo dos indivíduos, a Assimetria Flutuante (AF) desponta como uma ferramenta importante como indicador do desempenho de peixes. A Assimetria Flutuante é definida como pequenas alterações percebíveis entre os planos de simetria bilateral dos organismos (Allenbach, 2010; Beasley et al., 2013). Essa ferramenta consiste na medição de uma série de características discretas e/ou contínuas, em ambos os lados do indivíduo de uma espécie, com o objetivo de se avaliar-se determinado fator estressante externa afeta o desenvolvimento ontogenético do mesmo (Allenbach, 2010; Beasley et al., 2013). Através da AF é possível determinar se os efeitos de variações ambientais afetam de alguma forma o desenvolvimento dos peixes.

Ate o momento não há estudos sobre AF em larvas de peixes de cultivo. A carapeba, *Eugerres brasilianus* é citada entre os peixes marinhos com maior potencial para cultivo no Brasil (Allenbach, 2010). Possui hábitos noturnos, é generalista e oportunista, concentra sua atividade alimentar durante a noite, mas se alimenta durante o dia em locais mais escuros

(Zavala -Camin, 1996; Ramos et al., 2014). Este peixe em cativeiro adapta-se bem a alimentação artificial e tem melhor desenvolvimento ao ser mantido em uma densidade de estoque de 7-8 peixes/m<sup>3</sup>. *Eugerres brasilianus* enfrenta alguns desafios na larvicultura e não possui protocolo bem definido, nem produção comercial no Brasil (Soares et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar através de experimentos em microcosmos, a existência de AF nas larvas de *E. brasilianus* submetidas a diferentes temperaturas e salinidades, de forma a contribuir na busca da redução de anomalias e perdas econômicas em pisciculturas marinhas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar através de experimentos em microcosmos, assimetria flutuante nas larvas de *Eugerres brasilianus* submetidas a diferentes temperaturas e salinidades.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Medir o diâmetro dos olhos e o comprimento total das larvas;
- Calcular a assimetria flutuante;
- Correlacionar AF com sobrevivência das larvas e os valores das variáveis de temperatura e salinidade;

## **3. HIPÓTESE**

Alterações na temperatura e salinidade refletem em maiores valores de AF do diâmetro dos olhos de larvas de *Eugerres brasilianus*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção de larvas**

As larvas de carapeba, *E. brasilianus*, foram obtidas em fevereiro de 2017, através de peixes reprodutores mantidos em cativeiro no Laboratório de Recursos Marinhos

(LAREMAR – IEAPM), Arraial do Cabo, RJ - Brasil. A desova da espécie foi retirada do tanque e acondicionada em aquários de 1,5L aerados, onde ficaram até a eclosão de suas larvas, que ocorreu aproximadamente após 24h. Em seguida as larvas foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para os tratamentos do presente estudo com auxílio de uma pipeta pasteur.

#### **4.2. Experimento 1**

No experimento 1 foi testada a assimetria flutuante das larvas em diferentes temperaturas. Foram mantidas aproximadamente 26 larvas em cada aquário de 1,5L, até consumirem aproximadamente 70% do saco vitelínico e com isso atingirem o “*point of no return*” (PNR), que é o momento onde a privação de alimento afeta as larvas, devido a diminuição da reserva vitelínica. O PNR foi estimado com base no tempo total de absorção do saco vitelínico, que segundo Alvarez-Lajonchère (1996) para *E. brasiliensis* é de até 5 dias.

Foram realizados três tratamentos de diferentes temperaturas: 20°C; controle de 25°C comumente usado na literatura na fase larval da espécie segundo Alvarez-Lajonchère (1996) e Costa et al. (2015); e 30°C, com três réplicas cada. Para manter as temperaturas desejadas nos tratamentos foi usado termostato (Roxin HT-1900) e resfriador (Gelaqua 20001). Todos aquários se mantiveram aerados ( $\pm 6,8$ mg/l) através de aeradores. A salinidade mantida em todos aquários foi de  $\pm 35$ , conforme sugerido por Alvarez-Lajonchère (1996) e Costa et al. (2015). Durante todo experimento a água usada em todos aquários não foi renovada.

#### **4.3. Experimento 2**

No experimento 2 foi testada a assimetria flutuante em diferentes salinidades. Foram mantidas aproximadamente 26 larvas em cada aquário de 1,5L, até consumirem aproximadamente 70% do saco vitelínico e com isso atingirem o PNR.

Foram realizados três tratamentos de diferentes salinidades: 25, 30 e controle de 35 - comumente usado na literatura na fase larval da espécie segundo Alvarez-Lajonchère (1996) e Costa et al., (2015), com três réplicas cada. A salinidade foi mantida através da água do mar tratada com UV disponível no LAREMAR/IEAPM, e quantificada com auxílio de um refratômetro (Atago 53m). A água encontrava-se em 35 de salinidade e para atingir valores menores foi adicionado água doce não clorada disponível no laboratório. Todos aquários mantiveram-se aerados ( $\pm 6,8$ mg/l) através aeradores. A temperatura mantida em todos

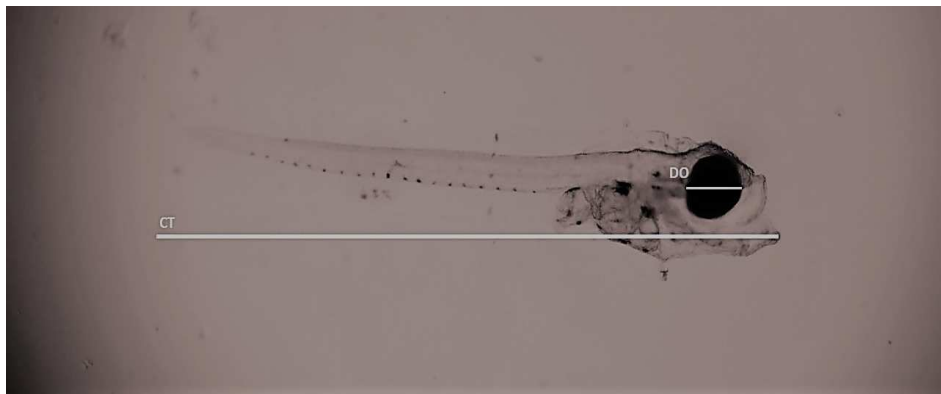
aquários foi de 25°C, de acordo com o proposto por Alvarez-Lajonchère (1991) e Costa et al. (2015).

Após cada experimento as larvas foram eutanasiadas em gelo e posteriormente fixadas em formol a 10% para a realização das medidas morfométricas.

#### 4.4. Assimetria Flutuante

Para a análise morfológica das larvas, foi usado um microscópio Olympus DP72 com câmera fotográfica com precisão de zoom de 4x. As larvas foram posicionadas para obtenção de fotografias do lado esquerdo e direito. Foi utilizado glicerol para melhor posicionamento e clareamento das larvas na lâmina, o que resultou em uma melhor visualização das mesmas.

Para a medição das larvas foi utilizado o programa TPSDIG (2.3.2). Foram feitas medidas do comprimento total e do diâmetro dos olhos (Almeida & Grossman, 2014; Seixas et al., 2016; Lutterschmidt et al., 2016). Todas as medidas foram feitas duas vezes pelo mesmo observador, sendo as estruturas lesionadas descartadas, a fim de minimizar a ocorrência de erro de medição. Foi medido um total de 95 larvas.



**Figura 1:** Larva de *E. brasiliensis*. DO = diâmetro dos olhos (mm); CT = comprimento total (mm).

#### 4.5. Tratamento dos dados e Análises Estatísticas

O teste PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) foi utilizado (Distância Euclidiana; 10000 permutações por análises) para observar a ocorrência do erro de medição entre os valores encontrados na primeira e segunda medição. Resultados não significativos ( $p > 0,05$ ) eliminam a possibilidade de erro de medição, sendo considerada uma probabilidade de 95%.

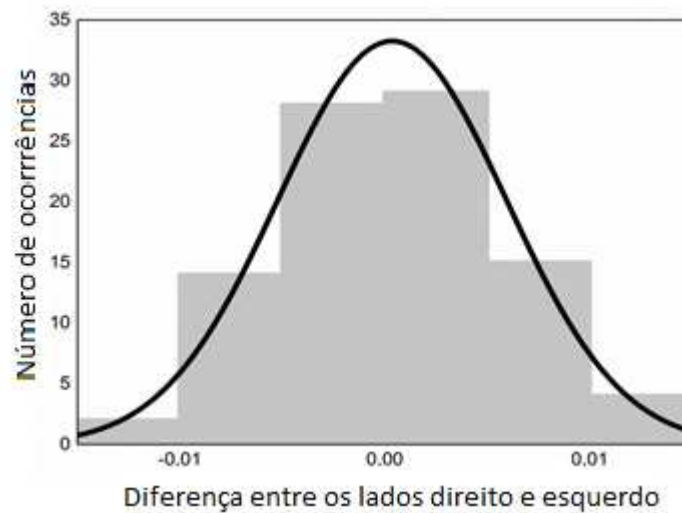
Para avaliar o tipo de assimetria existente (i.e. assimetria direcional, assimetria flutuante ou antissimetria) no diâmetro dos olhos, foram aplicados os testes t-Student e histograma de distribuição. O teste t-Student avaliou se os valores diferiram da média zero e, com o auxílio de histogramas, se os dados se ajustaram a curva de distribuição normal. A confirmação de média zero e da normalidade dos dados valida a existência da assimetria flutuante (Palmer, 1994; Oxnevad et al., 2002). Falsos resultados da existência da assimetria flutuante podem ser encontrados devido a correlações significativas entre os níveis de assimetria com o tamanho da estrutura analisada (Palmer & Strobeck, 1992; Palmer, 1994). Para verificar a dependência da AF em relação ao tamanho da estrutura, foi realizado o teste de correlação de Spearman entre a simetria absoluta [R-L] e o tamanho do caractere [R+L]/2. O coeficiente de Spearman é mais recomendado para este tipo de análise, pois também é capaz de detectar relações não-lineares (Palmer & Strobeck, 1986; 1992).

Para calcular os níveis de AF foram selecionados três índices individuais: FA1 = |D-E|; FA2 = |D-E|÷[(D+E)÷2]; e FA5 = (D-E)<sup>2</sup>, como proposto por Palmer (1994), onde: D = lado direito; e E = lado esquerdo. Estes três índices são os mais difundidos e comumente usados em estudos de AF (Palmer & Strobeck, 1992; Palmer, 1994), por serem de fácil aplicação, compreensão e baixa vulnerabilidade ao viés de dados. A única estrutura pareada testada para o presente estudo com AF foi o diâmetro dos olhos, por ter sido a única com precisão a ser medida.

O teste PERMANOVA foi usado para comparar medias de percentagem de sobrevivência das larvas nos tratamentos de temperatura e salinidade. PERMANOVA também foi usado para determinar quais médias eram significativamente diferentes da AF em *E. brasiliensis* entre os tratamentos de salinidade e temperatura seguida do teste pos-hoc PERMANOVA, ao nível de confiança de 95% (p< 0,05). Todas as análises do PERMANOVA foram realizadas no programa PAST 3.10 (Hammer et al., 2001).

## 5. RESULTADOS

A frequência das diferenças entre o lado direito e esquerdo para o diâmetro do olho não diferiram significativamente de zero (Teste t-Student; p=0,54), eliminando a possibilidade de presença de assimetria direcional. A distribuição normal da diferença entre os lados do diâmetro do olho demonstrada pelo histograma atendeu satisfatoriamente ao pressuposto da normalidade, e eliminou a presença de antissimetria. Tais resultados comprovam a existência de assimetria flutuante (Figura 2).



**Figura 2.** Histograma da frequência de diferenças entre os lados direito e esquerdo para o diâmetro dos olhos em *E. brasiliensis*

O teste de correlação de Spearman não identificou relações significativas entre o diâmetro do olho e o comprimento total de *E. brasiliensis* (Spearman ( $r$ );  $p = -0,97$ ), eliminando a interferência do comprimento total da larva na estrutura analisada.

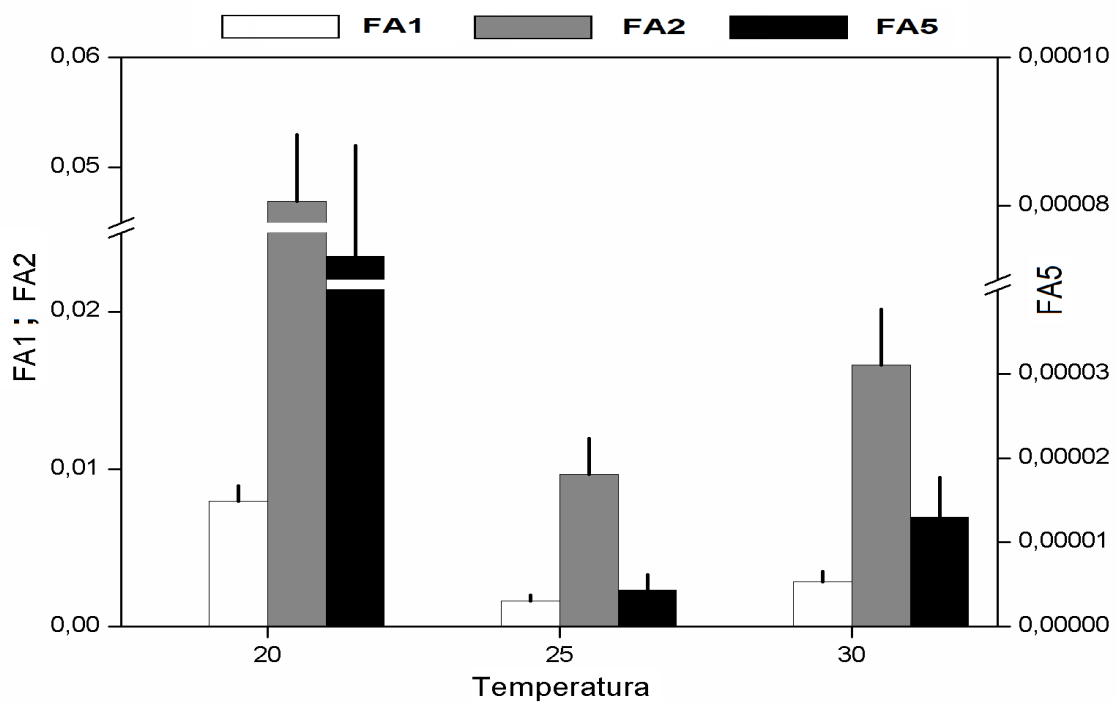
A comparação entre a primeira e segunda medida do diâmetro do olho não apresentou diferença significativa (PERMANOVA;  $F = 0,001$ ;  $p = 0,97$ ), o que descarta a influência de erro de medição.

A percentagem de sobrevivência das larvas de *E. brasiliensis* não diferiu significativamente entre os tratamentos de temperatura (PERMANOVA;  $F = 0,57$ ;  $p = 0,58$ ), onde se foi observado uma média de sobreviventes de  $62,3\% \pm 0,11$  para temperatura de  $20^\circ\text{C}$ ;  $57,6\% \pm 0,07$  para temperatura de  $25^\circ\text{C}$ ; e  $56,9\% \pm 0,09$  para temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Também não houve diferenças significativas da sobrevivência das larvas em diferentes salinidades (PERMANOVA;  $F = 0,42$ ;  $p = 0,68$ ), onde se foi observado uma média de sobreviventes de  $57,3\% \pm 0,11$  para salinidade de 25;  $58\% \pm 0,04$  para salinidade de 25; e  $63\% \pm 0,13$  para salinidade de 30.

No entanto, a AF diferiu significativamente em todos os tratamentos de temperatura (PERMANOVA;  $F = 20,7$ ;  $p = 0,0001$ ). Os índices apontam uma maior ocorrência de AF para as larvas submetidas ao tratamento de  $20^\circ\text{C}$  (Tabela 1; Figura 3).

**Tabela 1.** PERMANOVA dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *E. brasiliensis* nos tratamentos com diferentes temperaturas e salinidades. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ). C = 20°C, S=25°, W=30°C.

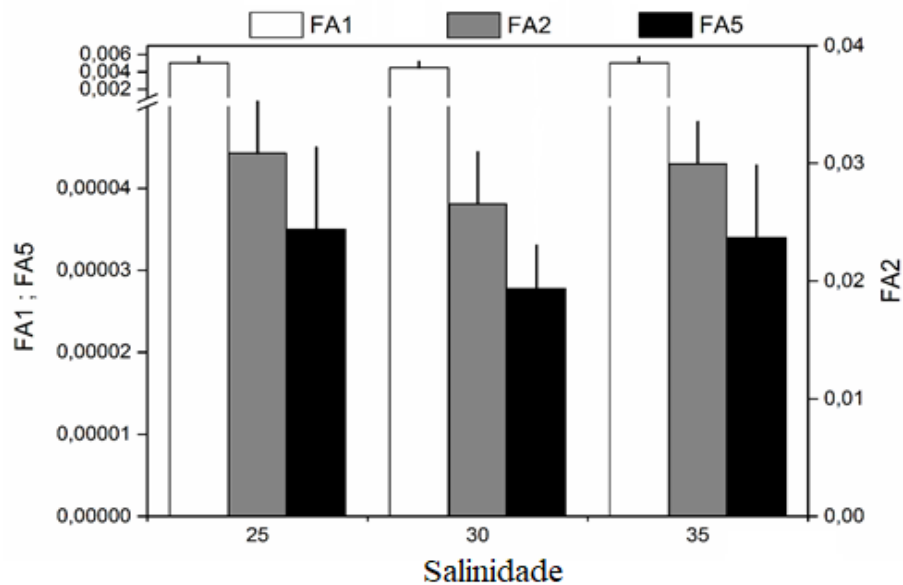
Índices de Assimetria Flutuante	Temperatura			Salinidade	
	F	p	Post hoc	F	p
FA1	20,85	$p < 0,01$	C > S=W	0,18	0,84
FA2	20,7	$p < 0,01$	C > S=W	0,26	0,77
FA5	17,9	$p < 0,01$	C > S=W	0,17	0,86



**Figura 3** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *E. brasiliensis* nos tratamentos com diferentes temperaturas.

Os índices de AF dos olhos de *E. brasiliensis* não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos de salinidade (PERMANOVA;  $F=0,25$ ;  $p=0,77$ ) (Tabela 1; Figura 4).





**Figura 4.** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) do diâmetro dos olhos de *E. brasiliensis* nos tratamentos com diferentes salinidades.

## 6. DISCUSSÃO

A mortalidade de *E. brasiliensis* de aproximadamente 40% nas primeiras 24 horas de vida em ambos tratamentos (temperatura e salinidade) retrata a sensibilidade das larvas recém eclodidas. Segundo Pepin et al., (2014) o gargalo na larvicultura de peixes pode ocorrer em um curto período crítico como resultado da inanição após a absorção da reserva vitelínica, ou durante um período mais prolongado do nascimento até a metamorfose (Cushing, 1990; Alvarez-Lajonchre et al., 1991; Emata et al., 1994; Glamuzina et al., 1998). Além disso, no término da reserva vitelínica, qualquer limitação morfológica e fisiológica, como o tamanho menor dos olhos, da boca ou o desenvolvimento incompleto das glândulas digestivas pode ser letal para as larvas (Maciel, 2006). Já nos estágios de flexão, devido à mudança de estágio larval, anomalias existentes podem gerar a morte dos indivíduos.

A mortalidade registrada no presente estudo, não foi relacionada com a assimetria flutuante (AF) das larvas de *E. brasiliensis*. Entretanto, a AF do diâmetro dos olhos da espécie foi associada com a variação de temperatura, revelando que o tratamento de menor temperatura testado (20°C) foi o mais estressante. Resultados contrários, porem registrados em peixes adultos por Jawad et al., (2012) mencionam que o diâmetro dos olhos não apresenta

sensibilidade para detecção da AF, sendo esta considerada uma estrutura menos vulnerável aos agentes estressores ambientais e genéticos.

Nossos resultados, por outro lado, revelam que o diâmetro dos olhos de larvas de *E. brasiliensis* é uma ferramenta importante de AF, possivelmente devido aos órgãos dos sentidos como a visão receberem estímulos físicos e químicos do ambiente. A acuidade visual dos teleosteos está diretamente relacionada ao crescimento do olho, qualidade da óptica e a quantidade de luz recebida (De Busserolles et al., 2013). A AF observada no diâmetro dos olhos de *E. brasiliensis* pode afetar a detecção de luz no ambiente, influenciando desta forma o comportamento de forrageamento, sendo uma limitadora do crescimento (Blaxter, 1986). Na natureza, a escuridão é um refúgio importante dos predadores visuais (Clark & Levy, 1988), e a capacidade de ver e capturar presas com pouca luz pode ser de grande importância para a sobrevivência das larvas (Suthers & Sundby, 1996). Além disso, a limitação de forrageamento afetando o crescimento das larvas, pode também inferir diretamente na idade reprodutiva da espécie. Esse padrão foi observado por Jawad et al., (2012), ao estudarem o diâmetro dos olhos de *Leignathus equulus* detectaram uma relação direta do crescimento somático da espécie com a idade reprodutiva da mesma. O reflexo da AF no diâmetro dos olhos também pode refletir na agilidade de fuga a possíveis predadores. Segundo Vollset et al., (2011), as larvas de *Gadus morhua* diminuíram o ângulo de giro e a frequência de movimentos de natação sob baixa intensidade de luz relacionada as alterações oculares.

Dentre os fatores abióticos, a temperatura é considerada um dos mais importantes a serem analisados (Wang & Tsai, 2000; Takle et al., 2005), devido ao seu papel fundamental no desenvolvimento do crescimento, afetando principalmente os estágios larvais e juvenis de peixes (Sanseverino & Nessimian, 2008), o que explica a sua influência na AF detectada no presente estudo. A temperatura em torno de 20°C para larvas de *E. brasiliensis*, retrata alterações no diâmetro do olho da espécie que possivelmente afetara o desempenho da mesma em sistema de cultivo. A AF no diâmetro dos olhos em temperaturas mais baixas pode reduzir a aptidão dos indivíduos afetando a capacidade visual da espécie na procura e captura de alimentos, reprodução e/ou sobrevivência, afetando assim seu desempenho zootécnico sendo um problema econômico em pisciculturas (Bosch & Márquez, 2000). No entanto, são necessários mais estudos para confirmação dessa hipótese.

Segundo Politis et al., (2017) a temperatura é importante para a otimização das condições de criação na aquicultura, especialmente durante os estágios críticos iniciais da história da vida dos peixes. Existem relatos de estudos com larvicultura de peixes associando

anomalias morfológicas com diferentes exposições a variações de temperatura, como o trabalho de Barón-Aguilar et al., (2015) onde demonstraram que larvas de *Centropomus undecimalis* criadas a 23°C apresentaram malformações, sugerindo uma influência negativa sobre o desenvolvimento inicial da larva, redução da taxa metabólica e baixo consumo de energia quando comparada a 25°C que é utilizada como padrão no protocolo de criação desta espécie. As larvas submetidas a temperaturas mais elevadas (28°C e 31°C) também mostraram desempenho inferior as larvas mantidas a 25°C. Este padrão de de temperaturas também foi observado por Sfakianakis et al., (2011), ao utilizarem larvas de *Danio rerio* para observar a presença de alterações nos caracteres morfométricos e merísticos desde sua eclosão até atingirem 12 mm. Estes autores observaram que temperaturas extremas utilizadas (22°C e 31°C) causaram alterações merísticas importantes. No entanto, Politis et al., (2017), registraram que larvas de *Anguilla anguilla*, apresentaram menor incidência de deformidades a 18°C, em um estudo testando temperaturas de 16°C, 18°C, 20°C, 22°C e 24°C. Padrão similar foi observado em estudos com *Dicentrarchus labrax* que revelam maiores alterações morfológicas em experimentos com temperatura a 20°C do que em 15°C (Sfakianakis et al., 2006). Por outro lado, Georgakopoulou et al., (2010), ao estudarem larvas de *Sparus aurata*, desde o estágio embrionário até juvenil testando três temperaturas (16, 19 e 22°C), observaram que temperaturas inferiores favoreciam malformações no esqueleto.

A salinidade também é considerada um parâmetro ambiental que influencia a sobrevivência, crescimento e distribuição de peixes (Holliday, 1969; Beamish, 1970; Boeuf & Payan, 2001). Ela pode afetar a sobrevivência ao diminuir a alimentação dos peixes (Dendrinis & Thorpe, 1985; Fielder & Bardsley, 1999) e ao modificar o custo energético para a regulação osmótica e iônica (De Boeck et al., 2000, Boeuf & Payan, 2001). No entanto, a variação de salinidade testada no presente estudo, não teve correlação significativa com a ocorrência de AF na fase larval de *E. brasiliensis*, possivelmente por ser uma espécie que tolera grandes variações de salinidade, o que a faz permanecer em ambientes marinhos e estuarinos, explorando os recursos alimentares disponíveis (De Andrade-Tubino et al., 2008). Segundo Vasconcelos Filho et al., (2009) os Gerrídeos são comuns em ambiente estuarino e marinho, caracterizando sua estratégia de vida. Segundo Soares (2017) a salinidade desempenha papel fundamental no desenvolvimento e reprodução de *E. brasiliensis*, estando seus níveis ótimos entre 26,5-37, o que a torna agente desencadeador da melhoria do desempenho da espécie em ambientes marinhos. Neste contexto, esta faixa de salinidade está

dentro da variação utilizada nos tratamentos deste estudo, não sendo um fator determinante de mortalidade e de AF na fase larval da espécie.

O efeito da salinidade varia muito conforme a estratégia de vida dos peixes. Nossos resultados são corroborados por Faulk & Holt (2006) que ao estudarem Beijupirá (*Rachycentron canadum*) observaram que a variação de salinidade durante a fase larval não interfere em sua sobrevivência. Estes autores registraram que, larvas desta espécie de até três dias de vida suportam variações de salinidade entre 20,1–35,6. Larvas de *Solea senegalensis* também se mostraram resistentes em salinidades entre 10 - 33 (Leitón et al., 2012). Estudos realizados com *Inimicus japonicus* durante a fase de absorção do saco vitelínico relatam que os mesmos não sofreram efeitos negativos quando expostos a salinidade entre 25- 29 (Gong Huang & Wen, 2017).

Um possível mecanismo de relação entre AF e estresse é que os organismos requerem mais energia para compensar o estresse, resultando em menores gastos com reprodução e crescimento (Leung et al., 2000), ou seja, tal estresse reduz a energia disponível para o desenvolvimento de precisão nos caracteres (Sommer 1996). De acordo com Kanegae & Lomônaco (2003) é possível prever que organismos com menos habilidade para a plasticidade sejam mais susceptíveis a apresentar maiores índices de AF em situações de estresse. Portanto, maiores níveis de perturbação de habitat podem aumentar os níveis de AF da população, antes de um decréscimo na sobrevivência tornar-se aparente (Lens et al., 2002a).

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo é o pioneiro na detecção de AF no diâmetro dos olhos de larvas da carapeba, *E. brasiliensis* mantidas a temperatura de 20°C. Nossos resultados revelam que a AF no diâmetro dos olhos é uma técnica sensível e eficiente que deve ser usada como ferramenta de detecção de estresse em estágios iniciais de vida dos peixes, e que pode auxiliar no desenvolvimento de protocolos para a larvicultura evitando assim perdas econômicas em sistemas de criação.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Allenbach, D. M. 2010. Fluctuating asymmetry and exogenous stress in fishes: a review. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 21, p. 355–376.

- Almeida, D., Grossman, G. D. 2014. Regulated small rivers as 'nursery' areas for invasive largemouth bass *Micropterus salmoides* in Iberian waters. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 24, n. 6, p. 805-817.
- Alvarez-Lajonchère, L., Pérez Sánchez, L., Hernández Molejón, O. G. 1991. Primeros resultados positivos en experimentos de desove inducido de la rabirrubia, *Ocyurus chrysurus* (Bloch) en Cuba. *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, v. 16, p. 49-58.
- Alvarez Lajonchère, L., Sánchez, L. P., Molejón, O. G., Gómez, E. T. 1996. Mass production of striped patao *Eugerres brasiliensis* juveniles in Cuba. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 27, n. 3, p. 347-352.
- Barón Aguilar, C. C., Rhody, N. R., Brennan, N. P., Main, K. L., Peebles, E. B., Muller Karger, F. E. 2015. Influence of temperature on yolk resorption in common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) larvae. *Aquaculture Research*, v. 46, n. 7, p. 1679-1687.
- Beamish, F. W. H. 1970. Influence of temperature and salinity acclimation on temperature preference of the euryhaline fish *Tilapia nilotica*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, v. 27, n. 7, p. 1209-1214.
- Beasley, D. E., Bonisoli-Alquati, A., Mousseau, T. A. 2013. The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: a meta-analysis. *Ecological Indications*, v. 30, p. 218-26.
- Blaxter, K. An historical perspective: the development of methods for assessing nutrient requirements. 1986. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 45, n. 2, p. 177-183.
- Boeuf, G., Payan, P. 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 130, n. 4, p. 411-423.
- Bosch, J., Márquez, R. 2000. Tympanum fluctuating asymmetry, body size and mate choice in female midwife toads (*Alytes obstetricans*). *Behaviour*, v. 137, n. 9, p. 1211-1222.
- Cerqueira, V. R., Brüger, A. M. 2001. Effect of light intensity on initial survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) Larvae. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 44, n. 4, p. 343-349.
- Cerqueira, V. R., Tsuzuki, M. Y. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 17-28.
- Clark, C. W., Levy, D. A. 1988. Diel vertical migrations by juvenile sockeye salmon and the antipredation window. *The American Naturalist*, v. 131, n. 2, p. 271-290.

- Clarke, G. M. 1992. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin.
- Clarke, G. M. 1995. Relationships between developmental stability and fitness: application for conservation biology. *Conservation Biology*, 9(1), 18-24.
- Costa, C. W., V. D. A., Passini, G., Teles, A., Cerqueira, V. R. 2015. First feeding of *Eugerres brasiliensis* (Carapeva) larvae with *Acartia tonsa* (Copepod) nauplii increases survival and resistance to acute stress. *Boletim de Indústria Animal*, 72(4), 277-283.
- Cushing, D. H. 1990. Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Advances in Marine Biology*, 26: 249–294.
- De Andrade Tubino, M. F., Ribeiro, A. L. R., Vianna, M. 2008. Organização espaço-temporal das ictiocenoses demersais nos ecossistemas estuarinos brasileiros: uma síntese. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 4, p. 5.
- De Boeck, G., Vlaeminck, A., Van Der Linden, A., Blust, R. 2000. The energy metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to salt stress: an increase in energy expenditure or effects of starvation? *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 73, n. 1, p. 102-111.
- De Busserolles, F., Fitzpatrick, J. L., Paxton, J. R., Marshall, N. J., Collin, S. P. 2013. Eye-size variability in deep-sea lanternfishes (Myctophidae): an ecological and phylogenetic study. *PLoS One*, v. 8, n. 3.
- Dendrinou, P., Thorpe, J. P. 1985. Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture*, v. 49, n. 3-4, p. 333-358.
- Emata, A. C., Eullaran, B., Bagarinao, T. U. 1994. Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, v. 121, n. 4, p. 381-387.
- Faulk, C.K., Holt, G.J. 2006. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity. *Aquaculture*, v. 254, p. 275–283.
- Fielder, D. S. Bardsley, W. 1999. A preliminary study on the effects of salinity on growth and survival of mullet *Argyrosomus japonicus* larvae and juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 30, n. 3, p. 380-387.
- Fuller, R. C., Houle, D. 2002. Detecting genetic variation in developmental instability by artificial selection on fluctuating asymmetry. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 15, n. 6, p. 954-960.

- Glamuzina, B., Skaramuca, B., Glavic, N., Kozvul, V., Dulcic, J., Kraljevic, M. 1998. Egg and early larval development of laboratory reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pacies, Serranidae). *Scientia Marina*, v. 62, n. 4, p. 373-378.
- Gong, X, Huang, X, Wen, W. 2017. Influence of salinity on the early development and biochemical dynamics of a marine fish, *Inimicus japonicus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, p. 1-11.
- Hammer, O., Harper, D. A. Ryan, P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1.
- Holliday, F. G. T. 1969. The Effects of Salinity on the Eggs and Larvae of Teleosts. In: *Fish physiology*. Academic Press, p. 293-311.
- Jawad, L., Al-Mamry, J., Al-Busaidi, J., Al-Mamari, A., Al-Mamry, S., Al-Owisi, K., Al-Rubiey, M. 2012. Asymmetry in some morphological characters of Indian Oil Sardine, *Sardinella longiceps* Valenciennes, 1847 collected from Muscat Waters on the Sea of Oman. *Water Research and Management*, v. 2, n. 1, p. 61-64.
- Kanegae, A. P., Lomônaco, C. 2003. Plasticidade morfológica, reprodutiva e assimetria flutuante de *Myzus persicae* (Sulzer)(Hemiptera: Aphididae) sob diferentes temperaturas. *Neotrop Entomol*, 32(1), 37-43.
- Leitón, S. E. A., Rodriguez Rúa, A., Asensio, E., Infante, C., Manchado, M., Fernández Díaz, C., & Cañavate, J.P. 2012.. Effect of salinity on egg hatching, yolk sac absorption and larval rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Reviews in Aquaculture*, v. 4, n. 2, p. 49-58.
- Lens, L. U. C., Van Dongen, S., Kark, S., Matthysen, E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies?. *Biological reviews*, 77(1), 27-38.
- Leung, B., Forbes, M. R., Houle, D. 2000. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *American Naturalist*, 155, 101–115.
- Lim, C. E., Webster, C. D. 2006. Nutrient requirements. *Tilapia: Biology, Culture and Nutrition*. Food Products Press, New York, USA, 469-501.
- Lomonaco, C., Germanos, E. 2001. Variações fenotípicas em *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae) em resposta à competição larval por alimento. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 2, p. 223-231.

- Lutterschmidt, W. I., Martin, S. L., Schaefer, J. F. 2016. Fluctuating asymmetry in two common freshwater fishes as a biological indicator of urbanization and environmental stress within the Middle Chattahoochee Watershed. *Symmetry*, v. 8, n. 11, p. 124.
- Maciel, C. M. R. R. 2006. Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus valenciennes* (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 229p.
- Markow, T. A. 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology*, v. 40, n. 1, p. 105-120.
- Ostini, S, Oliveira, I.R., Serralheiro, P. C. S., Sanches, E.G. 2007. Criação do robalo-peva (*Centropomus parallelus*) submetido a diferentes densidades de estocagem. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, n.3, p. 250-257.
- Oxnevard, S. A., Heibo, E., Vollestad, L. A. 2002. Is there a relationship between fluctuating asymmetry and reproductive investment in perch (*Perca fluviatilis*)? *Canadian Journal of Zoology*, v. 80, p. 120–125.
- Palmer, A. R., Strobeck, C. 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: M. Polak (ed.). *In: Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. 279-319. Oxford University Press: United Kingdom.
- Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: A primer. In T. A. Markow (Ed.). *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. 335-364. Kluwer: Netherlands.
- Palmer, A. R., Strobeck, C. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica*, 191, 55-70.
- Palmer, R., Strobeck, C. 1998. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 17, p. 391-421.
- Pechenic, J. A., Wendt, D. E., Jarrett, J. N. 1998. Metamorphosis is not a new beginning. *BioScience*, v. 48, p. 901–910.
- Pepin, P., Robert, D., Bouchard, C., Dower, J. F., Falardeau, M., Fortier, L., Meekan, M. G. 2014. Once upon a larva: revisiting the relationship between feeding success and growth in fish larvae. *ICES Journal of Marine Science*, v. 72, n. 2, p. 359-373.
- Politis, S. N., Mazurais, D., Servili, A., Zambonino-Infante, J. L., Miest, J. J., Sørensen, S. R., Butts, I. A. 2017. Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PloS one*, 12 (8).



- Ramos, J.A.A., M. Barletta, D.V. Dantas, A.R.A. Lima, M.F. Costa. 2014. Trophic niche and habitat shifts of sympatric Gerreidae. *J. Fish. Biol.*, v.85, p. 1446-1469.
- Relyea, R. A., Hoverman, J. T. 2003. The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia* v. 134, p. 596–604.
- Sanseverino, A. M., Messimian, J. L. 2008. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 4,
- Seixas, L.B, Dos Santos, A.F.G.N, Dos Santos, L.N. 2016. Fluctuating asymmetry: A tool for impact assessment on fish populations in a tropical polluted bay, Brazil. *Ecological indicators*, v. 71, p. 522-532.
- Sfakianakis, D. G., Georgakopoulou, E., Papadakis, I. E., Divanach, P., Kentouri, M., & Koumoundouros, G. 2006. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 254(1-4), 54-64.
- Sfakianakis, D. G, Leris, I., Laggis, A., Kentouri, M. 2011. The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Environmental Biology of Fishes*, v. 92, n. 2, p. 197-205.
- Soares, E.C., Paiva, A. G., Santos, E. L., Pereira, S. M., Santos, E. S., Almeida, E. O., Silva, T. J. 2017. Potential of carapeba, *Eugerres brasiliensis* for culture. Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research, v. 44, n. 4.
- Sommer, C. 1996. Ecotoxicology and developmental stability as an in situ monitor of adaptation. *Ambio* 25: 374–376.
- Suthers, I. M., Sundby, S. 1996. Role of the midnight sun: comparative growth of pelagic juvenile cod (*Gadus morhua*) from the Arcto-Norwegian and a Nova Scotian stock. *ICES Journal of Marine Science*, v. 53, n. 5, p. 827-836.
- Take, H., Baevefjord, G., Lunde, M., Kolstad, K., Andersen, O. 2005. The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, v. 249, n. 1, p. 515-524.
- Tsuzuki, M. Y., Berestias, A. C. 2008. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v.34, n.4, p. 535-541.
- Vasconcelos-Filho, L, A., Neumann, L, S., Eskenazi, L, E., De Oliveira, A. M. S. 2009. Hábitos alimentares de consumidores primários da ictiofauna do sistema estuarino de Itamaracá (Pernambuco-Brasil). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(1), 21-31.

- Vollset, K. W., Folkvord, A., Browman, H. I. 2011. Foraging behaviour of larval cod (*Gadus morhua*) at low light intensities. *Marine biology*, v. 158, n. 5, p. 1125-1133.
- Wang, Li Hsueh, Tsai, Ching Lin. 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 286, n. 5, p. 534-537.
- Zavala-Camin, L.A. 1996. Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes. Eduem/SBI, Maringá.

## Capítulo II

---

### **Efeito de variáveis ambientais sobre a assimetria bilateral de larvas de peixe palhaço *Amphirion ocellaris***

## RESUMO

O presente trabalho é pioneiro em avaliar através de experimentos em microcosmos, a existência de assimetria flutuante (AF) nas larvas do peixe palhaço, *Amphirion ocellaris* submetidas a diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C), salinidades (25, 30 e 35) e fotoperíodos (6, 8 e 10h), com três replicas cada. Foram utilizados três índices individuais:  $FA1=|D-E|$ ;  $FA2 = |D- E|÷[( D+E) ÷2]$ ; e  $FA5 = (D-E)^2$ , como proposto por Palmer (1994), onde: D = lado direito; e E = lado esquerdo. A AF foi aplicada no diâmetro dos olhos de 101 larvas de *A. ocellaris*. Foi aplicada PERMANOVA para verificar diferenças entre os tratamentos e a AF. O teste T-student validou a existência de AF nas larvas de *A. ocellaris* ( $p=0,54$ ). A sobrevivência das larvas não diferiu significativamente para diferentes salinidades (PERMANOVA;  $F=0,5$ ;  $p=1$ ), temperaturas (PERMANOVA;  $F= 0,8$ ;  $p=0,68$ ) e fotoperíodos (PERMANOVA;  $F= 0,13$ ;  $p=0,99$ ). Para a salinidade, o índice AF2 apontou uma diferença significativa (PERMANOVA;  $F=6,02$ ;  $p=0,006$ ) sugerindo que a salinidade mais alta (35) foi mais estressante para *A. ocellaris*. Os experimentos com temperatura (PERMANOVA;  $F= 1,65$ ;  $p=0,19$ ) e fotoperíodo (PERMANOVA;  $F= 1,05$ ;  $p=0,35$ ) não apresentaram diferenças significativas. A ausência de relação significativa da AF com a sobrevivência possivelmente ocorreu, devido às larvas ainda possuírem saco vitelínico, o que justifica a baixa mortalidade registrada. O peixe palhaço possui protocolo bem desenvolvido e mostra melhor sobrevivência para salinidades entre 25-30, corroborando com nossos dados. A ocorrência de AF não foi alterada por diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) e fotoperíodos (6h, 8h e 10h), isto pode sugerir uma baixa vulnerabilidade para os fatores nos parâmetros analisados, mas também pode ter sido reflexo do tempo de duração do experimento.

Palavras-chave: Piscicultura marinha; Assimetria flutuante; Pomacentridae; Morfometria; Larvicultura.

## ABSTRACT

The present work is a pioneer in evaluating, through experiments in microcosms, the existence of Fluctuating asymmetry (FA) in the larvae of the clownfish, *Amphirion ocellaris* submitted to different temperatures (20, 25 and 30°C), salinities (25, 30 and 35) and photoperiods (6, 8 and 10h), with three replicates each. Three individual indices were used:  $FA1 = |D-E|$ ;  $FA2 = |D-E| \div [(D+E) \div 2]$ ; and  $FA5 = (D-E)^2$ , as proposed by Palmer (1994), where: D = right side; and E = left side. AF was applied to the eye diameter of 101 larvae of *A. ocellaris*. PERMANOVA was applied to verify differences between treatments and FA. The T-student test validated the presence of FA in *A. ocellaris* larvae ( $p = 0.54$ ). The larvae survival did not differ significantly for different salinities (PERMANOVA,  $F = 0.5$ ,  $p = 1$ ), temperatures (PERMANOVA;  $F = 0.8$ ;  $p = 0.68$ ) and photoperiods (PERMANOVA;  $F = 0.13$ ;  $p = 0.99$ ). For salinity, the AF2 index showed a significant difference (PERMANOVA;  $F = 6.02$ ;  $p = 0.006$ ) suggesting that the higher salinity (35) was more stressful for *A. ocellaris*. The experiments with temperature (PERMANOVA;  $F = 1.65$ ;  $p = 0.19$ ) and photoperiod (PERMANOVA;  $F = 1.05$ ;  $p = 0.35$ ) showed no significant differences. The absence of a significant relationship between FA and survival may have occurred because larvae still have a yolk sac, which justifies the low mortality rate. The clownfish has a well developed protocol and shows better survival for salinities between 25-30, corroborating with our data. The occurrence of FA was not altered by different temperatures (20°C, 25°C and 30°C) and photoperiods (6h, 8h and 10h), this may suggest a low vulnerability to the factors in the analyzed parameters, but may also have the duration of the experiment.

**Keywords:** Marine fish farming; Fluctuating asymmetry; Pomacentridae; Morphometry; Larviculture.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de peixes de corte é o foco da piscicultura mundial, no entanto o cultivo de peixes ornamentais tem ganhado cada vez mais espaço e tem se consolidado como um importante setor da Aquicultura (Palma et al., 2008). O valor do comércio de peixe ornamental cresceu significativamente ao longo das últimas décadas. Entre 2000 e 2011, as exportações globais de peixes ornamentais aumentaram de US\$ 181 milhões para US\$ 372 milhões. Este setor desempenha um papel relevante em termos de redução da pobreza nos países em desenvolvimento e preservação marinha (Monticini, 2010).

Ao contrário do comércio de espécies de peixes ornamentais de água doce onde 90% dos organismos são provenientes da Aquicultura, a grande maioria das 1.471 espécies marinhas mundialmente comercializadas para fins ornamentais são extraídas do seu habitat natural (Wabnitz et al., 2003). O peixe-palhaço *Amphirion ocellaris*, por exemplo, foi altamente afetado pela extração irresponsável e foi amplamente coletado em regiões no Pacífico. Em virtude disso, iniciou-se a reprodução em cativeiro desta espécie e como o sucesso da mesma, hoje os peixes palhaços são amplamente estudados, comercializados e preservados.

A larvicultura costuma ser uma etapa delicada na produção de peixes. Mesmo peixes amplamente estudados como o *A. ocellaris* podem apresentar problemas neste período e gerar prejuízos aos produtores. A determinação dos melhores parâmetros ambientais para o cultivo de larvas pode contribuir com o crescimento e a sobrevivência larval, com a redução do período de larvicultura e os custos de produção (Hart et al., 1996). Um dos problemas mais comuns nesta fase é a adaptação ao primeiro alimento, logo após a exaustão do vitelo. Alguns parâmetros físicos também podem ter grande importância neste momento, sendo a temperatura, a salinidade e o fotoperíodo variáveis consideradas como os mais importantes na durante a ontogenia (Hart et al., 1996; Kamler, 2002). Esses parâmetros têm sido investigados para avaliar os impactos na sobrevivência, crescimento, natação e metamorfose na larvicultura das espécies do gênero *Amphiprion* (Arvedlund et al., 2000; Green et al., 2004; Le et al., 2009; Medeiros, 2013).

Para observar as alterações que esses parâmetros podem causar nesta fase larval a assimetria flutuante (AF) destaca-se devido à intrínseca capacidade de revelar a estabilidade do indivíduo diante o estresse ambiental. O uso da AF tem se consolidado como ferramenta indicadora da qualidade individual e/ou estimador de algum tipo de perturbação ambiental (Palmer & Strobeck, 1992; Somarakis et al., 1997; Oxnevard et al., 2002; Kristoffersen & Megoulas, 2009;). Em teoria, estruturas morfológicas pareadas apresentam perfeita simetria

entre elas (Van Vallen, 1962), desta forma, os desvios da manutenção do eixo da simetria bilateral podem indicar organismos submetidos a estresses ambientais (Palmer, 1994; Somarakis et al., 1997). A AF pode ser definida como alterações morfológicas aleatórias entre os planos com simetria bilateral de uma determinada estrutura, em decorrência do efeito de condições ambientais adversas (Van Vallen, 1962; Palmer, 1994; Herminta et al., 2013). Através da AF é possível determinar se os efeitos de variações ambientais afetam de alguma forma o desenvolvimento dos peixes.

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar através de experimentos em microcosmos, a existência de AF nas larvas de *Amphirion ocellaris* submetidas a diferentes temperaturas, salinidades e fotoperíodos, de forma a contribuir na busca da redução de anomalias e perdas econômicas em pisciculturas marinhas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar através de experimentos em microcosmos, assimetria flutuante nas larvas de *Amphirion ocellaris* submetidas a diferentes salinidades, temperaturas e fotoperíodos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Medir o diâmetro dos olhos e o comprimento total das larvas;
- Calcular a assimetria flutuante;
- Correlacionar AF com sobrevivência das larvas e os valores das variáveis de salinidade, temperatura e fotoperíodo;

## **3. HIPÓTESE**

Valores de salinidade, temperatura e fotoperíodo refletem em maiores valores de AF do diâmetro dos olhos de larvas de *Amphirion ocellaris*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Aquisição de larvas**

As larvas de Peixe palhaço, *Amphirion ocellaris*, foram obtidas através de uma desova de peixes reprodutores que fazem parte do plantel da empresa de aquarofilia Aquasmart em São Paulo, SP, Brasil, no período entre o final de maio e o início de junho de 2017. Os ovos foram retirados dos aquários das matrizes e foram acondicionados em um aquário de 40L, aerado através de mangueiras de silicone conectadas ao sistema de aeração da empresa onde ficaram até a sua eclosão, que ocorreu em aproximadamente dez dias. Após a eclosão as larvas foram selecionadas aleatoriamente com uma pipeta pasteur e transferidas para os aquários experimentais de 1,5L (11,5cm x 11,5cm x 13cm) onde foram mantidos por 24h.

#### **4.2 Experimento 1**

Foi analisado o diâmetro dos olhos das larvas em diferentes salinidades. Utilizaram-se três tratamentos (25, 30 (salinidade controle usada na fase larval da espécie (Cerqueira & Tsuzuki, 2009) e 35) com três réplicas cada. Foram colocadas 5 larvas em cada aquário de 1,5L (11,5cm x 11,5cm x 13cm), que foram mantidas por 24h até absorção do saco vitelínico (Cerqueira & Tsuzuki, 2009). Para os teores de salinidade foi usado sal marinho comercial, e quantificado com auxílio de um refratômetro (Modelo RTS-101 ATC). A temperatura controle mantida em todos experimentos foi de 25°C, seguindo o protocolo da empresa para o cultivo da espécie.

#### **4.3 Experimento 2**

No experimento 2 foi analisado o diâmetro dos olhos da espécie em diferentes temperaturas. Utilizaram-se três tratamentos (20°C, 25°C (temperatura controle usada na fase larval da espécie (Cerqueira & Tsuzuki, 2009)) e 30°C) com três réplicas cada. Foram colocadas 5 larvas em cada aquário de 1,5L (11,5cm x 11,5cm x 13cm) que foram mantidas por 24h até absorção do saco vitelínico (Cerqueira & Tsuzuki, 2009). O controle de temperatura foi realizado utilizando um termostato (Roxin Ht-1900). A salinidade controle mantida em todos experimentos foi de 30, seguindo o protocolo da empresa e de Araújo et al., (2000).

#### **Experimento 3**

Foi analisado o diâmetro dos olhos das larvas em diferentes fotoperíodos. Utilizaram-se três tratamentos (6h, 8h e 10h (controle)) com três réplicas cada. Foram adicionadas 5 larvas em cada aquário de 1,5L (11,5cm x 11,5cm x 13cm), que foram mantidas por 24h até a absorção do saco vitelínico (Cerqueira & Tsuzuki, 2009). Para o bloqueio de luz durante o período escuro dos experimentos foram utilizadas lonas pretas. A salinidade controle mantida para todos os experimentos foi de 30, e a temperatura de 25°C, seguindo o protocolo da empresa para o cultivo da espécie e por Araújo et al., (2000).

Durante todos os experimentos não foi necessário nenhum tipo de aeração devido a duração, quantidade de larvas e tamanho dos aquários utilizados no experimento. Durante este período as larvas foram alimentadas uma vez ao dia com 100 ml de rotíferos e 60ml de microalgas.

No final de cada experimento, as larvas foram eutanasiadas em gelo e eugenol e armazenadas em formol a 10% para as análises morfológicas em microscopia no Laboratório de Ecologia Aplicada da UFF. O presente estudo tem aprovação do Comitê de Ética Animal da UFF - CEUA, processo n. 912.

#### 4.5 Assimetria Flutuante

Para a análise morfológica das larvas, foi usado uma lupa Olympus BX51 com câmera fotográfica (AxioCamERc5s) com precisão de zoom de 1.0. As larvas foram posicionadas para obtenção de fotografias do lado esquerdo e direito (Figura 1). Foi utilizado glicerol para melhor visualização e posicionamento das larvas na lâmina.

Para a medição das larvas foi utilizado o programa TPSDIG (2.3.2). Foram feitas medidas do comprimento total das larvas (mm) e do diâmetro dos olhos das mesmas (mm) (Almeida & Grossman, 2014; Lutterschmidt et al., 2016; Seixas et al., 2016). O diâmetro dos olhos foi medido duas vezes em pelo mesmo observador, sendo as estruturas lesionadas descartadas, a fim de minimizar a ocorrência de erro de medição. Foi medido um total de 101 larvas.





Figura 1. Larva de *A. ocellaris* com medidas de comprimento total (mm) e diâmetro do olho (mm) geradas nos programa TPSDIG (2.3.2).

#### 4.6 Tratamento de Dados e Análises Estatísticas

O teste PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) foi utilizado (Distância Euclidiana; 10000 permutações por análises) para observar a ocorrência do erro de medição entre os valores encontrados na primeira e segunda medição realizadas para o diâmetro dos olhos. Resultados não significativos ( $p > 0,05$ ) eliminam a possibilidade de erro de medição, sendo considerada uma probabilidade de 95%.

Para avaliar o tipo de assimetria existente (i.e. assimetria direcional, assimetria flutuante ou antissimetria) no diâmetro dos olhos, foram aplicados os testes t-Student e histograma de distribuição. O teste t-Student avaliou se os valores diferiram da média zero e, com o auxílio de histogramas, se os dados se ajustaram a curva de distribuição normal. A confirmação de média zero e da normalidade dos dados valida a existência da AF (Palmer, 1994; Oxnevard et al., 2002). Falsos resultados da existência da AF podem ser encontrados devido a correlações significativas entre os níveis de assimetria com o tamanho da estrutura analisada (Palmer & Strobeck, 1986; Palmer, 1994).

Para verificar a dependência da AF em relação ao tamanho da estrutura, foi realizado o teste de correlação de Spearman entre a simetria absoluta  $[R-L]$  e o tamanho do caractere  $[R+L]/2$ . O coeficiente de Spearman é mais recomendado para este tipo de análise, pois também é capaz de detectar relações não-lineares (Palmer & Strobeck, 1986).

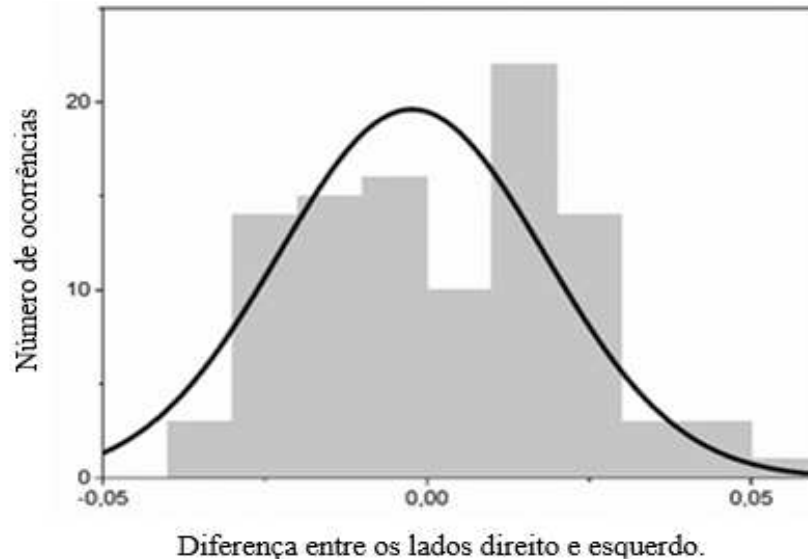
Para calcular os níveis de AF foram selecionados três índices individuais:  $FA1 = |D-E|$ ;  $FA2 = |D-E| \div [(D+E) \div 2]$ ; e  $FA5 = (D-E)^2$ , como proposto por Palmer (1994), onde: D = lado direito; e E = lado esquerdo. Estes três índices são os mais difundidos e comumente usados em estudos de AF (Palmer & Strobeck, 1992; Palmer, 1994), por serem de fácil aplicação, compreensão e baixa vulnerabilidade ao viés de dados. A única estrutura pareada

testada para o presente estudo com AF foi o diâmetro dos olhos, por ter sido a única com precisão a ser medida.

O teste PERMANOVA foi usado para comparar médias de percentagem de sobrevivência das larvas nos tratamentos testados. O PERMANOVA também foi usado para determinar quais médias eram significativamente diferentes da AF em *A. ocellaris* entre os tratamentos de salinidade, temperatura e fotoperíodo seguida do teste pos-hoc PERMANOVA, ao nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises do PERMANOVA foram realizadas no programa PAST 3.10 (HAMMER et al., 2001).

## 5. RESULTADOS

A frequência das diferenças entre o lado direito e esquerdo para o diâmetro do olho não diferiram significativamente de zero (Teste t-Student;  $p=0,54$ ), eliminando a possibilidade de presença de assimetria direcional. A distribuição normal da diferença entre os lados do diâmetro do olho demonstrada pelo histograma atendeu satisfatoriamente ao pressuposto da normalidade, e eliminou a presença de antissimetria. Neste contexto, tais resultados comprovam a existência de assimetria flutuante (Figura 2).



**Figura 2.** Histograma de frequência de diferenças entre o lado direito e esquerdo para o diâmetro dos olhos em *Amphirion ocellaris*.

O teste de correlação de Spearman não identificou relações significativas entre o diâmetro do olho e o comprimento total de *A. ocellaris* (Spearman ( $r$ );  $p= 0,20$ ), eliminando a interferência do comprimento total da larva na estrutura analisada.

A comparação entre a primeira e segunda medida do diâmetro do olho não apresentou diferença significativa (PERMANOVA;  $F= 0,96$ ;  $p=0,77$ ), o que descarta a influência de erro de medição.

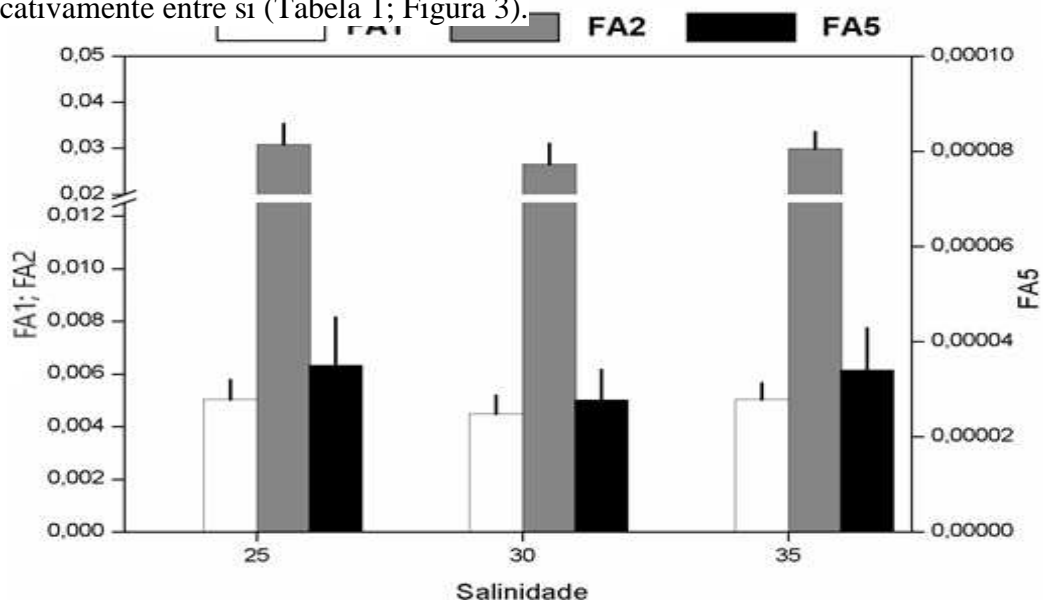
A percentagem de sobrevivência das larvas de *A. ocellaris* não diferiu significativamente entre os tratamentos de salinidade (PERMANOVA;  $F=0,5$ ;  $p=1$ ), onde se foi observado uma média de sobreviventes de  $97,7\% \pm 0,15$  para salinidade de 25;  $97,7\% \pm 0,15$  para salinidade de 30; e  $100\%$  para salinidade de 35. Também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos temperatura (PERMANOVA;  $F= 0,8$ ;  $p=0,68$ ), onde se foi observado uma média de sobreviventes de  $97,7\% \pm 0,15$  para temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ ;  $93,3\% \pm 0,27$  para temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ ; e  $97,7\% \pm 0,15$  para temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Não houve diferença significativa da sobrevivência entre os tratamentos de fotoperíodo (PERMANOVA;  $F= 0,13$ ;  $p=0,99$ ), onde se foi observado uma média de sobreviventes de  $91,1\% \pm 0,15$  para o fotoperíodo de 6h; de  $93,3\% \pm 0,27$  para o fotoperíodo de 8h; e de  $97,7 \pm 0,15$  para o fotoperíodo de 10h.

A AF diferiu significativamente no FA2 nos tratamentos de salinidade (Tabela 1).

**Tabela 1.** PERMANOVA dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *Amphirion ocellaris* nos tratamentos com diferentes salinidades, temperaturas e fotoperíodos. \*Diferença significativa ( $p<0,05$ ).

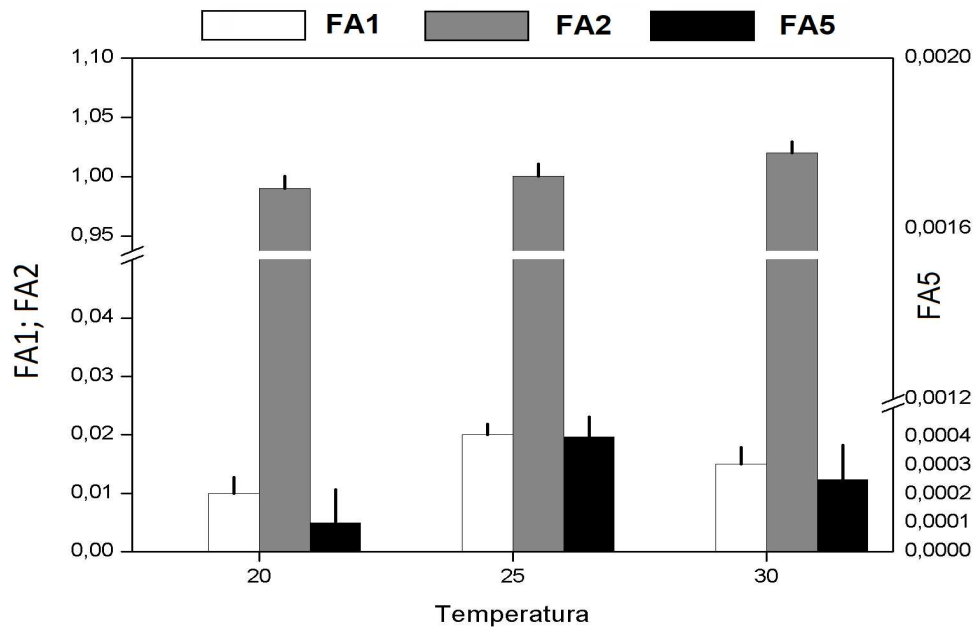
Índices de Assimetria Flutuante	Salinidade			Temperatura		Fotoperíodo	
	F	<i>p</i>	Post hoc	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
FA1	1,40	0,260	-	0,19	0,82	0,97	0,42
FA2	6,02	0,006*	35 < 30 =25	1,75	0,19	1,06	0,35
FA5	0,98	0,392	-	0,19	0,84	1,22	0,32

O índice FA2 apontou uma maior ocorrência de AF para as larvas submetidas ao tratamento de salinidade de 35 do que nos tratamentos de 25 e 30 que não diferiram significativamente entre si (Tabela 1; Figura 3).



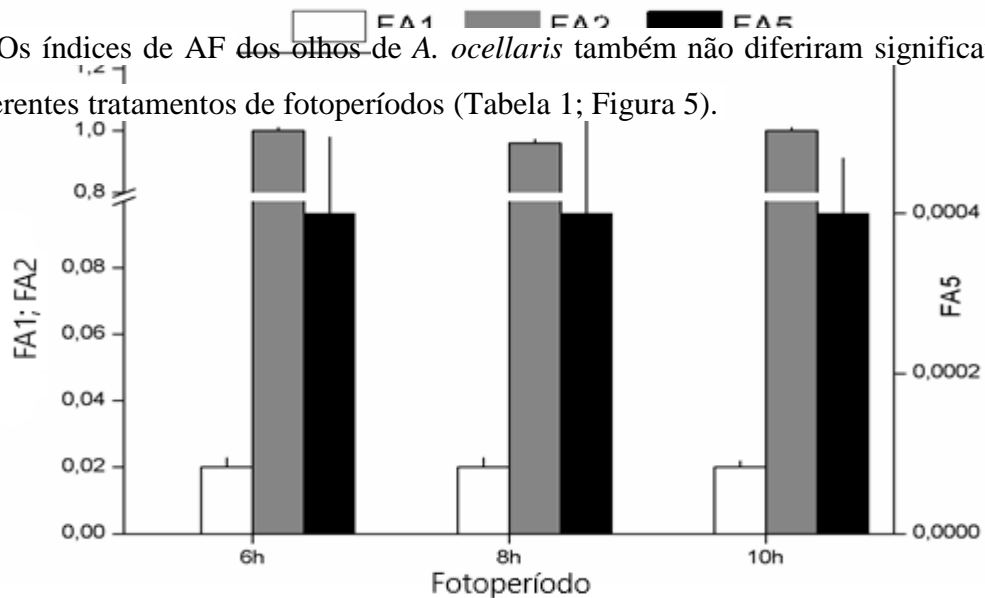
**Figura 3.** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *Amphirion ocellaris* nos tratamentos com diferentes salinidades.

Os índices de AF dos olhos de *A. ocellaris* não diferiram significativamente nos tratamentos com diferentes temperaturas (Tabela 1, Figura 4).



**Figura 4.** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *Amphirion ocellaris* nos tratamentos com diferentes temperaturas.

Os índices de AF dos olhos de *A. ocellaris* também não diferiram significativamente nos diferentes tratamentos de fotoperíodos (Tabela 1; Figura 5).



**Figura 5.** Média  $\pm$  erro padrão dos índices de assimetria flutuante (FA1; FA2; FA5) usando o diâmetro dos olhos de *Amphirion ocellaris* nos tratamentos com diferentes fotoperíodos.

## 6. DISCUSSÃO

O diâmetro dos olhos de peixes para validação da existência da AF ainda não é uma abordagem muito reconhecida. Em larvas de *A. ocellaris* o diâmetro dos olhos apresenta sensibilidade para detecção da AF, possivelmente por serem funcionais e em fase de desenvolvimento, o que os torna vulneráveis aos agentes estressores ambientais e genéticos, ao contrario de relato de estudos em peixes adultos onde esta estrutura é considerada menos sensível (Palmer & Strobeck, 2003; Jawad et al., 2012). Nossos resultados apontam a AF no diâmetro dos olhos nas primeiras 24h, período que antecede a absorção do saco vitelínico, que pode vir afetar o papel decisivo na percepção do alimento e conseqüentemente no desenvolvimento de *A. ocellaris* (Gerking, 1994).

Não foram detectadas evidências de antissimetria em *A. ocellaris*. A identificação da existência de outros tipos de assimetria bilateral, além da flutuante (i.e. direcional ou antissimetria) é recomendável (Palmer, 1994; Allenbach et al., 1999), uma vez que a ocorrência destas pode interferir nos resultados de alguns estimadores da instabilidade do desenvolvimento (Palmer, 1994; Graham et al., 1998; Van Dongen et al., 1999). Entretanto, muitos estudos não dão a devida atenção a essa diferenciação.

Ao se testar os parâmetros abióticos no presente estudo, apenas a salinidade influenciou a AF do diâmetro dos olhos de forma significativa. No gênero *Amphirion*, os fatores abióticos têm sido investigados para avaliar os impactos na sobrevivência, crescimento, natação e metamorfose durante a larvicultura (Arvedlund et al., 2000; Green et al., 2004; Le et al., 2009; Medeiros, 2013 ). A tolerância à salinidade de uma espécie é uma consideração importante no cultivo de organismos marinhos e de água doce, fornecendo informações sobre os requisitos ambientais básicos essenciais para o sucesso do manejo em cativeiro (Dhaneesh et al., 2012). A salinidade influencia a quantidade de energia investida na

osmorregulação, e com isso afeta diretamente a eficiência da utilização da reserva vitelínica, o crescimento de larvas e sua sobrevivência (Howell et al., 1998). No presente estudo, o índice FA2, exibiu maior relação significativa nos tratamentos de salinidade de 35, indicando que a maior salinidade causa maior estresse para as larvas, ao contrario do observado nos tratamentos de salinidade de 25 e 30. Este padrão é corroborado por Le et al., (2009; 2011) onde mencionam que na larvicultura de *Amphirion clarkii* e *Amphirion percula* é importante manter a salinidade de 25, em virtude do melhor desempenho zootécnico devido ao menor gasto de energia das espécies para a osmorregulação.

A assimetria flutuante (AF), por outro lado não diferiu nos tratamentos de diferentes temperaturas da água. A faixa de tratamento utilizada: 20°C, 25°C e 30°C foi bem tolerada pela espécie, não evidenciando estresse nas larvas. A temperatura desempenha um papel importante na distribuição vertical de peixes ornamentais marinhos dentro de habitats de recifes de corais (Wexler et al., 2007). A sobrevivência de larvas de peixes marinhos durante a primeira semana após a eclosão depende das interações entre predadores-presas, mas também, pode depender da temperatura, salinidade e níveis de oxigênio encontrados nesses habitats onde ocorre a desova (Glynn, 2001; Fiedler & Talley 2006). Segundo Margulies et al., (2007) a duração em que ocorre a absorção do saco vitelino até a primeira alimentação é completamente dependente da temperatura. Entender qual a melhor temperatura para o desenvolvimento do peixe além de favorecer o crescimento, pode favorecer maior sucesso produtivo em piscicultura. Trabalhos realizados com larvas mantidas em experimentos com diferentes temperaturas por Methari et al., (2015) com *Premnas biaculeatus*, *Amphiprion clarkii* e *Amphiprion akallopisos*; Ye Le et al., (2011) com *Amphiprion clarkii*; e Rao et al., (2014) com *A. ocellaris* observaram melhores desempenhos das espécies frente a temperaturas em torno de 34°C, no entanto, estes estudos não abordaram AF.

Entre os fatores ambientais, o fotoperíodo age como um sincronizador do ritmo endógeno e influencia a atividade locomotora, o crescimento, a taxa metabólica, a pigmentação corporal e reprodução a de peixes teleósteos (Boeuf & Le Bail, 1999; El-Sayed & Kawanna, 2004; Veras et al., 2013). O ciclo claro/escuro é reconhecido como o principal fator que arrasta ritmos biológicos em peixes teleósteos através sua influência na fisiologia alimentar e na expressão gênica (López-Patiño et al., 2011; Del Pozo et al., 2012; Martín Robles et al., 2012; Montoya et al., 2010; Vera et al., 2013). Este fator também influencia a alimentação que segue certos padrões de ritmos circadianos (Reynalte-Tataje et al., 2002) e a estratégia de vida dos peixes. No presente trabalho, não foi evidenciado relação entre o

fotoperíodo e a AF das larvas de *A. ocellaris*, nos tratamentos de 6h, 8h e 10h de luz. Padrão oposto do observado foi descrito por Arvedlund et al. (2000) e Pereira-Davison & Callan (2017) onde observaram que 16h de luz era o ideal para a produção de *Amphiprion melanopus* e *Zebrasoma flavescens* respectivamente, ao se comparar o desempenho das espécies mantidas num fotoperíodo de 12h e 24h, no entanto, estes autores não testaram AF. Segundo Villamizar et al., (2011) e Blanco-Vives (2010) um regime de luz contínuo é considerado estressante sobre o desenvolvimento de larvas de várias espécies de peixes, causando possíveis problemas como: redução da inflação da bexiga natatória, deformações do esqueleto, especialmente a mandíbula (Villamizar et al., 2009; Blanco-Vives, 2010), características estas não observadas para as larvas do peixe-palhaço no primeiro dia de vida.

No presente estudo, observou-se que há diferença da sensibilidade dos diferentes índices testados com o carácter analisado, que foi o diâmetro dos olhos das larvas. Em geral, os índices FA1 e FA2 são utilizados como avaliadores de estresse nas pesquisas com assimetria bilateral (Palmer, 1994). Ambos os índices produzem valores de fácil entendimento e interpretação, são considerados imparciais ao desvio padrão da amostra e recomendado para testar diferenças entre três ou mais amostras (Palmer & Strobeck, 1992; Palmer, 1994). O FA1 e FA5 foram menos sensíveis quando comparados ao índice FA2, apesar do FA1 ser um dos índices mais frequentemente utilizados como estimador da AF em estudos com peixes (Somarakis et al., 1997; Oxnevad et al., 2002; Ayoade et al., 2004; Kristoffer & Magoulas, 2009) e o FA5 ser particularmente recomendado para amostras de pequeno tamanho ( $N \leq 25$ ; Palmer & Strobeck, 1986; Palmer, 1994). Os resultados encontrados demonstraram que realmente há variações na sensibilidade dos índices que estimam a AF, ratificando os resultados de Palmer & Strobeck (1986) e Palmer (1994). Neste contexto, percebe-se que o uso de diferentes índices é importante para acrescentar uma maior robustez a análise de AF frente a cada carácter a ser testado, assim como, pesquisas adicionais se fazem necessárias para investigar as diferenças morfológicas observadas.

Para todos os experimentos testados, a percentagem de mortalidade registrada no presente estudo foi baixa (<10%) em todos os tratamentos, não sendo relacionada significativamente com a AF das larvas de *A. ocellaris*. A baixa mortalidade pode ser reflexo das primeiras 24h de vida das larvas, período em que ainda havia reserva vitelínica. Segundo Olivotto et al., (2011), na larvicultura do peixe-palhaço a maior mortalidade ocorre entre o primeiro e o sétimo dia, devido a transição da alimentação endógena para a exógena.

Em suma, o presente trabalho é pioneiro na detecção de AF no diâmetro do olho de larvas de *Amphiprion ocellaris*. Devido ao curto período de absorção da reserva vitelínica o protocolo que utiliza a fase do “ponto de não retorno” (PNR) pode não ser o mais indicado para espécies com esta estratégia de vida. É possível que a sensibilidade da AF aumente ao testar sua ocorrência em um período maior de vida destas larvas. No entanto, os dados aqui apresentados, reforçam a utilização da AF como uma ferramenta eficiente para detectar a ocorrência de estresse em período larval, que pode vir acarretar no desempenho zootécnico desta espécie em sistemas de cultivo.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A escassez de estudos sobre a utilização da AF em larvas de peixes mantidas em diferentes condições ambientais dificulta a comparação entre os resultados encontrados. Nossos resultados sinalizaram que as variações dos níveis da AF coincidiram com ambientes com maiores sanidades.

Pesquisas adicionais são recomendadas, para testar a validação do protocolo com a mesma espécie com período de vida maior na fase larval e/ou juvenil, a fim de detectar se os desvios bilaterais são corrigidos durante o desenvolvimento, ou se existe uma variação natural dos desvios bilaterais próprio da espécie, além de, estender o presente trabalho a outras larvas de espécies de peixe marinho oriundas de piscicultura, de forma a contribuir na busca da redução de anomalias e perdas econômicas.

## **8. CONCLUSÃO**

Este trabalho acrescenta uma nova abordagem a ser aplicada no desenvolvimento da piscicultura no país. Foi possível obter resultados importantes para duas espécies que apresentam estratégias de vida distintas e que são exploradas comercialmente em diferentes áreas. A Assimetria Flutuante é utilizada em estudos ecológicos e demonstra ser um importante indicador ambiental, sua utilização na produção animal abre um novo caminho e a ausência de estudos similares mostra a necessidade de ampliar os estudos e investimentos nesta técnica para possibilitar testes de outros fatores e outras espécies.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allenbach, D. M., Sullivan, K. B., Lydy, J. M. 1999. Higher fluctuating asymmetry as a measure of susceptibility to pesticides in fishes. *Environ. Toxicol. Chem*, 18, 899–905.
- Almeida, D., Grossman, G. D. 2014. Regulated small rivers as ‘nursery’ areas for invasive largemouth bass *Micropterus salmoides* in Iberian waters. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 24, n. 6, p. 805-817.
- Arvedlund, M., Larsen, K., Winsor, H. 2000. The embryonic development of the olfactory system in *Amphiprion melanopus* (Perciformes: Pomacentridae) related to the host imprinting hypothesis. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, p.1103-1109.
- Arvedlund, M., McCormick, M. I., Ainsworth, T. 2000. Effects of photoperiod on growth of larvae and juveniles of the anemonefish *Amphiprion melanopus*. *Naga, The ICLARM Quarterly*, v. 23, n. 2, p. 18-23.
- Ayoade, A. A., Sowunmi, A. A., Nwachukwu, H. I. 2004. Gill asymmetry in *Labeo ogunensis* from Ogun river, Southwest Nigeria. *Revista de biología tropical*, v. 52, n. 1, p. 171-175.
- Blanco-Vives, B., Villamizar, N., Ramos, J., Bayarri, M. J., Chereguini, O., Sánchez-Vázquez, F. J. 2010. Effect of daily thermo-and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, v. 306, n. 1-4, p. 137-145.
- Boeuf, G; Le Bail, P. 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, v. 177, n. 1-4, p. 129-152.
- Cerqueira, V. R., Tsuzuki, M. Y. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 17-28,
- Clarke, G. M. 1995. Relationships between developmental stability and fitness: application for conservation biology. *Conservation Biology*, v. 9, n. 1, p. 18-24.
- Dhaneesh, K.V., Devi, K.N., Kumar, T.T.A., Balasubramanian, T., Tissera, K. 2012. Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. *Journal of King Saud University – Science*. 24: 201-209.
- El-Sayed, A. M., Kawanna, M. 2004. Effects of photoperiod on the performance of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: I. Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. *Aquaculture*, v. 231, n. 1-4, p. 393-402.

- Fiedler, P. C., Talley, L. D. 2006. Hydrography of the eastern tropical Pacific: a review. *Progress in Oceanography*, v. 69, n. 2-4, p. 143-180.
- Fuller, R. C., Houle, D. 2002. Detecting genetic variation in developmental instability by artificial selection on fluctuating asymmetry. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 15, n. 6, p. 954-960.
- Gerking, S.D. 1994. *Feeding ecology of fish*. Califórnia: Academic Press.
- Glynn, P. W. 2001. Eastern Pacific coral reef ecosystems. In *Coastal marine ecosystems of Latin America* (pp. 281-305). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Graham, J. H., Emlen, J. M., Freeman, D. C., Leamy, L. J., Kieser, J. A. 1998. Directional asymmetry and the measurement of developmental instability. *Biological Journal of the Linnean Society*, 64, 1-16.
- Green, B. S. 2004. Parental and environmental effects on the early life history of a tropical reef fish, *Amphiprion melanopus*. Tese de Doutorado. James Cook University.
- Hart, P. R., Hutchinson, W. G., Purser, G. J. 1996. Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*, Günther, 1862). *Aquaculture*, 144(4), 303-311.
- Hermita, Z. M., Gorospe, J. G., Torres, M. A. J., Lumasag, G. J., Demayo, C. G. 2013. Describing body shape within and between sexes and populations of the Mottled Spinefoot fish, *Siganus fuscescens* (Houttuyn, 1782) collected from different Bays in Mindanao Island, Philippines. *AAFL Bioflux*, 6(3).
- Hilomen-Garcia, G. V. 1997. Morphological abnormalities in hatchery-bred milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) fry and juveniles. *Aquaculture*, v. 152, n. 1-4, p. 155-166.
- Howell, B. R., Day, O. J., Ellis, T., Baynes, S. M. 1998. Early life stages of farmed fish. *Biology of farmed fish*, v. 1, p. 27-66.
- Jawad, L., Al-Mamry, J., Al-Busaidi, J., Al-Mamari, A., Al-Mamry, S., Al-Owisi, K., Al-Rubiey, M.. 2012. Asymmetry in some morphological characters of Indian Oil Sardine, *Sardinella Longiceps*, Valenciennes, 1847 collected from Muscat Waters on the Sea of Oman. *Water Research and Management*, 2(1), 61-64.
- Lomonaco, C, Germanos, E. 2001. Variações fenotípicas em *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae) em resposta à competição larval por alimento. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 2, p. 223-231.
- Kamler, E. 2002. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 12, n. 1, p. 79-103.

- Kristoffersen, J. B., Magoulas, A. 2009. Fluctuating asymmetry and fitness correlations in two *Engraulis encrasicolus* populations. *Journal of fish biology*, v. 75, n. 10, p. 2723-2736,
- Le, Y., Sheng-Yun, Y., Xiao-Ming, Z., Min, L., Jing-Yi, L., Kai-Chang, W. 2011. Effects of temperature on survival, development, growth, and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecologica Sinica*, v.31, p.241-245,
- Lomônaco, C., Germanos, E. 2001. Variações fenotípicas em *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) em resposta à competição larval por alimento. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 2, p. 223-231.
- López-Patiño, M. A., Rodríguez-Illamola, A., Gesto, M., Soengas, J. L., Míguez, J. M. 2011. Changes in plasma melatonin levels and pineal organ melatonin synthesis following acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different water salinities. *Journal of Experimental Biology*, v. 214, n. 6, p. 928-936.
- Lutterschmidt, W., I., Martin, S., L., Schaefer, Jacob F. 2016. Fluctuating asymmetry in two common freshwater fishes as a biological indicator of urbanization and environmental stress within the Middle Chattahoochee Watershed. *Symmetry*, v. 8, n. 11, p. 124.
- Margulies, D., Sutter, J. M., Hunt, S. L., Olson, R. J., Scholey, V. P., Wexler, J. B., Nakazawa, A. 2007. Spawning and early development of captive yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Fishery Bulletin*, v. 105, n. 2, p. 249-265.
- Martín-Robles, Á. J., Whitmore, D., Sánchez-Vázquez, F. J., Pendón, C., Muñoz-Cueto, J. A. 2012. Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of Period1, Period2, and Clock transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 182, n. 5, p. 673-68.
- Medeiros, A. F. F. D. 2013. Desenvolvimento de larvas do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*: efeito da salinidade e da temperatura. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Monticini, P. 2010. The Ornamental Fish Trade: Production and Commerce of Ornamental Fish: Technical-managerial and Legislative Aspects. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Yúfera, M., Sánchez-Muros, M. J., Sánchez-Vázquez, F. J. 2010. Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, v. 306, n. 1-4, p. 315-321,

- Oxnevard, S. A., Heibo, E., Vollestad, L. A. 2002. Is there a relationship between fluctuating asymmetry and reproductive investment in perch (*Perca fluviatilis*)? *Canadian Journal of Zoology*, v. 80, p. 120–125.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G. J., Avella, M. A., & Calado, R. (2011). Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(2), 135-166.
- Palma, J., Stockdale, J., Correia, M., & Andrade, J. P. 2008. Growth and survival of adult long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) using frozen diets. *Aquaculture*, v. 278, n. 1-4, p. 55-59.
- Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: A primer. In T. A. Markow (Ed.). *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. 335-364. Kluwer: Netherlands.
- Palmer, A. R., Strobeck, C. 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: M. Polak (ed.). *In: Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. 279-319. Oxford University Press: United Kingdom.
- Palmer, R., Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 17, 391-421.
- Pereira-Davison, E; Callan, C. K. 2018. Effects of photoperiod, light intensity, turbidity and prey density on feed incidence and survival in first feeding yellow tang (*Zebrasoma flavescens*) (Bennett). *Aquaculture Research*, v. 49, n. 2, p. 890-899.
- Rao, M. Vishwas; Haq, Ma Badhul; Kumar, Tt Ajith. 2014. Influence of temperature on survival, growth and plasma levels of false percula clown fish, *Amphiprion ocellaris*.
- Reynalte-Tataje, D., Luz, R. K., Meurer, S., Zaniboni-Filho, E., & De Oliveira Nuñer, A. P. 2002. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum: Biological and Health Sciences*, p. 439-443.
- Roo, F. J., Socorro, J., Izquierdo, M. S., & Caballero, M. J. 2001. Histological characterization of the *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) larvae visual system development. *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas (España)*.
- Seixas, L.B; Dos Santos, A.F.G.N; Dos Santos, L.N. 2016. Fluctuating asymmetry: A tool for impact assessment on fish populations in a tropical polluted bay, Brazil. *Ecological indicators*, v. 71, p. 522-532.

- Somarakis, S., Kostikas, I., Tsimenides, N. 1997. Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval fish as an indicator of condition: conceptual and methodological aspects. *Journal of Fish Biology*, v. 51, n. sA, p. 30-38.
- Van Dongen, S., Lens, L., Molenberghs, G. 1999. Mixture analysis of asymmetry: Modelling directional, asymmetry, antisymmetry and heterogeneity in fluctuating asymmetry. *Ecology Letters*, 2, 387-396.
- Van Dongen, S., 2006. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of evolutionary biology*, 19(6), 1727-1743.
- Van Vallen, L. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, 16, 125-142. 1962.
- Veras, G. C., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., Oliveira, M. M., Rosa, P. V., & Felizardo, V. O. 2013. Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. *Archivos de Zootecnia*, v. 62, n. 237, p. 25-43.
- Villamizar, N., García-Alcazar, A., Sánchez-Vázquez, F. J. 2009. Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, v. 292, n. 1-2, p. 80-86.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T. 2003. From Ocean to Aquarium the global trade in marine ornamental species. UNEP-WCMC, Cambridge, UK.
- Wexler, J. B., Chow, S., Wakabayashi, T., Nohara, K., Margulies, D. 2007. Temporal variation in growth of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) larvae in the Panama Bight, 1990. *Fishery Bulletin*, v. 105, n. 1, p. 1-18.
- Methari, V. R., Kumar, T. T. A., Haq, M. A. B., Raja, C., Mohamed, S. 2015. Ascertainning the potential effects of temperature on growth, survival and feeding of different juvenile clown fish. *Journal of Coastal Life Medicine*, v. 3, n. 2, p. 98-105.
- Ye, L., Yang, S. Y., Zhu, X. M., Liu, M., Lin, J. Y., Wu, K. C. 2011. Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecologica Sinica*, v. 31, n. 5, p. 241-245.