



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Tania Maria Lopes dos Santos

**Efeito da coloração ambiental sobre o desenvolvimento e
respostas de estresse do peixe-palhaço *Amphiprion frenatus***

Florianópolis

2023

Tania Maria Lopes dos Santos

**Efeito da coloração ambiental sobre o desenvolvimento e
respostas de estresse do peixe-palhaço *Amphiprion frenatus***

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Doutor em
Aquicultura

Orientador: Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coorientador: Prof. Leonardo José Gil Barcellos, Dr.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Tania Maria Lopes dos
Efeito da cor ambiental sobre o desenvolvimento e
respostas de estresse do peixe-palhaço *Amphiprion frenatus*
/ Tania Maria Lopes dos Santos ; orientador, Alex Pires de
Oliveira Nuñez, coorientador, Leonardo José Gil Barcellos,
2023.

64 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. bem-estar de peixes. 3. cortisol. 4.
estresse. 5. metamorfose. I. Pires de Oliveira Nuñez,
Alex. II. Barcellos, Leonardo José Gil. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

Tania Maria Lopes dos Santos

**Efeito da coloração ambiental sobre o desenvolvimento e
respostas de estresse do peixe-palhaço *Amphiprion frenatus***

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado
por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Renata Ávila Ozório, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Renata Maria Guerreschi, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Egydio Barreto, Dr.
Universidade Estadual de Paulista

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão
que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Aquicultura.

Prof. Dr. Maurício Laterça Martins
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alex Pires de Oliveira Nuner
Orientador

Florianópolis
2023

Este trabalho é dedicado a mim, por ter sobrevivido aos momentos difíceis do Doutorado, e ao professor Leonardo por ter me ajudado a passar por estes momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos laboratórios que forneceram suporte durante o estudo: Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), Laboratório de Piscicultura marinha (LAPMAR/UFSC), Laboratório de Cultivo de Algas (LCA/UFSC), Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/UFSC), Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM/UFSC) e Laboratório de Fisiologia de Peixes (LFP/UPF).

Ao professor Alex Pires de Oliveira Nuñez, por ter aceitado a me orientar no final do Doutorado.

Em especial ao professor Leonardo José Gil Barcellos, por tem sido meu porto seguro durante os momentos difíceis do doutorado.

Agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, tenham contribuído para este trabalho, e que não tenham sido referenciados aqui.

Agradeço a compreensão de todos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Me encaixei no meu quebra-cabeça colorido”.

RESUMO

A coloração de fundo influencia positivamente a fase inicial de desenvolvimento de algumas espécies de peixes. Assim, aqui nós avaliamos se diferentes cores de aquários afetam o crescimento, o desenvolvimento e as respostas de estresse em larvas de peixe-palhaço-tomate *Amphiprion frenatus*. Operacionalmente, distribuímos as larvas de *A. frenatus* em aquários brancos (AB); aquários amarelos (AM); aquários azuis (AZ) e aquários pretos (AP) e acompanhamos o desenvolvimento das larvas até 61 dias pós-eclosão (DAE), e testamos se as cores dos aquários afetaram a resposta endócrina de larvas de peixe-palhaço-tomate a um desafio de estresse agudo. Mostramos que as cores dos aquários influenciaram o desenvolvimento inicial do peixe-palhaço tomate, bem como seu processo de metamorfose. De fato, 87,2 % das larvas criadas em AP completaram a metamorfose e atingiram a fase juvenil ao 61-DAE, enquanto 20,6 em AZ e apenas 6,2% em AM atingiram a fase juvenil. Além disso, nenhuma das larvas criadas em AB completou o processo de metamorfose. Quando os peixes foram submetidos a um estressor agudo padrão 61-DAE, apenas os peixes criados em aquários brancos apresentaram aumento nos níveis de cortisol tecidual. Nossos resultados sugerem fortemente que a metamorfose de *A. frenatus* pode ser acelerada se a larvicultura ocorrer em aquários pretos, e recomendamos evitar tanques brancos para a larvicultura de *A. frenatus*. Este resultado tem fortes implicações práticas e econômicas, uma vez que os espécimes de peixe-palhaço-tomate são comercializados na fase juvenil, de modo que todas as estratégias que possam encurtar o período necessário para que os peixes atinjam a fase juvenil são bem-vindas.

Palavras-chave: Aquicultura; bem-estar de peixes; cortisol; estresse; metamorfose.

ABSTRACT

Background color positively influences the initial phase of development of some fish species. Thus, we evaluate if different aquarium colors affect growth, development, and stress responses in tomato clownfish *Amphiprion frenatus* larvae. Operationally, we distribute the larvae of *A. frenatus* in white aquariums (AB); yellow Aquariums (AM); blue (AZ), and black (AP) aquariums, and we follow the development of larvae up to 61 days post-hatch (DPH). Also, we tested if the colors of the aquariums affected the endocrine response of tomato clownfish larvae to a challenge of acute stress. We show that the colors of aquariums influenced the initial development of tomato clownfish and its metamorphosis process. In fact, 87.2 % of the larvae created in AP completed metamorphosis and reached the youth phase to 61-DAE, while 20.6 in AZ and only 6.2 % in AM reached the youth phase. In addition, none of the larvae created in AB has completed the metamorphosis process. When fish were subjected to a standard acute stressor 61-DPH, only fish created in white aquariums had increased tissue cortisol levels. Our results strongly suggest that *A. frenatus* metamorphosis can be accelerated if larviculture occurs in black aquariums, and we recommend avoiding white tanks for *A. frenatus* larviculture. This result has practical solid, and economic implications since tomato clownfish specimens are marketed in the youth phase, so all strategies that can shorten the period needed for fish to achieve the youth phase are welcome.

Keywords: Aquaculture; cortisol; fish welfare; metamorphosis; stress.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1. Aparência de juvenil de *Amphiprion frenatus* cultivado em aquários de coloração preta por 61 dias após a eclosão..... 16
- Figura 2. Cores da desova do casal de reprodutores de *Amphiprion frenatus*. A. Desova com 48 horas no vaso de barro, homorgânica, com ovos pequenos de coloração rosada. B. Desova com 24 horas no vaso de barro, homorgânica, com ovos pequenos de coloração laranja. 17

Capítulo 1

- Fig. 1. Representação esquemática do desenho experimental (Fotos, Santos, TML). 29
- Fig. 2. Porcentagem de animais sem bandas ou com bandas, e dia de início e de final de cada condição da larvicultura de *Amphiprion frenatus*, submetidos em diferentes cores de aquários por 61-DAE. A) Aquários Brancos. B) Aquários Azuis. C) Aquários Amarelos. D) Aquários Pretos. SB: Sem Banda. Cab: Cabeça. Ab: Abdômen. Cau: Cauda. Juv: Juvenil a: aparecimento. d: desaparecimento..... 32
- Fig. 3. Larvas de *Amphiprion frenatus* criadas em aquários com paredes de cores diferentes a 61-DAE. A) Aquário Branco (AB). Larvas no final do processo de metamorfose com desaparecimento das bandas e início do desaparecimento da banda da região dorsal; peso = 498,40 mg; comprimento = 29,30 milímetros. B. Aquário Branco (AB). Início do processo de metamorfose com o desaparecimento da banda, iniciando na região genital com um branco bem sutil; peso = 250,00 mg; comprimento = 28,00 mm. C: Aquário Amarelo (AM). Larvas no final do processo de metamorfose com desaparecimento das bandas acima da nadadeira peitoral; peso = 250,00 mg; comprimento = 28,00 mm. D: Aquário Amarelo (AM). Início do processo de metamorfose com o desaparecimento da banda, iniciando na região genital com branco bem sutil; peso = 250,00 mg; comprimento = 28,00 mm. E: Aquário Azul (AZ). Larvas no final do processo de metamorfose com desaparecimento quase imperceptível das bandas da nadadeira dorsal; peso = 433,10 mg; comprimento = 29,50 mm. F: Aquário Azul (AZ). larvas no início do processo de metamorfose, com desaparecimento da banda acima da nadadeira peitoral; o peso de 433,10 mg e com um comprimento de 29,50 mm. G e H: Aquário Preto (AP). Metamorfose completa; juvenil com peso de 418,20 mg e 23,90 mm de comprimento. 33

Capítulo 2

- Fig. 1.** Representação esquemática do desenho experimental (Fotos, Santos, TML).43
- Fig. 2.** Resposta do cortisol tecidual ao estresse em peixes-palhaço tomate (*Amphiprion frenatus*) estocados em aquários de cores brancas, azuis, amarelas e preta, submetidos a estresse agudo. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM e foram comparados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. (N = 6). *p<0,05; ** p<0,01 *** e p<0,001.46

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. Levantamento de grupos de animais de estimação entre os anos 2018 e 2021 (em milhões).....	15
--	----

Capítulo 1

Tabela 1. Número de não juvenis e juvenis de cada condição de larvicultura de <i>Amphiprion frenatus</i> , submetidos em diferentes cores de aquários por 61-DAE. AB: aquário branco. AZ: aquário azul. AM: aquário amarelo. AP: aquário preto.....	35
Tabela 2. Testes de independência qui-quadrado entre classes não juvenis-juvenis e diferentes combinações de classes de coloração na larvicultura de <i>Amphiprion frenatus</i> por 61-DAE. AB: aquário branco. AZ: aquário azul. AM: aquário amarelo. AP: aquário preto. O caractere “x” indica comparação; o caractere "-" significa <i>pool</i> de dados de cores.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB:	Aquário branco
AM:	Aquário amarelo
AP:	Aquário preto
AZ:	Aquário azul
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAE:	Dia após a eclosão
HPI:	Eixo hipotálamo-hipófise
HSPs:	Proteínas de estresse
h:	Hora
pH:	Potencial Hidrogeniônico
L:	Litro
LAPAD:	Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce
LAPOM:	Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos
LAPMAR:	Laboratório de Peixes Marinhos
LMM:	Laboratório de Moluscos Marinhos
NH ₄ + NH ₃ :	Amônia total
NO ₂ :	Nitrito
UFSC:	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	MERCADO DE PEIXES MARINHOS ORNAMENTAIS	14
1.2	MEIO AMBIENTE	15
1.3	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE <i>Amphiprion frenatus</i>	16
1.4	LARVICULTURA	18
1.5	METAMORFOSE	18
1.6	COLORAÇÃO DO AMBIENTE	20
1.7	BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE	21
1.8	OBJETIVOS	24
1.8.1	Objetivo Geral	24
1.8.2	Objetivos Específicos	24
1.9	ESTRUTURAÇÃO DA TESE	24
2	Capítulo 1: Influência da coloração do tanque no peixe-palhaço-tomate (<i>Amphiprion frenatus</i>): desenvolvimento inicial e metamorfose	26
2.1	Introdução	26
2.2	Material e Métodos	28
2.2.1	Estratégia de estudo	28
2.2.2	Animais.....	28
2.2.3	Observação da metamorfose.....	30
2.2.4	Análise Estatística.....	31
2.3	Resultados.....	31
2.4	Discussão	34
2.5	Agradecimentos	37
2.6	Referências	38
3	Capítulo 2: A coloração do tanque influencia a resposta do peixe-palhaço-tomate (<i>Amphiprion frenatus</i>) a desafio de estresse agudo	40
3.1	Introdução	41
3.2	Material e métodos	42
3.2.1	Animais.....	43
3.2.2	Teste de desafio de estresse agudo e determinação de cortisol de tecidual.....	44
3.2.3	Análises estatísticas	45
3.3	Resultados.....	45
3.4	Discussão	45
4	CONCLUSÃO GERAL	54
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	55

INTRODUÇÃO

1.1 MERCADO DE PEIXES MARINHOS ORNAMENTAIS

A aquicultura é uma atividade que se apresenta como uma alternativa para diminuir a pesca sobre determinadas espécies, mas que também implica em perdas econômicas para os pescadores artesanais, pois a redução dessa pesca também reduz a renda familiar (ARAÚJO et al., 2017). Contudo, a aquicultura pode estimular os pescadores a redirecionarem suas atividades produtivas visando manter sua fonte de renda através da captura de espécies que ainda não são fornecidas pelo cultivo, o que também pode acabar contribuindo para a sobrepesca de determinadas espécies (RAMOS et al., 2015).

O comércio de organismos de aquário está crescendo em todo o mundo, especialmente em termos de diversidade de espécies, e segundo TechSci Research (2021), o mercado global de peixes ornamentais foi avaliado em US\$ 6.800 milhões em 2019 e deve atingir US\$ 11.336,47 milhões até 2025, crescendo de mais de 10%. Este mercado depende de uma oferta contínua de animais aquáticos saudáveis e coloridos, em um setor que apresenta poucas iniciativas de sustentabilidade. De acordo com Rhyne et al. (2017), o comércio de peixes ornamentais é uma indústria multibilionária avaliada em aproximadamente US\$ 15 bilhões, sendo que aproximadamente de 500 milhões de peixes são comercializados anualmente em 145 países, dos quais 80-85% são espécies tropicais (GOSWAMI e ZADE, 2015). A produção de peixes ornamentais apresentou crescimento de 6,1% desde os últimos dados disponíveis de 2013, ficando atrás apenas da produção de gatos que apresentou alta de 8,1% durante o mesmo período (INSTITUTO PET BRASIL, 2019). No Brasil, a piscicultura ornamental marinha tem se fortalecido, e ampliado sua participação no mercado. Em 2021 o comércio de peixes ornamentais apresentou aumento de 20,8 milhões de espécimes (Tabela 1), que representou um aumento de 4,5% (INSTITUTO PET BRASIL, 2021).

No mercado de animais marinhos mais de 2.500 espécies são comercializadas (1800 espécies de peixes e 700 espécies de invertebrados), das quais aproximadamente 90% são capturadas na natureza (PALMTAG, 2017). Dessas 2.500 espécies, cerca de 60% são de origem dulcícola e 40% de origem marinha (RAJA et al., 2019), sendo que os principais fornecedores de organismos ornamentais marinhos são os países da Ásia, entre os quais Singapura se configura como o principal exportador mundial (SOMAM et al., 2021).

Apesar dos avanços recentes nos métodos de cultivo terem permitido que mais de 330 espécies de peixes ornamentais marinhos sejam produzidas em cativeiro (SWEET, 2018), aproximadamente 30 espécies tornaram-se comercialmente disponíveis (CALLAN et al.,

2018). Porém, uma vez que a indústria global de peixes ornamentais marinhos está em constante expansão, novas linhas de pesquisa devem ser promovidas para preencher as lacunas existentes com relação à criação em cativeiro de peixes ornamentais (OLIVOTTO et al., 2011; CALADO et al., 2017).

1.2 MEIO AMBIENTE

O rápido aumento da demanda por peixes e invertebrados de origem marinha no comércio de animais de estimação produz a ameaça de aumento da pressão de coleta sobre os recursos naturais (DHANEESH et al., 2012). Os recifes de corais abrigam abundante biodiversidade e sua importância é crucial tanto ponto de vista socioeconômico como ecológico, oferecendo vários serviços e benefícios ambientais, tais: proteção costeira, manutenção de estoques pesqueiros, ecoturismo e espécies com potencial farmacêutico (BRANDER et al., 2007). Contudo, estes ecossistemas têm sido gravemente impactados pelas ações humanas, ligadas por exemplo às alterações climáticas (MUMBYN e ANTHONY, 2015), acidificação dos oceanos (COMEAU et al., 2015), sobrepesca (MCCLANAHAN et al., 2015), esgoto e resíduos industriais (WEAR e THURBER, 2015) e turismo (PEREIRA et al., 2014).

A alta demanda por peixes ornamentais marinhos devido aos recentes desenvolvimentos na aquariofilia, que resultou em uma superexploração do estoque natural e consequente destruição das áreas de recifes (DHANEESH et al., 2012).

Além disso, as práticas de pesca destrutivas empregadas para a captura de peixes ornamentais levaram a altas taxas de mortalidade pós-captura e à destruição do habitat dos recifes de coral (SCHMIDT e KUNZMANN, 2005). Além disso, a destruição de espécimes não-alvo, incluindo espécies de invertebrados sésseis, produz enorme preocupação (SOMAN et al., 2021).

Tabela 1. Levantamento de grupos de animais de estimação entre os anos 2018 e 2021 (em milhões).

Ano	Cães	Gatos	Aves	Peixes	Répteis e pequenos mamíferos	Total
2018	54,2	23,9	39,8	19,1	2,3	139,30
2019	55,1	24,7	40	19,4	2,4	141,60
2020	55,9	25,6	40,4	19,9	2,51	144,31
2021	58,1	27,1	41	20,8	2,53	149,53
Evolução 2020/2021(%)	4,0	6,0	1,5	4,5	0,8	3,6

Fonte: Instituto Pet Brasil, 2021.

Desse modo, a reprodução em cativeiro de espécies de peixes comercializadas para aquariofilia representa o único meio sustentável para atender a demanda crescente do setor, bem como para abastecer recursos naturais já esgotados.

Nesse sentido, fica claro que a única alternativa viável para proteger os estoques naturais e, ao mesmo tempo atender ao aumento da demanda por peixes-palhaço, é o seu cultivo em cativeiro.

1.3 CARATERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Amphiprion frenatus*

Entre as várias espécies de peixes ornamentais marinhos se destacam as dos gêneros *Amphiprion* e *Premnas*, pertencentes à família Pomacentridae e subfamília Amphiprioninae, que mundialmente são conhecidos como peixes-palhaço ou peixes-anêmona-do-mar e congregam trinta espécies (WILKERSON, 2001). Segundo Madhu et al. (2006), esses peixes são atrações muito populares em todo o mundo por causa de seu pequeno tamanho, robustez, atratividade em função das características das cores, natureza pacífica, alta adaptabilidade ao cativeiro, aceitabilidade de dieta artificial, comportamento fascinante e relação simbiótica com as anêmonas-do-mar.

Entre as espécies de peixes-palhaço destaca-se *Amphiprion frenatus*, conhecido com peixe-palhaço-tomate (Figura 1). Os habitats naturais do *A. frenatus* são as áreas de corais de recifes no Pacífico Indo-Occidental: Golfo da Tailândia ao sudoeste de Palau, do norte ao sul do Japão, sul de Java e Indonésia (<http://www.fishbase.org/summary/6509>), que são áreas frequentemente impactadas pelas descargas de esgoto produzido pelas populações locais e turistas (CHEN e HSIEH, 2017).

Figura 1. Aparência de juvenil de *Amphiprion frenatus* cultivado em aquários de coloração preta por 61 dias após a eclosão.



Fonte: Foto da autora, 2021.

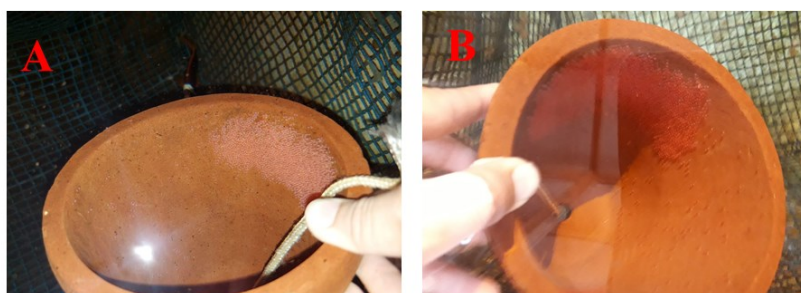
Amphiprion frenatus é uma espécie hermafrodita, protândrica, ou seja, que inverte o sexo, de macho para fêmea. A espécie vive em grupos sociais, nos quais existe uma hierarquia de dominação baseada no tamanho dos animais, com fêmeas maiores e dominantes (FRICKE e FRICKE, 1977). Os peixes-palhaço formam uma unidade social que consiste em um par monogâmico e vários subadultos que não se reproduzem (CHEN e HSIEH, 2017).

Segundo Iwata e Manbo (2013), inúmeras interações agonísticas ocorrem em cada grupo para manter as diferenças de tamanho entre os indivíduos, estratégia importante para o *status* de classificação social e diferenciação sexual. A poligamia não ocorre, e apenas o casal adulto apresenta comportamento reprodutivo; quando a fêmea reprodutora morre, o próximo macho reprodutor sofre reversão de sexo para se tornar uma fêmea reprodutora (FAUTIN e ALLEN, 1992).

Os peixes-palhaço exibem cuidados parentais com a desova (FRICKE e FRICKE, 1977), principalmente dos machos, que ficam nadando próximo aos ovos produzindo movimentos leves com as nadadeiras para oxigenar os ovos, e para a retirados dos ovos não fecundados ou fungados com a boca. Os peixes-palhaço-tomate são os únicos em que o tempo de eclosão é muito maior do que o de outras espécies, o que resulta em larvas bem desenvolvidas na eclosão, e, com isto, em menor tempo de duração do período larval (JOB e BELLWOOD, 2000), com média de 12 dias para eclosão das larvas.

A taxa de eclosão por desova varia com a temperatura e com a concentração de oxigênio dissolvido na água (MARISCAL, 1970), sendo que a faixa ideal de temperatura oscila entre 26,3 e 27,3 °C. Segundo Wilkerson (2001) as desovas de *Amphiprion clarkii*, *Amphiprion perideraion* e *Premnas biaculeatus* são laranja-amareladas, rosadas e vermelhas, respectivamente e, de acordo com Dhaneesh et al. (2012), os ovos são adesivos e cobertos por córion transparente. As cores da desova de *A. frenatus* do presente estudo estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Cores da desova do casal de reprodutores de *Amphiprion frenatus*. A. Desova com 48 horas no vaso de barro, homorgânica, com ovos pequenos de coloração rosada. B. Desova com 24 horas no vaso de barro, homorgânica, com ovos pequenos de coloração laranja.



1.4 LARVICULTURA

A aquicultura ornamental marinha depende da produção de ovos viáveis, e do aumento do número de larvas que sofrem metamorfose em juvenis, sendo que a fase inicial da larvicultura é considerada a mais crítica para a produção da maioria dos peixes ornamentais marinhos (HOLT, 2003).

A larvicultura é uma fase importante no processo de cultivo pois representa as primeiras fases de desenvolvimento dos animais, nas quais as larvas estão mais sensíveis às variações de temperatura, salinidade, luz e de manejos nutricionais (OLIVOTTO et al., 2011; ABE et al., 2016).

A literatura científica relata várias pesquisas em larvicultura com espécies do gênero *Amphiprion* sp., nas quais foram avaliados o efeito de vários parâmetros como o fotoperíodo (ARVEDLUND et al., 2002), a temperatura, na natação (GREEN e FISHER, 2004) e a salinidade sobre a sobrevivência (YE et al., 2009), crescimento (OLIVOTTO et al., 2008a; OLIVOTTO et al., 2008b) natação e metamorfose das larvas (GREEN; FISHER, 2004; SALIS et al., 2018).

Segundo Olivotto et al. (2011), a transição de alimentos endógenos para exógenos, quando as larvas consomem completamente o saco vitelino e começam a se alimentar dos alimentos disponíveis no ambiente se constitui em um dos maiores obstáculos para o cultivo de larvas de peixes marinhos. A concentração de alimento e a frequência alimentar são parâmetros importantes nessa fase, pois influenciam diretamente a sobrevivência e o crescimento dos animais, e quando bem estabelecidos possibilitam o escalonamento da alimentação, otimizando a mão-de-obra e consequentemente aumentando a produtividade (LUZ e PORTELLA, 2005; ZUANON et al., 2011).

Um dos principais entraves que ocorrem na larvicultura de peixes marinhos é a alta mortalidade, que ocorre principalmente nos primeiros dias devido a vários fatores, entre os quais não se pode descartar a coloração do ambiente.

1.5 METAMORFOSE

A metamorfose é um processo de transformação que faz parte do desenvolvimento pós-embrionário, sendo crucial para a manutenção das populações de peixes recifes adultos.

Durante o período de metamorfose, as larvas passam mudanças morfológicas complexas e crescimento notável que transformam as larvas em juvenis em pouco tempo (PÉREZ-DOMÍNGUES e HOLT 2006). Nessa fase, os peixes são particularmente sensíveis a

estressores antropogênicos que afetam os recifes de coral (MCMENAMIN e PARICHY 2013; LECCHINI et al., 2017).

A metamorfose é caracterizada por mudanças marcadas de larvas para juvenis, sendo uma etapa do desenvolvimento que torna o cultivo de espécies marinhas um desafio particular, que não é encontrada em peixes de água doce (PUTRA et al., 2012). Segundo Victor e Wellington (2000), as espécies de peixes-palhaço apresentam uma fase larval curta, com duração de 10 a 15 dias após a eclosão (DAE), sendo que outras espécies de peixes de recifes de coral podem apresentar duração de 19 a 70 DAE.

De acordo com Olivotto et al. (2011), o processo de metamorfose foi antecipado por três dias em comparação com o controle quando uma dieta enriquecida com gordura altamente insaturada (HUFA) foi oferecida a larvas de *A. ocellaris*. Nesta espécie, a metamorfose envolve a formação completa de três bandas brancas verticais, o que corresponde à transição à fase juvenil (SALIS et al., 2018). Além disso, com o aparecimento de bandas brancas verticais nas regiões da cabeça, abdominal e pedúnculo caudal, uma alteração na natação comportamento de *A. ocellaris* é observada, com larvas nadando na coluna d'água enquanto os metamórficos e pós-metamorfos nadam próximas ao fundo (ROUX et al., 2019).

De acordo com Salis et al. (2018), na fase adulta, espécies do gênero *Amphiprion* são classificados em quatro categorias de acordo com suas bandas: espécies sem bandas brancas verticais (*A. akallopisos*, *A. pacificus*, *A. ephippium* e *A. sandaracimos*); espécies com uma banda branca vertical na região da cabeça (*A. barberi*, *A. frenatus*, *A. leucokranos*, *A. moculochi*, *A. nigripes*, *A. ormanensis*, *A. perideraion* e *A. rubrocinctus*); espécies com duas bandas brancas verticais, na cabeça e na região abdominal (*A. akindynos*, *A. allardi*, *A. bicinctus*, *A. chagosensis*, *A. chrysopterus*, *A. latifasciatus*, *A. omanensis* e *A. sebae*) e espécies com três bandas brancas verticais, nas regiões da cabeça, abdominal e no pedúnculo caudal (*A. biaculeatus*, *A. chrysogaster*, *A. latezonatus*, *A. ocellaris*, *A. percula* e *A. tricinctus*).

A espécie foco deste estudo, *A. frenatus*, apresenta, na fase adulta, uma única banda branca vertical na região da cabeça. Nenhuma outra espécie apresenta uma única banda branca vertical nas regiões do abdominal ou pedúnculo caudal. No entanto, a banda branca vertical na região abdominal está sempre relacionada à banda branca vertical na cabeça, e a do pedúnculo caudal está sempre associada à banda branca vertical do abdominal (SALIS et al., 2018).

O papel funcional das bandas brancas em *Amphiprion* ainda é desconhecido, no entanto ele pode estar associado à defesa contra predadores, ao tipo de macro-habitat e ao reconhecimento intraespecífico (ROUX et al., 2019). O aparecimento de bandas brancas

verticais em *A. ocellaris* pode indicar o momento da metamorfose, que é caracterizada por alterações de pigmentação, e não por mudanças.

Existem vários artigos científicos como os de Ninwichian et al. (2022), com *Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*, e de Lopez-Betancur et al. (2020), com *Oreochromis niloticus*, que mostram que diferentes cores de tanques influenciam a sobrevivência, o crescimento e o bem-estar dos peixes na larvicultura, mas que não indicam como as cores dos ambientes afetam a metamorfose de *A. frenatus*.

1.6 COLORAÇÃO DO AMBIENTE

O bem-estar das espécies cultivadas, incluindo peixes, é de suma importância. Sendo sencientes, os peixes têm a capacidade de fazer escolhas, experimentar estados semelhantes ao medo, reconhecer-se mutuamente e evitar condições adversas (HUNTINGFORD et al., 2006; WARD et al., 2005).

Dentre os vários fatores que causam estresse num sistema de cultivo, a coloração do ambiente deve ser considerada, pois ela pode interferir em aspectos biológicos dos animais, principalmente no que se refere ao seu comportamento (SOARES et al., 2001), segundo Cerqueira et al. (2014), relacionada à defesa (camuflagem), à agressividade (ataque) ou à atração sexual de parceiros. Para Fanta (1995), a coloração do ambiente pode interferir no funcionamento do sistema nervoso e, assim, interferir em algumas situações experimentais.

Na aquicultura, o bem-estar dos peixes pode ser comprometido pela introdução de novos habitats ou pela alteração do seu habitat natural, e, nesse sentido, a coloração de fundo dos tanques de cultivo é geralmente selecionada com base na experiência prática ou em observações das taxas de crescimento alcançadas (LI et al., 2016). A coloração do tanque pode induzir uma variedade de respostas em relação ao crescimento, sobrevivência (PAWAR et al., 2001; KANG; KIM, 2013), coloração da pele (ESLAMLOO et al., 2015; KARAKATSOULI et al., 2015), resposta ao estresse (RAGHAVA et al., 2013; OKADA et al., 2015), comportamento e aceitação alimentar (ZHANG et al., 2015; LI et al., 2016), ou produzir efeitos combinados em peixes. Segundo Li et al. (2016), as cores escuras, como o preto, são inadequadas para o bem-estar de juvenis de linguado (*Scophthalmus maximus*).

Na larvicultura de *Coregonus peled*, com base na sobrevivência e desempenho no crescimento, os melhores resultados foram obtidos em tanques das cores preto e branco em relação às cores vermelho e cinza (SEBESTA et al., 2018); para o cultivo de *Chanos chanos* a coloração amarela produziu melhores resultados (BERA et al., 2019); para larvas de *Perca fluviatilis* com até doze dias após a eclosão, Palińska-żarska et al. (2019) mostraram que o

cultivo deve ser realizado em tanque de coloração preta; e na larvicultura de *Clarias magurna* e *Pangasius pangasius*, são recomendadas, respectivamente, as cores preto e verde (FEROSEKHAN et al., 2020).

A coloração do ambiente é bastante estressante para as larvas do bagre-amarelo, *Pelteobagrus fulvidraco*. Larvas do bagre-amarelo apresentaram maior sobrevivência e crescimento em tanques das cores azuis escuro ou pretos, crescimento e sobrevivência moderados quando cultivados em tanques da coloração brancos, e crescimento e sobrevivência reduzido em tanques de coloração verde (PICHIRIKKAT et al., 2013). Outro estudo mostrou que o crescimento das larvas de *Hucho taimen* foi afetado pelas cores dos tanques, sendo que o crescimento foi maior nos tanques amarelos do que nos tanques pretos ou vermelhos (WANG et al., 2017). A coloração inadequada do tanque poderia reduzir o contraste alimentar (MONK et al., 2008), dificultando a alimentação.

As larvas de peixes são cultivadas em altas densidades em ambiente artificial, uma condição potencialmente estressante que pode prejudicar seu bem-estar. A coloração de fundo também influencia o crescimento e desenvolvimento de *Morone saxatilis* (MARTIN-ROBICHAUD e PETERSON 1998), *Acipenser ruthenus* (BAYRAMI et al., 2017), *Lates calcarifer* (SANTISATHITKUL et al., 2019), *Dawkinsia filamentosa* (PADHI et al., 2022) e *Amphiprion clarkii* (SHIN et al., 2012). A intensidade da coloração da pele de *Pagrus auratus* (DOOLAN et al., 2008) e *Amphiprion ocellaris* (YASIR e QIN 2009; DÍAZ-JIMÉNEZ et al., 2021) também foi afetada pela coloração do ambiente.

1.7 BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE

O ambiente do cultivo de larvas de peixes em laboratório é diferente do ambiente natural, no qual as larvas de peixes precisam caçar comida para sobreviver ao ambiente hostil, sendo que a improvisação na tecnologia de cultivo *indoor* de larvas aumenta seu crescimento e sobrevivência (BERA et al., 2019).

O emprego do conceito de bem-estar animal tem sido incentivado nas últimas décadas para se adaptar às demandas públicas e legislativas, priorizando o bem-estar positivo, em vez de apenas evitar e aliviar condições de desfavoráveis e precárias dos sistemas de cultivo (FIFE-COOK e FRANKS, 2019; LAWRENCE et al., 2019). O conceito de bem-estar dos peixes envolve um conjunto multifatorial baseado em medidas físicas, fisiológicas, comportamentais e psicológicas dos indivíduos (ELLIS et al., 2012).

O bem-estar dos peixes pode ser influenciado pelos efeitos das cores dos ambientes. Segundo Rosenthal e Lobel (2006), as mudanças nos ambientes aquáticos podem afetar

diretamente diversos tipos de comunicação, e ter consequências negativas no comportamento, (dos SANTOS GAUY et al., 2018), principalmente ocasionando um desequilíbrio em sua homeostase, ou seja, estressando os peixes.

Segundo Chrousos e Gold (1992), estresse é “uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo animal, chamado homeostase, é ameaçado ou sofre distúrbio como resultado da ação de estímulos intrínsecos ou extrínsecos, comumente definidos como estressores e é restabelecida por um conjunto complexo de respostas adaptativas”. Já Selye (1973), definiu estresse como "a resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda feita sobre ele". De acordo com Iwama (1993), o estresse produz respostas de duas maneiras diferentes, sendo que em uma a resposta ocorre em prazo curto (estresse agudo) e na outra a resposta normalmente conduz a um baixo crescimento e ganho de peso (estresse crônico).

A resposta ao estresse é considerada um mecanismo adaptativo que permite ao peixe lidar com estressores reais ou percebidos, a fim de manter seu estado normal ou homeostático (BARTON 2002). De forma simplificada, o estresse pode ser considerado como um estado de homeostase ameaçado que é restabelecido por um conjunto complexo de respostas adaptativas (CHORUSOS, 1998). Contudo, a resposta ao estresse ocorre a partir de uma série de mecanismos fisiológicos, tais como alterações nas proteínas, no metabolismo energético, imunológico, endócrino, e como mudanças neurais e comportamentais, que tentarão primeiro superar a situação estressante e depois compensar os desequilíbrios produzidos (SULA e ALIKO 2017).

Com todas essas reações, os peixes conseguem fugir de situações perigosas, como as que envolvem risco de vida e integridade do corpo e, posteriormente, podem lidar com a carga alostática produzida pelo estressor, e reintegrar o equilíbrio dos sistemas fisiológicos para recuperar a homeostase (TORT, 2011). Os efeitos metabólicos do estresse social provavelmente são maiores em condições de cultivo, pois a oportunidade para a fuga é limitada, o que influencia o desempenho dos peixes na aquicultura (MERIGHE et al., 2004).

Estas respostas fisiológicas de peixes aos agentes estressores ambientais são divididas em primárias, secundárias e terciárias (BARTON 2002). As respostas primárias envolvem as respostas neuroendócrinas iniciais, que incluem a liberação de catecolaminas do tecido cromafim (RANDALL e PERRY, 1992; REID et al., 1998) e a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal (HPI) culminando na liberação de hormônios corticosteróides na circulação (ELLSAESSER e CLEM, 1986; MOMMSEN et al., 1999). Segundo Mommsen et al. (1999), as respostas secundárias incluem alterações nos níveis plasmáticos, teciduais de íons, metabólitos, em características hematológicas e proteínas de estresse térmico (HSPs do inglês

heat shock proteins), que se relacionam com ajustes fisiológicos do metabolismo, como na respiração, estado ácido-base, equilíbrio hidromineral, função imunológica e suas respostas. As respostas terciárias se referem a aspectos do desempenho do animal como um todo, como mudanças no crescimento, condição, resistência a doenças, atividade, comportamento e sobrevivência (WEDEMEYER et al., 1990).

Alguns constituintes do plasma podem ser utilizadas na avaliação da condição de saúde ou de estresse dos peixes (WAGNER e CONGLETON, 2004). O estresse eleva o cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997; POTTINGER e MOSUWE 1994) e a glicose plasmáticos (SILBERGELD 1974), considerados bons marcadores da resposta a situações estressantes (BALM et al., 1989; BARCELLOS et al., 1999).

O principal glicocorticoide produzido pelos peixes é o cortisol que, além de exercer papel principal na resposta ao estresse e na homeostase relacionada ao estresse, influencia outras características, como o comportamento, crescimento, reprodução e osmorregulação (WENDELAAR BONGA, 1997; GRIFFITHS et al., 2012).

O estresse tem sido discutido com grande intensidade quando relacionado ao cultivo de organismos aquáticos, principalmente na fase de larvicultura, uma vez que os peixes podem desenvolver um sistema glicocorticoide funcional em estágio iniciais (WILSON et al., 2014). Segundo Rehman et al. (2017), as condições estressantes estão presentes durante a fase embrionária, e consequências indesejáveis podem ocorrer e predispor os peixes ao aumento da mortalidade, doenças e ao comprometimento do crescimento.

O cortisol tecidual foi medido para avaliar a resposta ao estresse em alevinos e pequenos peixes ornamentais, como o peixe-zebra *D. rerio* (POTTINGER; CALDER, 1995; RAMSAY et al., 2006). A identificação de possíveis causas de estresse para peixes ornamentais é importante para melhorar as taxas de sobrevivência e a qualidade geral dos peixes (BARCELLOS et al., 2007), uma vez que a redução do estresse pode melhorar a saúde e o bem-estar da espécie (RAMSAY et al., 2006).

Em cultivo do peixe-dourado, *Carassius auratus*, o crescimento foi significativamente melhorado em tanques de cores brancas, enquanto os tanques das cores vermelhas e azuis foram considerados mais estressantes e imunossupressores para esta espécie, sugerindo que essas cores são inadequadas para o seu cultivo (ESLAMLOO et al., 2015).

Rotllant et al. (2003), observaram que o pargo-vermelho (*Pagrus pagrus*) apresentou menor grau de estresse em tanques brancos do que em tanques cinzas ou pretos, conforme verificado pelos níveis de hormônios relacionados ao estresse. Contudo, muitos peixes podem mudar a coloração do corpo para combinar com o fundo em resposta ao estresse (Xu et al.,

2006). De acordo com Li et al. (2016), as cores escuras, como o preto, são inadequadas para o cultivo de *Scophthalmus maximus*, tendo em vista o seu bem-estar. Existe influência da coloração do ambiente sobre estresse social em juvenis de tilápias-do-Nilo, em particular nas interações agonísticas entre coespecíficos e sobre a concentração plasmática do hormônio cortisol (MERIGHE et al., 2004). Os autores supracitados sugerem que o cultivo de juvenis de tilápias seja realizado em tanques de cores verdes ou pretas, que são as recomendadas para a manutenção da espécie por amenizarem as interações agonísticas e o estresse, enquanto as cores marrons e azuis devem ser evitadas, por estimularem estas respostas.

Contudo, quando a resposta ao estresse é prolongada ou grave, ela pode ter consequências que podem ser prejudiciais à saúde, às defesas imunológicas, ao crescimento e/ou à reprodução dos peixes (SAPOLSKY et al., 2000; REYES-LÓPEZ et al., 2019). Desse modo, encontrar maneiras de mitigar esses efeitos é importante tanto para o bem-estar dos peixes quanto para uma piscicultura bem-sucedida

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Avaliar se a coloração ambiental altera o desenvolvimento e as respostas de estresse em larvas de *Amphiprion frenatus*.

1.8.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se diferentes cores ambientais afetam o crescimento e o desenvolvimento de larvas de peixe-palhaço-tomate *Amphiprion frenatus* e o seu processo de metamorfose.
- b) Avaliar a resposta de juvenis de peixe-palhaço-tomate *Amphiprion frenatus*, cultivados em aquários de diferentes colorações de ambiente, a um estressor agudo.

1.9 ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A tese foi estruturada por uma introdução geral, apresentando a contextualização do tema e os objetivos, e por dois capítulos, formados pelos seguintes artigos científicos:

Capítulo 1: Artigo científico intitulado “Influência das cores dos aquários nos peixe-palhaço-tomate (*Amphiprion frenatus*): desenvolvimento inicial e metamorfose”. O artigo aborda o efeito de diferentes cores do ambiente afetam o crescimento e o desenvolvimento de larvas de peixe-palhaço-tomate *A. frenatus* e seu processo de

metamorfose. O artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Environmental Biology of Fishes*.

Capítulo 2: Artigo científico intitulado “The tank color influences the response of tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*) to an acute stress challenge”. O artigo avaliou a resposta do peixe-palhaço-tomate *A. frenatus* cultivados em diferentes cores de aquário a um estressor agudo padrão. O artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Aquaculture*.

Capítulo 1:

Influência da coloração do ambiente no peixe-palhaço-tomate (*Amphiprion frenatus*): desenvolvimento inicial e metamorfose

Abstract

The background color influenced positively the early development phase of some fish species. Thus, here we evaluated whether different tank colors affect the growth and development of larval tomato clownfish *Amphiprion frenatus* and its metamorphosis process. Operationally, we distributed the *A. frenatus* larvae in white (WA); yellow (YA); blue (BA) and black aquaria (BLA) and accompanied the larvae development until 61-DPH. We showed that background color influences the early development of tomato clownfish, as well their metamorphosis process. In fact, 87.2 % of the larvae reared in BLA completed the metamorphosis and reached the juvenile stage at 61-DPH, while only 20.6 % in BA and 6.2 % in YA reached the juvenile stage. In addition, none of the larvae reared in WA completed the metamorphosis process. Our results strong suggests that the metamorphosis of *A. frenatus* could be accelerated if the larviculture occurs in black aquaria. This result has strong practical and economic implications since the tomato clownfish specimens were commercialized at juvenile stage, and all strategies that could shorten the period necessary to fish reach the juvenile stage are welcome.

Keywords: clownfish, anemonefish, larviculture, growth performance, metamorphosis.

Resumo

A coloração do ambiente influencia positivamente a fase inicial de desenvolvimento de algumas espécies de peixes. Desse modo, nós avaliamos se diferentes cores de tanque afetam o crescimento e o desenvolvimento de larvas do peixe-palhaço-tomate *Amphiprion frenatus* e o seu processo de metamorfose. Operacionalmente, distribuimos as larvas de *A. frenatus* em aquários brancos (AB), aquários amarelos (AM), aquários azul (AZ) e aquários pretos (AP) e acompanhamos o desenvolvimento das larvas até 61 dias após eclosão (DAE). Mostramos que a coloração de fundo influenciou o desenvolvimento inicial do peixe-palhaço tomate, bem como seu processo de metamorfose. De fato, 87,2% das larvas criadas em AP completaram a metamorfose e atingiram a fase juvenil aos 61-DAE, enquanto apenas 20,6% no AZ e 6,2 % no AM atingiram a fase juvenil. Além disso, nenhuma das larvas criadas em AB completou o processo de metamorfose. Nossos resultados sugerem fortemente que a metamorfose de *A. frenatus* pode ser acelerada se a larvicultura ocorrer em aquários pretos. Este resultado tem implicações práticas e econômicas, uma vez que os espécimes de peixe-palhaço-tomate são comercializados na fase juvenil, e todas as estratégias que possam encurtar o período necessário para que os peixes atinjam essa fase são bem-vindas.

Palavras-chave: peixe-palhaço, peixe-anêmona, larvicultura, desempenho de crescimento, metamorfose.

1.10 Introdução

O comércio de peixes ornamentais marinhos está crescendo em todo o mundo, no qual mais de 1.800 espécies de peixes são comercializadas, das quais aproximadamente 90% são capturadas na natureza (Palmtag 2017; Raja et al. 2019). O mercado de peixes ornamentais

depende de uma oferta contínua de animais saudáveis e coloridos, e dentre as espécies de peixes ornamentais mais comercializadas, destacam-se as do gênero *Amphiprion*, mundialmente conhecidos como peixe-palhaço. Por esta razão, o seu cultivo em cativeiro é a única alternativa disponível para salvar os estoques naturais dos peixes-palhaço e atender ao aumento da demanda por seu comércio.

A aquicultura ornamental marinha depende da produção de ovos viáveis e de muitas larvas e juvenis viáveis. A larvicultura é uma fase crítica para a produção de peixes ornamentais marinhos (Holt 2003), pois as larvas são mais sensíveis à temperatura, salinidade, luz e manejo nutricional (Olivotto et al. 2011; Abe et al. 2016). Portanto, todos os procedimentos que melhorem a sobrevivência e o desenvolvimento dos peixes, principalmente na fase de larvicultura, são bem-vindos.

Na fase larval os peixes são cultivadas em altas densidades em ambiente artificial, uma condição potencialmente estressante que pode prejudicar seu bem-estar. As cores do ambiente, por sua vez, estão entre as muitas variáveis que influenciam o bem-estar e o desenvolvimento dos peixes. A coloração influencia o crescimento e o desenvolvimento de várias espécies de peixes como *Morone saxatilis* (Martin-Robichaud & Peterson 1998), *Acipenser ruthenus* (Bayrami et al. 2017), *Lates calcarifer* (Santisathitkul et al. 2019), *Dawkinsia filamentosa* (Padhi et al. 2022) e *Amphiprion clarkii* (Shin et al. 2012). A intensidade da coloração da pele também foi afetada pela coloração do ambiente em *Pagrus auratus* (Doolan et al. 2008) e *Amphiprion ocellaris* (Yasir e Qin 2009; Díaz-Jiménez et al. 2021).

A metamorfose é um processo de transformação de desenvolvimento pós-embrionário que é crucial para a manutenção das populações de peixes adultos de recife, e é particularmente sensível aos estressores antropogênicos que afetam os recifes de coral (McMenamin e Parichy 2013; Lecchini et al. 2017). Durante o período de metamorfose, as larvas passam mudanças morfológicas complexas e crescimento notável, que transformam larvas em juvenis em pouco tempo (Pérez-Domínguez e Holt 2006).

De acordo com Olivotto et al. (2011), o processo de metamorfose foi antecipado em três dias em relação ao controle quando uma dieta enriquecida com ácido graxo altamente insaturado (HUFA) foi oferecida a larvas de *A. ocellaris*. Nesta espécie, a metamorfose envolve a formação completa de três bandas brancas verticais, o que corresponde à transição para a fase juvenil (Salis et al. 2018). Além disso, com o aparecimento de bandas brancas verticais nas regiões da cabeça, abdominal e pedúnculo caudal, observa-se uma mudança no

comportamento de natação de *A. ocellaris*, com as larvas nadando na coluna d'água enquanto os metamórficos e pós-metamorfos nadam mais próximos ao fundo (Roux et al. 2019).

Para larvas de *A. frenatus*, em condições de cultivo com tratamento medicamentoso de TAE684 (NVP-TAE684) (HY-10192, MedChem Express), um inibidor específico da tirosina quinase específica de leucócitos (Ltk) e do receptor de tirosina quinase (Alk), a fase juvenil foi alcançada quando duas ou três bandas brancas verticais estavam presentes nas regiões da cabeça, abdominal e pedúnculo caudal; o desaparecimento das bandas do abdominal e pedúnculo ocorreu meses depois, sendo uma característica proeminente nos juvenis de *A. frenatus* (Salis et al. 2018).

Segundo Victor e Wellington (2000), as espécies de peixes-palhaço apresentam estágio larval curto, com duração de 10 a 15 dias, uma vez que a fase larval em outras espécies de peixes de recifes de coral variam entre 19 e 70 dias.

No entanto, não foram encontrados estudos avaliando os possíveis efeitos da coloração do ambiente sobre o desenvolvimento inicial do peixe-palhaço-tomate (*A. frenatus*). Portanto, avaliamos se diferentes cores de tanque afetaram o crescimento e o desenvolvimento de larvas dessa espécie, e o seu processo de metamorfose.

1.11 Material e Métodos

1.11.1 Estratégia de estudo

Um casal de reprodutores de *Amphiprion frenatus* foi utilizado para a produção das larvas, que com peso inicial de $2,71 \pm 0,14$ mg e comprimento inicial de $3,30 \pm 0,47$ mm foram distribuídas, na densidade de 4 larvas.L⁻¹, em aquários de 10 L de quatro cores diferentes, denominados aquários brancos (AB), aquários azuis (AZ), aquários amarelos (AM) e aquários pretos (AP) (Fig. 1). A coloração foi obtida revestindo cada aquário com papel adesivo na coloração de cada tratamento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado por 61 dias pós-eclosão (DAE).

1.11.2 Animais

1.11.2.1 Casal de reprodutores

O casal de reprodutores de *A. frenatus* foi mantido em tanque-rede (90 L), submerso em tanque de concreto de 8.000 L, com fluxo de água contínuo e taxa de renovação de água de 130 L.h⁻¹. Além disso, foi instalado um vaso de barro para ser usado como ninho para desova. A água que abastecia o sistema de recirculação do tanque de concreto foi coletada diretamente do

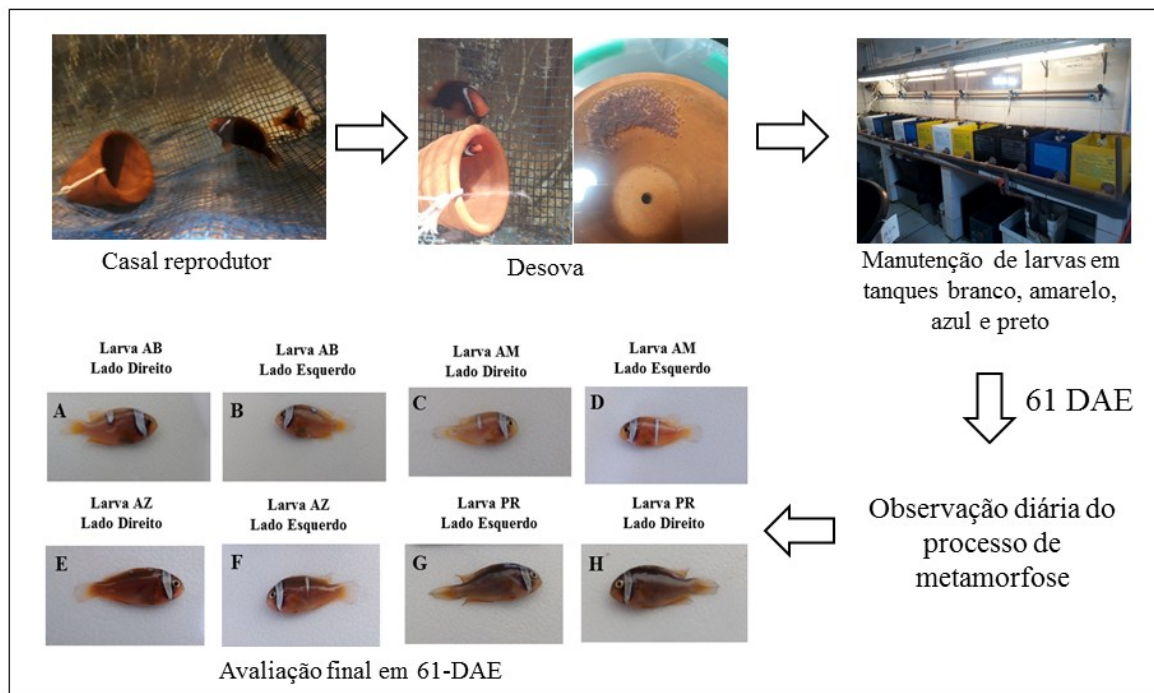
mar, tratada com filtragem mecânica (filtro de polipropileno de 100 μm) e biológica (cerâmica), e mantida sob aeração constante em fotoperíodo 12:12.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (08:30, 11:30, 14:30 e 17:30h) até a saciedade aparente com um primix composta por camarão marinho fresco (40%), peixe (salmão 15% e sardinha 15%), lulas (10%), moluscos bivalves (mexilhão 10%, ostra 5% e vieira 5%), e pré-mistura vitamínica (1 g.kg^{-1}), produzida em liquidificador. Além disso, os peixes receberam ração em flocos Tropical Krill Flakes®, ração Tropical, Soft Line America S® e ração Tropical D-Allio Plus Granulat®.

Os reprodutores foram monitorados diariamente, e após a desova, que ocorreu após nove dias, um vaso de barro com a desova foi retirado e transferido para um tanque de fibra de vidro com capacidade de 60 L de água, mantido nas condições dos reprodutores até a eclosão, que durou uma média de 12 dias.

As seguintes variáveis de qualidade da água do tanque do casal de reprodutores foram medidas diariamente às 08:00 h: concentração de oxigênio dissolvido ($6,0 \pm 0,52 \text{ mg.L}^{-1}$), temperatura da água ($23,36 \pm 1,20 \text{ }^{\circ}\text{C}$), pH ($8,32 \pm 0,14$) e salinidade ($35,0 \pm 0,20 \text{ ‰}$). Essas variáveis oscilaram dentro das faixas aceitáveis para a espécie.

Fig. 1. Representação esquemática do desenho experimental (Fotos, Santos, TML).



1.11.2.2 Larvas

As larvas de *A. frenatus* permaneceram no tanque de fibra de vidro até o quinto dia após a eclosão (5-DAH) e então foram transferidas para as unidades experimentais (três aquários de 10L por cor, Figura 1) na densidade de 4 larvas.L⁻¹. Cada aquário foi distribuído aleatoriamente na sala experimental para evitar viés devido à incidência de luz (Figura 1). A água utilizada foi a mesma que abastecia o tanque de cultivo.

Os aquários foram sifonados três vezes ao dia antes da reposição de alimentos para retirada de alimentos e fezes do fundo, e 30% da água foi trocada. Lâmpadas LED brancas forneceram intensidade de luz na sala das unidades experimentais (9 W, 6500 K, 900 lumens).

Nas unidades experimentais, as larvas foram alimentadas três vezes ao dia às 09:00, 13:00 e 17:00 h, utilizando o seguinte esquema de alimentação: larvas de 5 a 7-DAE foram alimentadas com rotíferos *Brachionus plicatilis* (5 rotíferos. ml⁻¹). Entre 6 e 7-DAE, teve início a mudança na alimentação, de rotíferos vivos para náuplio de *Artemia* spp., e de 6 a 20-DAE, as larvas foram alimentadas com *Artemia* spp. náuplios (3 náuplios.ml⁻¹). Entre 16 e 20-DAE, passou-se gradualmente a alimentação de *Artemia* spp. para alimentos comerciais (Dr. Bassleer Biofish -Food baby nano food®). Em seguida, entre 20 e 40-DAE as larvas foram alimentadas com Dr. Bassleer Biofish -Food baby nano food® até a saciedade aparente. Aos 38-DAE, mudou-se para o alimento Sano® S-Pak 5/8 até a saciedade aparente até 60-DAE.

Em relação à qualidade da água das unidades experimentais, as concentrações de oxigênio dissolvido variaram entre os tratamentos de $5,22 \pm 0,46$ a $5,65 \pm 0,50$ mg.L⁻¹. A temperatura da água variou de $25,34 \pm 1,5$ a $25,79 \pm 1,54$ °C. O pH oscilou entre $8,3 \pm 0,07$ e $8,49 \pm 0,06$, a salinidade de $35,49 \pm 0,09$ a $35,66 \pm 0,92$ ‰, as concentrações de amônia total entre $0,134 \pm 0,09$ e $0,186 \pm 0,07$ mg.L⁻¹ e de nitrito entre $0,034 \pm 0,01$ e $0,064 \pm 0,064$ mg.L⁻¹. Não houve diferenças estatísticas na qualidade da água entre as unidades experimentais.

1.11.3 Observação da metamorfose

A observação do processo de metamorfose, definido pelo aparecimento e desaparecimento das bandas brancas verticais nas larvas, foi realizada diariamente pela manhã, com lupa de 12 LEDs, durante 60-DAE. Nesse mesmo momento diário, observa-se o comportamento das larvas, principalmente quanto à sua localização, atividade locomotora no aquário e agressividade em relação aos coespecíficos.

Ao final do experimento, cada larva foi fotografada dos lados direito e esquerdo para se obter a porcentagem do processo de metamorfose.

1.11.4 Análise Estatística

A independência entre o fator de metamorfose, formado pelas classes não juvenil e juvenil, e o fator de coloração do aquário, formado pelos aquários com as cores: aquários brancos (AB), aquários azuis (AZ), aquários amarelos (AM) e aquários pretos (AP), foi analisada pelo teste do qui-quadrado, ao nível de significância de 0,05%. Inicialmente, todas as cores foram incluídas no teste (AB x AZ x AM x AP). Subsequentemente, diferentes comparações parciais (AB x AZ x AM; AB x AM; AZ x AP), e comparações com cores agrupadas (AB-AZ-AM x AP; AB-AM x AZ; caractere "-" indica dados agrupados enquanto "x" a comparação) foram realizadas.

1.12 Resultados

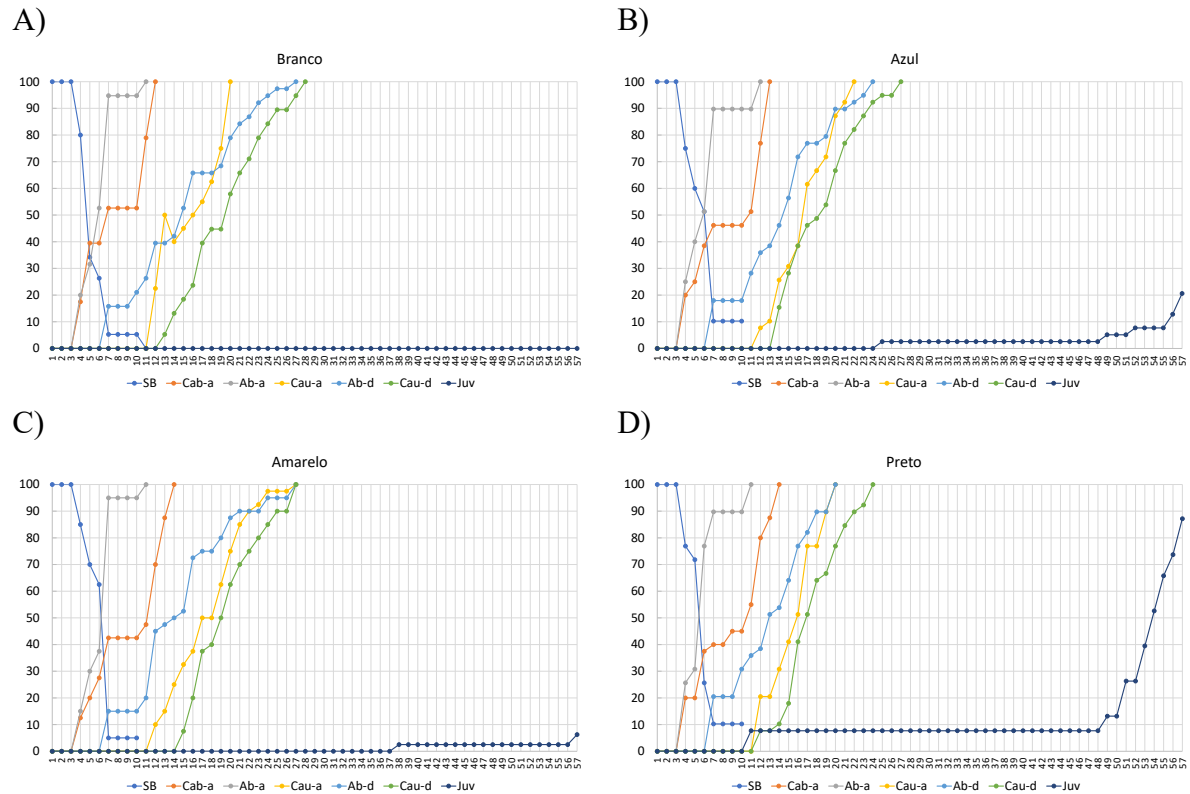
As larvas de *A. frenatus* apresentam três bandas brancas verticais na região da cabeça, abdominal e pedúnculo caudal, e na fase adulta, apenas uma na região da cabeça. No presente estudo, até o 5-DAE, as larvas não apresentaram nenhuma banda branca vertical, porém, no 8-DAE (2º dia do experimento), as larvas de todos os tratamentos (AB, AM, AZ e AP) passaram a apresentar bandas nas regiões da cabeça e abdominal, simultaneamente (Fig. 2). O surgimento se inicia com a formação de uma banda transparente que se torna totalmente branca.

Do 5-DAE ao 10-DAE, o comportamento das larvas dos tratamentos AB e AM foi semelhante, sendo que as larvas sempre permaneceram nadando na superfície e nas laterais dos aquários, principalmente dos lados esquerdos e direitos. Nesse intervalo a coloração larval mudou de amarelo para laranja.

As larvas do tratamento AZ permaneceram nas laterais e centro dos aquários, e sua coloração mudou de amarelo para laranja-avermelhado. No tratamento AP, as larvas apresentaram um padrão diferente, permanecendo na coluna d'água principalmente no centro do aquário, com algumas nadando ativamente contra a corrente. Como resultado, a coloração mudou para avermelhada escura.

Com 11-DAE, as larvas do tratamento AB apresentaram 50% das bandas brancas verticais da cabeça e região abdominal. Entretanto, nos tratamentos AZ e AP, 50% das larvas apresentaram duas bandas brancas verticais com 15-DAE, enquanto no tratamento AM esse padrão ocorreu com 16-DAE. Nesta fase, as bandas brancas verticais na região da cabeça eram completamente brancas, enquanto as da região abdominal ainda eram transparentes. No 17-DAE, três larvas do tratamento AP completaram o processo de transição de larvas para juvenis (Fig. 2).

Fig. 2. Porcentagem de animais sem bandas ou com bandas, e dia de início e de final de cada condição da larvicultura de *Amphiprion frenatus*, submetidos em diferentes cores de aquários por 61-DAE. A) Aquários Brancos. B) Aquários Azuis. C) Aquários Amarelos. D) Aquários Pretos. SB: Sem Banda. Cab: Cabeça. Ab: Abdômen. Cau: Cauda. Juv: Juvenil a: aparecimento. d: desaparecimento.



As larvas se adaptaram bem a todos os tratamentos, nadando ativamente nos aquários e principalmente próximo à saída de água, sendo que no AP, algumas larvas nadavam contra a corrente. Esses aquários apresentavam condição de difícil registro visual, visto que as larvas se camuflavam com preto das paredes do aquário.

O surgimento da terceira banda branca vertical na região do pedúnculo caudal apareceu aos 15, 16, 17 e 17-DAE, respectivamente para os tratamentos, AP, AB, AZ e AM (Fig. 2). No 24-DAE, 100% das larvas apresentaram três bandas brancas verticais nos tratamentos AB e AP, com 26-DAE no tratamento AZ, e com 31-DAE no tratamento AM (Fig. 2).

O processo de transformação das larvas para o estágio juvenil nos tratamentos AZ ocorreu aos 29-DAE, atingindo 2,56% dos peixes ($n=1$), e aos 42-DAE no tratamento AM (2,50%; $n=1$). O tratamento AB não produziu juvenis, enquanto no AP 7,70% ($n=3$) eram juvenis (Fig. 2).

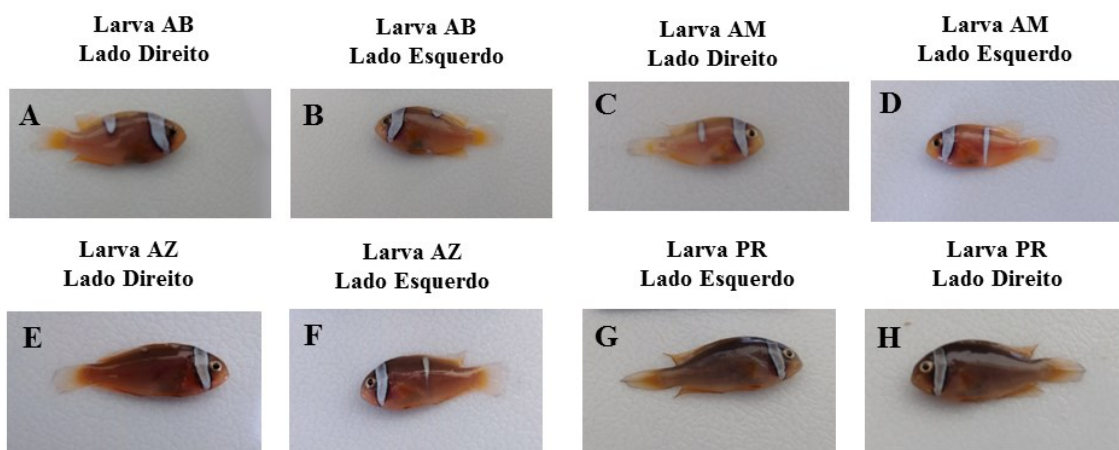
No 11-DAE, teve início o processo de desaparecimento da banda branca vertical da região abdominal, em todos os tratamentos (Fig. 2), tendo sido observados dois padrões de desaparecimento. Em um deles o desaparecimento teve início na região da nadadeira peitoral e finalizou nas extremidades da região ventral, acima da papila urogenital, e da nadadeira dorsal

(Fig. 3A e 3B, enquanto no outro o início ocorreu na região da nadadeira peitoral e finalizou nas extremidades da região ventral, acima da papila urogenital da nadadeira dorsal (Fig. 3C e 3D). Geralmente estes processos não ocorrerem simultaneamente nos lados direito e esquerdo (Fig. 3). As bandas brancas verticais da região do pedúnculo caudal iniciam com coloração branca, finalizando como uma branca transparente que posteriormente desaparece completamente.

Todos os tratamentos foram finalizados com 61-DAE. No tratamento AB, nenhuma das larvas completou o processo de desaparecimento da banda branca vertical na região abdominal, e 76,47% (n=26) e 85,29% (n=29) das larvas permaneceram com bandas abdominais incompletas no lado direito e no lado esquerdo, respectivamente. Além disso, as larvas apresentavam coloração que tendia ao alaranjado (Fig. 2, 3A e 3B).

No tratamento AM, 6,25% das larvas completaram a metamorfose e atingiram o estágio juvenil, sendo que 87,55% (n=28) e 81,25% (n=26) das larvas permaneceram com as bandas abdominais incompletas nos lados direito e esquerdo, respectivamente. As larvas apresentaram coloração laranja escuro (Fig. 2, 3C e 3D).

Fig. 3. Larvas de *Amphiprion frenatus* criadas em aquários com paredes de cores diferentes a 61-DAE. A) Aquário Branco (AB). Larvas no final do processo de metamorfose com desaparecimento das bandas e início do desaparecimento da banda da região dorsal; peso = 498,40 mg; comprimento = 29,30 milímetros. B. Aquário Branco (AB). Início do processo de metamorfose com o desaparecimento da banda, iniciando na região genital com um branco bem sutil; peso = 250,00 mg; comprimento = 28,00 mm. C: Aquário Amarelo (AM). Larvas no final do processo de metamorfose com desaparecimento das bandas acima da nadadeira peitoral; peso = 250,00 mg; comprimento = 28,00 mm. D: Aquário Amarelo (AM). Início do processo de metamorfose com o desaparecimento da banda, iniciando na região genital com branco bem sutil; peso = 250,00 mg; comprimento = 28,00 mm. E: Aquário Azul (AZ). Larvas no final do processo de metamorfose com desaparecimento quase imperceptível das bandas da nadadeira dorsal; peso = 433,10 mg; comprimento = 29,50 mm. F: Aquário Azul (AZ). larvas no início do processo de metamorfose, com desaparecimento da banda acima da nadadeira peitoral; o peso de 433,10 mg e com um comprimento de 29,50 mm. G e H: Aquário Preto (AP). Metamorfose completa; juvenil com peso de 418,20 mg e 23,90 mm de comprimento.



No tratamento AZ, 20,59% das larvas completaram a metamorfose e atingiram o estágio juvenil, sendo que 58,83% (n=20) e 65,76% (n=22) das larvas permaneceram com as bandas da região abdominal incompletas no lado direito e no lado esquerdo, respectivamente. Além disso, as larvas apresentaram coloração vermelho escuro (Fig. 2, 3E e 3F).

No tratamento AP, 87,18% (n=34) das larvas completaram a metamorfose e atingiram a fase juvenil, sendo que 12,82% (n=5) e 10,26% (n=4) das larvas permaneceram com as bandas da região abdominal incompletas no lado direito e no lado esquerdo, respectivamente, com larvas apresentando coloração avermelhada escura (Fig. 2, 3G e 3H).

O teste do qui-quadrado foi aplicado para avaliar a independência entre o fator de metamorfose, formado pelas classes não juvenil e juvenil, e o fator de coloração do aquário, formado pelas cores AB, AZ, AM e AP. O número de animais observado em cada classe está apresentado na Tabela 1. Inicialmente o teste foi aplicado com todas as classes de coloração (Tabela 1A), mostrando que a metamorfose foi dependente delas. Considerando-se a diferença no número de juvenis nos tanques AP, esta coloração foi comparada com o conjunto das demais, tendo sido encontrada dependência (Tabela 2B), assim como no teste entre os tratamentos AB, AM e AZ (Tabela 2C). Para as cores AB e AZ, o teste do qui-quadrado mostrou independência com a proporção entre não juvenis e juvenis, que foi a mesma para essas cores, com maior número de não juvenis (Tabela 2D). A metamorfose em aquários AZ diferiu da combinação AB-AM, uma vez que o número de juvenis em AB-AM foi menor do que o esperado e maior do que o esperado em aquários AZ (Tabela 2E). Esse mesmo padrão foi observado em aquários com a coloração AZ em relação à coloração AP (Tabela 2F).

1.13 Discussão

Aqui mostramos que as cores dos aquários influenciaram o desenvolvimento inicial do peixe-palhaço-tomate (*A. frenatus*) e seu processo de metamorfose pois, de fato, 87,18% das larvas cultivadas em aquários pretos (AP) completaram a metamorfose e atingiram o estágio juvenil no 61-DAE. Em comparação, apenas 20,59% nos peixes dos aquários azuis (AZ) e 6,25% nos aquários amarelos (AM) atingiram o estágio juvenil. Além disso, nenhuma das larvas cultivadas em aquários brancos (AB) completou o processo de metamorfose.

Por outro lado, as cores dos aquários não produziram diferenças no peso final das larvas aos 61-DAE ($F_{3,88} = 1,308$, $p = 0,2768$), que apresentaram pesos médio ($\pm$ desvio-padrão) iguais a $250,10 \pm 13,87$, $270,30 \pm 14,32$, $248,10 \pm 11,59$ e $276,10 \pm 10,83$ mg, para os tratamentos AB, AZ, AM e AP, respectivamente.

Tabela 1. Número de não juvenis e juvenis de cada condição de larvicultura de *Amphiprion frenatus*, submetidos em diferentes cores de aquários por 61-DAE. AB: aquário branco. AZ: aquário azul. AM: aquário amarelo. AP: aquário preto.

Classe	AB	AZ	AM	AP	Total
Não-juvenil	34	27	30	5	96
Juvenil	0	7	2	34	43
Total	34	34	32	39	139

Tabela 2. Testes de independência qui-quadrado entre classes não juvenis-juvenis e diferentes combinações de classes de coloração na larvicultura de *Amphiprion frenatus* por 61-DAE. AB: aquário branco. AZ: aquário azul. AM: aquário amarelo. AP: aquário preto. O caractere “x” indica comparação; o caractere “-” significa *pool* de dados de cores.

A)					D)				
AB x AZ x AM x AP					AB x AM				
	Valor	gl	<i>p</i>			Valor	gl	<i>p</i>	
X ²	83,804	3	<0,01	*	X ²	0,581	1	0,45	ns
<i>n</i>	139				<i>n</i>	66			
B)					E)				
AB-AZ-AM x AP					AB-AM x AZ				
	Valor	gl	<i>p</i>			Valor	gl	<i>p</i>	
X ² c	80,265	1	<0,01	*	X ² c	6,439	1	0,011	*
<i>n</i>	139				<i>n</i>	100			
C)					F)				
AB x AZ x AM					AZ x AP				
	Valor	gl	<i>p</i>			Valor	gl	<i>p</i>	
X ²	9,233	2	0,01	*	X ² c	30,07	1	<0,01	*
<i>n</i>	100				<i>n</i>	73			

X₂c = correção de continuidade. gl = graus de liberdade.

Os processos de desenvolvimento e metamorfose do peixe-palhaço podem ser avaliados com base em traços qualitativos (Roux et al. 2019). Dentre esses traços, o aparecimento e desaparecimento das bandas brancas verticais da cabeça, abdominal e pedúnculo caudal podem ser utilizados para avaliar se o peixe atingiu o estágio juvenil (Roux et al. 2019).

No presente estudo, observamos o aparecimento de bandas brancas verticais na região cabeça e abdominal no 8-DAE. A formação simultânea das duas bandas brancas verticais foi observada em *A. ocellaris* (Roux et al. 2019) e *A. frenatus* (Salis et al. 2018). No entanto, em *A. frenatus*, a primeira banda branca vertical foi observada na região abdominal com 10-DAE e a segunda banda branca vertical foi registrada na região da cabeça com 13-DAE (Putra et al. 2021). No pedúnculo caudal, a terceira banda branca vertical apareceu mais tarde, aproximadamente no 17-DAE, em *A. ocellaris* (Roux et al. 2019) e com 14-DAE em *A. frenatus*.

(Roux et al. 2019). Os mesmos autores afirmaram que o desaparecimento das bandas brancas verticais abdominal e pedúnculo caudal pode levar vários meses, sendo uma característica dos juvenis de *A. frenatus*. Em nosso estudo, apenas os peixes do tratamento AP mostraram que essas bandas desapareceram.

De acordo com Salis et al. (2018), na fase adulta, os peixes do gênero *Amphiprion* são classificados em quatro categorias de acordo com suas bandas: espécies sem bandas brancas verticais (*A. akallopisos*, *A. pacificus*, *A. ephippium* e *A. sandaracimos*); espécies com uma banda branca vertical na região da cabeça (*A. barberi*, *A. frenatus*, *A. leucokranos*, *A. mocolochi*, *A. nigripes*, *A. ormanensis*, *A. perideraion* e *A. rubrocinctus*); espécies com duas bandas brancas verticais, na cabeça e região abdominal (*A. akindynos*, *A. allardi*, *A. bicinctus*, *A. chagosensis*, *A. chrysopterus*, *A. latifasciatus*, *A. omanensis* e *A. sebae*) e espécies com três bandas brancas verticais, nas regiões da cabeça, abdominal e pedúnculo caudal (*A. biaculeatus*, *A. chrysogaster*, *A. latezonatus*, *A. ocellaris*, *A. percula* e *A. tricinctus*).

A espécie foco deste estudo, *A. frenatus*, na fase adulta, apresenta uma única banda branca vertical na região da cabeça, sendo que nenhuma espécie apresenta uma única banda branca vertical nas regiões do abdominal ou pedúnculo caudal. No entanto, a banda branca vertical na região abdominal está associada à banda branca vertical na região da cabeça e à banda branca vertical na região do pedúnculo caudal está sempre relacionado a bandas brancas verticais na região da cabeça e abdominal (Salis et al. 2018).

O aparecimento de bandas brancas verticais em *A. ocellaris* pode indicar o momento da metamorfose, caracterizada por alterações de pigmentação e não por alterações morfológicas. Ainda que o papel funcional das bandas brancas verticais no *Amphiprion* ainda seja desconhecido, ele pode estar associado à defesa contra predadores, ao tipo de macro-habitat e ao reconhecimento das espécies (Roux et al. 2019).

Quando ameaçadas, as larvas do tratamento AP se comportaram de forma diferente das dos demais tratamentos. Enquanto os peixes em AP pareceram se proteger no fundo dos aquários, mantendo uma distância de 2 a 3 cm entre eles, possivelmente devido à camuflagem dos aquários escuros, nos demais tratamentos de cores, os peixes pareceram buscar proteção nas laterais do aquários. Também observamos que os peixes do tratamento AP apresentaram interações menos agressivas. A interação agressiva faz parte do comportamento natural de várias espécies de peixes (Damsgård e Huntingford 2012); no entanto, em ambientes de aquários artificiais, juvenis e adultos se envolvem em interações agressivas para estabelecer uma hierarquia social (Gauy et al. 2018).

Esse ambiente mais seguro e menos agressivo poderia explicar os melhores resultados alcançados no tratamento AP. O comportamento menos agressivo em ambientes mais seguros é plausível e reforçado pelo fato de que a agressividade dos peixes está correlacionada com a razão sexual, o tamanho do aquário e a quantidade de abrigo disponível (Baensch 2017). De fato, uma menor agressividade pode indicar menos estresse em peixes dominantes e subordinados, resultando em uma melhor condição de bem-estar (Olivotto e Geffroy 2017).

A coloração de aquário preto também influenciou positivamente a fase inicial de desenvolvimento de outras espécies de peixes, como o robalo, *Morone saxatilis* (Martin-Robichaud e Peterson 2008), o robalo asiático *Lates calcarifer* (Santisathitkul et al. 2020), e outras espécies de peixe-palhaço, *A. ocellaris*, em ambiente com fundo preto, mantém a coloração vermelha intensa, característica da espécie (Díaz-Jiménez et al. 2021).

Os efeitos relacionados à coloração do tanque em vários aspectos, como o desenvolvimento e a pigmentação em peixes do gênero *Amphiprion* (Yasir e Qin 2009; Díaz-Jiménez et al. 2021), reforçam fortemente que esses peixes podem detectar e reagir a diferentes cores. Assim, descartamos os possíveis efeitos de outras condições de criação, uma vez que os peixes de todos os tratamentos foram mantidos em condições idênticas de qualidade de água e de alimentação.

O fato deste estudo ter sido realizado com larvas de apenas um casal reprodutor de peixe-palhaço confere ao mesmo baixa diversidade genética suficiente. Entretanto, consideramos que essa limitação não diminui a importância de nossos achados, uma vez que dados sobre os efeitos da coloração no desenvolvimento inicial e metamorfose de *A. frenatus* não foram ainda relatados na literatura científica.

1.14 Agradecimentos

O estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - código 001), com bolsa de estudos para TMLS e pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), com bolsa de produtividade em pesquisa (número 303263/2018-0) recebida por LJGB.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que suportam os resultados deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação e pertinência.

Referências

- Abe HA, Dias JAR, Reis RGA, Sousa NC, Ramos FM, Fujimoto RY (2016) Manejo alimentar e densidade de estocagem na larvicultura do peixe ornamental amazônico *Heros severus*. Bol Inst Pesca 42(3): 514-522 <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p514>
- Baensch F (2017) Dwarf angelfish. In: Calado R, Olivotto I, Planas OM, Holt JG (eds) Marine Ornamental Species Aquaculture. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 279-298 <https://doi.org/10.1002/9781119169147>
- Bayrami A, Noverian HA, Sharif EA (2017) Effects of background colour on growth indices and stress of young sterlet (*Acipenser ruthenus*) in a closed circulated system. Aquacult Res 48: 2004–2011 <https://doi.org/10.1111/are.13033>
- Damsgård B, Huntingford F (2012) Fighting and aggression. In: Huntingford F, Jobling M, Kadri S (eds) Aquaculture and Behavior. Blackwell Publishing Ltd., Hoboken, pp 248-285 <https://doi.org/10.1002/9781444354614>
- Díaz-Jiménez L, Hernández-Vergara MP, Pérez-Rostro CI, Olvera-Novoa MA (2021) The effect of two carotenoid sources, background colour and light spectrum on the body pigmentation of the clownfish *Amphiprion ocellaris*. Aquacult Res 52(7): 3052-3061 <https://doi.org/10.1111/are.15149>
- Doolan BJ, Allan GL, Booth MA, Jones PL (2008) Effects of cage netting colour and density on the skin pigmentation and stress response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). Aquacult Res 39: 1360-1368 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02003.x>
- Gauy ACS, Boscolo CNP, Gonçalves-De-Freitas E (2018) Lower water turnover reduces the effects on social aggression of the cichlid *Pterophyllum scalare*. Appl Animal Behav Sci 198: 121-126 <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.10.003>.
- Holt GJ (2003) Research on Culturing the Early Life Stages of Marine Ornamental Fish. In: Cato J, Brown CL (eds) Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation. Iowa State Press, Ames, pp 251–254
- Lecchini D, Dixon DL, Lecellier G, Roux N, Frédérick B, Besson M, Nakamura Y (2017) Habitat selection by marine larvae in changing chemical environments. Mar Poll Bull 114(1): 210-217 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.083>.
- Martin-Robichaud DJ, Peterson RH (2008) Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). Aquacult Res 29: 539–547 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00234.x>
- McMenamin SK, Parichy DM (2013) Metamorphosis in Teleosts. In: Shi Y (ed) Current Topics in Developmental Biology. Academic Press, London, pp 127-165 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00005-8>.
- Olivotto I, Planas M, Simoes N, Holt GJ, Avella MA, Calado R (2011) Advances in breeding and rearing marine ornamentals. J World Aqua Soc 42(2): 135–166 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00453.x>

Olivotto I; Geffroy B (2017) Clownfish. *In*: Calado R, Olivotto I, Oliver MP, Holt GJ (eds) Marine Ornamental Species Aquaculture, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 177-199 <https://doi.org/10.1002/9781119169147>

Padhi N, Jena SK, Ail SKS, Ferosekhan S, Sahoo SN, Udit UK, Bairwa MK, Swain SK (2022) Does tank background colour influence the growth, survival, and carotenoid content in fishes? An illustration in filament barb, *Dawkinsia filamentosa* (Valenciennes, 1844). *Aquacult* 560: 738536 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738536>

Palmtag MR (2017) The marine ornamental species trade. *In*: Calado R, Olivotto I, Oliver MP, Holt GJ (eds) Marine Ornamental Species Aquaculture, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 3-14 <https://doi.org/10.1002/9781119169147>

Pérez-Domínguez R, Holt GJ (2006) Interrenal and thyroid development in red drum (*Sciaenops ocellatus*): effects of nursery environment on larval growth and cortisol concentration during settlement. *Gen Comp Endocrinol* 146(2): 108–118 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.10.006>.

Putra DF, Abol-Munafi AB, Muchlisin ZA, Chen JC (2012) Preliminary study on the morphology and digestive tract development of tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*) under captive condition. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation Bioflux*, 5(1), 29-35

Raja K, Aanand P, Padmavathy S, Sampathkumar JS (2019) Present and future market trends of Indian ornamental fish sector. *Internat J Fish Aquat Stud* 7(2): 06-15

Roux N, Salis P, Lambert A, Logeux V, Soulat O, Romans P, Laudet V (2019) Staging and normal table of post-embryonic development of the clownfish (*Amphiprion ocellaris*). *Develop Dynam* 248(7): 545-568 <https://doi.org/10.1002/dvdy.46>

Salis P, Roux N, Soulat O, Lecchini D, Laudet V, Frédérick B (2018) Ontogenetic and phylogenetic simplification during white stripe evolution in clownfishes. *BMC Biol* 16: 90 <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0559-7>

Santisathitkul N, Thongprajukaew K, Saekhow S, Sandos P, Buntomnimit S, Kanghae H (2020) Optimal background colour for rearing Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquacult Res* 51(4): 1743-1752 <https://doi.org/10.1111/are.14521>

Shin HS, Lee J, Choi CY (2012) Effects of LED light spectra on the growth of the yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii*. *Fish Sci* 78(3): 549–556 <http://doi:10.1007/s12562-012-0482-8>

Victor BC, Wellington GM (2000) Endemism and the pelagic larval duration of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. *Mar Ecol Progress Series* 205: 241-248

Yasir I, Qin JG (2009) Impact of background on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *J World Aqua Soc* 40(6): 724-734 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00292.x>

Capítulo 2:

A coloração do tanque influencia a resposta do peixe-palhaço-tomate (*Amphiprion frenatus*) a desafio de estresse agudo

Tania Maria Lopes dos Santos¹, Elen Monique de Oliveira Sousa², Monica Yumi Tsuzuki², Alex Pires de Oliveira Nuñez¹ & Leonardo José Gil Barcellos^{3,4*}

¹Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce/LAPAD - Universidade Federal de Santa Catarina/CCA/ Departamento de Aquicultura, Rodovia Francisco Thomaz Dos Santos, 3532, Armação do Pântano do Sul • Florianópolis, SC, Brasil CEP 88066-260. TMLS - tania.dossantas@gmail.com; APON - alex.nuner@ufsc.br

²Laboratório de Peixes Ornamentais Marinhos/LAPOM – Universidade Federal de Santa Catarina/CCA/Departamento de Aquicultura, Servidão dos Coroas, nº 503, Barra da Lagoa - Florianópolis, SC. CEP 88061-600. EMOS - monique.olis@hotmail.com; MYT - monica.tsuzuki@ufsc.br

³Laboratório de Fisiologia de Peixes – Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação. BR 285, Km 292.7, Campus I, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS, Brazil. lbarcellos@upf.br

⁴Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

Abstract

Larviculture is an important phase in the cultivation process because larvae are more sensitive to stress and fluctuations of a series of variables such as temperature, salinity, nutritional management, intensity, the light spectrum, and environmental colors. In this sense, we evaluated whether aquarium colors affect the endocrine response of clownfish (*Amphiprion frenatus*) larvae to an acute stress challenge. In this study, we show that the color of the aquarium influences the response of the endocrine stress axis in tomato clownfish. When fish underwent a standard acute stressor 61 days after hatching, only fish cultivated in white aquariums showed increased body cortisol levels. Thus, from the results presented here, it is recommended to avoid white tanks for *A. frenatus* larviculture. The lowest level of stress and the highest welfare of larvae created in colorful tanks can have important practical applications, as almost all clownfish in ornamental aquariums come from captive breeding.

Keywords: anemonefish, cortisol, fish welfare, larviculture, stress.

Resumo

A larvicultura é uma fase importante no processo de cultivo porque as larvas são mais sensíveis ao estresse e às oscilações de uma série de variáveis, como a temperatura, salinidade, manejo nutricional, intensidade, espectro da luz e cores do ambiente. Nesse sentido, testamos neste estudo se as cores dos aquários afetam a resposta endócrina de larvas de peixe-palhaço-tomate

Amphiprion frenatus a um desafio de estresse agudo. Neste estudo, mostramos que a coloração do aquário influencia a resposta do eixo do estresse endócrino em peixes-palhaço tomate. Quando os peixes foram submetidos a um estressor agudo padrão 61 dias após a eclosão, apenas os peixes estocados em tanques brancos apresentaram aumento nos níveis de cortisol corporal. Desse modo, a partir dos resultados aqui apresentados, recomenda-se evitar tanques brancos para a larvicultura de *A. frenatus*. O menor nível de estresse e o maior bem-estar de larvas criadas em tanques coloridos podem ter aplicações práticas importantes, já que quase todos os peixes-palhaço no comércio de aquários ornamentais são oriundos de criação em cativeiro.

Palavras-chave: bem-estar de peixes, cortisol, estresse, larvicultura.

1.15 Introdução

Os peixes do gênero *Amphiprion*, conhecidos mundialmente como peixes-palhaço, figuram entre os peixes ornamentais marinhos mais comercializados. Neste sentido, essa demanda do mercado consumidor estimulou o desenvolvimento do cultivo dessas espécies em sistemas em cativeiro.

No cultivo de animais aquáticos, o estresse tem sido abordado com grande preocupação, principalmente na fase de larvicultura, uma vez que os peixes podem desenvolver um sistema glicocorticoide funcional em estágio iniciais (WILSON et al., 2014). Segundo Rehman et al. (2017), condições estressantes estão presentes durante a fase embrionária, e consequências indesejáveis podem ocorrer e predispor os peixes ao aumento da mortalidade, a doenças e ao comprometimento do crescimento.

Estudos relacionados ao estresse foram desenvolvidos para várias espécies de peixes de marinho como o pargo-vermelho (*Pagrus pagrus*) (Rotllant et al. 2003; Van der Salm et al. 2006), a dourada (*Pagrus auratus*) (Doolan et al. 2008), o esturjão (*Acipenser ruthenus*) (Bayrami et al. al., 2017), e o barramundi (*Lates calcarifer*) (Morshedi et al., 2020), e em peixes de água doce como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Volpato e Barreto 2001), jundiá (*Rhamdia quelen*) (Barcellos et al. 2009), o tricogaster cobra (*Trichogaster pectoralis*) (Ninwichian et al. 2018), o peixe-zebra (*Danio. rerio*) (Abreu et al. 2020).

A resposta ao estresse é considerada um mecanismo adaptativo que permite ao peixe lidar com estressores reais ou percebidos, a fim de manter seu estado normal ou homeostático (BARTON 2002). De forma simplificada, o estresse pode ser considerado como um estado de homeostase ameaçado que é restabelecido por um conjunto complexo de respostas adaptativas (CHORUSOS, 1998). Contudo, a resposta ao estresse ocorre a partir de uma série de mecanismos fisiológicos, tais como alterações nas proteínas, no metabolismo energético,

imunológico, endócrino, e como mudanças neurais e comportamentais, que tentarão superar a situação estressante e compensar os desequilíbrios produzidos (SULA e ALIKO 2017).

Conforme apontado por Ruchin (2020), cores específicas estressam os peixes, o que pode ser identificado pelo aumento do nível de cortisol. O cortisol, além de exercer papel central na resposta ao estresse e na homeostase relacionada ao estresse, influencia outras características, como o comportamento, o crescimento, a reprodução e a osmorregulação (WENDELAAR BONGA, 1997; GRIFFITHS et al., 2012).

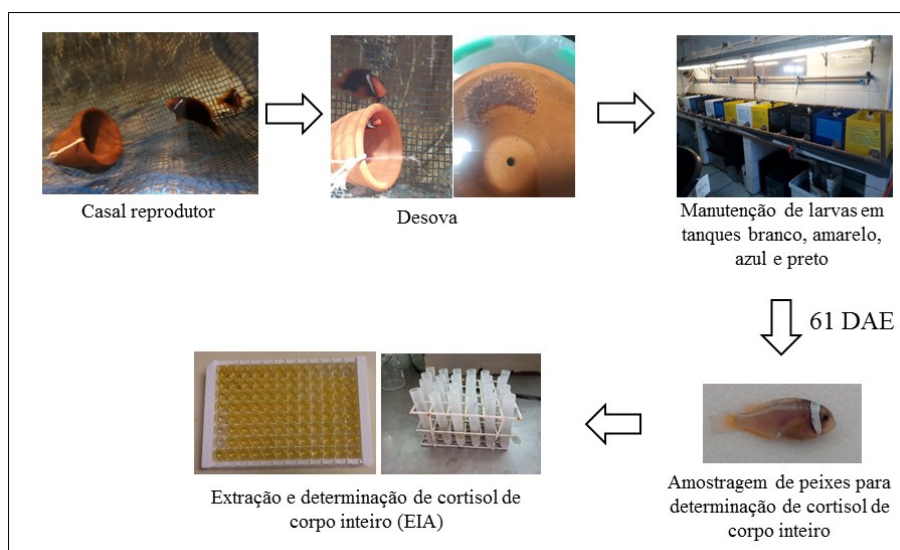
O aumento do cortisol tem sido utilizado como biomarcador de estresse em espécies do gênero *Amphiprion* (IWATA et al. 2012). No entanto, não foram encontrados estudos avaliando os possíveis efeitos das cores dos aquários na resposta ao estresse do peixe-palhaço-tomate, (*A. frenatus*). Neste sentido, avaliamos a resposta de juvenis dessa espécie criados em diferentes cores de aquários a um estressor agudo padrão.

1.16 Material e métodos

Para a produção das larvas utilizadas neste estudo foi utilizado um casal de reprodutores de peixe-palhaço-tomate (*A. frenatus*). Larvas com peso inicial de $2,71 \pm 0,14$ mg e comprimento inicial de $3,30 \pm 0,47$ mm foram distribuídas, na densidade de 4,0 larvas/L, em aquários de 10 L de quatro cores diferentes: branco (AB), azul (AZ), amarelo (AM) e preto (AP). Escolhemos essas cores com base em estudos anteriores conduzidos com diferentes espécies de peixes (Bayrami et al. 2017, Abreu et al. 2020; Mapunda et al. 2021). A coloração de cada tratamento foi obtida revestindo-se cada aquário com papel adesivo.

O experimento foi conduzido em delineamento casualizado por 61 dias após a eclosão (DAE), e ao final desse período foi aplicado um desafio de estresse, a emersão aérea por 120 s; posteriormente os peixes foram eutanasiados para determinação do cortisol tecidual (Fig. 1).

Fig. 1. Representação esquemática do desenho experimental (Fotos, Santos, TML).



1.16.1 Animais

1.16.1.1 Reprodutores

O casal de peixes-palhaço-tomate (*A. frenatus*) foi mantido em tanque-rede (90 L), submerso em tanque de concreto de 8.000 L, com fluxo de água contínuo e taxa de renovação de água de 130 L/h para a produção de larvas. Um vaso de barro foi instalado para ser usado como ninho para a desova. A água que abastecia o sistema de recirculação do tanque de concreto foi coletada diretamente do mar, submetida a filtração mecânica (filtro de polipropileno de 100 µm) e biológica (cerâmica), e mantida sob aeração constante em fotoperíodo 12:12.

O casal de reprodutor foi alimentado quatro vezes ao dia (08:30, 11:30, 14:30 e 17:30h) até a saciedade aparente com primix composta por camarão-marinho fresco (40%), peixes (salmão 15 % e sardinha 15%), lulas (10%), moluscos bivalves (mexilhão 10%, ostra 5% e vieira 5%), e pré-mistura vitamínica (1 g/kg), misturadas em liquidificador. Além disso, os peixes receberam ração em flocos Tropical Krill Flakes®, ração Tropical, Soft Line America S® e ração Tropical D-Allio Plus Granulat®.

Os reprodutores foram monitorados diariamente, e quando a desova ocorreu, após nove dias, o vaso de barro com a desova foi retirado e transferido para um tanque de fibra de vidro com capacidade de 60 L de água, mantido nas condições dos reprodutores até a eclosão, que levou, em média, 12 dias.

A seguintes variáveis de qualidade da água do tanque do casal reprodutor foi medida diariamente às 08:00 h: concentração de oxigênio dissolvido ($6,0 \pm 0,52$ mg/L), temperatura da

água ($23,36 \pm 1,20^{\circ}\text{C}$), pH ($8,32 \pm 0,14$) e salinidade ($35,0 \pm 0,20$). Os parâmetros de qualidade da água oscilaram dentro de uma faixa aceitável para a espécie.

1.16.1.2 Larvas

As larvas de peixe-palhaço-tomate permaneceram no tanque de fibra de vidro até o quinto dia após a eclosão (5-DAE), quando foram transferidas para as unidades experimentais, formadas por aquários de vidro de 10L, abastecidos com a mesma água do tanque de criação, na densidade de 4 larvas/L. Cada aquário foi distribuído aleatoriamente na sala experimental para evitar viés devido à incidência de luz (ver Fig. 1). Os aquários foram sifonados três vezes ao dia, antes da reposição de alimentos, para retirada de alimentos e fezes do fundo, quando 30% da água era trocada. Lâmpadas LED brancas forneceram intensidade luminosa na sala das unidades experimentais (9 W, 6500 K, 900 lúmens).

Nas unidades experimentais, as larvas foram alimentadas às 09:00, 13:00 e 17:00 h, utilizando o seguinte esquema de alimentação: larvas de 5 a 7-DAE receberam rotíferos *Brachionus plicatilis* (5 rotíferos/ ml). Entre 6 e 7-DAE, teve início a mudança de alimentação de rotíferos vivos para *Artemia* sp., e de 6 a 20-DAE, as larvas foram alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. (3 náuplios/ml). Entre 16 e 20-DAE, gradualmente os náuplios de *Artemia* sp. foram substituídos por alimento em pó comercial (Dr. Bassleer Biofish - Food baby nano food®). De 20 a 40-DAE, as larvas foram alimentadas com Dr. Bassleer Biofish – Food baby nano food® até a saciedade aparente. Aos 38-DAE, gradualmente foi utilizada o alimento em flocos Sano® S-Pak 5/8, utilizado até a saciedade aparente até 61-DAE.

Em relação à qualidade da água das unidades experimentais, os valores de oxigênio dissolvido variaram entre os tratamentos de $5,22 \pm 0,46$ a $5,65 \pm 0,50$ mg/L. A temperatura da água variou de $25,34 \pm 1,5$ a $25,79 \pm 1,54$ °C. O pH oscilou entre $8,3 \pm 0,07$ e $8,49 \pm 0,06$, a salinidade entre $35,49 \pm 0,09$ e $35,66 \pm 0,92$, e as concentrações de amônia total e de nitrito entre $0,134 \pm 0,09$ e $0,186 \pm 0,07$ mg/L e $0,034 \pm 0,01$ e $0,064 \pm 0,064$ mg/L, respectivamente. Não foram registradas diferenças estatísticas dessas variáveis entre as unidades experimentais.

1.16.2 Teste de desafio de estresse agudo e determinação de cortisol de tecidual

O desafio de estresse agudo foi realizado aos 61-DAE em todos os tratamentos de cor. De cada repetição, 12 larvas foram capturadas aleatoriamente, seis para o teste de estresse e seis como controle ($n = 6$). Metade das larvas foi imediatamente anestesiada e sacrificada em solução de óleo de cravo (0,16 mg/L; Balamurugan et al. 2016) e armazenadas a -80°C . A outra metade foi exposta ao ar por 120 s, devolvidas à água e sacrificadas após 15 minutos, seguindo

o mesmo procedimento. O tipo de estressor e o tempo de exposição utilizados tiveram como base os níveis de pico de cortisol em outros pequenos peixes teleósteos, como o peixe-zebra (*D. rerio*) (Abreu et al. 2014) e o peixe-palhaço selvagem (*A. ocellaris*) (Mills et al. 2020).

O procedimento de extração de cortisol de tecidual foi realizado conforme descrito por Oliveira et al. (2014), e os níveis de cortisol foram medidos por kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (teste EIAgen CORTISOL, BioChem ImmunoSystems). O uso de kits baseados em EIA para determinação do cortisol sanguíneo em peixes do gênero *Amphiprion* foi previamente validado (Mills et al., 2010).

1.16.3 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, e sua normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os níveis de cortisol de corpo inteiro de peixes criados em tanques de diferentes cores foram analisados com análise de variância (ANOVA) de duas vias com exposição ao estressor e cores do tanque como fatores independentes, seguido pelo teste de Tukey.

1.17 Resultados

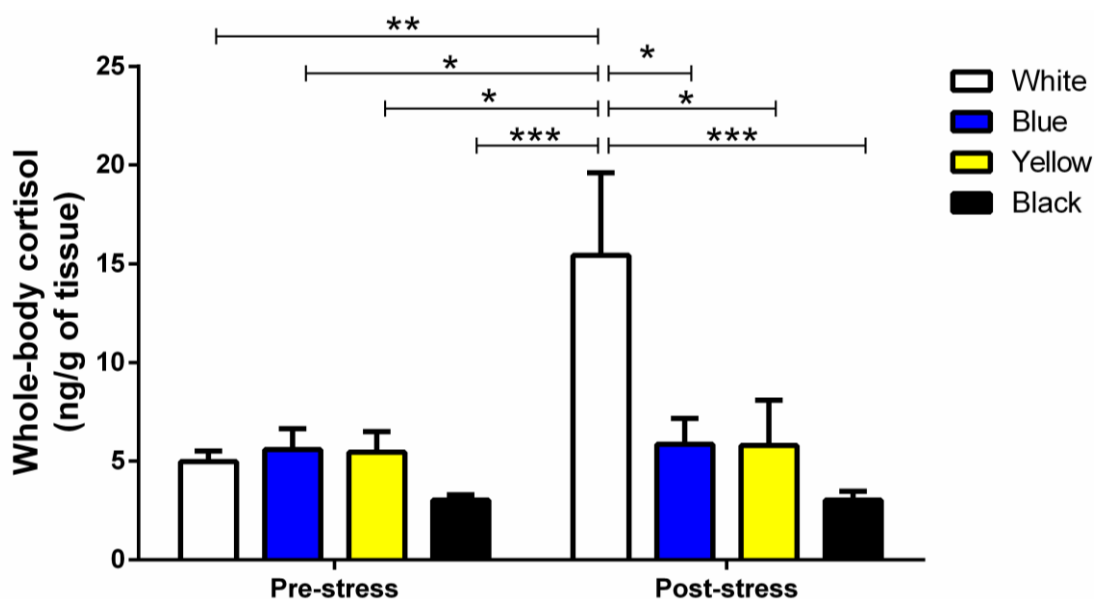
A ANOVA de duas vias revelou interação significativa coloração do aquário e exposição ao estressor ($F_{3,40} = 3,823$, $p < 0,01$). Apenas os peixes mantidos no tratamento AB apresentaram aumento significativo das concentrações de cortisol tecidual após a exposição ao estressor (Fig. 2). As concentrações de cortisol pós-estresse de peixes no tratamento AB também foram maiores do que os valores pós-estresse obtidos para peixes estocados em outras condições de coloração (Fig. 2).

1.18 Discussão

A influência das cores dos aquários na resposta ao estresse dos peixes já foi documentada para várias espécies de peixes, mas não para o peixe-palhaço-tomate (*A. frenatus*).

No esturjão (*Acipenser ruthenus*), o cortisol plasmático de peixes estocados no escuro foi menor do que o de peixes estocados em tanques de coloração branca (Bayrami et al. 2017). No entanto, aquários coloridos (verde e azul) induziram menos estresse para o pompano de nariz arrebitado (*Trachinotus blochii*) (Mapunda et al. 2021) e para o peixe-zebra (*D. rerio*) (Abreu et al. 2020).

Fig. 2. Resposta do cortisol tecidual ao estresse em peixes-palhaço tomate (*Amphiprion frenatus*) estocados em aquários de cores brancas, azuis, amarelas e preta, submetidos a estresse agudo. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM e foram comparados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. (N = 6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



Por outro lado, os níveis plasmáticos de cortisol em peixes estocados em tanques brancos, como o peixe marinho barramundi (*Lates calcarifer*) (Morshedi et al. 2022) e o peixe de água doce carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (Papoutsoglou et al. 2000), foram significativamente mais baixos do que aqueles em tanques pretos. Para o pargo-vermelho (*Pagrus auratus*), peixes estocados em tanques pretos apresentaram valores mais elevados de cortisol (Doolan et al. 2008), e, em contraste, aqueles cultivados em tanques brancos apresentaram menor aumento de cortisol, condição que se manteve durante todo o experimento (Rotllant et al. 2003). Esta espécie, quando desafiada com um estressor agudo, apresentou resposta de cortisol semelhante à de peixes cultivados em tanques brancos e vermelhos (Van der Salm et al. 2006).

Situação semelhante foi registrada para o jundiá (*Rhamdia quelen*), uma espécie de bagre de hábitos noturnos, para a qual a coloração de fundo não apresentou influência sobre a resposta ao estresse. No entanto, os peixes mantidos em tanques fechados permaneceram com níveis de cortisol aumentados até 24 h (Barcellos et al. 2009). Por sua vez, as cores dos aquários (preto, branco ou azul) não afetaram cronicamente os níveis de cortisol plasmático do acará (*Geophagus brasiliensis*) (Miyai et al. 2020). Esses achados sugerem uma modulação espécie-específica da coloração de fundo sobre a resposta ao estresse em peixes.

No presente estudo mostramos que a coloração do aquário influenciou a resposta de estresse ao eixo endócrino no peixe-palhaço-tomate, pois quando submetidos a um estressor

agudo padrão por 61-DAE, apenas peixes cultivados no tratamento AB apresentaram aumento em seus níveis de cortisol tecidual.

Uma condição a ser investigada é considerar as cores típicas a que os peixes estão expostos em seu ambiente e as circunstâncias em que eles potencialmente evoluíram para se entender a especificidade das respostas ao estresse em diferentes espécies. Nossos resultados estão focados apenas em um desafio de estresse agudo, e não podemos descartar que as cores dos aquários possam afetar a resposta do cortisol por um período mais prolongado.

O mecanismo subjacente ao efeito de diferentes cores dos aquários na resposta ao estresse de *A. frenatus* pode estar relacionado ao papel potencial do hormônio α -MSH na liberação de cortisol (Balm et al. 1995; Lamers et al. 1992; Huising et al. 2004). O hormônio α -MSH está intimamente relacionado à adaptação a diferentes origens e cores claras (Lamers et al. 1992). Nesse sentido, o papel modulador do α -MSH sobre as alterações relacionadas às cores dos aquários sobre os níveis de cortisol deve ser investigado em *A. frenatus*. Outro mecanismo candidato é o efeito direto da coloração e da intensidade da luz sobre o sistema nervoso central (SNC), uma vez que a coloração do tanque induz algumas mudanças de comportamento (Abreu et al. 2020).

No presente estudo, foram descartados possíveis efeitos de outras condições do cultivo, uma vez que os peixes de todos os tratamentos foram mantidos em condições idênticas de qualidade água (temperatura, pH, N) e alimentação. Os efeitos relacionados ao aquário e/ou coloração da luz em vários aspectos, como o desenvolvimento e a pigmentação em peixes do gênero *Amphiprion* (Yasir e Qin 2009; Díaz-Jiménez et al. 2021) mostraram que esses peixes podem detectar e reagir a diferentes cores dos aquários. Desse modo, as ausências de resposta dos peixes cultivados nos tratamentos AM, AZ e AP não podem ser atribuídos à incapacidade dos peixes em detectar a coloração do ambiente.

Independentemente das discrepâncias na resposta do cortisol à coloração do aquário nas espécies de peixes, a ausência de aumento significativo nos níveis de cortisol do tecidual de larvas de *A. frenatus* cultivadas nos tratamentos AM, AZ ou PA e indica menor estresse em comparação com aquelas cultivadas no tratamento AB. Além disso, as cores preferidas podem ter implicações substanciais para o bem-estar dos peixes. Existem estudos que mostraram os efeitos das cores da parede (Barcellos et al. 2009), da coloração clara (Maia e Volpato 2013) e da coloração de refúgio (Maia et al. 2021) sobre os níveis de bem-estar dos peixes.

Os baixos níveis de cortisol encontrados em peixes-palhaço-tomate cultivados em aquários coloridos podem indicar um maior status de bem-estar nesses peixes.

Esses resultados minimizam a possibilidade de que uma menor resposta de cortisol de larvas cultivadas em aquários coloridos possa resultar de um enfraquecimento da capacidade de resposta ao estresse, o que pode ser interpretado como um baixo grau de bem-estar.

Neste estudo o cortisol tecidual foi mensurado em um tempo específico após o estressor ter sido aplicado, e não podemos descartar que os efeitos da coloração do aquário possam vir a ocorrer em períodos mais longos (Rotllant et al. 2003; Barcellos et al. 2009). Além disso, usamos apenas o cortisol como biomarcador de estresse, porém outros efeitos poderiam ocorrer em outras variáveis, como aquelas relacionadas ao comportamento (Mills et al. 2020). Como as larvas foram produzidas a partir de uma única desova de *A. frenatus*, sua variação genética é restrita. Essa baixa diversidade, entretanto, reforça os efeitos da coloração sobre a responsividade das larvas ao estresse, pois ela não pode ser atribuída à variação da diversidade genética de peixes de diferentes origens. No entanto, consideramos que as limitações apontadas acima não reduzem a relevância deste estudo, uma vez que não há dados sobre os efeitos da coloração do ambiente (aquário ou luz) na resposta ao estresse de *A. frenatus*.

A partir dos resultados apresentados, recomendamos evitar aquários brancos para a larvicultura de *A. frenatus*. Por outro lado, o estresse mais baixo e o elevado bem-estar de larvas cultivadas em aquários coloridos podem ter fortes aplicações práticas, já que quase todos os peixes-palhaço no comércio de aquários ornamentais são oriundos de cultivos em cativeiro.

Contribuições dos autores

TMLS, MYT e LJGB conceberam o estudo. Os experimentos e análises laboratoriais foram realizados por TMLS e EMOS. LJGB e APON realizaram as análises estatísticas. Os dados foram discutidos, referenciados e revisados por TMLS, EMOS, APON e LJGB. O rascunho original e a revisão da redação foram realizados por TMLS, APON e LJGB. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Financiamento

O estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES – Código de Financiamento 001), com bolsa de estudos para TMLS, e pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), com bolsa de produtividade em pesquisa (número 303263/2018-0) recebida por LJGB.

Declarações

Declaração de aprovação ética

Este estudo está em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (Protocolo nº 8653190221).

Consentimento para participar

Não se aplica.

Consentimento para publicação

Não se aplica.

Interesses competitivos

Os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes a divulgar.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que suportam os achados deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação plausível.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos laboratórios que forneceram suporte durante o estudo: Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC), Laboratório de Peixes Marinhos (LAPMAR/UFSC) e Laboratório de Cultivo de Algas (LCA/UFSC). Os autores agradecem também aos alunos de pós-graduação Suelen Mendonça-Soares, Milena Fortuna, Wagner Antonio Tamagno, Amanda Carolina Cole Varela, Aline Pompermaier e aos alunos de graduação do Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade de Passo Fundo, por todo o auxílio e aplicação de técnicas habilidosas durante todas as análises de determinação do cortisol corporal.

Referências

Abe HA, Dias JAR, Reis RGA, Sousa NC, Ramos FM, Fujimoto RY (2016) Manejo alimentar e densidade de estocagem na larvicultura do peixe ornamental amazônico *Heros severus*. Bol Inst Pesca 42(3):514-522 <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p514>

Abreu MS, Giacomini ACVV, Genario R, Santos BE, Marcon L, Demin KA, Kalueff AV (2020) The impact of housing environment color on zebrafish (*Danio rerio*) anxiety-like behavioral and physiological (cortisol) responses. Gen Comp Endocrinol 294:113499 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113499>

Abreu MS, Koakoski G, Ferreira D, Oliveira TA, Rosa JGS, Gusso D, Giacomini ACV, Piatto AL, Barcellos LJG (2014) Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. PLoS ONE 9(7): e103232 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103232>

- Balamurugan J, Kumar TTA, Prakash S, Meenakumari B, Balasundaram C, Harikrishnan R (2016). Clove extract: A potential source for stress free transport of fish. *Aquaculture* 454(1): 171-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.020>
- Balm PHM, Hovens MLM, Wendelaar Bonga SE (1995) Endorphin and MSH in concert form the corticotropic principle release by tilapia (*Oreochromis mossambicus*: Teleostei) melanotropes. *Peptides* 16:463–469 [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)00204-J](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)00204-J)
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM, Rosa JGS, Koakoski G, Centenaro L, Pottker E (2009) Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. *Aquaculture* 288:51–56 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.002>
- Barcellos, L. J. G.; Ritter, F.; Kreutz, L. C.; Quevedo, R. M.; da Silva, L. B.; Bedin, A. C.; Cericato, L. O cortisol de corpo inteiro aumenta após contato direto e visual com um predador em zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, v. 272, n. 1-4, p. 774-778, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.002>.
- Barton BA (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr Comp Biol* 42:517–525 <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Bayrami A, Noverian HA, Sharif EA (2017) Effects of background colour on growth indices and stress of young sterlet (*Acipenser ruthenus*) in a closed circulated system. *Aquacult Res* 48:2004–2011 <https://doi.org/10.1111/are.13033>
- Biondo MV, Burki RP (2014) A Systematic Review of the Ornamental Fish Trade with Emphasis on Coral Reef Fishes—An Impossible Task. *Animals* 2020(10) <https://doi.org/10.3390/ani10112014>
- Díaz-Jiménez L, Hernández-Vergara MP, Pérez-Rostro CI, Olvera-Novoa MÁ (2021) The effect of two carotenoid sources, background colour and light spectrum on the body pigmentation of the clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquacult Res* 52(7):3052-3061 <https://doi.org/10.1111/are.15149>
- Doolan BJ, Allan GL, Booth MA, Jones PL (2008) Effects of cage netting colour and density on the skin pigmentation and stress response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquacult Res* 39:1360-1368 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02003.x>
- Eslamloo, K.; Akhavan, S. R.; Eslamifar, A.; Henry, M. A. Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*, v. 46, n. 1, p. 202-215, 2015. <https://doi.org/10.1111/are.12177>.
- Holt GJ (2003) Research on Culturing the Early Life Stages of Marine Ornamental Fish. Iowa State Press, Ames, Iowa
- Huising MO, Metz JR, van Schooten C, Taverne-Thiele AJ, Hermesen T, Verburg-van Kemenade BML, Flik G (2004) Structural characterization of a cyprinid (*Cyprinus carpio* L.) CRH, CRH-BP and CRH-R1, and the role of these proteins in the acute stress response. *J Molecul Endocrinol* 32:627–648 <https://doi.org/10.1677/jme.0.0320627>

- Iwata E, Mikami K, Manbo J, Moriya-Ito K, Sasaki H (2012) Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zool Sci* 29:849–855 <https://doi.org/10.2108/zsj.29.849>
- Lamers AE, Flik G, Atsma W, Wendelaar-Bonga SE (1992) A role for di-acetyl α -melanocyte stimulating hormone in the control of cortisol release in the teleost *Oreochromis mossambicus*. *J Endocrinol* 135:285–292 <https://doi.org/10.1677/joe.0.1350285>
- Maia CM, Alves NPC, Tatemoto P (2021) Juvenile Nile tilapia fish avoid red shelters. *J Appl Anim Welf Sci* 24(1):98-106 <https://doi.org/10.1080/10888705.2020.1848567>
- Maia CM, Volpato GL (2013) Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. *Zoology* 116(1):64–66 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000800011>
- Mapunda J, Mtolera MSP, Yahya SAS, Ngo VM, Golan M, Nguyen VM (2021) Effect of tank colour on growth, survival, stress level, digestive enzymatic activities and body composition of snubnose pompano (*Trachinotus blochii* Lacépède) larvae. *Aquacult Res* 52(12):6244-6255 <https://doi.org/10.1111/are.15487>
- Martin-Robichaud DJ, Peterson RH (2008) Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Aquacult Res* 29:539–547 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00234.x>
- Mills SC, Beldade R, Henry L, Laverty D, Nedelec SL, Simpson SD, Radford AN (2020) Hormonal and behavioural effects of motorboat noise on wild coral reef fish. *Env Poll* 262:114250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114250>
- Mills SC, Mourier J, Galzin R (2010) Plasma cortisol and 11-ketotestosterone enzyme immunoassay (EIA) kit validation for three fish species: the orange clownfish *Amphiprion percula*, the orangefin anemonefish *Amphiprion chrysopterus* and the blacktip reef hark *Carcharhinus melanopterus*. *J Fish Biol* 77:769–777 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02693.x>
- Miyai CA, Sanches FHC, Costa TM, Barreto RE (2020) Intruder traits modulate aggressive behavior of territory owners. *Sci Rep* 10:12050 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68513-1>
- Morshedi V, Pradhoshini KP, Tangestani N, Ghasemi A, Sotoudeh E, Gamoori R, Musthafa MS (2022) Effects of rearing tank colour on growth indices, blood chemistry, digestive enzymes, expression of stress and growth-related genes of Asian sea bass juvenile (*Lates calcarifer*). *Aquacult Res* 53:3780–3787 <https://doi.org/10.1111/are.15884>
- Ninwichian P, Phuwan N, Jakpim K, Sae-Lim P (2018) Effects of tank color on the growth, stress responses, and skin color of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*). *Aquacult Internat* 26:659–672. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0242-6>
- Oliveira TA, Koakoski G, Motta AC, Piato AL, Barreto RE, Volpato GL, Barcellos LJG (2014) Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Hormon Behav* 65:340–344 <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.009>
- Olivotto I, Planas M, Simoes N, Holt GJ, Avella MA, Calado R (2011) Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *J World Aquacult Soc* 42(2):135–166 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00453.x>

- Padhi N, Jena SK, Ail SKS, Ferosekhan S, Sahoo SN, Udit UK, Bairwa MK, Swain SK (2022) Does tank background colour influence the growth, survival, and carotenoid content in fishes? An illustration in filament barb, *Dawkinsia filamentosa* (Valenciennes, 1844). *Aquaculture* 560:738536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738536>
- Palmtag MR (2017) The marine ornamental species trade. In: Calado L, Olivotto MP, Holt GJ (eds) *Marine ornamental species aquaculture*. Wiley Blackwell, Chichester, UK. p. 942.
- Papoutsoglou SE, Mylonakis G, Miliou H, Karakatsouli NP, Chadio S (2000) Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. *Aquacult Engineer* 22:309–318 [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00056-X)
- Pottinger, T. G.; Calder, G. M. Physiological stress in fish during toxicological procedures: a potentially confounding factor. *Environ. Toxicol. Water Qual*, v.10, p. 135–146, 1995. <https://doi.org/10.1002/tox.2530100208>.
- Raja K, Aanand P, Padmavathy S, Sampathkumar JS (2019) Present and future market trends of Indian ornamental fish sector. *Internat J Fish Aquat Stud* 7(2):06-15
- Ramsay, J. M.; Feist, G.W.; Varga, Z. M.; Westerfield, M.; kent, M. L.; Schreck, C. B. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, v. 258, p. 565–574, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.020>.
- Rehman, S.; Gora, A. H.; Ahmad, I.; Rasool, S. I. Stress in aquaculture hatcheries: source, impact and mitigation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, v. 6, p. 3030–3045, 2017. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.357>.
- Rotllant J, Tort L, Montero D, Pavlidis M, Martinez M, Wendelaar Bonga SE, Balm HH (2003) Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 223:129–139 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00157-1)
- Ruchin AB (2020) Environmental colour impact on the life of lower aquatic vertebrates: development, growth, physiological and biochemical processes. *Rev Aquacult* 12:310–327 <https://doi.org/10.1111/raq.12319>
- Santisathitkul N, Thongprajukaew K, Saekhow S, Sandos P, Buntomnimit S, Kanghae H (2020) Optimal background colour for rearing Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquacult Res* 51(4):1743-1752 <https://doi.org/10.1111/are.14521>
- Santos TML, Sousa EMO, Tsuzuki MY, Nuñez APO, Barcellos LJG The tank color influences the growth and development of tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*). *In preparation*.
- Shin HS, Lee J, Choi CY 2012 Effects of LED light spectra on the growth of the yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii*. *Fish Sci* 78(3):549–556 <http://doi:10.1007/s12562-012-0482-8>
- Thlusty MF, Rhyne AL, Kaufman L, Hutchins M, Reid GM, Andrews C, Dowd S (2013) Opportunities for public aquariums to increase the sustainability of the aquatic animal trade. *Zoo Biol* 32(1):1-12 <https://doi.org/10.1002/zoo.21019>

Van der Salm AL, Pavlidis M, Flik G, Wendelaar Bonga SE (2006) The acute stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*, kept on a red or white background. Gen Comp Endocrinol 145:247–253 <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.09.010>

Volpato GL, Barreto RE (2001) Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. Braz J Med Biol Res 34:1041–1045 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000800011>

WILSON, K.S.; MATRONE, G.; LIVINGSTONE, D. E.W.; MULLINS, J. J.; TUCKER, C. S.; HADOKE, P. W. F.; KENYON, C. J.; DENVIR, M. A. Physiological roles of glucocorticoids during early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). J. Physiol, v. 24, p. 6209–6220, 2014. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.256826>.

Yasir I, Qin JG (2009) Impact of background on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. J World Aqua Soc 40(6):724-734 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00292.x>

CONCLUSÃO GERAL

O comércio de organismos aquáticos dá preferência a peixes-palhaço tomate de cores mais vivas e brilhantes. Contudo, para que isto aconteça, os animais precisam ser cultivados em tanques de cores claras, que causam estresse e prejudicam o bem-estar dos peixes.

Nosso estudo mostrou que larvas de *A. frenatus* cultivadas em aquários brancos, produzem um nível mais elevado da concentração de cortisol tecidual, quando comparadas a larvas cultivadas em aquários com cores escuras. Por outro lado, o cultivo de *A. frenatus* em aquários escuros, propicia larvas menos estressadas, porém com colorações mais escuras, menos atrativas para o comércio.

No entanto, com o aumento das pesquisas em ambientes aquáticos com diferentes cores, e com o resultado aqui mostrado, de que ambientes de coloração clara estressa e prejudica o bem-estar dos peixes, a ampla divulgação dos resultados dessas pesquisas poderia contribuir para uma mudança gradual do mercado, no sentido de torna-lo mais ético e mais preocupado com o bem-estar dos peixes comercializados em detrimento de sua maior beleza aos nossos olhos, como já acontece com outras espécies de animais de estimação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ABE, H. A.; DIAS, J. A. R.; REIS, R. G. A.; SOUSA, N. C.; RAMOS, F. M.; FUJIMOTO, R. Y. Manejo alimentar e densidade de estocagem na larvicultura do peixe ornamental amazônico *Heros severus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 514-522, 2016.
- ARAÚJO, J. G.; dos SANTOS, M. A. S.; REBELLO, F. K.; ISAAC, V. J. Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 4. 2, p. 297-307, 2017. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n2p297>.
- ARVEDLUND, M.; MCCORMICK, M. I.; AINSWORTH, T. Effects of photoperiod on growth of larvae and juveniles of the anemonefish *Amphiprion melanopus*, Naga. **ICLARM Quart**, v. 23, n. 2, p. 18–23, 2002.
- BALM, PHM, L.; AMBERT, J. D. G.; WENDELAAR- BONGA, S. E. Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 76, p. 53- 62, 1989. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(89\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(89)90032-4).
- BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v, **30**, n. 6, p. 437-444, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00348.x>.
- BARCELLOS, L. J. G.; RITTER, F.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; DA SILVA, L. B.; BEDIN, A. C.; CERICATO, L. O cortisol de corpo inteiro aumenta após contato direto e visual com um predador em zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 272, n. 1-4, p. 774-778, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.002>.
- BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids1. **Integr Comp Biol**, v. 42, n. 3, 517-525, 2002. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- BAYRAMI, A.; NOVERIAN, H.A.; SHARIF, E. A. Effects of background colour on growth indices and stress of young sterlet (*Acipenser ruthenus*) in a closed circulated system. **Aquacult Res**, v. 48, p.2004–2011, 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13033>.
- BERA, A.; KAILASAM, M.; MANDAL, B.; SUKUMARAN, K.; MAKESH, M.; HUSSAIN, T.; VIJAYAN, K. K. Effect of tank colour on foraging capacity, growth and survival of milkfish (*Chanos chanos*) larvae. **Aquaculture**, v. 512, p. 734347, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734347>.
- BRANDER, L. M.; VAN BEUKERING, P. V.; CESAR, H. S. J. The recreational value of coral reefs: a meta-analysis. **Ecological Economics**, v. 63, p.209-218, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2006.11.002>.
- CALADO, R.; OLIVOTTO, I.; OLIVER, M. P., M.; HOLT, G. J. Marine Ornamental Species Aquaculture. Wiley Blackwell, Oxford, U.K. 2017.f

CALLAN, C. K.; BURGESS, A. I.; ROTHE, C. R.; TOUSE, R. Development of Improved Feeding Methods in the Culture of Yellow Tang, *Zebrasoma flavescens*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 49, n. 3, p. 493-503, 2018.

CERQUEIRA, M. A.; BARBOSA, J. M.; SILVIA, R. M. Influência da coloração na sobrevivência de pós-larvas de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) durante a incubação. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 2, n. 1, p. 73-81, 2014. <https://doi.org/10.2312/ActaFish.2014.2.1.73-81>.

COMEAU, S.; CARPENTER, R. C.; LANTZ, C. A.; EDMUNDS, P. J. Ocean acidification accelerates dissolution of experimental coral reef communities. **Biogeosciences**, v. 12, p. 365-372, 2015. <https://doi.org/10.5194/bg-11-12323-2014>.

CHEN, T. H.; HSIEH, C. Y. Fighting Nemo: Effect of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on aggressive behavior and social hierarchy of the false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*. **Marine pollution bulletin**, v. 124, n. 2, p. 760-766, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.04>.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concept the stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioural homeostasis. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 267, p. 1244-1252, 1992.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 851, p. 311– 335, 1998.

DÍAZ-JIMÉNEZ, L.; HERNÁNDEZ-VERGARA, M. P.; PÉREZ-ROSTRO, C. I.; OLVERA-NOVOA, M. A. The effect of two carotenoid sources, background colour and light spectrum on the body pigmentation of the clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquacult Res**, v. 52, n. 7, p. 3052-3061, 2021. <https://doi.org/10.1111/are.15149>.

DOOLAN, B. J.; ALLAN, G. L.; BOOTH, M. A.; JONES, P. L. Effects of cage netting colour and density on the skin pigmentation and stress response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). **Aquacult Res**, v. 39, p. 1360-1368, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02003.x>.

dos SANTOS GAUY, A. C.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Less water renewal reduces effects on social aggression of the cichlid *Pterophyllum scalare*. **Applied Animal Behavior Science**, v. 198, p. 121-126, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.10.003>

DHANEESH, K. V.; DEVI, K. N.; KUMAR, T. A.; BALASUBRAMANIAN, T.; TISSERA, K. Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 24, n. 3, p. 201-209, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2011.03.00>.

ELLIS, T.; YILDIZ, H. Y.; L'ÓPEZ-OLMEDA, J.; SPEDICATO, M. T.; TORT, L.; ØVERLI, Ø.; MARTINS, C. I. M. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiol. Biochem**, v. 38, p. 163–188, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9568-y>.

- ELLSAESSER, C. F.; CLEM, L. W. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. **Journal of Fish Biology**, v. 28, n. 4, p. 511-521, 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05187.x>
- ESLAMLOO, K.; AKHAVAN, S. R.; ESLAMIFAR, A.; HENRY, M. A. Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 1, p. 202-215, 2015. <https://doi.org/10.1111/are.12177>.
- FAUTIN, D. G.; ALLEN, G. R.; ALLEN, G. R.; NATURALIST, A.; ALLEN, G. R.; NATURALISTE, A. (1992). Field guide to anemone fishes and their host sea anemones. **Perth: Western Australia Museum**. p. 78, 1992.
- FANTA, E. Influence of background color on the behaviour of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichilidae). **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 38, n. 4, p. 1237-1251, 1995.
- FIFE-COOK, I.; FRANKS, B. (2019). Positive Welfare for Fishes: Rationale and Areas for Future Study. **Fish**, v. 4, n. 2, p. 31, 2019. <https://doi.org/10.3390/fishes4020031>.
- FISHBASE. *Amphiprion frenatus* Brevoorte, 1856 Peixe-palhaço de tomate. Disponível em <https://www.fishbase.se/summary/Amphiprion-frenatus.html>. Acesso em 28/09/2022.
- FRICKE, H.; FRICKE, S. Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. **Nature**, v. 266, p. 830-832, 1977.
- GREEN, B. S.; FISHER, R. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, v. 299, n. 1, p. 115–132, 2004.
- GRIFFITHS, B. B.; SCHOONHEIM, P. J.; ZIV, L.; VOELKER, L.; BAIER, H.; GAHTAN, E. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Front Behav Neurotic.**, v. 6, p. 68, 2012. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00068>.
- GOSWAMI, C.; ZADE, V. S. Análise do Comércio Internacional e Escopo Comercial Econômico de Peixes Ornamentais. **Revista Internacional de Engenharia e Ciências Aplicadas**, v. 2, n. 5, p. 257929, 2015.
- HOLT, G. J. Research on Culturing the Early Life Stages of Marine Ornamental Fish. **Iowa State Press, Ames, Iowa**, p. 251–254, 2003.
- HUNTINGFORD, F. A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V. A.; KADRI, S.; POTTINGER, T. G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J. F. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, n. 2, p. 332-372, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x>.
- INSTITUTO PET BRASIL. Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil (2018). Disponível em: <http://institutopetbrasil.com/imprensa/cento-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>. Acesso em 01/11/2022.
- INSTITUTO PET BRASIL. Censo Pet IPB: com alta recorde de 6% em um ano, gatos lideram crescimento de animais de estimação no Brasil (2018). Disponível em:

<https://institutopetbrasil.com/fique-por-dentro/amor-pelos-animais-impulsiona-os-negocios-2-2/>. Acesso em 01/11/2022.

IWAMA, G. K. Intensive fish production, Course Manual UBC Access Guided Independent Study. Vancouver: **The University of British Columbia**, 1993.

IWATA, E.; MANBO, J. Territorial behaviour reflects sexual status in groups of false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) under laboratory conditions. **Acta Ethologica**, v. 16, n. 2, p. 97-103, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10211-012-0142-0>.

JOB S. D.; BELLWOOD D. R. Light sensitivity in larval fishes: Implications for vertical zonation in the pelagic zone. **Limnol Oceanogr**, v. 45, p. 362–371, 2000. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.2.0362>.

KANG, D. Y.; KIM, H. C. Influence of density and background color to stress response, appetite, growth, and blind-side hypermelanosis of flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 221-232, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9693-2>.

KARAKATSOULI, N.; KASSIANOS, N.; PAPOUTSOGLU, S. E. Effects of rearing density and tank colour on juvenile sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) growth performance. **Aquaculture International**, v. 23, n. 4, p. 943-953, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9853-8>.

LAWRENCE, A. B.; VIGORS, B.; SANDØE, P. What Is so Positive about Positive Animal Welfare? —A Critical Review of the Literature. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 783, 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9100783>.

LECCHINI, D.; DIXSON, D. L.; LECHELLIER, G.; ROUX, N.; FRÉDÉRICH, B.; BESSON, M.; NAKAMURA, Y. Habitat selection by marine larvae in changing chemical environments. **Mar Poll Bull**, v. 114, n. 1, p. 210-217, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.083>.

LI, X.; CHI, L.; TIAN, H.; MENG, L.; ZHENG, J.; GAO, X.; LIU, Y. Colour preferences of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Physiology & behavior**, v. 156, p. 64-70, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.01.007>.

LOPEZ-BETANCUR, D.; MORENO, I.; GUERRERO-MENDEZ, C.; GÓMEZ-MELÉNDEZ, D.; MACIAS, P, M. de J.; OLVERA-OLVERA, C. Effects of Colored Light on Growth and Nutritional Composition of Tilapia, and Biofloc as a Food Source. **Applied sciences**, v. 10, n. 1, p. 362, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10010362>.

LUZ, R. K.; PORTELLA, M. C. Diferentes densidades de estocagem na larvicultura do trairão *Hoplias lacerdae*. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, p. 95-101, 2005a. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/68097/2-s2.0-26844504758.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso 02/11/2020.

MADHU, K.; MADHU, R.; KRISHNAN, L.; SASIDHARAN, C. S.; VENUGOPAL, K. M. Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive condition. **Marine**

Fisheries Information Service, Technical and Extension Series, v. 188, p. 1-5, 2006.
Disponível em <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/3673>.

MARISCAL, R. N. The nature of the symbiosis between Indo-Pacific anemone fishes and sea anemones. **Marine Biology**, v. 6, n. 1, p. 58-65, 1970.

MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; PETERSON, R. H. Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, n. 8, p. 539-547, 1889.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00234.x>.

MERIGHE, G. K. F.; PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; NEGRÃO, J. A.; RIBEIRO, S. Efeito da coloração do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33, 828-837, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000400002>.

NINWICHIAN, P.; PHUWAN, N.; LIMLEK, P. Effects of tank color on growth, survival rate, stress response and skin color of juvenile hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 554, p. 738129, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738129>.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Comments on Fish and Fisheries Biology**, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999, <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>.

MONK, J.; PUVANENDRAN, V.; BROWN, J. A. Does different tank bottom colour affect the growth, survival and foraging behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae? **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 197-202, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.018>

MUMBY, P. J.; ANTHONY, K. Resilience metrics to inform ecosystem. management under global change with application to coral reefs. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 1088-1096, 2015. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12380>.

MCCLANAHAN, T. R.; GRAHAM, N. A. J.; MACNEIL, M. A.; CINNER, J. E. Biomass based targets and the management of multispecies coral. reef fisheries. **Conservation Biology**, v. 29, p. 409-417, 2015. <https://doi.org/10.1111/cobi.12430>.

MCMENAMIN, S. K.; PARICHY, D. M. Metamorphosis in Teleosts. In Y. Shi (Ed). **Current Topics in Developmental Biology**. Academic Press, London, p. 127-165, 2013.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00005-8>.

OKADA, T.; NAKATANI, M.; SAWA, A. Y.; MIYASHITA, S.; KUMAI, H.; ISHIBASHI, Y. Effect of tank wall colour and pattern on the survival rate of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel) during ship transportation. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 2, p. 446-452, 2015. <https://doi.org/10.1111/are.12196>.

OLIVOTTO, I.; CAPRIOTTI, F.; BUTTINO, I.; AVELLA, A. M.; VITIELLO, V.; MARADONNA, F.; CARNEVALI, O. The use of harpacticoid copepods as live prey for

Amphiprion clarkii larviculture: effects on larval survival and growth. **Aquaculture**, v. 274, n. 2, p. 347-352, 2008a.

OLIVOTTO, I.; BUTTINO, I.; BORRONI, M.; PICCINETTI, C. C.; MALZONE M. G.; CARNEVALI, O. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture, **Aquaculture**, v. 284, n. 1, p. 211–216, 2008b.

OLIVOTTO, I.; DI STEFANO, M.; ROSETTI, S.; COSSIGNANI, L.; PUGNALONI, A.; GIANTOMASSI, F.; CARNEVALI, O. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*, Pomacentridae) larval development and metamorphosis: Molecular and biochemical implications.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, v. 159, n. 3, p. 207-218, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.004>.

OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; SIMOES, N.; HOLT, G.J.; AVELLA, M. A. & CALADO, R. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. **J World Aqua Soc**, v. 42, n. 2, p. 135–166, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00453.x>.

PADHI, N.; JENA, S. K.; AIL, S. K. S.; FERROSEKHAN, S.; SAHOO, S. N.; UDIT, U. K.; BAIRWA, M. K.; SWAIN, S. K. Does tank background colour influence the growth, survival, and carotenoid content in fishes? An illustration in filament barb, *Dawkinsia filamentosa* (Valenciennes, 1844). **Aquaculture**, v. 560, p.738536, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738536>.

PALIŃSKA-ŻARSKA, K.; KREJSZEFF, S.; ŁOPATA, M.; ŻARSKI, D. Effect of water hardness, temperature, and tank wall color, on the effectiveness of swim bladder inflation and survival of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) larvae reared under controlled conditions. **Aquaculture International**, v. 2, n. 4, p. 931-943, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0333-4>.

PALMTAG, M. R. **The marine ornamental species trade**. In R. Calado, I.; Olivotto, M. P.; Holt, G. J., editors. Marine ornamental species aquaculture. Wiley Blackwell, Chichester, UK. p. 942, 2017.

PAWAR, H. B.; SANAYE, S. V.; MURUGAN, A.; SREEPADA, R. A. Effect of tank background colour on the growth and survival of juvenile yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852) in the pelagic phase. **The Israeli Journal of Aquaculture**, IIC:63.2011.621. 2011.

PEREIRA, P. H. C.; MORAES, R. L.; DOS SANTOS, M. V. B.; LIPPI, D. L.; EITOSA, J. L. L.; PEDROSA, M. The influence of multiple factors upon reef fish abundance and species richness in a tropical coral complex. **Ichthyological Research**, v. 61, p. 375-384, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10228-014-0409-8>.

PÉREZ-DOMÍNGUEZ, R.; HOLT, G. J. Interrenal and thyroid development in red drum (*Sciaenops ocellatus*): effects of nursery environment on larval growth and cortisol concentration during settlement. **Gen Comp Endocrinol**, v. 146, n. 2, p. 108–118, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.10.006>.

- PICHIRIKKAT, R. R.; ZHU, X. M.; LEI, W.; HAN, D.; YANG, Y. X.; XIE, S. Q. Rearing tank colour influences survival and growth of the early larvae of the Chinese Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* Richardson, **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 37, n. 2, p. 177-184, 2013. <https://doi.org/10.7541/2013.2>.
- POTTINGER, T. G.; CALDER, G. M. Physiological stress in fish during toxicological procedures: a potentially confounding factor. **Environ. Toxicol. Water Qual**, v.10, p. 135–146, 1995. <https://doi.org/10.1002/tox.2530100208>.
- POTTINGER, T. G.; MOSUWE, E. The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a “critical period”. **General and Comparative Endocrinology**, v, 95, n. 3, p. 350-362, 1994. <https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1133>.
- PUTRA, D. F.; ABOL-MUNAFI, A. B.; MUCHLISIN, Z. A.; CHEN, J. C. Preliminary study on the morphology and digestive tract development of tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*) under captive condition. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation**, v. 5, n. 1, p. 29-35.
- RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. Catecholamines. In W. S. Hoar and D. J. Randall (eds.), **Fish Physiology**, v.12B, p. 255-300, 1992.
- RAGHAVAN, P. R.; XIAO-MING, Z. H. U.; WU, L. E. I.; DONG, H. A. N.; YUN-XIA, Y. A. N. G.; SHOU-QI, X. I. E. Rearing tank color influences survival and growth of the early larvae of the yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, Richardson. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 37, n. 2, p. 176-184, 2013. <https://doi.org/10.7541/2013.2>.
- RAJA, K.; AANAND, P.; PADMAVATHY, S.; SAMPATHKUMAR, J. S. Present and future market trends of Indian ornamental fish sector. **International Journal of Fish and Aquatic Studies**, v. 7, n. 2, p. 06-15, 2019.
- RAMOS, F. M.; ARAÚJO, M. L. G.; PRANG, G.; FUJIMOTO, R. Y. Peixes ornamentais de importância econômica e biológica para o rio Xingu. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 75, n. 3, p. 95-98, 2015. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.02614BM>.
- RAMSAY, J. M.; FEIST, G.W.; VARGA, Z. M.; WESTERFIELD, M.; KENT, M. L.; SCHRECK, C. B. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 258, p. 565–574, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.020>.
- REHMAN, S.; GORA, A. H.; AHMAD, I.; RASOOL, S. I. Stress in aquaculture hatcheries: source, impact and mitigation. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.**, v. 6, p. 3030–3045, 2017. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.357>.
- REID, S. G.; BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 1-2, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00037-1).

REYES-LÓPEZ, F.E.; AERTS, J.; VALLEJOS-VIDAL, E.; AMPE, B.; DIERCKENS, K.; TORT, L.; BOSSIER, P. Modulation of innate immune-related genes and glucocorticoid synthesis in gnotobiotic full-sibling European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae challenged with *Vibrio anguillarum*. **Front. Immunol.** v. 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018>.

ROSENTHAL, G. G.; LOBEL, P.S. Communication. In: Sloman, K.A., Wilson, R.W., Balshine, S. (Eds.), **Behaviour and Physiology of Fish**. Elsevier Inc., San Diego, p. 39–79, 2006.

ROTLLANT, J.; TORT, L.; MONTERO, D.; PAVLIDIS, M.; MARTINEZ, M.; BONGA, S. W.; BALM, P. H. M. Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. **Aquaculture**, v. 223, n. 1-4, p. 129-139, 2003.

ROUX, N.; SALIS, P.; LAMBERT, A.; LOGEUX, V.; SOULAT, O.; ROMANS, P.; LAUDET, V. Staging and normal table of post-embryonic development of the clownfish (*Amphiprion ocellaris*). **Develop Dynam**, v. 248, n. 7, p. 545-568, 2019. <https://doi.org/10.1002/dvdy.46>.

SALIS, P.; ROUX, N.; SOULAT, O.; LECCHINI, D.; LAUDET, V.; FRÉDÉRICH, B. Ontogenetic and phylogenetic simplification during white stripe evolution in clownfishes. **BMC Biol**, v. 16, p 90, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0559-7>.

SANTISATHITKUL, N.; THONGPRAJUKAEW, K.; SAEKHOW, S.; SANDOS, P.; BUNTOMNIMIT, S.; KANGHAE, H. Optimal background colour for rearing Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Aquacult Res**, v. 51, n. 4, p. 743-1752, 2019. <https://doi.org/10.1111/are.14521>.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Preparative actions. **Endocr. Rev**, v. 21, p. 55–89, 2000. <https://doi.org/10.1210/er.21.1.55>.

SEBESTA, R.; STEJSKAL, V.; MATOUSEK, J.; LUNDOVA, K. The Effect of Light Intensity and Tank Wall Colour on Survival and Growth of Peled *Coregonus peled* Gmelin 1788 Larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n. 7, p. 541-549, 2018. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_7_01.

SELYE, H. The Evolution of the Stress Concept. **American Scientist**, v. 61, n. 6, p. 692-699, 1973.

SILBERGELD, E. K. Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 11, p. 20-25, 1974.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; DE FARIA, A. C. E. A. Influência da disponibilidade de presas, do contraste visual e do tamanho das larvas de *Pantala* sp (Odonata, Insecta) sobre a predação de *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Crustacea). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 357-362, 2001. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v23i0.2689>.

SOMAN, M.; CHADHA, N. K.; MADHU, K.; MADHU, R.; SAWANT, P. B.; FRANCIS, B. Optimization of temperature improves embryonic development and hatching efficiency of

false clown fish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830 under captive condition. **Aquaculture**, v. 536, p. 736417, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736417L>.

SULA, E.; ALIKO, V. Effects of stressors on hematological and immunological response in the freshwater crucian carp fish, *Carassius carassius*. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, p. 583-590, 2017.

SCHMIDT, C.; KUNZMANN, A. Post-harvest mortality in the marine aquarium trade: A case study from an Indonesian export facility. **Live Fish Newsletter for Reef**, v. 13, p. 3-12, 2015.

SHIN, H. S.; LEE, J.; CHOI, C. Y. Effects of LED light spectra on the growth of the yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii*. **Fish Sci**, v. 78, n. 3, p. 549–556, 2012. <http://doi:10.1007/s12562-012-0482-8>

SWEET, T. The state of the marine breeders' art, 2017. CORAL 13:31–37. Talbot, R. 2018. "New anti. Disponível em <https://www.reef2rainforest.com/2016/11/17/coral-magazines-captive-bred-marine-fish-species-list-for-2017/>. Acesso em 01/10/2022.

TECHSCI RESEARCH. Mercado de peixes ornamentais será avaliado em US\$ 11,3 bilhões até 2025. New York, 2021. Disponível em: <https://www.techsciresearch.com/news/5494-ornamental-fish-market-to-be-valued-usd-11-3-billion-by-2025.html>. Acesso em 05/11/2022.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1366-1375, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.

VICTOR, B. C.; WELLINGTON, G. M. Endemism and the pelagic larval duration of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 205, p. 241-248, 2000.

WANG, C. A.; XU, Q., L. I, J.; WANG, L.; ZHAO, Z.; DU, X.; YIN, J. Effects of tank colour on growth and survival of taimen *Hucho taimen* (Pallas, 1773) larvae. **Aquaculture international**, v. 25, n.1, p. 437-446, 2017. <https://doi10.1007/s10499-016-0041-x>.

WAGNER, T.; CONGLETON, J.L. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, p. 1066–1074, 2004. <https://doi.org/10.1139/f04-050>.

WARD, A. J.; HOLBROOK, R. I, KRAUSE, J.; HART, P. J. Social recognition in sticklebacks: the role of direct experience and habitat cues. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v, 57, n. 6, p. 575-583, 2005.

WEAR, S. L.; THURBER, R. V. Sewage pollution: mitigation is key. for coral reef stewardship. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1355, p. 15-30, 2015. <https://doi:10.1111/nyas.12785>.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; MCLEAY, D. J. Stress and acclimation. **Methods for fish biology**, p. 451–489. 1990.

- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.501>
- WILKERSON J. D. Clownfishes: A Guide to Their Captive Care, Breeding, and Natural History. **Neptune City, NJ: TFH Publications**, p. 240, 2001.
- WILSON, K.S.; MATRONE, G.; LIVINGSTONE, D. E.W.; MULLINS, J. J.; TUCKER, C. S.; HADOKE, P. W. F.; KENYON, C. J.; DENVIR, M. A. Physiological roles of glucocorticoids during early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). **J. Physiol**, v. 24, p. 6209–6220, 2014. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.256826>.
- XU, J.; LIU, Y.; CUI, S.; MIAO, X. Respostas comportamentais da tilápia (*Oreochromis niloticus*) a flutuações agudas nos níveis de oxigênio dissolvido monitoradas por visão computacional. **Aquaculture Engineering**, v. 35, n. 3, p. 207-217, 2006.
- YASIR, I.; QIN, J. G. Impact of background on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. **J World Aqua Soc**, v. 40, n. 6, p. 724-734, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00292.x>.
- YE, L.; YANG, S.Y.; WANG, Y.; WU, K. C. Effect of salinity on the survival activity and larviculture of anemonefish (*Amphiprion clarkii*), **J. Anhui. Agric. Sci**, v. 37, n. 1, p. 162–164, 2009.
- ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 165-174, 2011. Disponível em <http://www.sbz.org.br/revista/artigos/66271.pdf>. Acesso em 02/11/2020.
- ZHANG, J.; GUO, H.; MA, Z.; JIANG, S.; WU, K. L. I, Y.; QIN, J. G. Effects of prey color, wall color and watercolor on food ingestion of larval orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822). **Aquaculture International**, v. 23, n. 6, p. 1377-1386, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9890-y>.