



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

Sérgio Leandro Araújo Silva

**Aspectos comportamentais e reprodutivos, e descrição da desova, de ovos e de larvas do
Grappa brasiliensis Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro**

Florianópolis
2022

Sérgio Leandro Araújo Silva

**Aspectos comportamentais e reprodutivos, e descrição da desova, de ovos e de larvas do
Gramma brasiliensis Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro**

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: Dra. Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis
2022

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

Araújo Silva, Sérgio Leandro

Aspectos comportamentais e reprodutivos, e descrição da desova, de ovos e de larvas do *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro / Sérgio Leandro Araújo Silva ; orientador, Mônica Yumi Tsuzuki, 2022.
57 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Gramma brasiliensis*. 3. Criação em cativeiro. 4. Reprodução. 5. Peixes ornamentais marinhos. I. Tsuzuki, Mônica Yumi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Sérgio Leandro Araújo Silva

**Aspectos comportamentais e reprodutivos, e descrição da desova, de ovos e de larvas do
Gramma brasiliensis Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro**

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

Prof.(a) Dr.(a) Mônica Yumi Tsuzuki
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Evoy Zaniboni Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Miguel Mies
Universidade de São Paulo

Dr. Osmar José Luiz Junior
Charles Darwin University – Austrália

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.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^ª. Dra. Mônica Yumi Tsuzuki
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à memória do meu pai, Sérgio da Silva.

AGRADECIMENTOS

À minha família.

Agradeço a todos os colegas do LAPOM que de alguma forma contribuíram com o trabalho.

À minha orientadora, Professora Mônica Yumi Tsuzuki, pela confiança e orientação ao longo desses quatro anos.

Gostaria de agradecer a Vanessa Martins da Rocha, por todo apoio e ajuda que foram imprescindíveis ao trabalho.

A todos os professores e equipe do PPGAQI da UFSC.

Gostaria de agradecer a toda equipe do LAPMAR pela parceria.

Ao LMM pela contribuição com o fornecimento de microalgas, fundamental ao trabalho.

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

RESUMO

O grama brasileiro *Gramma brasiliensis* é uma espécie de peixe ornamental marinho endêmica da costa brasileira e importante para o mercado da aquariofilia. Atualmente sua captura, transporte e comercialização estão proibidas em todo o território brasileiro, exceto indivíduos oriundos de empreendimentos aquícolas. O desenvolvimento de um protocolo de reprodução da espécie em cativeiro constitui uma importante ferramenta de conservação, e é de interesse para o comércio. Existem poucas informações a respeito do seu comportamento e da sua reprodução em cativeiro, portanto este estudo tem como objetivos: 1- testar a formação de casais e haréns em diferentes aquários (70 e 110 L) e tanques (150 e 310 L); 2- testar a escolha de diferentes espécies de macroalgas (*Chaetomorpha linum*, *C. antennina*, *Jania* sp., *Hypnea* sp., *Plocamium brasiliense*) e materiais sintéticos (barbante branco de 1 mm, manta acrílica de polyester, linha de nylon de 0.3 mm de diferentes cores – verde, vermelho e amarelo) pelos peixes para a construção de ninhos em cativeiro; 3- descrever o comportamento de corte e comparar com a literatura disponível para *G. brasiliensis* e *G. loreto* em ambiente natural e, 4- fornecer dados sobre a desova da espécie e uma breve descrição dos ovos e larvas, incluindo informações sobre o tamanho da boca. Com base nos resultados, sugerimos que *G. brasiliensis* seja mantido em pares devido ao seu comportamento agressivo. Pares mantidos em aquários de 70 L demonstraram maior agressividade quando comparados aos pares mantidos em aquários de 110 L e tanques maiores. As macroalgas do gênero *Chaetomorpha* e todos os materiais sintéticos foram utilizados pelos peixes para a construção do ninho, indicando sua viabilidade. O comportamento de corte de *G. brasiliensis* em cativeiro foi descrito pela primeira vez e foi semelhante ao verificado para *G. loreto* no habitat natural - “U-Turn com corpo tremendo”. Os eventos de desova demonstraram massas de ovos de 27 a 950 ovos, com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, indicativo de desovas parceladas. Os ovos eram esféricos com um diâmetro médio de 1,0 mm e mantidos juntos por filamentos emaranhados nas projeções coriônicas. As larvas eclodiram com $3,55 \pm 0,09$ (média±DP) mm de comprimento padrão, olhos bem desenvolvidos, saco vitelino totalmente absorvido, bexiga natatória inflada e boca aberta. A alimentação exógena com rotíferos começou antes de 12 hpe (horas pós-eclosão). A primeira larva com flexão da notocorda foi verificada no dia 7 e a primeira larva assentada no dia 21. O primeiro indivíduo demonstrou metamorfose completa no dia 27. O presente estudo apresentou pela primeira vez informações sobre desova, ovos e larvas de *G. brasiliensis*, além de informações sobre aspectos comportamentais e reprodutivos da espécie, que contribuirão para avanços na sua aquicultura.

Palavras-chave: Grammatidae; Criação em cativeiro; Reprodução; Aquicultura; Peixes ornamentais marinhos.

ABSTRACT

The Brazilian Gramma *Gramma brasiliensis* is a species of marine ornamental fish endemic to the Brazilian coast and important for the aquarium market. Currently, its capture, transport and commercialization are prohibited throughout the Brazilian territory, except from aquaculture projects. The development of a protocol for the reproduction of the species in captivity is an important conservation tool and is of interest to the aquarium trade. There are few information about its behaviour and reproduction in captivity, so this study aims to: 1- test the formation of pairs and harems in different aquariums (70 and 110 L) and tanks (150 and 310 L); 2- test the choice of different species of macroalgae (*Chaetomorpha linum*, *C. antennina*, *Jania* sp., *Hypnea* sp., *Plocamium brasiliense*) and synthetic materials (1 mm white string, acrylic polyester filter floss, different colours of 0,3 mm nylon thread - green, red and yellow) by fish for nest building in captivity; 3- describe the courtship behaviour and compare with available literature for *G. brasiliensis* and *G. loreto* in natural environment and, 4- provide data on the spawning of the species and a brief description of the eggs and larvae, including mouth size information. Based on the results, we suggest that *G. brasiliensis* should be kept in pairs due to its aggressive behaviour. Pairs kept in 70-L aquariums demonstrated greater aggressiveness when compared to pairs kept in 110-L aquariums and larger tanks. The macroalgae of the genus *Chaetomorpha* and all synthetic materials were utilized by the fish to build nest, indicating its viability. The courtship behaviour of *G. brasiliensis* in captivity was described for the first time and it was similar to one verified for *G. loreto* in the natural habitat - “U-turn with body quivering”. The spawning events demonstrated egg masses from 27 to 950 eggs, with different developmental stages on the larger egg masses. Eggs were spherical with an average diameter of 1.0 mm and held together by filaments entangling chorionic projections. Larvae hatched with $3,55 \pm 0,09$ mm SL (standard length), well developed eyes, fully absorbed yolk-sac, an inflated swim bladder and open mouth. Exogenous feeding on rotifers began within 12-hph (hours post-hatch). First larva showing flexion of the notochord was verified on day 7 and first settled larvae verified by day 21. First individual showed total metamorphosis by day 27. This study presented for the first time information on spawning, eggs and larvae of *G. brasiliensis*, in addition to information on behavioural and reproductive aspects of the species, which will contribute to advances in the species' aquaculture.

Keywords: Grammatidae; Captive-breeding; Reproduction; Aquaculture; Marine-ornamental-fish.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Gramma brasiliensis*15
- Figura 2. Casal de *G. brasiliensis* mantido no LAPOM, com destaque para a fêmea sexualmente madura com abdome abaulado15
- Figure 3. Photographs of aquariums and tanks used in pair and harem formation experiments. (A) 70 L aquarium utilized in pair formation experiment / (B) 110 L aquarium utilized in pair formation experiment / (C) 150 L tank utilized in harem formation experiment / (D) 310 L tank utilized in harem formation experiment.....24
- Figure 4. Choice of macroalgae and synthetic materials by all five *G. brasiliensis* males. (A) Number of “Catch-spit” behaviour among five different macroalgae / (B) Number of “Catch-spit” behaviour among five different synthetic materials / (C) Number of “Catch-nest” behaviour among five different macroalgae / (D) Number of “Catch-nest” behaviour among five different synthetic materials.....29
- Figure 5. “U-turn with body quivering” courtship display32
- Figure 6. Females` responses to males` courtship displays34
- Figura 7. Exemplos de medidas da abertura da boca (GH), largura da boca (MW), largura do corpo (BW) e profundidade do corpo (BD)43
- Figura 8. (A) Ovos de *G. brasiliensis* com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento. (B) Projeções coriônicas enredando ovos de *G. brasiliensis* com embriões bem desenvolvidos, mostrando olhos pigmentados e saco vitelino.....44
- Figura 9. Desenvolvimento larval de *Gramma brasiliensis* em cativeiro. Vários indivíduos são mostrados. (A) Larva de pré-flexão com menos de 12 hph com olhos bem desenvolvidos, sem saco vitelino, bexiga natatória inflada e intestino cheio de rotíferos; (B) Larva de pré-flexão em 2-dae; (C) Larva de pré-flexão em 3-dae; (D) Larva de pré-flexão em 4-dae; (E) Larva de pré-flexão em 5-dae; (F) Larva de pré-

flexão em 6-dae; (G) Larva de pré-flexão em 7-dae; (H) Larva com 8-dae com flexão inicial da notocorda e formação inicial dos raios da nadadeira caudal; (I) Larva pós-flexão em 11-dae com nadadeira caudal formada e formação de nadadeira anal e dorsal; (J) Larva pós-flexão em 16-dae com aumento da pigmentação avermelhada na cabeça; (K) Larva pós-flexão assentada com 21-dae com nadadeira anal e dorsal45

Figura 10. Regressão linear entre SL e MW (mm). $R = 0,984$ ($y = 0,1266x - 0,0681$), $p < 0,05$, $n = 11$, considerando de 1 a 21-dae (cada ponto de dados representa um valor médio de 5 larvas)46

LISTA DE TABELAS

Table 1. Study's experiments timeline	22
Table 2. Number of macroalgae "Catch-spit" and "Catch-nest" behaviours of five different males. The second column indicates the number of times the materials were offered to the fish	29
Table 3. Number of synthetic materials "Catch-spit" and "Catch-nest" behaviours of five different males. The second column indicates the number of times the materials were offered to the fish	30
Table 4. Number of single U-turns with body quivering (U-turn BQ), number of U-turns BQ sequences (minimum two movements) and total U-turn BQ performed by different males, registered in a total of 54 h of video recordings	33
Table 5. Comparison between time pairs spent inside the nest and males' time alone in the nest among <i>Gramma brasiliensis</i> and <i>Gramma loreto</i>	35
Table 6. Medidas (em mm) de larvas de <i>G. brasiliensis</i> criadas. Os dados são apresentados como valores médios e desvio padrão. Abreviações: SL - Comprimento padrão, Min GH - Abertura mínima da boca (abertura a 45°), Max GH - Abertura máxima da boca (abertura a 90°), MW - Largura da boca, BW - Largura do corpo e BD - profundidade corporal (medidas na nadadeira peitoral).....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 <i>Gramma brasiliensis</i>	14
1.2 JUSTIFICATIVA	17
1.3 OBJETIVOS	18
1.3.1 Objetivo geral	18
1.3.2 Objetivos específicos	18
1.4 ESTRUTURA DA TESE	18
2 Pair and harem formation, nest-building and courtship behaviour of the marine ornamental fish <i>Gramma brasiliensis</i> Sazima, Gasparini & Moura, 1998 in captivity	19
2.1 ABSTRACT	19
2.2 RESUMO	20
2.3 INTRODUCTION	21
2.4 MATERIALS AND METHODS	22
2.4.1 Animals and maintenance conditions	22
2.4.2 Experiments timeline	23
2.4.3 Pair and harem formation experiment	23
2.4.4 Nest-building materials experiment	25
2.4.5 Courtship behaviour experiment	26
2.5 RESULTS AND DISCUSSION	26
2.5.1 Pair and harem formation	26
2.5.2 Nest-building materials	28
2.5.3 Courtship behaviour experiment	32
2.6 CONCLUSIONS	36
2.7 CONFLICTS OF INTEREST	36
2.8 ACKNOWLEDGEMENTS	36
2.9 REFERENCES	36
3 Descrição da desova, ovos e larvas do <i>Gramma brasiliensis</i> Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro	39
3.1 RESUMO	39
3.2 ABSTRACT	40
3.3 INTRODUÇÃO	40
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.6 REFERÊNCIAS	47
4 CONCLUSÕES GERAIS	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	52
7 APÊNDICE	55

INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes ornamentais estão entre os mais populares animais de estimação do mundo e a indústria do aquarismo representa um importante setor do mercado nacional e internacional de peixes. O Brasil exporta cerca de 6,5 milhões de dólares em peixes ornamentais, sendo a grande maioria representada por espécies de águas continentais (EMBRAPA, 2018). As espécies marinhas, embora constituam uma parcela menor do volume comercializado, representam um grande incremento de receita, pois o valor unitário dos espécimes é geralmente maior (ALBUQUERQUE-FILHO, 2003; SAMPAIO; ROSA, 2003).

Ao contrário dos peixes ornamentais de água doce, onde a grande maioria dos exemplares comercializados é produzida em cativeiro, no mercado de peixes ornamentais marinhos, a maioria das espécies é capturada no ambiente natural (WOOD, 2001; MONTEIRO-NETO et al., 2003; WABNITZ et al., 2003; PALMTAG, 2017). Além disso, existem métodos de coleta invasivos (como cianetos e explosivos) e ocorrem mortalidades de até 80% dos animais durante o processo de captura, manejo e transporte, além do acometimento por doenças ocorridas ao longo do processo (WABNITZ et al., 2003).

A realidade extrativista e altamente seletiva desta atividade, e o grande número de animais capturados, juntamente com a inexistência de um controle efetivo pelas autoridades sobre a captura e o comércio de peixes ornamentais marinhos, levam a um alto risco de sobrexploração dos recursos naturais, demonstrando a insustentabilidade desta atividade (WOOD, 2001; MONTEIRO-NETO et al., 2003; GASPARINI et al., 2005).

O desenvolvimento de protocolos confiáveis e sustentáveis para a criação de peixes recifais na aquicultura é essencial para auxiliar na redução da pressão de pesca sobre as populações selvagens e serve como opção alternativa de renda para produtores. A indústria de aquarofilia poderia receber um suprimento estável de peixes ornamentais com grande demanda oriundos da produção aquícola, o que minimizaria os impactos da variação sazonal ou restrição na captura de peixes selvagens (EVERS; PINNEGAR; TAYLOR, 2019). Isso tem se mostrado viável no comércio de peixes ornamentais de água doce, pois algumas espécies ameaçadas ou protegidas foram criadas com sucesso em cativeiro e vendidas legalmente para atender à demanda (EVERS; PINNEGAR; TAYLOR, 2019).

Complementarmente, a piscicultura ornamental marinha produz espécimes mais resistentes, com melhor adaptação ao cativeiro e às dietas artificiais (WITTENRICH, 2007) e contribui para o estudo minucioso da biologia das espécies (DHERT et al., 1997; TLUSTY, 2002). Os aquaristas também podem preferir peixes criados em cativeiro em vez de peixes

selvagens por terem maior expectativa de vida e menor mortalidade em aquários (OLIVIER, 2003; PALMTAG, 2017). Além disso, os híbridos de peixes ornamentais marinhos de alto valor ou aqueles com fenótipos únicos geralmente estão disponíveis apenas por meio de reprodução seletiva em cativeiro (BAENSCH; TAMARU, 2009; PALMTAG, 2017).

Entretanto, algumas espécies possuem requisitos específicos, demandam tempo e/ou altos custos de produção, que são inconsistentes com os objetivos de lucratividade de empresas privadas. Segundo Olivotto et al. (2011), alguns fatores são críticos e podem dificultar o processo de reprodução de peixes ornamentais em cativeiro, como a indução à desova, a determinação do sexo, o desenvolvimento do embrião (que se relaciona à nutrição, manejo e genética dos reprodutores), a eclosão e a transição da alimentação endógena para a exógena. Ainda podemos citar a adaptação e a maturação gonadal de indivíduos selvagens em cativeiro, especialmente para espécies que apresentam comportamento territorialista e agressivo. Nesse contexto, o desenvolvimento de pacotes tecnológicos para criação de certas espécies se faz necessário (OLIVOTTO et al., 2017) e a pesquisa acadêmica pode levar a avanços significativos (POUIL et. al., 2020).

1.1 *Gramma brasiliensis*

Dentre as espécies brasileiras com interesse para o mercado de peixes ornamentais e com poucos estudos relativos a seu comportamento e produção em cativeiro, podemos citar o gramma brasileiro *Gramma brasiliensis*, espécie derivada da caribenha *Gramma loreto* Poey 1868, a partir de uma especiação alopátrica (MOLINA et al., 2012). O *G. brasiliensis* é a única espécie da família Grammatidae que ocorre no Brasil, sendo endêmica da costa brasileira. Distribui-se do Maranhão (incluindo o Parcel de Manoel Luís) ao Rio de Janeiro e também é encontrado no arquipélago de Fernando de Noronha (LEITE, 2013; SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998).

Tem como característica um colorido vibrante, com corpo nitidamente bicolor – violeta na metade anterior do corpo e amarelo na metade posterior (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998) (Figura 1). É considerado um animal planctívoro e invertívoro bentônico (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998; FLOETER et al., 2007; LEITE, 2013) e alguns indivíduos pequenos já foram observados realizando o trabalho de “limpeza” em espécies de peixes maiores (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998; LEITE, 2013).



Figura 1: *Gramma brasiliensis*. Foto: Gasparini, J.L.

Dada as suas características de formato e coloração, que as tornam uma espécie com potencial para ornamentação (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998), seus estoques pesqueiros foram afetados pela sobrexploração sofrida para abastecimento do mercado ornamental e pela degradação ambiental, fazendo com que fosse incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 2004). Atualmente sua captura, transporte e comercialização estão proibidas em todo o território brasileiro, exceto indivíduos oriundos de empreendimentos aquícolas devidamente cadastrados na atividade pesqueira e com licença válida na categoria aquicultura (BRASIL, 2021).

Alcançar a maturidade sexual e obter desovas em cativeiro é fundamental para qualquer tentativa de criação de peixes ornamentais marinhos, mas a plasticidade das características na sexualidade e diferenciação sexual de peixes recifais muitas vezes tornam difícil a formação de casais ou haréns de reprodutores (CHEN et al., 2019). Em alguns casos, o gênero pode se tornar distinguível após o vínculo ser formado entre um par de reprodutores, com diferenças morfológicas (demonstração de abdome abaulado no caso de fêmeas maduras – Figura 2) ou comportamentais (proteção e limpeza dos locais de desovas ou ninhos) (CHEN et al., 2019).



Figura 2. Casal de *G. brasiliensis* mantido no LAPOM, com destaque para a fêmea sexualmente madura com abdome abaulado. Foto: Fiuza, T.

No caso do *G. brasiliensis*, espécie hermafrodita protogínica diândrica (LEITE et al., 2018) que não exhibe dimorfismo sexual, estas diferenciações podem ser observadas após o

estabelecimento do casal ou harém. Machos ativos (com gônadas maduras) tendem a serem maiores que as fêmeas ativas em grupos sociais (LEITE, 2013; LEITE et al., 2016; LEITE et al., 2018). No entanto, a obtenção de indivíduos em fases anteriores da maturação sexual pode tornar a identificação do sexo muito difícil.

Além disso, a família Grammatidae apresenta agressividade intra e interespecífica em ambiente natural (FREEMAN; ALEVIZON, 1983; KINDINGER, 2016) e apenas um trabalho avaliou a formação de casais ou haréns de *G. brasiliensis* em cativeiro (LEITE, 2013), com relatos de intensa agressividade intraespecífica, resultando em mortalidades. Dessa forma, a investigação de estruturas (aquários ou tanques) adequadas para a manutenção dessa espécie em cativeiro, seja em casais ou haréns, se faz necessário.

Outra característica que permite a distinção dos sexos nesta espécie é o comportamento de nidificação, que é realizado exclusivamente por machos, também comum à espécie *G. loreto*. O macho dominante constrói ninhos em fendas ou depressões dos recifes utilizando macroalgas, onde a fêmea, que apresenta desova parcelada, libera massas de ovos demersais (LEITE et al., 2018; ASOH; YOSHIKAWA, 1996). Os ovos são mantidos unidos por filamentos coriônicos, imediatamente fertilizados pelo macho (ASOH; YOSHIKAWA, 1996). A coleta de macroalgas ocorre na coluna d'água e tem como objetivo proteger tocas e construir ninhos para acomodar os ovos (LEITE et al., 2018; ASOH; YOSHIKAWA, 1996). Não há estudos, entretanto, que avaliem a aceitação ou preferência de diferentes macroalgas ou materiais sintéticos por esses peixes em cativeiro. Determinar se o *G. brasiliensis* aceita materiais sintéticos, de baixo custo e acessíveis, e quais macroalgas poderiam ser fornecidas, são informações relevantes a produtores que pretendem trabalhar com sua produção.

Alguns estudos relataram aspectos reprodutivos de *G. loreto* e *G. brasiliensis* (ASOH, 1996; ASOH; SHAPIRO, 1997; GUTIÉRREZ; BÁEZ-HIDALGO, 2002; LEITE et al., 2016). Agregações de *G. loreto* de doze ou mais indivíduos ocorrem em associação com grandes corais, cavernas e saliências, e desovam em grupos sociais que consistem em 1-2 machos e 3-9 fêmeas (ASOH; SHAPIRO, 1997). Os machos dominantes desovam com várias fêmeas e os ninhos contêm simultaneamente ovos de fêmeas diferentes (ASOH, 1996; ASOH; YOSHIKAWA, 1996). Por outro lado, *G. brasiliensis* foi encontrado principalmente em pares, com proporção sexual de 1,03 fêmea para 1 macho (LEITE, 2013) ou em pequenos haréns em pequenas cavernas e sob saliências, a maioria nadando de cabeça para baixo, com relatos de até 4 indivíduos (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998) e até 6 indivíduos (LEITE, 2013).

Uma descrição detalhada do comportamento de corte de *G. loreto* no ambiente natural pode ser encontrado em Asoh (1996). No entanto, informações sobre o comportamento reprodutivo de *G. brasiliensis* são encontradas em apenas um estudo (LEITE, 2013), com destaque ao observado em ambiente natural e dados limitados em cativeiro, principalmente sobre o comportamento de corte da espécie.

Além da carência de estudos relacionados à manutenção e reprodução de peixes adultos em cativeiro, não há trabalhos publicados até o momento com informações sobre desova e descrição do embrião e larva do *G. brasiliensis*. A compreensão do desenvolvimento de larvas e da biologia alimentar de peixes marinhos é essencial para selecionar um protocolo alimentar e um ambiente de criação adequado para melhorar o desempenho de larvas no período inicial da criação (HU et al., 2018). O início da alimentação exógena é um momento crucial no desenvolvimento de larvas de peixes e tem sido associado a mortalidades massivas tanto na natureza quanto em populações de laboratório (YÚFERA; DARIAS, 2007). Informações como tamanho de boca, por exemplo, são importantes, já que a boca pode limitar fisicamente as partículas de comida que um peixe pode ingerir (HU et al., 2018). Estas informações são fundamentais para promover avanços no desenvolvimento de um protocolo de criação.

Diante disso, o presente trabalho pretende ampliar os conhecimentos acerca do comportamento, reprodução e do desenvolvimento inicial de larvas do *G. brasiliensis* em cativeiro, com a finalidade de desenvolver tecnologia para a produção dessa espécie para posterior transferência ao setor produtivo.

1.2 JUSTIFICATIVA

Publicações de trabalhos científicos sobre comportamento, reprodução e desenvolvimento inicial de larvas do *Gramma brasiliensis* em cativeiro são escassos.

Trata-se de uma espécie endêmica e sua captura, transporte e comercialização são proibidos em todo o território brasileiro, exceto indivíduos oriundos de empreendimentos aquícolas devidamente cadastrados na atividade pesqueira e com licença válida na categoria aquicultura, segundo portaria SAP/MAPA Nº 387, de 9 de Setembro de 2021 (BRASIL, 2021). Dessa forma, o desenvolvimento de um protocolo de criação para a espécie é de grande interesse para a indústria da aquariofilia, e poderá também contribuir no âmbito socioambiental, de modo a reduzir seu extrativismo, além de constituir uma alternativa de renda para produtores.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Contribuir com o desenvolvimento da criação em cativeiro do *Gramma brasiliensis*.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a influência de diferentes tamanhos de aquários e tanques na formação de casais e haréns de *G. brasiliensis*;
- b) Determinar as preferências de macroalgas e substratos sintéticos para a confecção de ninhos por parte dos machos de *G. brasiliensis*;
- c) Descrever o comportamento reprodutivo de corte dos casais de *G. brasiliensis* em cativeiro;
- d) Descrever a desova, ovos e desenvolvimento inicial das larvas do *G. brasiliensis*.

1.4 ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho é dividido em dois capítulos:

Capítulo 1: Artigo intitulado “Pair and harem formation, nest-building and courtship behaviour of the marine ornamental fish *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 in captivity”, publicado na revista *Marine and Freshwater Research* (<https://doi.org/10.1071/MF20302>).

Capítulo 2: Artigo intitulado “Descrição da desova, ovos e larva do *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro”, a ser submetido como “short communication” para publicação na revista *Aquaculture Research*.

2 Pair and harem formation, nest-building and courtship behaviour of the marine ornamental fish *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 in captivity

Formação de casais e haréns, construção de ninhos e comportamento de corte do peixe ornamental marinho *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro

**Sérgio Leandro Araujo-Silva^{A,D}, Raoani Cruz Mendonça^B, Douglas da Cruz Mattos^C,
Rafael de Oliveira Jaime Sales^A, Mônica Yumi Tsuzuki^A**

^A Laboratory of Marine Fishes and Ornaments (LAPOM), Aquaculture Department, Agricultural Sciences Center (CCA), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis - SC, CEP 88034-001, Brazil.

^B Federal Institute of Pará (IFPA), Rua Antônio Fulgêncio da Silva, s/n, Bairro Parque Universitário, Breves - PA, CEP 68800-000, Brazil.

^C Federal Institute of Espírito Santo (IFES), Rua Augusto Costa de Oliveira, 660, Piúma - ES, CEP 29285-000, Brazil.

^D Corresponding author. Email: sergiol.bio@gmail.com

2.1 ABSTRACT

The Brazilian basslet *Gramma brasiliensis* is an ornamental fish species of significance to the fish market and the development of a breeding protocol is of interest to the aquarium trade. There are few information regarding its behaviour in captivity, thus this study aims to: 1- test pair and harem formation in different aquariums (70 and 110 L) and tank sizes (150 and 310 L); 2- test choice of different macroalgae species and synthetic materials by the fish for nest building in captivity and 3- describe the courtship behaviour and compare with available literature for *G. brasiliensis* and *G. loreto* in natural environment. Based on the results, we suggest that *G. brasiliensis* should be kept in pairs due to its aggressive behaviour. The macroalgae of the genus *Chaetomorpha* and all synthetic materials were utilized by the fish to build nest, indicating its viability. The courtship behaviour of *G. brasiliensis* in captivity was described for the first time and it was similar to one verified for *G. loreto* in the natural habitat - “U-turn with body quivering”.

Key words: Grammatidae; Captive breeding; Reproduction; Aquaculture.

2.2 RESUMO

O gramma brasileiro *Gramma brasiliensis* é uma espécie de peixe ornamental importante para o mercado de peixes e o desenvolvimento de um protocolo de reprodução é de interesse para o comércio de aquários. Existem poucas informações a respeito do seu comportamento em cativeiro, portanto este estudo tem como objetivos: 1- testar a formação de casais e haréns em diferentes aquários (70 e 110 L) e tamanhos de tanques (150 e 310 L); 2- testar a escolha de diferentes espécies de macroalgas e materiais sintéticos pelos peixes para a construção de ninhos em cativeiro e 3- descrever o comportamento de corte e comparar com a literatura disponível para *G. brasiliensis* e *Gramma loreto* em ambiente natural. Com base nos resultados, sugerimos que *G. brasiliensis* deve ser mantido em casais devido ao seu comportamento agressivo. As macroalgas do gênero *Chaetomorpha* e todos os materiais sintéticos foram utilizados pelos peixes para a construção do ninho, indicando sua viabilidade. O comportamento de corte de *G. brasiliensis* em cativeiro foi descrito pela primeira vez e foi semelhante ao verificado para *G. loreto* no habitat natural - “U-Turn com corpo tremendo”.

Palavras-chave: Grammatidae; Criação em cativeiro; Reprodução; Aquicultura.

2.3 INTRODUCTION

The basslet *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini and Moura, 1998, is a Brazilian marine fish species of interest to the ornamental trade. The species holds high commercial value in aquarium trade due to its shape and vibrant bicolour colouration - violet in the anterior half of the body and yellow in the posterior half (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998). This species derives from the Caribbean *Gramma loreto* Poey, 1868, by allopatric speciation (MOLINA et al., 2012) and is the only representative of the Grammatidae family occurring in Brazil, being endemic to the Brazilian coast (SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998). It is distributed from the state of Maranhão (including Parcel de Manoel Luís) to Rio de Janeiro and is also found in the archipelagos of Fernando de Noronha (LEITE, 2013; SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998) and Abrolhos (FERREIRA; MAIDA, 2006).

Due to environmental degradation and mostly overharvesting for the ornamental industry, natural stocks have been affected resulting in its inclusion in the Brazilian's endangered species list (IBAMA, 2004). Considering that, a breeding protocol for the species is of extreme interest to the aquarium trade. Apart from reducing pressure on natural stocks, it can be an alternative income for producers. In this sense, it is important to understand the reproductive and behavioural aspects of this fish in captivity.

The Grammatidae family can show intraspecific and interspecific aggressiveness in the natural environment (FREEMAN; ALEVIZON, 1983; KINDINGER, 2016). *Gramma brasiliensis*, in turn, demonstrate intense intraspecific aggressiveness in captivity (LEITE, 2013), fact to be considered when trying a pair or harem formation in tanks or aquariums.

According to Leite (2013) and Leite et al. (2016), the Brazilian basslet present diandric protogynous hermaphroditism and do not exhibit sexual dimorphism, but active males (with mature gonads) tend to be larger than active females in social groups. The same studies observed that in the wild, they breed in pairs or small harems, with one dominant male, other male(s) and females.

The nesting behaviour using macroalgae by *G. loreto* and *G. brasiliensis* in natural environment has been reported, with male participation only. The dominant male builds nests using macroalgae in holes and depressions of the reefs, where the female releases a mass of demersal eggs (LEITE et al., 2018; ASOH; YOSHIKAWA, 1996) held together by chorionic filaments, being immediately fertilized by the male (ASOH; YOSHIKAWA, 1996). Macroalgae collection takes place in the water column and is intended to protect burrows and build nests to accommodate eggs (LEITE et al., 2018; ASOH; YOSHIKAWA, 1996). These

studies, however, did not evaluate the acceptability and/or preference of different macroalgae or synthetic materials by fish under captive conditions.

Some studies have reported the reproductive aspects of *G. loreto* and *G. brasiliensis* (ASOH, 1996; ASOH; SHAPIRO, 1997; GUTIÉRREZ; BÁEZ-HIDALGO, 2002; LEITE et al., 2016), and a detailed description of the courtship behaviour of *G. loreto* in the natural environment can be found in Asoh (1996). Information on the reproductive behaviour of *G. brasiliensis* is found in only one study (LEITE, 2013), with limited information about the courtship behaviour, especially in captive condition. Here, we compared the reproductive behaviours described by these authors with what was verified in aquariums with pairs of *G. brasiliensis*.

Thus, in order to promote advances in the development of breeding protocols for this species, this study: 1- tested pair and harem formation in different aquariums and tanks sizes; 2- quantified the selection of different materials (natural and synthetic) for nest building under captive conditions and 3- described the courtship behaviour in captivity conditions and compared with available literature for *G. brasiliensis* and *G. loreto* in the natural environment.

2.4 MATERIAL AND METHODS

2.4.1 Animals and maintenance conditions

Wild *Gramma brasiliensis* (3-5 cm total length; n = 16) were obtained on December 2017 from the coast of Bahia state (12°57'26.0"S 38°31'46.5"W, Authorization SISBIO/ICMBio n° 22051-4) and sent to the Laboratory of Marine Fish and Ornamentals (LAPOM), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil. All experiments were carried out with authorization of the Ethics and Animal Use Committee CEUA-UFSC n° 3189250520.

The reduced number of individuals utilized in this study is related to the space availability in the laboratory and due to the difficulty of working with this species (i.e. its aggressive behaviour, which prohibits the use of many individuals in harems).

Fish were kept in three water recirculation systems (RAS) with temperature between 26 and 29 °C, salinity 30 to 32, photoperiod of 14 light/10 dark, pH 8.2, NO₂⁻ and NH₃ <0.025 ppm. Each system had a SUMP composed of a biological substrate, a mechanical filter, and a protein skimmer.

During the experiments, including the period between them, broodstock feeding was performed twice daily (8:30 am and 4 pm) until apparent satiety. In the mornings a home-made paste composed of fresh marine shrimp (40%), fish (salmon 15% and sardines 15%), squid (10%), bivalve molluscs (mussel 10%, oyster 5% and scallop 5%), with vitamin premix (1g kg^{-1}), all blended up in a blender, was provided. The afternoon feeding was comprised by a varied diet that included commercial marine ornamental fish feed (38% crude protein and 7% crude fat, Tropical[®] - Poland), metanauplii and adult *Artemia* sp. (enriched with the microalgae *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis galbana*) and frozen marine shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*) obtained from local producers.

2.4.2 Experiments timeline

Three experiments were carried out from December 2017 to October 2019. The same animals were used in all three experiments. Table 1 summarizes the timeline of this study.

Table 1: Study's experiments timeline.

Experiment		Start	End
Exp. 1	(Pair formation)	Dec 2017	Jan 2018
	(Harem formation)	Feb 2018	Mar 2018
Exp. 2	(Nesting materials)	Jun 2018	Jul 2018
Exp. 3	(Courtship behaviour)	Nov 2018	Oct 2019

2.4.3 Pair and harem formation experiment

Sixteen fish were accommodated in 8 aquariums for pair formation attempt.

For pair formation, the following systems were tested (all aquariums had all dark sides, except the front one, gravel in the bottom, two bricks and two PVC pipes with 15 cm length and 5 cm diameter):

Four 70 L glass aquariums (40 cm length x 35 cm width x 50 cm height);

Four 110 L glass aquariums (60 x 40 x 45 cm).

Fish were released simultaneously (one larger and one smaller) in the aquariums for observation. Larger individuals were considered possible males and smaller possible females (LEITE et al., 2016). When intense disputes, bite marks on the body or lack of feeding were verified, the largest individuals were separated and kept in circular 2-L net cages placed within the same aquarium (for physical but not visual isolation of individuals) for a three weeks period, and then released again. If intense fighting continued, fish were separated and

isolated for one more attempt with other partners. Observations were made each 2 hours (six times a day – light period only) during a 10 minutes period to verify possible disputes and determine possible pair's formations.

A pair was considered formed when no constant chasing and no bite marks on the body were verified and when both fish were accepting food well and simultaneously. To confirm the two individuals' sexes, we considered male when fish collected the materials to build nests (LEITE et al., 2018) and female when fish displayed rounded abdomen.

After the pair formation experiment was concluded, 9 fish were transferred to 3 larger tanks. The same experimental criteria were followed here.

For harem formation (three individuals: one larger, possible male, and two smaller ones, possible females, per tank), the following systems were tested (all with gravel in the bottom, three bricks and three PVC pipes with 15 cm length and 5 cm diameter):

One 150 L rectangular tank (80 cm length x 50 cm width x 40 cm height);

Two 310 L circular tanks (100 cm top diameter x 75 cm bottom diameter x 50 cm height).

The different aquariums and tanks utilized in these experiments are shown in Fig. 3.

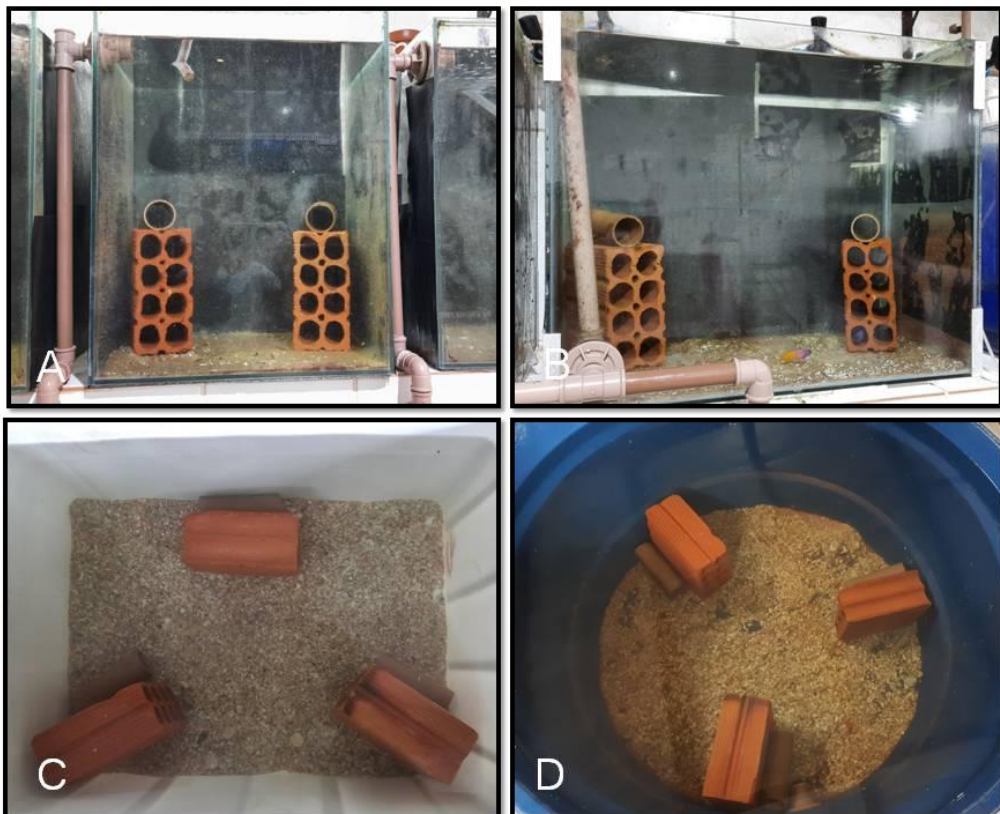


Fig. 3. Photographs of aquariums and tanks used in pair and harem formation experiments. (A) 70 L aquarium utilized in pair formation experiment / (B) 110 L aquarium utilized in pair formation experiment / (C) 150 L tank utilized in harem formation experiment / (D) 310 L tank utilized in harem formation experiment.

After the conclusion of harem formation experiment in the 150 and 310 L tanks, we also tried a three-fish harem formation in a 6,000 L tank (400 cm length x 150 cm width x 100 cm height, with one brick and two sets of four PVC pipes) by adding a female to a formed pair already settled in the tank.

2.4.4 Nest-building materials experiment

This experiment aimed to verify the acceptability and choices of different materials, macroalgae or synthetic materials, by *G. brasiliensis* for nest-building under captive conditions. Five formed pairs were used; three were kept in 110 L aquariums and two in 310 L tanks (same as described in pair and harem formation experiment).

Five species of macroalgae (*Chaetomorpha linum*; *C. antennina*; *Jania* sp.; *Hypnea* sp.; *Plocamium brasiliense*) collected from Barra da Lagoa beach, Florianópolis (except *C. linum*) and five types of synthetic materials (1 mm cotton white string; white polyester filter floss; 0.3 mm fishing nylon lines of different colours - green, red and yellow) were tested. These macroalgae were chosen due to their local availability, except for *C. linum* (commonly used in the marine aquarium hobby), and were kept in a white tray with aeration and a white light bulb. The synthetic materials were selected by their low price and easy acquisition in the local market. The macroalgae branches and pieces of synthetic materials measured approximately 4 cm. Nylon pieces were knife scraped to look curved or curled mimicking macroalgae filaments.

The release of the five macroalgae or five synthetic materials in the fish tanks was performed twice a day (morning and afternoon). Before releasing the materials, the observers remained at a distance of 1.5 m from the aquarium or tank and waited 5 min for the fish to get used to their presence. All five materials were released simultaneously (see Supplementary Material for videos) and, if the individual (male) showed no interest in any of them (i.e. did not moved towards the materials), the experiment was postponed to the next period or day. If the individuals showed some interest (i.e. approach the materials), two more releases were conducted, with a 5 min-interval period, so the observations could be made. When the five algae were released in the morning period, the five synthetic materials were released in the afternoon period, and vice-versa. A couple of hours after the release of the materials, tanks were siphoned to remove the non-utilized materials. The experiment lasted 30 days, totalling 114 releases of macroalgae and 120 releases of synthetic materials.

The two behavioural patterns quantified (in terms of frequency) were adapted from Asoh and Yoshikawa (1996) and Leite (2013):

"Catch-spit": when the individual picks up the material with the mouth and spits it;

"Catch-nest": when the individual picks up the material and takes it to the nest.

2.4.5 Courtship behaviour experiment

For this experiment, three 110 L aquariums holding formed pairs of *G. brasiliensis* were utilized, since there were the only ones to show any courtship behaviour. All aquariums had the same substrate (gravel, two bricks and two PVC pipes). Video recordings (20 to 78 minutes) were made in the morning period (9 to 11 a.m. – 2 hours after the beginning of the light period, set to 7 a.m.) on days when fish showed some courtship behaviour, totalling 54 hours of recordings. The room in which the aquariums were located was isolated, so there was no visual interference in the courtship response due to the passage of staff.

The videos were analysed for the description and quantification of fish behaviour mainly based on Asoh (1996) and Leite (2013). The total number of courtship displays, the number of courtship displays in repetition sequences (i.e. when the individual displays a movement immediately after another), the number of movements per sequence, male's residence time inside the nest, pair's residence time inside the nest, number of male's nest entering and number of pair's nest entering were observed. In addition, responses by the females were also quantified for each male courtship approach, according to Asoh (1996).

2.5 RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1 Pair and harem formation

After five days of the introduction of the fish for pair formation, the first disputes and fights were verified in all eight aquariums (70 and 110 L). Larger individuals presenting dominant behaviours over others were placed in the net cages kept within their aquariums for a period of 3 weeks, and then released again.

Individuals from three 110 L aquariums showed greater acceptance among them, with successful pair formation. However, in one aquarium, it was verified a death of the smaller individual with several body bite marks, 12 days after the release of the larger fish. Individuals in the 70 L aquariums continued to have confrontations and smaller individuals were switched from aquariums to try pair formation with different partners. The fighting continued and after 36 days, it was not possible to form pairs in the 70 L aquariums.

Fish kept in the smaller aquariums (70 L) showed greater aggressiveness when compared to the pairs kept in 110 L aquariums. *G. loreto* and *G. brasiliensis* present high fidelity to nest sites in the natural habitat (FREEMAN; ALEVIZON, 1983; WEBSTER; HIXON, 2000; WEBSTER, 2003; WEBSTER, 2004; LEITE, 2013; KINDINGER, 2016), characteristic that could suggest that small size aquariums would be adequate to keep pairs. However, the results of the present experiment suggest different aquarium sizes influenced the behaviour, probably due to the greater distance from one brick (shelter) to the other in the 110 L aquariums, since there is 20 cm more length when compared to the 70 L aquariums. The extended space between bricks might have provided more private space to the fish, diminishing confrontation.

Fish (eight individuals) that were kept in the four 70 L aquariums, along with the single fish that remained in the 110 L aquarium (fish that killed the smaller one), were transferred to 3 tanks (one rectangular 150 L and two circular 300 L) for the three-fish harem formation attempt. In the three tanks, there were constant attacks by two fish to one of the smaller individuals in all tanks. We observed that this aggressive behaviour affected negatively food intake by all individuals in the tanks, since the fish kept chasing the bullied one even in the moment of feeding.

Twenty-seven days after the fish were introduced into the tanks, two smaller ones were removed (one from each tank), due to excessive chasing, fighting and injuries. Finally, 57 days after the systems were assembled, a smaller fish was removed from the only tank that still had a three-fish harem, also due to fights and persecution. Thus, attempts in harem formation in these tanks did not succeed, since there was always a smaller individual pursued by both fish. In the three tanks, by removing the bullied fish, the other two fish accepted each other and began to eat normally, resulting in three new formed pairs.

Months later, we tried a three-fish harem formation in a 6,000 L tank by introducing a new female (that was alone due to its mate's death) to one formed pair already settled in this tank. Initially, both male and his previously formed pair female started chasing away the other female. The next day, a reversed situation occurred, with the new female being accepted by the male and starting to chase the other female away, until she later completely moved away from the brick chose as a refuge by the male, standing around 2 m away from the new pair. There is no data regarding the fidelity of *G. brasiliensis* males to females in the natural environment, but this experience showed that males can switch females in captivity.

Similar situations in the attempts of pair and harem formations have been reported by a Brazilian ornamental fish producer (Ivan Oliveira - Piscicultura Tanganyika, personal

communication), who tried unsuccessfully the formation of two harems of 6 fish each, in a 1.8m length and 3m length aquariums. It was verified mortalities and the male accepted just one female. In the attempts of pair formation, he was successful utilizing 1 m length aquariums.

Intraspecific competition based on size hierarchy, in which larger individuals maintain positions closer to the front of ledges, chasing smaller individuals that approximate them has been documented for *G. loreto* (WEBSTER; HIXON, 2000, WEBSTER, 2004). In the present study, we verified similar behaviour for *G. brasiliensis* in captivity. Males showed extremely high fidelity to the nest spot and spent more time in front of the brick or pipe in which the nest was built, while females stood by the side or behind it, even though the pair was already formed and no more fighting was verified. In the natural environment, positions closer to the front of ledges are favourable to higher feeding rates on passing plankton (WEBSTER; HIXON, 2000) and could diminish the chances of encounter with resident predators that are typically positioned at the back of ledges (WEBSTER, 2004).

In the wild, the Brazilian basslet is found in small harems (3 to 6 individuals) or, even more commonly in pairs, with a sex ratio of 1.03 female to 1 male (LEITE, 2013). This rate is lower than found for *G. loreto* (1.78:1 – ASOH; SHAPIRO, 1997; 1.44:1 – GUTIÉRREZ; BAÉZ-HIDALGO, 2002), commonly observed in aggregations of 10 to >100 individuals (WEBSTER, 2003). This indicate that *G. brasiliensis* prefers to breed in pairs or small harems, unlike the Caribbean species, fact that corroborates with the findings of this study.

2.5.2 Nest-building materials

In the natural environment, Leite et al. (2018) observed that *G. brasiliensis* did not capture algae adhered to substrates, and that the algae content inside the nests were not the same as those found in nearby regions, suggesting active selection. In the present study, it was observed that in the majority of times (>95%), the collection of materials (macroalgae and synthetic materials) occurred while they were still sinking, with rare occasions of interest by some on the bottom substrate. However, the collected materials on the bottom were filter floss and *C. linum*, probably due to its tangled shape and to the movement caused by the water, what might have attracted the fish.

Regarding macroalgae, a higher number of "Catch-spit" (233 times) was observed compared to "Catch-nest" behaviour (28 times). In this latter behaviour, only macroalgae of the genus *Chaetomorpha* was chosen. Concerning the synthetic materials, all of them were

selected in both behaviours, with "Catch-spit" occurring 106 times and "Catch-nest" 54 times (Fig. 4).

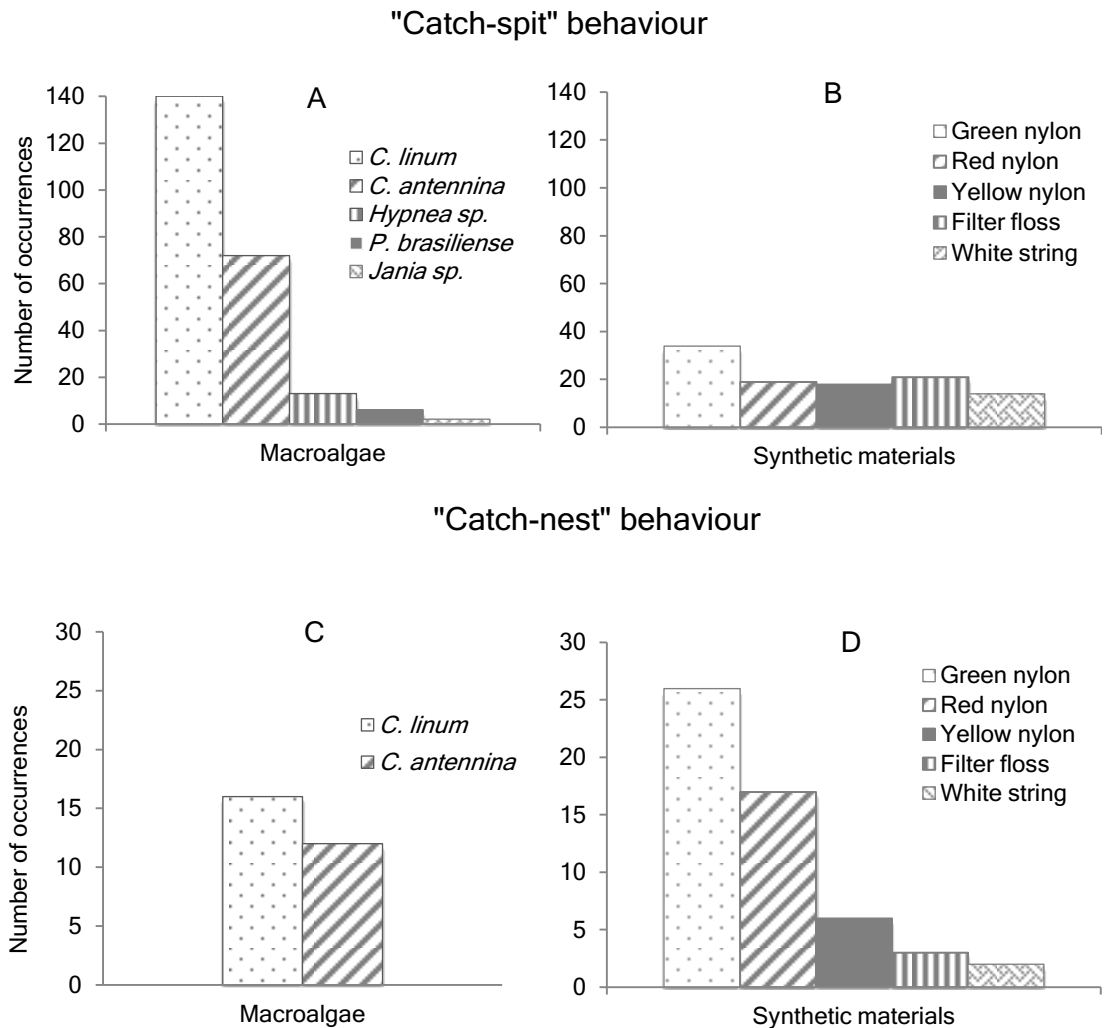


Fig. 4. Choice of macroalgae and synthetic materials by all five *G. brasiliensis* males. (A) Number of "Catch-spit" behaviour among five different macroalgae / (B) Number of "Catch-spit" behaviour among five different synthetic materials / (C) Number of "Catch-nest" behaviour among five different macroalgae / (D) Number of "Catch-nest" behaviour among five different synthetic materials.

Individually, the choices of macroalgae and synthetic materials are presented in tables 2 and 3.

Table 2: Number of macroalgae "Catch-spit" and "Catch-nest" behaviours of five different males. The second column indicates the number of times the materials were offered to the fish.

Pairs	Releases (n)	Macroalgae				
		<i>C. linum</i>	<i>C. antennina</i>	<i>Hypnea sp.</i>	<i>P. brasiliense</i>	<i>Jania sp.</i>
		"Catch-spit" / "Catch-nest"				
A	30	19 / 5	8 / 3	2 / 0	2 / 0	0 / 0
B	30	58 / 11	53 / 9	6 / 0	3 / 0	1 / 0
C	30	43 / 0	8 / 0	4 / 0	1 / 0	1 / 0
D	12	16 / 0	2 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
E	12	3 / 0	1 / 0	1 / 0	0 / 0	0 / 0
Total	114	140 / 16	72 / 12	13 / 0	6 / 0	2 / 0

Table 3: Number of synthetic materials "Catch-spit" and "Catch-nest" behaviours of five different males. The second column indicates the number of times the materials were offered to the fish.

Pairs	Synthetic materials					
	Releases (n)	Green nylon	Red nylon	Yellow nylon	Filter floss	White string
	"Catch-spit" / "Catch-nest"					
A	42	21 / 24	19 / 17	13 / 6	9 / 3	8 / 2
B	36	2 / 1	0 / 0	2 / 0	8 / 0	6 / 0
C	18	11 / 1	0 / 0	3 / 0	2 / 0	0 / 0
D	12	0 / 0	0 / 0	0 / 0	2 / 0	0 / 0
E	12	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Total	120	34 / 26	19 / 17	18 / 6	21 / 3	14 / 2

Chaetomorpha linum and *C. antennina* were the preferred macroalgae in "Catch-spit" behaviour and the only ones chosen in "Catch-nest" behaviour by males A and B. The "Algae-spit" behaviour (here adapted to the term "Catch-spit") may be a method of removing invertebrates that inhabit macroalgae (ASOH; YOSHIKAWA, 1996). The higher number of occurrences of this behaviour in *C. linum* (Fig. 4A) indicates a greater interest in this macroalgae, however, its reduced number of the "Catch-nest", when compared to its number in "Catch-spit" behaviour, may have occurred due to the fact that the coiled filaments of *C. linum* fill much of the nest, not requiring a large amount of this macroalgae. The same reasoning can be applied for the synthetic materials, as nylon lines takes up less space than the filter floss.

Despite the high numerical preference for the green and red colour nylon lines in "Catch-nest behaviour" (Fig. 4D), compared to the other synthetic materials, all materials were accepted for nesting by pair A (Table 3). Interestingly, even though the occurrence of 57 macroalgae "catch-spit" and 16 synthetic materials "catch-spit" behaviours by male C, none macroalgae "catch-nest" and only one green nylon "catch-nest" behaviours were verified. Pair B also demonstrated some interest on the synthetic materials, with 18 "catch-spit" verified, but only one "catch-nest" behaviour occurred, with the green nylon again (Table 3). Probably, pairs C, D e E were less interested in nesting during the experimental period and approached the materials with another purpose, such as checking for food.

Leite et al. (2018) reported the harvesting of floating thalli of calcareous algae *Gelidiopsis* spp. and *Jania* spp. by wild *G. brasiliensis*. Such selectivity and harvesting mode were related to the absence of suitable material for nesting along the dark surfaces of the

ledges where they are built, as well as small home range and feeding tactics of the species. Surprisingly, in our experiment, no interest in *Jania* sp. was shown by males (Fig. 4C).

It should be taken into consideration that, after the completion of the experiment, we continued providing filter floss and *C. linum* (since they could be caught even in the bottom substrate) for nesting purposes and it was observed, in all five aquariums or tanks, the presence of these materials inside the nests. In that case, these two materials were left for days inside the aquariums, so the fish had more time to catch it.

In the wild, the selected crevices for *G. brasiliensis* nesting had a single narrow entrance surrounded by algae thalli and worm tubes, and when the nest site was just a depression, there were interlaced algae until a front wall was built for the nest. In the deepest sections inside the nest, algae were used to form tangles, like a cushion for egg laying (LEITE et al., 2018). Asoh and Yoshikawa (1996) verified that when *G. loreto* used holes for nesting, extra openings were usually closed with a loose mat of algae, as well as the main entrances to decrease the size of the opening, what might serve as camouflage, act as a sieve to trap silt and provide a more easily defendable entrance.

This cushion-like nest, mainly structured with filter floss and *C. linum* was also verified in the present study. Nests were verified only in the deepest sections of the pipes or bricks, with no front wall built to protect the entrance, except in two occasions, when males kept a tangle of filter floss in front of the nest for a short period of time (days). This might be due to the lack of adequate materials and/or the absence of other animals in the aquarium, what could represent a threat to the eggs. Also, a larger nest entrance might be a way to improve oxygenation of the nest. Despite the levels of dissolved oxygen in the aquariums were kept $>6 \text{ mg L}^{-1}$, studies showed that larger nest entrances improve the flow of oxygenated water into the nest, which is critical to embryo development (JONES; REYNOLDS, 1999a; JONES; REYNOLDS, 1999b).

Among the different types of macroalgae and synthetic materials, the genus *Chaetomorpha* was the preferred by the fish to build nests in this experiment. The results obtained by pair A (Table 3), showed that all synthetic materials were also utilized for nesting, indicating the viability of using these materials in aquaculture, which are cheap and commonly available.

2.5.3 Courtship behaviour experiment

In this experiment, we described the courtship behaviour verified by three pairs of *G. brasiliensis* in captive conditions. Video recordings were set to start at the morning period due to previous observations of constant courtship displays, although this behaviour was observed all day, with less frequency in the afternoons. Differently, for *G. loreto* in the natural habitat, courtship was observed only from 10 min before sunrise to 1 hour after sunrise (ASOH, 1996).

The courtship behaviour of males followed some patterns. This behaviour will also be described as U-turn with body quivering (U-turn BQ) based on one of the behaviours described by Asoh (1996) for wild *G. loreto*. However, there are differences between the behaviour reported by this author and the ones verified here. In the present experiment, the approach of the male towards the female was usually performed slowly, and the return towards the nest was usually fast and always with the body quivering, summarized as follows: the male approaches, standing in front of, or beside the female, turns its body quivering (except when it is already heading towards the nest) and immediately goes towards the nest by swimming quickly and with the body quivering (Fig. 5 and also see Supplementary Materials).

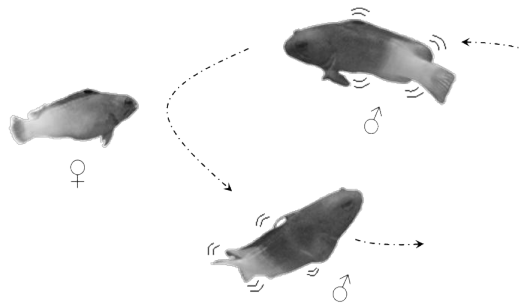


Fig. 5. “U-turn with body quivering” courtship display.

Leite (2013) described two reproductive behaviours *in situ* and in captive conditions: “U-turn” and “Caudal fin quivering”. The first was only verified by males in *in situ* observations and the latter only by small males and females, both *in situ* and in aquariums. The author associated the “caudal fin quivering” behaviour in captivity with submission of the smaller fish to the dominant male, as the individuals that were allocated with the dominant fish had their acceptance only by displaying this behaviour. However, this behaviour was not verified here.

Also, the “U-turn”, as described by Leite (2013), with fish swimming in front of the other, keeping the body curved in a U-shape, with the dorsal, pelvic and anal fins flattened against the body and entering the nest, was not verified here since in all cases the males presented body quivering and the fins were not flattened against the body.

Besides, male approaching the female with the fins flattened against the body and quivering while facing the female with erect fins as described by Asoh (1996) were not verified. We also noticed that, usually on the first approaches, the male would spend time near the female and only then would turn and move quivering toward the nest, or that as soon as the male came close to the female it would turn and move quivering towards the nest. On some occasions, when females showed some interest (i.e. following the male part-way towards the nest), the male performed U-turns BQ repetitions, in a way that both approaching and returning were faster than when compared to the first approaches. The quantification of the behaviours performed by males is summarized in table 4.

Table 4: Number of single U-turns with body quivering (U-turn BQ), number of U-turns BQ sequences (minimum two movements) and total U-turn BQ performed by different males, registered in a total of 54 h of video recordings.

	Single U-turn BQ	U-turn BQ sequences (minimum two movements)	Total U-turn BQ
Male 1	106	79	456
Male 2	220	60	493
Male 3	295	101	608

Of the total U-turn BQ sequences verified (considering the 3 males – n=240), males repeated the movements 2 to 21 times (3.6 ± 2.6 ; mean \pm standard deviation –SD, mode = 2). Considering only the sequences that resulted in the female entering the nest (n = 54), the displays ranged from 2 to 13 repetitions (3.8 ± 2.2 , mode =3).

According to Asoh (1996), in natural environment, *G. loreto* males repeated courtships displays while returning to their nests. Once the female came close to the nest, the male led it to the nest entrance, repeating the U-turns in front of the female and then entering the nest. The females either followed the male to the nest or remained outside. In the latter case, the male performed additional U-turns, and the female eventually entered the nest, occurring in 210 of 228 cases. Here, these sequences in which the male would enter the nest, exit and perform additional U-turns were also verified. There were 29 sequences with additional U-turns, but in only 14 times, females entered the nest (48.3%). The other nest entrances also occurred during movement sequences, but at the first male entry, the female accompanied it. Female behaviours in response to males’ U-turns BQ are shown in Fig. 6.

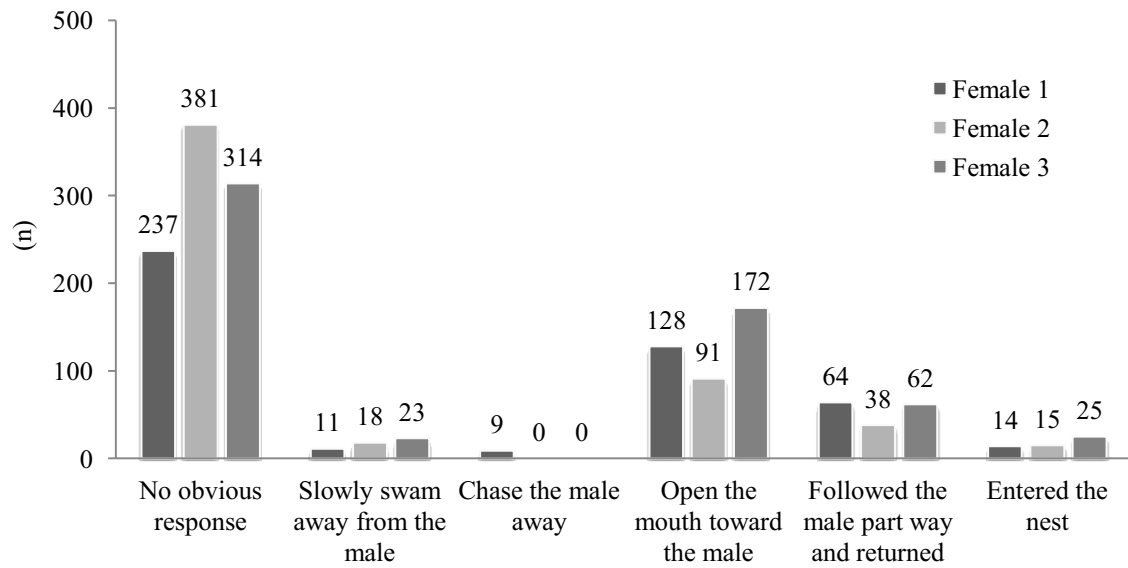


Fig. 6. Females' responses to males' courtship displays.

The behaviour “No obvious response” was the most common in the present study. Females appeared to ignore the male, sometimes even when the males presented sequences of movements. When they opened the mouth toward the males, usually they remained in the same spot, not running away from them, and interestingly, in many cases the male displayed the movement just after the female opens the mouth.

Asoh (1996) reported that females of *G. loreto* could enter the nest of the same male more than once per day. Here, we verified this behaviour in all three females. Female 2, for example, entered the nest seven times in a 40-min video in a particular day, while in most days there were no entrances at all.

Time inside the nest by the pairs was also verified by Asoh (1996), ranging from 3 to 421 s, with female exiting first in all cases. Males exited immediately after the female or remained for some time (3-145 s) after the female. In the present experiment, we found that the time spent in the nest ranged from 3 to 195 s, with an average of 57.9 ± 51.6 s SD, and female exited first in 88.8% of the times. In 77% of the times, females left the nest first, males performed at least one more U-turn BQ movement (either immediately or until 13 s later). In the other occasions, the male did not try new U-turns and remained inside the nest for 0 to 13 s (Table 5). The high incidence of U-turns BQ might be related to the attempt to invite females back to the nest and to the scarcity of spawning events in the present study. The same reasoning might explain the greater time *G. loreto* males remained inside the nest after

females left (i.e. they could have been taking care of the eggs) as observed by Asoh (1996) (Table 5).

Table 5: Comparison between time pairs spent inside the nest and males' time alone in the nest among *Gramma brasiliensis* (present study) and *Gramma loreto* (in the wild).

Reference	Time in the nest by pairs (s)	Time males spent in nest after females' exit (s)	Time males spent in nest alone (s)
Present study	3 - 195 (mean±SD = 57.9 ± 51.6, mode 25)	0 - 13 (mode 3)	2 - 249 (mean±SD = 29.6 ± 25.7) n=1008
Asoh (1996)	3 - 421 (mode 20)	3 - 145 (mode 10)	-
Asoh and Yoshikawa (1996)	-	-	2 - 440 (mean±SD = 23.8±60.7) n=1904

When males entered the nest alone, without trying any courtship display, they spent some seconds in the deep end of the nest and then, afterwards, stood in the entrance of it with just their heads out, guarding the nest, behaviour also described by Asoh and Yoshikawa (1996) and by Leite (2013). Asoh and Yoshikawa (1996) reported other behaviours regarding nesting, such as nest maintenance with macroalgae, detritus clearing (removing silt from the inside of the nest) and simple nest entering, the latter performed mainly in the reproductive season.

Here, we also quantified the residence time males spent alone inside the nests (Table 5). Dominant males in the wild environment have just one nest, according to Leite (2013), however, of the three males, two had only one nest in the aquarium, while the other built nests inside the eight holes of a brick. Even though the eight holes had nests, we verified that one was the preferred, with 52.6% of the entering activity by the male alone and being chosen 100% of the times when inviting the female to the nest. Due to the impossibility of visualization, we could not describe the activities performed by the males when inside the nest, with or without the female.

In the natural environment, Asoh (1996) reported that *G. loreto* females, when collected on their way to the nests, expelled hydrated eggs when extruded, while females collected at feeding sites after their exit from the nests did not expel hydrated eggs, indicating that females entered the nests for spawning purposes. Surprisingly, in the present study, even with the 54 times observed that *G. brasiliensis* females entered the nests, only one spawning event was observed, with 126 unfertilized eggs (pair 1). The lack of spawnings remains a

bottleneck for the breeding of this species, and more studies regarding this subject, with natural or artificial spawning induction, should be performed.

2.6 CONCLUSIONS

For captive breeding purposes, *G. brasiliensis* should be kept in pairs due to intense aggressive behaviour when in harems of three fish. In addition, pairs kept in 70 L aquariums demonstrated greater aggressiveness when compared to pairs kept in 110 L aquariums and larger tanks. Furthermore, it is worthwhile to note the success in the present study regarding pair formation, since six pairs were formed from the initial 16 individuals.

From all macroalgae tested, only the ones of the genus *Chaetomorpha* were utilized to form cushion-like shape nests. All the synthetic materials were accepted, therefore indicating their viability.

The courtship behaviour of *G. brasiliensis* in captivity was described for the first time and it was similar to one verified for *G. loreto* in natural habitat - “U-turn with body quivering”. However, even though the occurrence of hundreds of courtship displays, only one spawning event was verified. The reasons for the lack of spawning remains to be elucidated and represent a bottleneck for the breeding of this species. In this sense, more studies regarding this subject, using natural or artificial spawning induction, should be performed.

2.7 CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

2.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Federal Agency for Support and Evaluation of Post-Graduation in Education (Improvement of Higher Level Personnel, CAPES), which provided scholarship to the first-author of this study and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) for the grant to the last author (CNPq 306078/2017-1). Also, we thank all the laboratory staff that helped on the development of this study and the ornamental fish producer Ivan Oliveira for the information and suggestions provided.

2.9 REFERENCES

ASOH, K. Reproductive behavior and Mating System of the Fairy Basslet, *Gramma loreto*. *Copeia*, v. 4, p. 1037–1044, 1996.

- ASOH, K.; SHAPIRO, D. Y. Bisexual juvenile gonad and gonochorism in the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 1, p. 22–31, 1997.
- ASOH, K.; YOSHIKAWA, T. Nesting behavior, male parental care, and embryonic development in the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 1, p. 1–8, 1996.
- FERREIRA, B. P.; MAIDA, M. **Monitoramento dos recifes de coral do Brasil - Situação Atual e Perspectivas**. Brasília, MMA (Série Biodiversidade 18), 250p, 2006.
- FREEMAN, S.; ALEVIZON, W. Aspects of territorial behavior and habitat distribution of the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 3, p. 829–831, 1983.
- GUTIÉRREZ, L. P.; BÁEZ-HIDALGO, M. Reproducción y alimentación del loreto *Gramma loreto* Poey, 1868 (Pisces, Grammatidae), en la costa norte de la Habana, Cuba. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 23, n. 3, p. 195–201, 2002.
- IBAMA, **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Instrução Normativa N^o 5. Diário Oficial da União 28/05/2004, 136–142, 2004.
- JONES, J. C.; REYNOLDS, J. D. Oxygen and the trade-off between egg ventilation and brood protection in the common goby. **Behaviour**, v. 136, n. 7, p. 819–832, 1999.
- JONES, J. C.; REYNOLDS, J. D. Costs of egg ventilation for male common gobies breeding in conditions of low dissolved oxygen. **Animal Behaviour**, v. 57, n. 1, p. 181–188, 1999.
- KINDINGER, T. L. Symmetrical effects of interspecific competition on congeneric coral-reef fishes. **Marine Ecology Progress Series**, v. 555, p. 1–11, 2016.
- LEITE, J. R. **Biologia reprodutiva e etologia de *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini and Moura, 1998**. Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, 2013.
- LEITE, J. R. et al. Rediscovering hermaphroditism in Grammatidae with the description of the testicular gland in Brazilian Basslet *Gramma brasiliensis*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 743–749, 2016.
- LEITE, J. R. et al. Bird-like complex nesting behaviour by the Brazilian-endemic reef fish *Gramma brasiliensis*. **Marine and Freshwater Research**, v. 69, n. 6, p. 982–986, 2018.
- MOLINA, W. F. et al. Chromosomal differentiation and speciation in sister-species of Grammatidae (Perciformes) from the Western Atlantic. **Helgoland Marine Research**, v. 66, n. 3, p. 363–370, 2012.
- SAZIMA, I.; GASPARINI, J. L.; MOURA, R. L. *Gramma brasiliensis*, a new basslet from western South Atlantic (Perciformes: Grammatidae). **Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**, v. 3, n. 1, p. 39–43, 1998.
- WEBSTER, M. S.; HIXON, M. A. Mechanisms and individual consequences of intraspecific competition in a coral-reef fish. **Marine Ecology Progress Series**, v. 196, p. 187–194, 2000.

WEBSTER, M. S. Temporal density dependence and population regulation in a marine fish. **Ecology**, v. 84, p. 623–628, 2003.

WEBSTER, M.S. Density dependence via intercohort competition in a coral-reef fish. **Ecology**, v. 85, p. 986–994, 2004.

3 Descrição da desova, ovos e larvas do *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 em cativeiro

Sérgio Leandro Araujo-Silva^A, Vanessa Martins da Rocha^B, Raoani Cruz Mendonça^C,
Douglas da Cruz Mattos^D, Mônica Yumi Tsuzuki^A

^ALaboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis - SC, CEP 88034-001, Brasil.

^BLaboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis - SC, CEP 88034-001, Brasil.

^CInstituto Federal do Pará, Rua Antônio Fulgêncio da Silva, s / n, Bairro Parque Universitário, Breves - PA, CEP 68800-000, Brasil.

^DInstituto Federal do Espírito Santo, Rua Augusto Costa de Oliveira, 660, Piúma - ES, CEP 29285-000, Brasil.

3.1 RESUMO

O *Gramma brasiliensis* é um peixe de interesse para o comércio ornamental, e atualmente sua captura, transporte e comercialização estão proibidos em todo o território brasileiro. O desenvolvimento de um protocolo de reprodução para esta espécie é uma ferramenta importante para fornecer animais cultivados ao comércio de aquários. Os objetivos deste estudo são fornecer dados sobre a desova da espécie e uma breve descrição dos ovos e larvas, incluindo informações sobre o tamanho da boca. Os eventos de desova demonstraram massas de ovos de 27 a 950 ovos. As maiores massas apresentaram embriões com pelo menos dois estágios de desenvolvimento diferentes. Os ovos são esféricos com um diâmetro médio de $1,0 \pm 0,06$ mm e são mantidos juntos por filamentos emaranhados nas projeções coriônicas. Larvas com <12 h da eclosão possuem $3,55 \pm 0,09$ mm de comprimento padrão, olhos bem desenvolvidos, saco vitelino totalmente absorvido, bexiga natatória inflada e boca aberta medindo 0.44 mm de abertura máxima. A alimentação exógena com rotíferos começou dentro de 12 h após a eclosão. A primeira larva apresentando flexão da notocorda foi verificada no dia 7 e a primeira larva assentada observada no dia 21. O primeiro indivíduo completou a metamorfose no dia 27. Este estudo apresentou pela primeira vez informações sobre desova, ovos e larvas de *G. brasiliensis*. Os próximos estudos avaliarão possíveis melhorias na larvicultura de *G. brasiliensis* com a inclusão de copépodes e a antecipação da mudança de presa de rotíferos para uma maior e mais adequada.

Palavras-chave: Reprodução em cativeiro; Peixes marinhos ornamentais; Grammatidae.

3.2 ABSTRACT

The Brazilian basslet *Gramma brasiliensis* is an ornamental fish of interest to the ornamental trade, and currently its capture, transport and sale are prohibited throughout the Brazilian territory. The development of a breeding protocol for this species is one important tool to provide cultivated animals to the aquarium trade. The purposes of this study are to provide data about the species' spawning and a brief description of the eggs and larvae, including mouth size information. The spawning events demonstrated egg masses from 27 to 950 eggs. Larger egg masses presented embryos with at least two different developmental stages. Eggs are spherical with an average diameter of 1.0 ± 0.06 mm and are held together by filaments entangling chorionic projections. Larvae hatched with 3.55 ± 0.09 mm SL, well developed eyes, fully absorbed yolk sac, an inflated swim bladder and open mouth with maximum gape height of 0.44 mm. Exogenous feeding on rotifers began within 12-hph (hours post-hatch). First larva showing flexion of the notochord was verified on day 7 and first settled larvae observed by day 21. First individual showed total metamorphosis by day 27. This study presented for the first time information on spawning, eggs and larvae of *G. brasiliensis*. Next studies will evaluate possible improvements in the larviculture of *G. brasiliensis* with the inclusion of copepods and the prey shift anticipation from rotifers to a larger and more suitable prey.

Key-words: Captive-breeding; Marine ornamental fish; Grammatidae.

3.3 INTRODUÇÃO

Gramma brasiliensis é endêmico da costa brasileira e o único representante da família Grammatidae ocorrendo no Brasil. É distribuído do Maranhão ao Rio de Janeiro e também é encontrado no arquipélago de Fernando de Noronha (LEITE, 2013; SAZIMA; GASPARINI; MOURA, 1998). Devido principalmente à coleta intensiva da indústria de peixes ornamentais, seus estoques naturais foram afetados resultando em sua inclusão na lista de espécies ameaçadas de extinção do Brasil (BRASIL, 2004) e atualmente tem sua captura, transporte e comercialização proibidos em todo o território brasileiro, exceto indivíduos de empreendimentos aquícolas devidamente cadastrados na atividade pesqueira e com licença válida na categoria aquicultura (BRASIL, 2021).

O gramma brasileiro apresenta hermafroditismo protogínico e não há dimorfismo sexual, mas os machos com gônadas maduras tendem a serem maiores que as fêmeas nos

grupos sociais (LEITE, 2013). No ambiente natural eles se reproduzem em pares ou pequenos haréns, com um macho dominante, outro(s) macho(s) e fêmeas (LEITE, 2013; LEITE et al., 2016). Esta espécie exibe comportamento de nidificação usando macroalgas para formar ninhos que lembram uma almofada para postura de ovos (LEITE et al., 2018). Foi relatada apenas participação masculina na confecção dos ninhos; semelhante ao seu congênere *Gramma loreto* Poey, 1868, com ninhos construídos em buracos e depressões dos recifes, onde a fêmea pode liberar massas de ovos demersais desenvolvidas de forma assíncrona (LEITE et al., 2016; LEITE et al., 2018; ASOH; YOSHIKAWA, 1996).

O Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) começou a trabalhar com *G. brasiliensis* em 2016, mas poucos eventos de desova foram observados até o momento desse estudo (n=4). Esta espécie apresenta comportamento intraespecífico agressivo e, apesar das exibições de corte, os eventos de desova em cativeiro podem ser escassos (ARAÚJO-SILVA et al., 2021). Não há dados publicados até o momento com informações sobre a desova da espécie e a descrição do embrião e larvas. Estas informações são importantes para promover avanços no desenvolvimento de um protocolo de criação, que é de interesse para o comércio da aquariofilia, e para a conservação da espécie. O objetivo deste estudo é fornecer dados sobre a desova da espécie e uma breve descrição dos ovos e larvas, incluindo informações sobre o tamanho da boca.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Gramma brasiliensis selvagens (comprimento total de 3–5 cm; n = 16) foram obtidos em dezembro de 2017 no litoral do estado da Bahia (12° 57'26,0" S, 38° 31'46,5" O; número da autorização SISBIO / ICMBio 22051-4) e enviados para o LAPOM. Todos os experimentos foram realizados com autorização do Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (n° 3189250520).

Os reprodutores foram mantidos em pares, em aquários de vidro de 110 L. Cada aquário possuía tijolos e tubos de PVC para fornecer refúgio e local de nidificação, com adição esporádica da macroalga *Chaetomorpha linum* e manta acrílica para serem usadas como substrato (ARAÚJO-SILVA et al., 2021). Poucos eventos de desova (n = 4) foram obtidos, então também utilizamos desovas obtidas por um produtor de peixes ornamentais (n = 2) (Ivan Oliveira - Piscicultura Tanganyika, Brasil), que gentilmente as enviou para nossa pesquisa.

As desovas foram abertas manualmente e esticadas em uma placa de Petri para serem fotografadas para facilitar a contagem. O programa Paint 3D (Microsoft[®]) foi utilizado para contar com a máxima precisão possível. Não foi feita uma contagem exata (exceto nas massas menores que 200 ovos) uma vez que as desovas foram mantidas vivas até a eclosão. Para a descrição das larvas, escolhemos a maior massa de ovos para que tivéssemos um número suficiente de larvas para fotografar. A massa de ovos foi mantida em uma incubadora feita de garrafa PET transparente com pequenos orifícios nas laterais, permitindo a troca de água e posterior saída das larvas, com aeração suave na parte inferior, permitindo com que a massa de ovos ficasse em movimentação constante. O aquário contendo a incubadora era retangular de vidro com laterais escuras (35 cm de comprimento X 25 cm de largura X 25 cm de profundidade) preenchidos com 17 L de água do mar filtrada (35 g/L de salinidade) e com temperatura mantida entre 27-28 °C durante a incubação e todo o período de larvicultura.

Amônia total (Alcon[®], Brasil) e oxigênio dissolvido (YSI pro 20, Yellow Springs, Ohio, EUA) foram medidos diariamente e permaneceram <0,25 mg / L e >5 mg / L, respectivamente. Após a eclosão, a incubadora foi removida e as larvas mantidas no mesmo aquário. As larvas foram alimentadas com rotíferos *Brachionus rotundiformis* (5 - 10 / mL) enriquecido (Algamac 3050[®] - Aquafauna, EUA) durante os primeiros 10 dias. Usamos o sistema de “água verde” adicionando microalgas vivas *Isocrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* em uma contagem de células de aproximadamente 200.000 e 80.000 células / mL, respectivamente. A iluminação foi feita por um par de lâmpadas fluorescentes brancas (5.000 K, 32 w cada - Phillips[®], Holanda) colocadas 50 cm acima do sistema, mantidas 16 horas por dia. Nenhuma troca de água ocorreu nos primeiros três dias da larvicultura. Posteriormente, 50% da água foi trocada diariamente e microalgas e rotíferos foram contados e repostos, se necessário. A partir do décimo dia, rotíferos pararam de ser repostos e foi iniciado o fornecimento de náuplios de *Artemia* sp. em uma densidade de 1 / mL. Após o dia 15, iniciou-se o fornecimento de metanáuplio de *Artemia* sp. enriquecido (Algamac 3050[®] - Aquafauna, EUA) (1 / mL).

As larvas foram coletadas diariamente do dia 1 ao 8 (n = 5) e nos dias 11, 16 e 21 (n = 3) para medições de comprimento padrão (SL), profundidade corporal (BD) medida na posição das nadadeiras peitorais, largura do corpo (BW) medida a partir da vista dorsal na posição das nadadeiras peitorais, abertura da boca (MGH) e largura da boca (MW). Consideramos o SL uma medida da ponta da mandíbula até a extremidade posterior da notocorda, a abertura mínima da boca (MinGH) uma medida da mandíbula superior e inferior com a abertura de um ângulo de 45° (MA et al., 2015), usando a equação $MinGH =$

$\sqrt{UJL^2 + LJL^2 - 2 \cdot UJL \cdot LJL \cdot \cos 45}$ e a abertura máxima da boca (MaxGH) uma medida da mandíbula superior e inferior com a abertura de um ângulo de 90° (SHIROTA, 1970; WITTENRICH; TURINGAN, 2011), usando a equação $\text{MaxGH} = \sqrt{UJL^2 + LJL^2}$, onde UJL é o comprimento da mandíbula superior e LJL é o comprimento da mandíbula inferior. Medimos o MW na vista dorsal da maxila, considerando a maior distância ao longo da abertura da boca, quando a boca estava fechada (QIN; FAST, 1997) (Figura 7). Regressão linear e correlação de Pearson foram realizadas entre SL e MW.

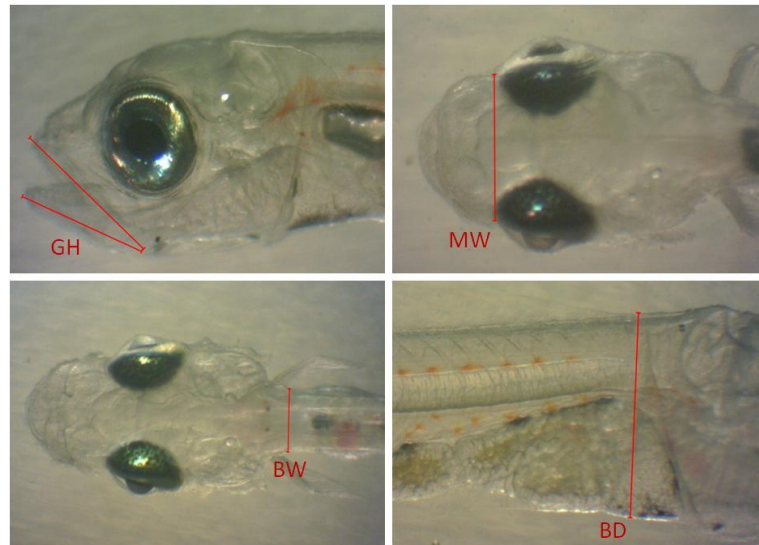


Figura 7: Exemplos de medidas da abertura da boca (GH), largura da boca (MW), largura do corpo (BW) e profundidade do corpo (BD) de larva de *Gramma brasiliensis* com 5 dias após eclosão (DAE).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seis eventos de desova produziram massas de ovos contendo 27, 127, 600, 750, 850 e 950 ovos. Massas com 27 e 127 ovos apresentaram embriões com estágios de desenvolvimento semelhantes, configurando um único evento de desova cada. As massas de ovos maiores apresentaram embriões com pelo menos dois estágios de desenvolvimento diferentes (Figura 8A), indicando que a fêmea desovou mais de uma vez durante alguns dias de intervalo; a massa de ovos contendo aproximadamente 950 ovos possuía 250 embriões com olhos bem desenvolvidos. Não foi possível identificar o intervalo exato entre uma desova e outra em uma mesma massa de ovos, no entanto, para *G. loreto*, Wittenrich (2007) verificou lotes menores, de 25 a 40 ovos, às vezes produzidos por vários dias consecutivos, também resultando em desovas com ovos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os ovos são esféricos com um diâmetro médio de $1,0 \pm 0,06$ mm (média \pm DP) (n=20), semelhante ao encontrado por Asoh e Yoshikawa (1996) para *Gramma loreto* ($0,95 \pm 0,06$

mm), e são mantidos juntos por filamentos emaranhados nas projeções coriônicas (Figura 8B). Essa adesão pode ocorrer para juntar os próprios ovos uns aos outros e ao substrato usado no processo de construção do ninho.

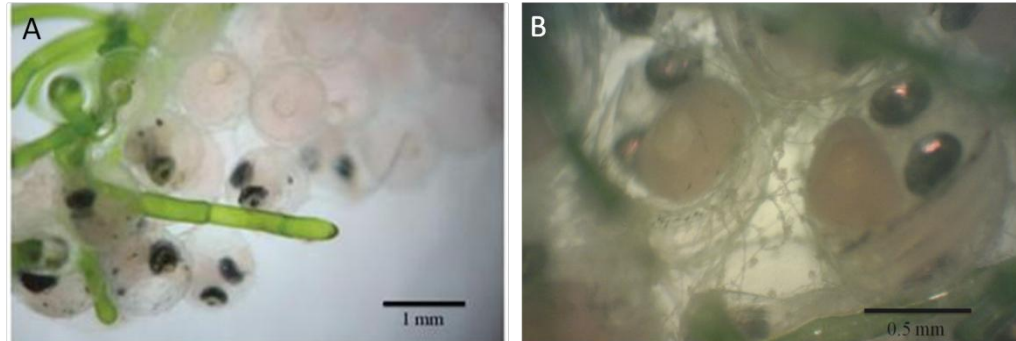


Figura 8: (A) Ovos de *G. brasiliensis* com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento. (B) Projeções coriônicas enredando ovos de *G. brasiliensis* com embriões bem desenvolvidos, mostrando olhos pigmentados e saco vitelino.

Semelhante ao verificado por Asoh e Yoshikawa (1996) com larvas recém-eclodidas de *G. loreto* (3.38 ± 0.35 mm de comprimento padrão - SL), as larvas de *G. brasiliensis* com poucas horas após eclosão (<12 h) possuem $3,55 \pm 0,09$ mm SL, olhos bem desenvolvidos, saco vitelino totalmente absorvido, bexiga natatória inflada e boca aberta. Alimentação exógena com rotíferos iniciou-se antes de 12 horas após eclosão. A primeira larva com flexão inicial da notocorda foi verificada aos 7 dae (dias após eclosão) ($5,99$ mm SL). Em 8 dae, 60% das larvas iniciaram a flexão da notocorda ($5,8 \pm 0,2$ mm SL) e no dia 11, todas as larvas apresentaram conclusão da flexão da notocorda ($6,24 \pm 0,09$ mm SL). As larvas pós-flexão aumentaram a pigmentação avermelhada na cabeça, encerraram a formação das nadadeiras anal e dorsal e a primeira larva assentada foi verificada no dia 21. Os dados obtidos das medições das larvas de *G. brasiliensis* do dia 1 ao dia 21 são apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Medidas (em mm) de larvas de *G. brasiliensis* criadas entre 27-28° C. Os dados são apresentados como valores médios e desvio padrão. Abreviações: SL - Comprimento padrão, Min GH - Abertura mínima da boca, Max GH - Abertura máxima da boca, MW - Largura da boca, BW - Largura do corpo e BD - profundidade corporal.

	SL	Min GH	Max GH	MW	BW	BD
Day 1	3.55 ± 0.09	0.31 ± 0.002	0.44 ± 0.003	0.38 ± 0.03	0.26 ± 0.01	0.52 ± 0.03
Day 2	3.99 ± 0.23	0.48 ± 0.06	0.70 ± 0.09	0.4 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.65 ± 0.09
Day 3	4.27 ± 0.33	0.54 ± 0.03	0.78 ± 0.05	0.47 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.72 ± 0.02
Day 4	4.47 ± 0.17	0.56 ± 0.05	0.81 ± 0.08	0.49 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.78 ± 0.05
Day 5	4.84 ± 0.32	0.59 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.54 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.85 ± 0.04
Day 6	4.93 ± 0.24	0.64 ± 0.04	0.92 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.90 ± 0.05
Day 7	5.70 ± 0.22	0.73 ± 0.08	1.06 ± 0.12	0.67 ± 0.02	0.39 ± 0.01	1.00 ± 0.06
Day 8	5.76 ± 0.19	0.77 ± 0.03	1.12 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.39 ± 0.02	1.05 ± 0.07
Day 11	6.24 ± 0.09	0.87 ± 0.02	1.25 ± 0.03	0.76 ± 0.02	0.48 ± 0.01	1.31 ± 0.01
Day 16	7.51 ± 0.01	1.11 ± 0.15	1.61 ± 0.22	0.94 ± 0.08	0.70 ± 0.02	1.66 ± 0.05
Day 21	8.45 ± 1.48	1.29 ± 0.26	1.87 ± 0.38	0.93 ± 0.10	0.80 ± 0.24	2.22 ± 0.59

A figura 9 (A-K) mostra o desenvolvimento larval do dia 1 ao dia 21 após a eclosão.

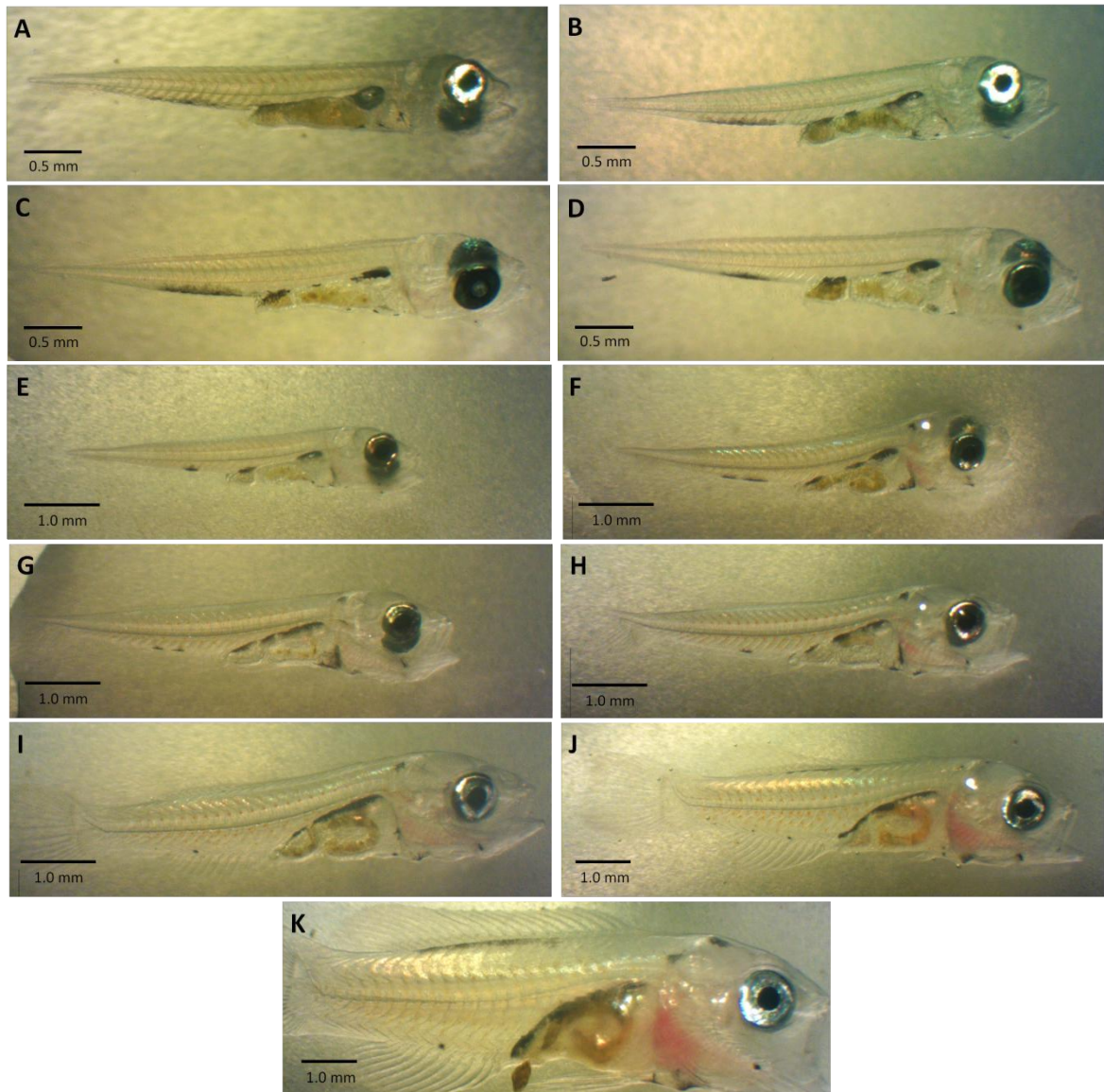


Figura 9: Desenvolvimento larval de *Gramma brasiliensis* em cativeiro. Vários indivíduos são mostrados. (A) Larva em pré-flexão com menos de 12 horas pós eclosão com olhos bem desenvolvidos, sem saco vitelino, bexiga natatória inflada e intestino cheio de rotíferos; (B) Larva em pré-flexão em 2-dae; (C) Larva em pré-flexão em 3-dae; (D) Larva em pré-flexão em 4-dae; (E) Larva em pré-flexão em 5-dae; (F) Larva em pré-flexão em 6-dae; (G) Larva em pré-flexão em 7-dae; (H) Larva em 8-dae com flexão inicial da notocorda e formação inicial dos raios da nadadeira caudal; (I) Larva pós-flexão em 11-dae com nadadeira caudal formada e formação de nadadeira anal e dorsal; (J) Larva pós-flexão em 16-dae com aumento da pigmentação avermelhada na cabeça; (K) Larva pós-flexão assentada com 21-dae com nadadeira anal e dorsal.

A largura média da boca de *G. brasiliensis* na primeira alimentação foi de 0,38 mm e aumentou linearmente com o comprimento corporal (Fig. 10).

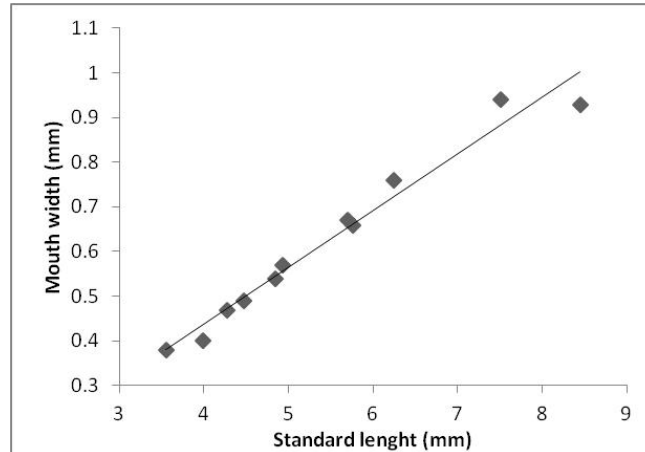


Figura 10: Regressão linear entre comprimento padrão e largura da boca (mm). $R = 0,984$ ($y = 0,1266x - 0,0681$), $p < 0,05$, $n = 11$, considerando de 1 a 21-dae (cada ponto de dados representa um valor médio de 5 larvas).

As medidas de altura e largura da boca estão ausentes para muitas espécies de peixes ornamentais marinhos, fato que limita a determinação de potenciais dietas larvais (BURGESS; CALLAN, 2018). As informações sobre as medidas do tamanho da boca são importantes para o desenvolvimento de um protocolo de larvicultura (períodos de mudança de presas), uma vez que existem preocupações contínuas em atender aos requisitos de mudança para alimentos de maior tamanho e nutrição diferente à medida que as larvas crescem (MOORHEAD; ZENG, 2011). Para otimizar as atividades de alimentação das larvas, a proporção entre a largura da presa e a largura da boca deve ser inferior a 50% (SHIROTA, 1970; FERNANDEZ-DIAZ et al., 1994; BUSCH, 1996; KREBS; TURINGAN, 2003).

Este estudo utilizou o alimento vivo tradicional para larvas de peixes marinhos (rotíferos e náuplios de *Artemia* sp.) e foi nossa primeira tentativa de reproduzir o *G. brasiliensis* em cativeiro. O número limitado de larvas saudáveis impediu o desenvolvimento de um experimento replicado, dificultando a avaliação de sobrevivência. Apesar disso, dois indivíduos assentados atingiram metamorfose total no dia 27, com coloração violeta na metade anterior do corpo e amarelada na posterior, semelhante aos 26 dias verificado por Wittenrich (2007) para *G. loreto*.

O uso ou suplementação de copépodes em conjunto com as dietas tradicionais (rotíferos ou *Artemia* sp.) tem mostrado resultados positivos, como aumento das taxas de crescimento, sobrevivência e pigmentação para várias espécies de peixes marinhos (HEATH; MOORE, 1997; MCEVOY et al., 1998; NÆSS; LIE, 1998; GOPAKUMAR; SANTHOSI, 2009; ZENG et al., 2018). Assim, próximos estudos devem avaliar possíveis melhorias na larvicultura de *G. brasiliensis* com a inclusão de copépodes e a antecipação do fornecimento de presas

maiores e mais adequadas após a alimentação inicial com rotíferos. Os dados fornecidos aqui com informações das larvas (especialmente medições do tamanho da boca) devem ajudar nas próximas etapas.

3.6 REFERÊNCIAS

ARAÚJO-SILVA, S. L. et al. Pair and harem formation, nest-building and courtship behaviour of the marine ornamental fish *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998 in captivity. **Marine and Freshwater Research**, 2021.

ASOH, K.; YOSHIKAWA, T. Nesting behavior, male parental care, and embryonic development in the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 1, p. 1–8, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Aquicultura e Pesca – MAPA/SAP (2021). Portaria nº 387, de 9 de setembro de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sap/mapa-n-387-de-9-de-setembro-de-2021-343816380>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (2004). Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de maio.

BURGESS, A. I.; CALLAN, C. K. Effects of supplemental wild zooplankton on prey preference, mouth gape, osteological development and survival in first feeding cultured larval yellow tang (*Zebrasoma flavescens*). **Aquaculture**, v. 495, p. 738–748, 2018.

BUSCH, A. Transition from endogenous to exogenous nutrition: larval size parameters determining the start of external feeding and size of prey ingested by Ruegen spring herring *Clupea harengus*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 130, p. 39–46, 1996.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. **Marine biology**, v. 118, n. 2, p. 323–328, 1994.

GHOSH, S.; KUMAR, T. T. A.; BALASUBRAMANIAN, T. Embryology of Maldives clownfish, *Amphiprion nigripes* (Amphiprioninae). **Journal of Ocean University of China**, v. 11, n. 2, p. 174–180, 2012.

GOPAKUMAR, G.; SANTHOSI, I. Use of copepods as live feed for larviculture of damselfishes. **Asian Fisheries Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2009.

HEATH, P. L.; MOORE, C. G. Rearing dover sole larvae on *Tisbe* and *Artemia* diets. **Aquaculture International**, v. 5, n. 1, p. 29–39, 1997.

KREBS, J. M.; TURINGAN, R. G. Intraspecific variation in gape–prey size relationships and feeding success during early ontogeny in red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 66, n. 1, p. 75–84, 2003.

LEITE, J. R. **Biologia reprodutiva e etologia de *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, 2013. 10.13140/RG.2.1.3165.2244

LEITE, J. R. et al. Rediscovering hermaphroditism in Grammatidae with the description of the testicular gland in Brazilian Basslet *Gramma brasiliensis*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 743–749, 2016.

LEITE, J. R. et al. Bird-like complex nesting behaviour by the Brazilian-endemic reef fish *Gramma brasiliensis*. **Marine and Freshwater Research**, v. 69, n. 6, p. 982–986, 2018.

MA, Z. et al. Food ingestion, consumption and selectivity of pompano, *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) under different rotifer densities. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 11, p. 2593–2603, 2015.

MCEVOY, L. et al. Lipid and fatty acid composition of normal and mal pigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched Artemia: a comparison with fry fed wild copepods. **Aquaculture**, v. 163, p. 235–248, 1998.

MOORHEAD, J. A.; ZENG, C. Breeding of the forktail blenny *Meiacanthus atrodorsalis*: broodstock management and larval rearing. **Aquaculture**, v. 318, p. 248–252, 2011.

NÆSS, T.; LIE, Ø. A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., juveniles: the role of diet. **Aquaculture Research**, v. 29, n. 12, p. 925–934, 1998.

QIN, J. G.; FAST, A. W. Food selection and growth of young snakehead *Channa striatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 21–25, 1997.

SAZIMA, I; GASPARINI, J. L.; MOURA, R. L. *Gramma brasiliensis*, a new basslet from the western South Atlantic (Perciformes: Grammatidae). **Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**, v. 3, n. 1, p. 39–43, 1998.

SHIROTA, A. Studies on the mouth size of fish larvae. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**. v. 36, p. 353–368, 1970.

WITTENRICH, M. L.; TURINGAN, R. G. Linking functional morphology and feeding performance in larvae of two coral-reef fishes. **Environmental biology of fishes**, v. 92, n. 3, p. 295–312, 2011.

ZENG, C., et al. The importance of copepods as live feed for larval rearing of the green mandarin fish *Synchiropus splendidus*. **Aquaculture**, v. 491, p. 65–71, 2018.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Para fins de reprodução em cativeiro, *G. brasiliensis* deve ser mantido em pares devido ao comportamento agressivo intenso quando em haréns de três peixes. Além disso, pares mantidos em aquários de 70 L demonstraram maior agressividade quando comparados aos pares mantidos em aquários de 110 L e tanques maiores.

Das macroalgas testadas, apenas as do gênero *Chaetomorpha* foram utilizadas para preparação de ninhos. Todos os materiais sintéticos foram aceitos, indicando sua viabilidade.

O comportamento de corte de *G. brasiliensis* em cativeiro foi descrito pela primeira vez e foi semelhante ao verificado para *G. loreto* em habitat natural - “U-turn com corpo tremendo”.

Este trabalho descreveu pela primeira vez a desova, ovos e larvas do *G. brasiliensis* em cativeiro. Seis eventos de desova produziram massas de ovos contendo de 27 a 950 ovos. Os ovos são esféricos, com diâmetro médio de 1,0 mm e mantidos juntos por filamentos emaranhados nas projeções coriônicas. Larvas eclodiram com média de 3,55 mm de comprimento padrão, olhos bem desenvolvidos, saco vitelino totalmente absorvido, bexiga natatória inflada e boca aberta medindo 0,44 mm de abertura máxima média e 0,38 mm de largura média.

Estas informações são importantes para o desenvolvimento de um protocolo de reprodução e larvicultura da espécie.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho com *Gramma brasiliensis* em cativeiro pode ser desafiador, principalmente por questões tratadas nesta tese, como agressividade e dificuldade na obtenção de desovas. Além disso, um problema recorrente enfrentado desde 2017 no LAPOM foi a mortalidade de reprodutores (n= 12) de *G. brasiliensis* devido a uma doença ainda não identificada, que acomete internamente a região oral e branquial, com o desenvolvimento exagerado de uma massa tecidual, impossibilitando a alimentação do animal e dificultando a ventilação branquial. Lâminas histológicas contendo as massas de tecido e órgãos dos indivíduos foram preparadas e estão sendo analisadas para futura descrição em literatura especializada.

No ano de 2019, uma tentativa de larvicultura de *G. brasiliensis* ocorreu nas instalações do LAPOM, com desova cedida pelo produtor Ivan Oliveira (Piscicultura Tanganyika). Devido à baixa eclosão e elevada mortalidade, não foi possível a realização de um experimento. Entretanto, cinco indivíduos sobreviveram e alcançaram a fase adulta. Destes, dois casais foram formados e constituem parte do plantel de reprodutores atualmente.

A idade de primeira maturação sexual de indivíduos nascidos em laboratório é uma informação valiosa sobre a biologia reprodutiva da espécie e de interesse para produtores. Com relação aos dois casais nascidos no LAPOM em 2019, foi verificado que a partir de 20 meses do nascimento dos mesmos, ambos os casais desovaram, indicando que a maturação sexual já havia sido atingida.

Em meados de 2021, além da larvicultura que foi descrita no Capítulo três desta tese, outro experimento foi realizado. O objetivo foi avaliar possíveis melhorias no desempenho das larvas de *G. brasiliensis* nos dez primeiros dias com utilização do copépode *Parvocalanus crassirostris* em complementação dos rotíferos. Os resultados demonstraram aumento do crescimento e pigmentação das larvas e serão descritos em artigo futuro.

As informações fornecidas pelo presente estudo orientam a produção do *G. brasiliensis* para a manutenção de reprodutores em pares, sugere volumes mínimos de aquários e tanques a serem utilizados a fim de reduzir a agressividade e demonstra a possibilidade da utilização de materiais sintéticos e macroalgas do gênero *Chaetomorpha* para nidificação. Além disso, foi apresentado o comportamento de corte dos machos e diversas respostas das fêmeas e foram brevemente descritas as desovas, ovos e larvas, com informações de tamanho de boca. Dados não inseridos na tese, mas que serão brevemente disponibilizados em literatura especializada, sugerem que a larvicultura deve incluir copépodes para otimizar o desempenho

das larvas. Próximos artigos podem avaliar períodos adequados de mudança de presas e início do fornecimento de rações de desmame.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ALBUQUERQUE-FILHO, A. C. Análise dos dados biológicos e comerciais de peixes ornamentais no Brasil/Fortaleza. **Dissertação de Mestrado, Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 93, 2003.**
- ASOH, K. Reproductive behavior and Mating System of the Fairy Basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 4, p. 1037–1044, 1996.
- ASOH, K.; SHAPIRO, D. Y. Bisexual juvenile gonad and gonochorism in the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 1, p. 22–31, 1997.
- ASOH, K.; YOSHIKAWA, T. Nesting behavior, male parental care, and embryonic development in the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 1, p. 1–8, 1996.
- BAENSCH, F. U.; TAMARU, C. S. Captive hybridization of two geographically isolated pygmy angelfish species, *Centropyge fisheri* and *Centropyge resplendens*. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2571–2584. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Aquicultura e Pesca – MAPA/SAP (2021). Portaria nº 387, de 9 de setembro de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sap/mapa-n-387-de-9-de-setembro-de-2021-343816380>
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (2004). Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de maio.
- CHEN, J. Y. et al. Recent advances of marine ornamental fish larviculture: broodstock reproduction, live prey and feeding regimes, and comparison between demersal and pelagic spawners. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1518–1541, 2020.
- DHERT P. et al. Possible applications of fish larviculture technology to ornamental fish production. **Aquarium Sciences and Conservation**, v. 1, p. 119–128, 1997.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/37829679/brasil-e-13-na-exportacao-de-peixes-ornamentais>. Acesso em: 08 de nov. de 2021.
- EVERS, H. G.; PINNEGAR, J. K.; TAYLOR, M. I. Where are they all from? – sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. **Journal of Fish Biology**, v. 94, p. 909–916, 2019.
- FLOETER, S. R. et al. Reef fish community structure on coastal islands of the southeastern Brazil: the influence of exposure and benthic cover. **Environmental Biology of Fishes**, v. 78, n. 2, p. 147–160, 2007.

- FREEMAN, S.; ALEVIZON, W. Aspects of territorial behavior and habitat distribution of the fairy basslet, *Gramma loreto*. **Copeia**, v. 3, p. 829–831, 1983.
- GASPARINI, J. L. et al. Marine ornamental trade in Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 14, n. 12, p. 2883–2899, 2005.
- GUTIÉRREZ, L. P.; BÁEZ-HIDALGO, M. Reproducción y alimentación del loreto *Gramma loreto* Poey, 1868 (Pisces, Grammatidae), en la costa norte de la Habana, Cuba. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 23, n. 3, p. 195–201, 2002.
- HU, J. et al. Feeding and development of warm water marine fish larvae in early life. In: **Emerging Issues in Fish Larvae Research**, Springer, Cham, p. 275–296, 2018.
- KINDINGER, T. L. Symmetrical effects of interspecific competition on congeneric coral-reef fishes. **Marine Ecology Progress Series**, v. 555, p. 1–11, 2016.
- LEITE, J. R. 2013. **Biologia reprodutiva e etologia de *Gramma brasiliensis* Sazima, Gasparini & Moura, 1998**. Ph.D. Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil10.13140/RG.2.1.3165.2244
- LEITE, J. R. et al. Rediscovering hermaphroditism in Grammatidae with the description of the testicular gland in Brazilian Basslet *Gramma brasiliensis*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 743–749, 2016.
- LEITE, J. R. et al. Bird-like complex nesting behaviour by the Brazilian-endemic reef fish *Gramma brasiliensis*. **Marine and Freshwater Research**, v. 69, n. 6, p. 982–986, 2018.
- MOLINA, W. F. et al. Chromosomal differentiation and speciation in sister-species of Grammatidae (Perciformes) from the Western Atlantic. **Helgoland Marine Research**, v. 66, n. 3, p. 363–370, 2012.
- MONTEIRO-NETO, C. et al. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State, northeast Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 12, n. 6, p. 1287–1295, 2003.
- OLIVIER, K. World trade in ornamental species. **Marine ornamental species–Collection, culture & conservation**, p. 49–63, 2003.
- OLIVOTTO, I. et al. Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory”. **General and comparative endocrinology**, v. 245, p. 116–121, 2017.
- OLIVOTTO, I. et al. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 2, p. 135–166, 2011.
- PALMTAG, M. R. The marine ornamental species trade. **Marine ornamental species aquaculture**, p. 3–14, 2017.
- POUIL, S. et al. Aquaculture of marine ornamental fish: overview of the production trends and the role of academia in research progress. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1217–1230, 2020.

SAMPAIO, C. L. S.; ROSA, I. L. Comércio de peixes ornamentais marinhos na Bahia: passado, presente e futuro. **Boletim da SBI**, n. 71, 2003.

SAZIMA, I.; GASPARINI, J. L.; MOURA, R. L. *Gramma brasiliensis*, a new basslet from the western South Atlantic (Perciformes: Grammatidae). **Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**, v. 3, n. 1, p. 39–43, 1998.

TLUSTY, M. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. **Aquaculture**, v. 205, n. 3-4, p. 203–219, 2002.

WABNITZ, C. **From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species**. UNEP/Earthprint, 2003.

WITTENRICH, M. L. **The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes: Mating, Spawning & Rearing Methods for Over 90 Species**. TFH Publications, Incorporated, 2007.

WITTENRICH, M. L.; TURINGAN, R. G. Linking functional morphology and feeding performance in larvae of two coral-reef fishes. **Environmental biology of fishes**, v. 92, n. 3, p. 295–312, 2011.

WOOD, E. **Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies**. Marine Conservation Society, Herefordshire, UK, 2001.

YÚFERA, M.; DARIAS, M. J. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 53–63, 2007.

7 APÊNDICE



Figura 11: Sistema de recirculação com unidades de 3 L montado para larvicultura de *Gramma brasiliensis* em 2019. Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 12: Sistema com incubadora de ovos e água verde utilizado para larvicultura de *G. brasiliensis* descrita no capítulo três desta tese. Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 13: Massa de tecido removido da boca de um exemplar adulto de *G. brasiliensis*. Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 14: Sistema de recirculação utilizado para experimento de larvicultura de *G. brasiliensis* com utilização de rotíferos e copépodes. Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 15: *G. brasiliensis* com 10 DAE alimentados apenas com rotíferos (*Brachionus rotundiformes*) enriquecido com Algamac 3050[®] (Aquafauna, EUA), na densidade de 10 mL⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 16: *G. brasiliensis* com 10 DAE alimentados com rotíferos (*Brachionus rotundiformes*) enriquecido com Algamac 3050[®] (Aquafauna, EUA), na densidade de 8 mL⁻¹ e copépode *Parvocalanus crassirostris* na densidade de 2 mL⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor.

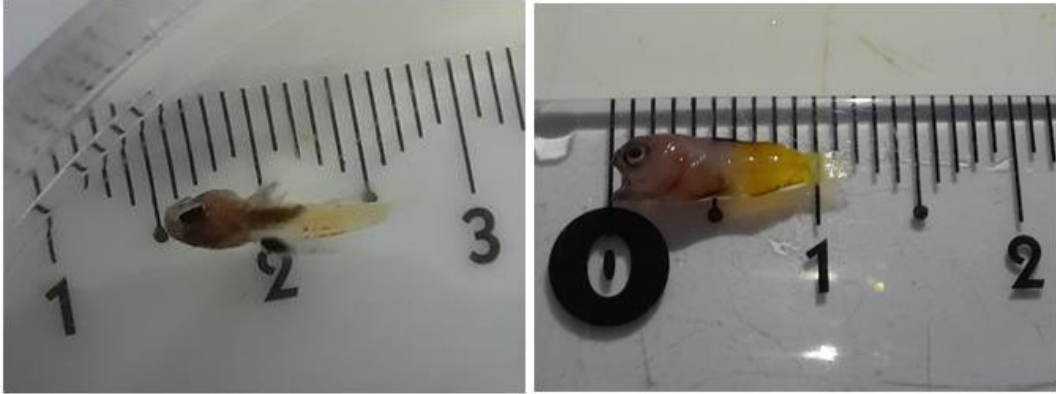


Figura 17: *G. brasiliensis* com 25 dae (esquerda) e 33 dae com metamorfose completa (direita).
Fonte: Elaborado pelo autor.