

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL)

Amanda Vaccani do Carmo

Biofluorescência no cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933: uma abordagem  
para a espécie e seu uso durante eventos de corte

Rio de Janeiro

2020

Amanda Vaccani do Carmo

Biofluorescência no cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933: uma abordagem para a espécie e seu uso durante eventos de corte

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências biológicas, área de concentração: Biodiversidade Neotropical.

Orientador: Dr. Luciano Neves dos Santos

Coorientador(a): Dra. Natalie Villar Freret-Meurer

Rio de Janeiro

2020

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

V Vaccani do Carmo, Amanda  
Biofluorescência no cavalos-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933: uma abordagem para a espécie e sua funcionalidade durante eventos de corte / Amanda Vaccani do Carmo. -- Rio de Janeiro, 2020.  
35

Orientador: Luciano Neves dos Santos.  
Coorientadora: Natalie Freret-Meurer.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

1. Comportamento Animal. 2. Comunicação Intraespecífica. 3. Biofluorescência. I. Neves dos Santos, Luciano, orient. II. Freret-Meurer, Natalie, coorient. III. Título.

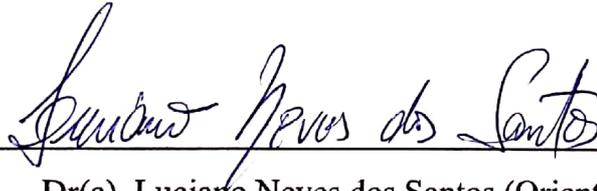
Amanda Vaccani do Carmo

**BIOFLUORESCÊNCIA NO CAVALO-MARINHO HIPPOCAMPUS REIDI  
GINSBURG 1933: UMA ABORDAGEM PARA A ESPÉCIE E SUA  
FUNCIONALIDADE DURANTE EVENTOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 09 de março de 2020.

**Banca Examinadora**



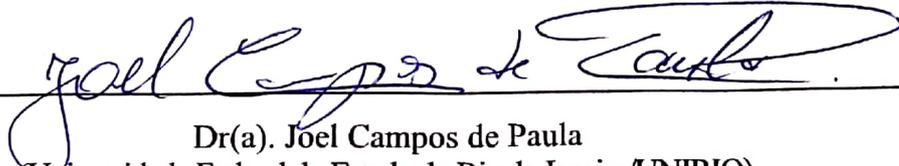
---

Dr(a). Luciano Neves dos Santos (Orientador)  
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)



---

Dr(a). Maria Alice dos Santos Alves  
(Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ)



---

Dr(a). Joel Campos de Paula  
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)

Dedico este trabalho aos meus pais, Nilton M. Rocha do Carmo e M. Lucia Vaccani do Carmo.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Dr. Luciano Neves dos Santos pelo apoio e confiança durante o desenvolvimento dessa pesquisa, pela oportunidade de ampliar meu conhecimento em outras atividades, e por toda contribuição ao longo desse trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Natalie Freret-Meurer por estar ao meu lado e ser fundamental durante toda minha trajetória acadêmica, por todo incentivo e confiança, me fazendo crescer a cada dia como pessoa e profissional, sendo um exemplo de dedicação, e por tudo que construímos ao longo desses dez anos.

Ao Dr. Áthila Bertoncini Andrade pela parceria, por toda orientação e apoio durante os experimentos, e por tantos ensinamentos fotográficos que tanto admiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro pela oportunidade de elaboração deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro pelas contribuições na minha formação acadêmica.

À Universidade Santa Úrsula e ISBio pelo apoio logístico.

À equipe do Laboratório de Comportamento Animal e Conservação - USU pelo auxílio durante os experimentos, por participarem de tantos campos e pelo companheirismo durante esses anos, em especial à Gabriela Cabiró, Eduarda Fialho, Victor Braga e Lucas Cayo.

À equipe do Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada - UNIRIO, em especial Marcela Rosa, Joice Silva e Vanessa Bettcher por dividirem tantos momentos importantes, e conquistas ao longo desse período, me ajudando sempre que preciso e compartilhando tantos momentos difíceis, tornando a rotina mais leve.

À Ana Clara Franco, por toda paciência e dedicação, além de todos os ensinamentos durante esse período. Por dividir a rotina, os momentos de desespero, de conquistas e me mostrando que a estatística não é um bicho de sete cabeças.

À Tatiane Fernández por dividir comigo o dia a dia, por me acompanhar em todos os campos, me apoiando e acreditando em mim sempre. Obrigada por ser incansável em todos os campos, por estar ao meu lado em todas as derrotas e vitórias.

À Nayara Okada por mesmo com a correria do dia a dia estar sempre presente, me incentivando em todas as minhas escolhas, torcendo pelo meu crescimento e compartilhando momentos bons e ruins.

Aos meus pais Nilton M. Rocha do Carmo e M. Lucia Vaccani do Carmo pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado e por todo apoio em minhas escolhas profissionais e pessoais.

À minha família e amigos por todo apoio e incentivo em seguir o caminho que escolhi.

Aos meus colegas de turma, pelo companheirismo, incentivo e convivência dividindo todos os momentos ao longo do curso.

Ao Dr. Marcelo Prim pelos equipamentos utilizados para os experimentos.

## Resumo

O ambiente marinho apresenta um domínio visual restrito devido às suas características luminosas. Em áreas mais profundas os longos comprimentos de onda são rapidamente absorvidos, prevalecendo o espectro monocromático azul. Nas áreas costeiras a intensidade luminosa também é restrita, principalmente em estuários e baías tropicais devido à presença de material particulado em suspensão. A biofluorescência, que é a capacidade de organismos absorverem luz em um determinado comprimento de onda e refleti-lo em comprimentos de onda diferentes, vem sendo identificada como um recurso de comunicação para diversas espécies marinhas. Neste trabalho investigamos a existência de biofluorescência em ambiente natural e controlado nos cavalos-marinhos de *Hippocampus reidi*, além de testar experimentalmente esse mecanismo de comunicação durante a corte. Os indivíduos foram submetidos à iluminação específica e registrados com câmera fotográfica acoplada à um filtro amarelo. A biofluorescência foi confirmada, pela primeira vez, para a espécie em diferentes fases da vida, sendo registrada nas colorações verde e vermelha para os indivíduos adultos e juvenis em ambiente natural e em laboratório, onde a coloração vermelha foi exibida em todo o corpo, e a coloração verde foi registrada principalmente na área dos olhos. Já os alevinos apresentaram uma variação da coloração da biofluorescência, exibindo apenas o verde, localizado nos olhos e estômago desses animais. As partes do corpo (cabeça e tronco) estão altamente correlacionadas para machos ( $r = 0,88$ ;  $p < 0,0001$ ) e fêmeas ( $r = 0,90$ ;  $p < 0,0001$ ), não existindo destaque para nenhuma parte do corpo responsável pela sinalização durante o contexto de corte. Não foi encontrada uma variação significativa entre sexos ( $F = 7,870$ ;  $p = 0,09$ ), nem entre os indivíduos submetidos ao tratamento e ao controle ( $F = 0,714$ ;  $p = 0,40$ ), indicando que possivelmente a biofluorescência não é utilizada para a corte da espécie *H. reidi*, e sugere-se que seja utilizada em outros contextos, como a camuflagem.

Palavras-chaves: Comportamento; corte; biofluorescência; peixes recifais; Syngnathidae

## Abstract

Marine environments have restricted visual layers regarding light characteristics. Overall, blue monochromatic spectrum prevails in offshore areas, since long wavelengths are quickly attenuated. Light intensity is even more constrained in coastal waters, particularly those of tropical estuaries and bays, because further scattering through dissolved and suspended materials. The biofluorescence, which is the organisms ability to absorb light and reflect it in a different wavelength. This ability has been used by several marine species for communication. In this study, we investigated the longsnout seahorses *Hippocampus reidi* biofluorescence exhibition in the field and controlled environment, as well as the biofluorescence during the courtship, experimentally. The individuals were submitted to specific lighting and recorded with a camera attached to a yellow filter. Biofluorescence was confirmed, for the first time, for this species at different stages of life, being recorded in green and red colors for adults and young in the natural habitat and laboratory. The red color was displayed throughout the body, and the green color was recorded mainly in the eye. The fry showed a biofluorescence variation, showing only green color, located in their eyes and stomach. The body parts (head and trunk) were highly correlated for males ( $r=0.88$ ;  $p<0.0001$ ) and females ( $r=0.90$ ;  $p<0.0001$ ). There was no emphasis on any part of the body responsible for signaling during the courtship. No significant variation was found between genders ( $F=7.870$ ;  $p=0.09$ ), neither between treatment and control ( $F=0.714$ ;  $p=0.40$ ), indicating possibly, the biofluorescence was not used to *Hippocampus reidi* courtship, and is suggested, this ability could be used in other contexts, such as camouflage.

Key words: behavior, courtship, biofluorescence, reef fish, Syngnathidae

## Lista de Figuras

Cap. 1 Figura 1: Localização onde os cavalos-marinhos foram coletados (círculo) e observados em ambiente natural (quadrado) .....	15
Cap. 1 Figura 2: <i>Hippocampus reidi</i> exibindo biofluorescência verde e vermelha em laboratório (A) e em ambiente natural (B). Cavalo-marinho macho com of 101 mm (A) exibindo pontos de biofluorescência verde na cabeça e tronco, enquanto macho de cavalo-marinho (B) 123 mm, exibe estrias de biofluorescência verde em áreas da cabeça e tronco. Biofluorescência verde nos olhos de indivíduos no laboratório (C) e em ambiente natural (D). Cavalos-marinhos com dois dias de vida sem exibir biofluorescência (E, F). Indivíduo jovem 43mm, exibindo biofluorescência vermelha (G). O mesmo indivíduo com coloração laranja sob iluminação de luz natural (H) .....	16
Cap. 1 Figura 3: Percentual de cobertura das diferentes colorações nas partes do corpo de indivíduos adultos em laboratório .....	17
Cap. 1 Figura 4: Percentual de cobertura das diferentes colorações nas partes do corpo de indivíduos juvenis em laboratório .....	18
Cap. 2 Figura 1: Localização de coleta dos indivíduos de <i>Hippocampus reidi</i> . Praia da Urca (Quadrado) e Praia da Raposa e Tapera Círculo) .....	24
Cap. 2 Figura 2: Duração (s) dos comportamentos mais exibidos por machos e fêmeas <i>Hippocampus reidi</i> durante o tratamento.....	25
Cap. 2 Figura 3: Duração (s) dos comportamentos exibidos por machos e fêmeas <i>Hippocampus reidi</i> durante o controle.....	25
Cap. 2 Figura 4: Correlação de <i>Pearson</i> da biofluorescência vermelha entre partes do corpo de machos do cavalo-marinho <i>H. reidi</i> .....	29
Cap. 2 Figura 5: Correlação de <i>Pearson</i> da biofluorescência vermelha entre partes do corpo de fêmeas do cavalo-marinho <i>H. reidi</i> .....	30
Cap. 2 Figura 6: Escalonamento Multidimensional Não Métrica analisando a biofluorescência vermelha nos cavalos-marinhos <i>H. reidi</i> machos e fêmeas dos experimentos de tratamento e controle .....	30

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>10</b>
<b>Introdução Geral</b> .....	<b>12</b>
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>13</b>
Abstract .....	13
Introduction .....	13
Materials and Methods .....	14
Results .....	16
Discussion .....	19
References .....	20
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>22</b>
Introdução .....	22
Material e Métodos .....	23
Resultados .....	26
Discussão .....	31
Conclusão .....	33
Referências Bibliográficas .....	33
<b>Conclusões Gerais</b> .....	<b>35</b>
<b>Referências</b> .....	<b>36</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O ambiente marinho possui características luminosas que o tornam diferenciado de outros ambientes. Os componentes da luz solar, vermelho, laranja, amarelo e verde são seletivamente removidos com o aumento da profundidade, resultando em uma faixa estreita, quase monocromática, de luz azul entre 470 e 480 nm (Sparks et al., 2014). As áreas costeiras marinhas ainda são submetidas a outras condições que podem limitar a qualidade luminosa até mesmo a profundidades menores que 10 metros, como por exemplo, a quantidade de material dissolvido e em suspensão, os quais podem alterar, filtrar ou refletir determinados comprimentos de ondas (Kirk, 2011). Essas características favorecem a utilização da biofluorescência para diversas funcionalidades.

A biofluorescência já foi registrada em diversas espécies, porém para peixes marinhos é particularmente importante pois são animais visuais, onde muitos possuem filtros intra-oculares amarelos que poderiam melhorar a percepção dessa coloração no oceano (Sparks et al., 2014). A fluorescência pode ser um mecanismo adequado para gerar uma fonte de luz vermelha local em habitats marinhos desprovidos de longos comprimentos de onda (Michielis et al., 2008). Na maioria dos organismos estudados as funções da biofluorescência não são bem compreendidas, no entanto tem sido sugerido que funcione como um sinal visual na comunicação entre indivíduos da mesma espécie (Arnold et al., 2002; Mazel et al., 2004; Lim et al., 2007).

A biofluorescência foi registrada para representantes da família Syngnathidae, incluindo diversas espécies de peixe cachimbo e cavalos-marinhos (Michiels et al, 2008, Sparks et al., 2014; Brauwer et al., 2018; Vaccani et al., 2019). Esses animais são conhecidos principalmente por sua mudança de coloração para camuflagem e comunicação intraespecífica (Lourie et al., 1999).

O presente trabalho teve o objetivo de verificar se o cavalo-marinho *Hippocampus reidi* produz biofluorescência em ambiente natural e em cativeiro em diferentes fases da vida e avaliar se esse processo é utilizado durante o processo de corte desses animais.

Acredita-se que indivíduos de *H. reidi* produzem biofluorescência no mesmo padrão em todas as fases da vida, em ambiente natural e em cativeiro, além de exibirem maior área corporal com biofluorescência durante a corte.

Capítulo 1– Publicado em: PLOS ONE, Agosto, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220561>

## **Shining in the dark: first record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi***

Amanda C. Vaccani<sup>1,2,#a,\*</sup>, Natalie V. Freret-Meurer<sup>2,#a</sup>, Áthila A. Bertoncini<sup>1,#b</sup>, Luciano N. Santos<sup>1,#b</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ecologia e Recursos Marinhos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>#a</sup> Current Address: Laboratório de Comportamento Animal e Conservação, Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>#b</sup> Current Address: Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\* Corresponding autor:

E-mail: [amandavaccani@hotmail.com](mailto:amandavaccani@hotmail.com) (ACV)

### ABSTRACT

Marine environments are visual domains restricted regarding light characteristics. Overall, blue monochromatic spectrum prevails in offshore areas especially below 15m depth, since long wavelengths are quickly attenuated. Light intensity is even more constrained in coastal waters, particularly those of tropical estuaries and bays, because further scattering through dissolved and suspended materials. Biofluorescence, which is the ability of organisms to absorb light and reflect it in a different wavelength, has been reported for many marine fish. In this paper, biofluorescence was recorded for the first time for the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*, under natural conditions at Ilha Grande bay, Brazil, and both adult, juvenile and fry individuals kept in captivity. Although displaying the same colour emissions, seahorses differed in relation to body lighting, colour patterns, and age wherein fluorescence occurs. Newborn seahorses exhibit green biofluorescence only in the eyes and stomach. Further experiments are necessary to address whether *H. reidi* can change the patterns of biofluorescence emission for sensorial and social purposes.

### INTRODUCTION

Marine environment has visually restricted domain when compared to terrestrial environments. Overall, blue monochromatic spectrum prevails in offshore areas, especially below 15m depth, since long wavelengths within the red-orange range are quickly attenuated by saltwater in shallower layers. Light intensity is even more constrained in coastal waters, particularly those of tropical estuaries and bays, because further scattering through dissolved and suspended materials [1]. Consequently, many species living in these systems display

particular mechanisms, such as biofluorescence, which might contribute for sensorial and social functions during lighting restrictive conditions [2].

Biofluorescence is the absorption of electromagnetic radiation at a specific wavelength, followed by their resubmission at a longer or shorter wavelength [3]. Biofluorescence occurrence has been largely reported, both for terrestrial and marine animals, but there is still little information about its functionality, although it is probably related to intraspecific communication [4,5] and camouflage [3]. This phenomenon has been reported for several marine organisms, especially invertebrates and fish [5,6,7,8], but its occurrence for tropical marine fish at natural conditions remains barely known.

Among reef fishes, seahorses (Syngnathidae family), are widespread in tropical and subtropical waters, and 42 species are currently known [9,10]. Three species are recorded in Brazil, the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933, the shortsnout seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810, and the most recently described Patagonian seahorse *Hippocampus patagonicus* Piacentino and Luzzatto, 2004. Although *H. reidi* is the most common seahorse species in Brazil, it has been regarded as *vulnerable* by the List of Threatened Species of the Brazilian Ministry of the Environment [11] and as *near threatened* by the Red List of the International Union for Conservation of Nature [12].

Worldwide, biofluorescence was recently reported for the Syngnathidae family, and only to four seahorse species, *H. erectus*, *Hippocampus zosterae* Jordan and Gilbert, 1882 [3], *Hippocampus bargibanti* Whitley, 1970 and *Hippocampus denise* Lourie and Randall, 2003 [13]. The present study aimed to check for biofluorescence in the seahorse *H. reidi* in both natural and captivity, describing its colour and body location. Potential implications on sensorial and social functions are briefly discussed.

## MATERIALS AND METHODS

Experiments in captivity were conducted with *H. reidi* captured in natural environment. Five *H. reidi* were caught (SISBio license code 56695-1) in February 2018 by a snorkeling diver on the rocky shores of Urca beach (22° 56'33 "S - 043° 09'27" W), Guanabara bay, Rio de Janeiro, Brazil (Fig 1). All animals ( $n=6$ ) used in experiments were returned to the same natural catch area, and there was no death of any individual. They were stored alive in plastic bags with salt water and carried to the Laboratory of Animal Behavior and Conservation, at Santa Ursula University, Rio de Janeiro. They were acclimatized for three days in aquarium at constant water conditions (Table 1). Twenty-four hours before each

experiment, the animals were cleaned manually, through softly friction with fingers, and then macroscopically checked to exclude any sign of epiphytes in the animal's body.

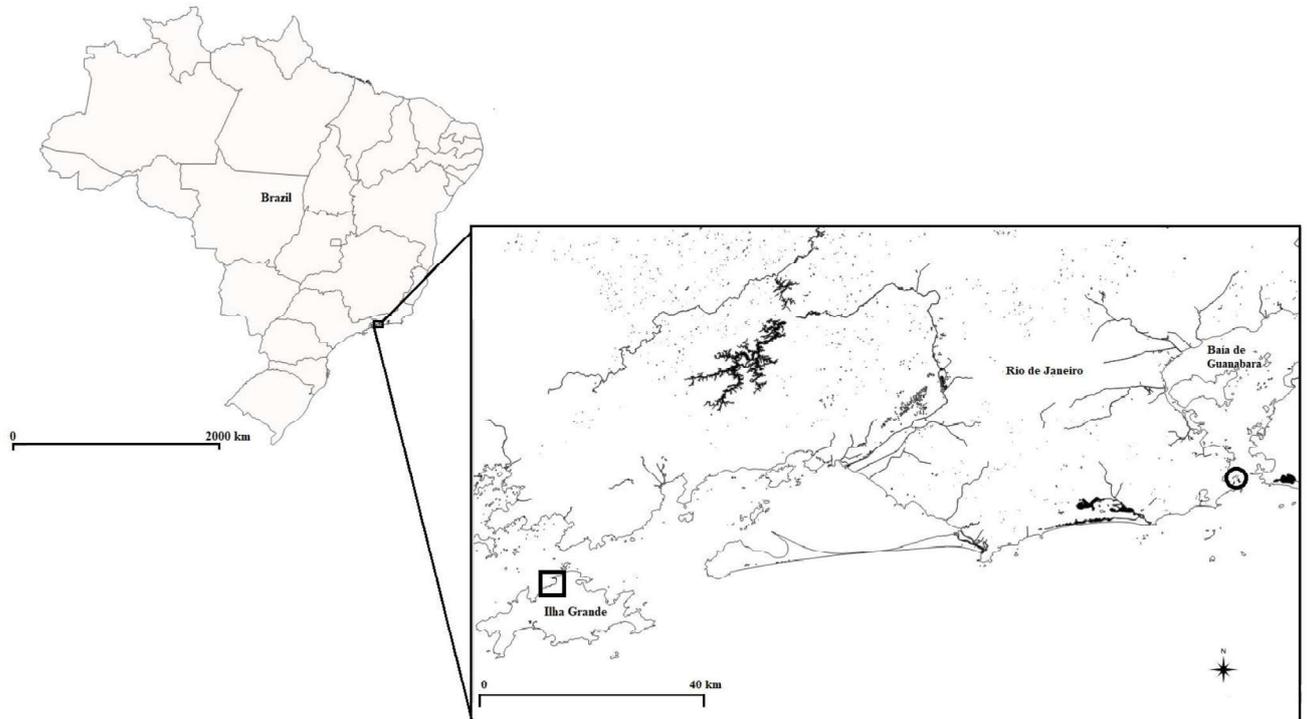


Fig 1. Locations where seahorses were collected (circle) and observed in the wild (square).

This study was approved by the Ethics Committee on the use of Animals (CEUAUSU00004) and followed the ‘Ethical Principles in Animal Research’ guidelines adopted by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA).

Experiments were conducted with two females, one male *H. reidi*, and two juveniles stocked in 80L-aquarium filled with saltwater. During the experiments seahorses were kept alone in the aquarium in complete darkness, lightened only by the Night Sea excitation (royal blue exposure: ~450 nm), with a yellow barrier filter that completely blocks the reflected excitation of 440–460nm wavelengths. The biofluorescence was recorded by a Canon EOS 5D mark IV camera and a Canon EF 100mm *f*/2.8LIS USM Macro lens.

A second experiment was performed using another pregnant male captured in September 2018 in Urca beach, Guanabara bay. The adult *H. reidi* was inspected for the occurrence of biofluorescence, and then the newborn seahorses were assessed during two days from their birth. The same aquarium conditions and equipment were used in this experiment, which occurred in October 2018.

Biofluorescence was registered in the field by two scuba divers between 6:00 and 9:00 pm on the rocky shores of Bananal beach (23°06'28.24" S e 44°14'57.16" W), Ilha Grande bay, in March 2018 (Fig 1). Three (two female and one male) individuals found in field were photographed with the same equipment used in laboratory.

The biofluorescence was qualified through the images analysis according to the body parts (head, trunk and tail) and colors displayed. We quantified fluorescence using the PhotoQuad software, where 100 points are randomly cast in each part of the body and classified according to the displayed color.

## RESULTS

In laboratory, all adults and juveniles ( $n=6$ ) showed red and green biofluorescence. Light emissions were observed over the trunk, on both eyes, sides and tail (Fig 2A and C). Green biofluorescence was more evident on the eyes and as small dots all over the body, while red color was found covering all over the head, trunk and tail. This pattern was the same for all but intensity varied among them. Pregnant male also showed the same pattern of biofluorescence found for the other seahorses, both in relation to color emission as for body location of lighting. Some individuals had small green dots on the trunk and tail, but it was not a pattern exhibited by all observed individuals.

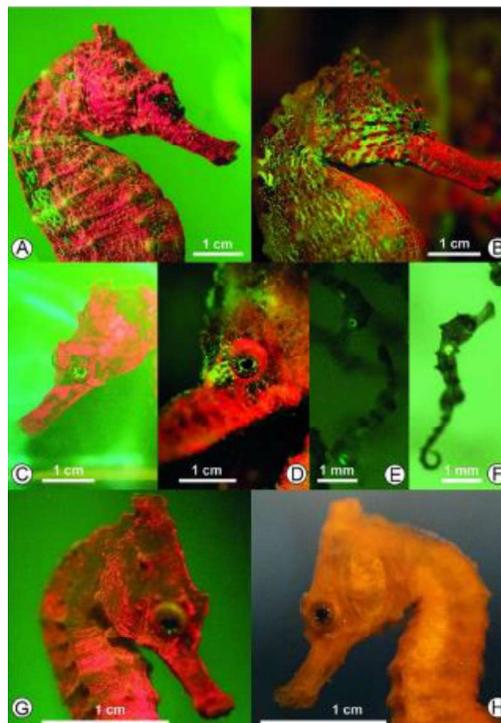


Fig 2. *Hippocampus reidi* exhibiting biofluorescence in green and red spectrum in laboratory (A) and field (B) conditions. Male seahorses of 101 mm (A) shows dots of green biofluorescence in the trunk

and head areas, while male seahorse (B) 123 mm, shows stripes of green biofluorescence in the trunk and head areas. Biofluorescence lighting in green spectrum in the eyes in laboratory (C) and field (D) conditions. Two-day-old seahorses showing no biofluorescence (E, F). A young seahorse, 4.3cm, exhibits mostly red biofluorescence under exciting light (G). The same individual is depicted in orange under natural white light (H). Photos: AAB.

Adult individuals had a higher percentage of red fluorescence both on the head (65.5%) and on the trunk (64.5%). The green color was only displayed on the head (2.3%) and the tail was 100% red (Fig 3). Other parts on the head and trunk presented no biofluorescence with 32.3% and 35.5% cover, respectively.

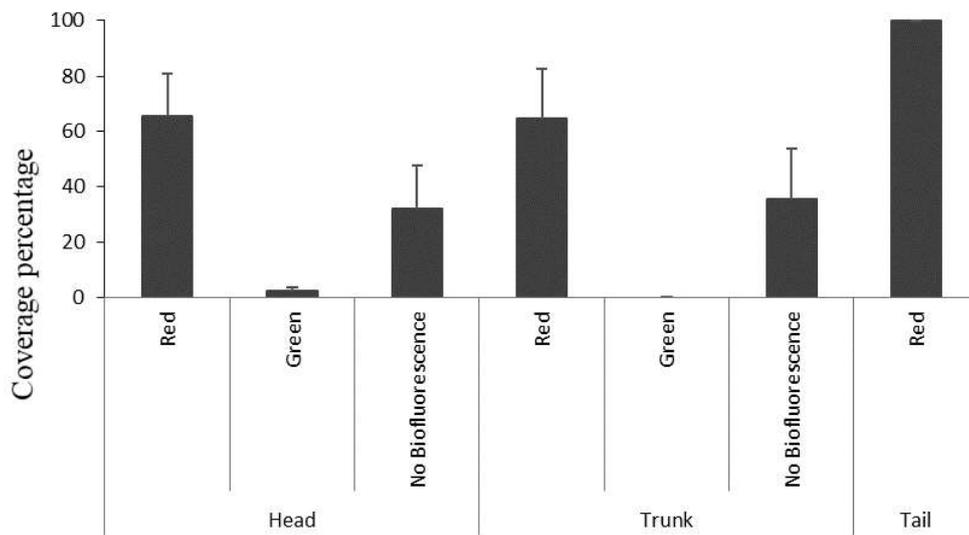


Fig 3. Percentage of color cover on body parts in adult individuals in laboratory.

The biofluorescence was not quantified for the individuals observed in the field, because they grasped on the holdfast and hid part of their body becoming impossible to analyze it in the images, therefore we only qualified according to the body part and coloration displayed.

Two young individuals were analyzed, which presented the major part of the body with red biofluorescence (head – 96,5%; trunk – 96%; tail – 100%) (Fig 4). Green fluorescence has only been observed on the eyes.

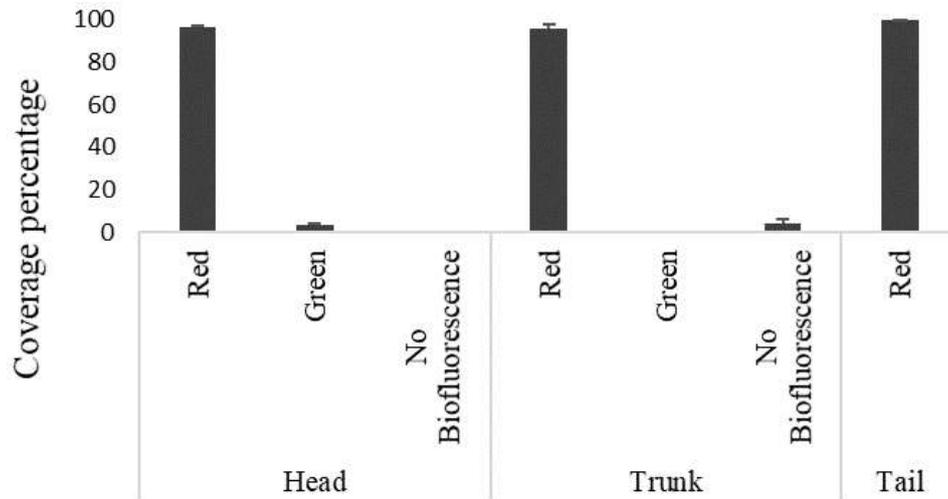


Fig 4. Percentage of color cover on body parts in juveniles individuals in laboratory.

Biofluorescence was recorded for all the 1.830 newborn seahorses, with green biofluorescence on the eyes and the stomach (Fig 2G). Our results indicate that biofluorescence already is present in the first two days of life in *H. reidi* (Fig 2E, and F).

In the field, three individuals were observed presenting green and red fluorescence as displayed in the laboratory. Green biofluorescence was observed on the eyes, also in the way of stripes along the head and on lateral side of the body of some individuals (Fig 2B). Red biofluorescence was observed throughout the whole *H. reidi* body (Fig 2B, and 1D), however it changed according to the green biofluorescence exhibition. Water characteristics in field were similar to the conditions maintained in the aquariums (Table I).

Table 1. Environmental variables measured during experiments and observations.

<b>Variables</b>	<b>Laboratory</b>	<b>Field</b>
Temperature (°C)	28.0	29.2
Salinity	33.0	33.8
pH	8.1	9.0
Ammonium (ppm)	0	Not measured
Nitrite (ppm)	0	Not measured
Nitrate (ppm)	0	Not measured

## DISCUSSION

Our study was the first to report biofluorescence for the longsnout seahorse *H. reidi* both in nature and captivity. Although displaying the same colour emissions (green and red), seahorses differed in relation to body lighting, colour patterns, and age at which fluorescence occurs. In laboratory, seahorses showed green biofluorescence in head and some individuals showed dots in the trunk, contrasting with seahorses in nature, which showed stripes of green biofluorescence in the trunk and head areas.

Our findings agree with those presented for other four seahorse species (*H. erectus*, *H. zosterae*, *H. bargibant* and *H. denise*) and also pipefish species of the Syngnathidae family, in relation to the occurrence of green and red biofluorescence [13, 14, 7, 3].

Red fluorescence was recorded covering the head, trunk and tail of seahorses in our study. Red fluorescence, ~600 nm of light spectrum, was detected for several marine species [14], but it has been recorded only for a few numbers of fish species [7, 15, 16, 17, 3, 18]. This pattern disagrees partially to Michiels et al.[7], who described red biofluorescence more associated with the head and eyes of several reef fish species, whereas the eyes of *H. reidi* were always lighting with green fluorescence. Michiels et al. [7] suggest that biofluorescence, especially the red spectrum, is related to intraspecific communication. Red fluorescence encompasses a wavelength range largely unavailable within the marine environment, being quickly attenuated with depth, especially in turbid systems, such as tropical bays and estuaries. Seahorses are visual animals, which use coloring in different context, such as courtship and camouflage [19].

According to Sparks et al.[3] in addition to red fluorescence, previously reported in fish associated with shallow reefs, marine fish also exhibit combinations of green, orange and red fluorescence, and some only green coloring, in unique patterns and species specific.

Green biofluorescence was recorded in a lesser extent for seahorses of both natural and captivity, occurring in the eyes of all individuals and as stripes and small dots spread in the trunk. Sparks et al. [3] reported green fluorescence covering the entire body of fishes of other families, contrasting with the patterns found for seahorses in the present study and for *H. bargibant* and *H. denise* [13], especially in relation to the eyes. Green fluorescence has been reported to attract preys in hydromedusa and has an effective result during day light [20]. Considering that *H. reidi* has green fluorescence mainly concentrated on the head, eyes and upper trunk, and it is a diurnal species, it is possible that green fluorescence is related to

prey attraction. Notably, younger individuals showed a very simple color pattern under fluorescence and under natural light conditions.

Our findings suggest thus that *H. reidi* might use biofluorescence as a complementary tool for communication, such as to contrast itself with the sea bottom and interact with other individuals at short distances. However, further studies should be performed to investigate whether this ability is important or not, since biofluorescence has already been detected for newborn seahorses of two-days age.

## REFERENCES

- [1] Kirk JTO. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge: University Press; 2011. 649 p.
- [2] Anthes N, Theobald J, Gerlach T, Meadows MG, Michiels NK. Diversity and Ecological Correlates of Red Fluorescence in Marine Fishes. *Front Ecol Evol.* 2016;4:126. doi: 10.3389/fevo.2016.00126
- [3] Sparks JS, Schelly RC, Smith WL, Davis MP, Tchernov D, Pieribone VA, Gruber DF. The covert World of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. *PLoS One.* 2014;9(1):e83259.
- [4] Arnold KE, Owens IPF, Marshall NJ. Fluorescent Signaling in Parrots. *Science.* 2002;295:92.
- [5] Mazel CH, Cronin TW, Caldwell RL, Marshall NJ. Fluorescent enhancement of signaling in a Mantis shrimp. *Science.* 2004;303:51.
- [6] Haddock SHD, Heine JN. Scientific blue-water diving. CA: California Sea Grant. 2005.
- [7] Michiels N, Anthes N, Hart N, Herler J, Meixner A, Schleifenbaum F, Schulte G, Siebeck U, Sprenger D, Wucherer M. Red fluorescence in reef fish: a novel signalling mechanism? *BMC Ecology.* 2008;8:16.
- [8] Haddock SH, Mastroianni N, Christianson LM. A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum Ctenophora. *Proc Biol Sci.* 2010;277: 1155-1160.
- [9] Lourie SA, Pollom RA, Foster SJ. A global revision of the Seahorses *Hippocampus Rafinesque 1810 (Actinopterygii: Syngnathiformes)*: Taxonomy and biogeography with recommendations for further research. *Zootaxa.* 2016;4146(1):1-66.
- [10] Zhang Y, Qin G, Wang X, Lin Q. A new species of seahorse (Teleostei: Syngnathidae) from the South China Sea. *Zootaxa.* 2016;4170(2):384-392.
- [11] List of Threatened Species of the Brazilian Ministry of the Environment, 2016.

- [12] IUCN – International Union for Conservation of Nature. Red List of Threatened Species. 2010. <http://www.iucnredlist.org/>. Accessed in 13 de setembro de 2018.
- [13] Brauwer M, Hobbs JA, Ambo-Rappe R, Jompa J, Harvey ES, McIlwain JL. Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. *Conservation Biology*. 2018;32:706-715. doi: 10.1111/cobi.13033
- [14] Kalb N, Schneider R, Sprenger D, Michiels N. The red-fluorescing marine fish *Tripterygion delaisi* can perceive its own red fluorescent color. *Ethology*. 2015;121:1–11. doi: 10.1111/eth.12367
- [15] Wucherer MF, Michiels NK. A fluorescent chromatophore changes the level of fluorescence in a reef fish. *PLoS One*. 2012;7:e37913. doi: 10.1371/journal.pone.0037913
- [16] Wucherer MF, Michiels NK. Regulation of red fluorescent light emission in a cryptic marine fish. *Front.Zool.*2014;11:1. doi: 10.1186/1742- 9994-11-1
- [17] Meadows MG, Anthes N, Dangelmayer S, Alwany MA, Gerlach T, Schulte G. Red fluorescence increases with depth in reef fishes, supporting a visual function, not UV protection. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 2014;281:1211. doi: 10.1098/rspb.2014.1211
- [18] Gerlach T, Theobald J, Hart NS, Collin SP, Michiels NK. Fluorescence characterization and visual ecology of pseudocheilimid wrasses. *Front. Zool.* 2016;13:13. doi: 10.1186/s12983-016-0145-1
- [19] Lourie SA, Vincent ACJ, Hall HJ. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse, London; 1999.
- [20] Gruber DF, Loew ER, Deheyn DD, Akkaynak D, Gaffney JP, Smith WL, Davis MP, Stern JH, Pieribone V, Sparks JS. Biofluorescence in Catsharks (Scyliorhinidae): Fundamental Description and Relevance for Elasmobranch Visual Ecology. *Scientific Reports*. 2016;6:1. doi: 10.1038/srep24751

## Capítulo 2.

Relevância da biofluorescência durante interações de corte do cavalo-marinho

*Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933

### INTRODUÇÃO

As interações sociais entre indivíduos são baseadas em troca de informações, o que faz da comunicação uma área essencial do comportamento animal. A comunicação visual possui vantagens por ter propagação instantânea e alta direcionalidade (Bradbury e Vehrencamp, 1998), podendo ser utilizada em diversas situações, como defesa contra predadores, identificação e seleção de parceiros reprodutivos e reconhecimento de indivíduos intraespecíficos (Dusenbery, 1992; Buchanan-Smith, 2005).

As características dessas interações variam de acordo com o ambiente em que são transmitidas. Quando comparado com o ambiente terrestre, o ambiente marinho possui características visuais bem distintas, devido ao seu espectro visual restrito (Sparks, et al., 2014). Essas características favorecem o uso da biofluorescência por diversos organismos, porém seu papel funcional é pouco conhecido.

A biofluorescência é um fenômeno físico ótico bem reportado para muitas espécies marinhas, incluindo vertebrados e peixes (Mazel et al., 2004; Haddock et al., 2005; Michiels et al., 2008; Haddock et al., 2009; Sparks et al., 2014). A descoberta da biofluorescência vermelha em peixes marinhos (Michiels et al., 2008; Sparks et al., 2014) indica que longos comprimentos de onda podem ter uma relevância para a ecologia visual maior do que já se conhece, já que em ambientes marinhos esses longos comprimentos de onda são atenuados com a profundidade e quantidade de material dissolvido em suspensão para áreas costeiras (Kirk, 2011).

Como sugerido por Anthes et al. (2016), a emissão de fluorescência com longos comprimentos de onda diminui rapidamente com a distância em ambientes marinhos. Por isso, acredita-se que determinados comprimentos de onda tenham função de comunicações de curta distância, como corte, territorialismo ou hierarquia social (Sparks et al., 2014).

A coloração corporal desempenha um papel importante na ecologia dos peixes e a biofluorescência já foi descrita para mais de 180 espécies, pertencentes à 50 famílias (Sparks et al., 2014), em diferentes padrões de coloração. Dentre elas, está a família Syngnathidae, com registro de biofluorescência para diversas espécies de peixe cachimbo (Michiels et al.,

2008, Sparks et al., 2014) e cinco espécies de cavalos-marinho (Sparks et al., 2014; Brauwer et al., 2018; Vaccani et al., 2019).

No Brasil ocorrem três espécies de cavalo-marinho, sendo elas *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933, *Hippocampus erectus* Perry, 1810 e *Hippocampus patagonicus* Piacentino e Luzzatto 2004. Apesar de ser a espécie mais abundante no Brasil, o cavalo-marinho *H. reidi*, conhecido como cavalo-marinho-do-focinho-longo, está inserido na categoria *Vulnerável* pela Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e *quase ameaçado* pela Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2010). Os cavalos-marinhos são animais visuais, que utilizam a mudança de coloração para camuflagem e comunicação intraespecífica, tendo como um dos exemplos desse tipo de comunicação, o display de mudança de coloração durante a corte, os quais indicam que os animais estão aptos à reprodução (Lourie et al., 1999).

O objetivo do presente trabalho foi investigar o uso da biofluorescência por indivíduos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* durante a corte.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A baía de Guanabara é um estuário tropical (Valentin et al., 1999) localizado na cidade do Rio de Janeiro sob as coordenadas 22°24' e 22°57' S e 042°33' e 043°19' W. Os padrões de precipitação encontrados na região e as variações de maré influenciam diretamente na qualidade de sua água. Este estuário apresenta sérios problemas de poluição e eutrofização, nos quais o primeiro sinal de deterioração é a pouca transparência das águas (SEA/UEPSAM, 2012).

A baía de Sepetiba localiza-se ao sul do estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22°54' e 23°04' S e longitude 43°33' e 44°02' W, com uma área total de aproximadamente 447 Km<sup>2</sup>, e possui profundidade média de 6m (Cunha, 2006). É um ambiente costeiro, com elevada produtividade, sendo importante para o estabelecimento de diversas espécies marinhas e por receber fluxos continentais e marinhos (Silva filho, 2015). Apresenta-se limitada ao sul pela Restinga e Ilha da Marambaia, a nordeste pela Baixada de Sepetiba e a Noroeste pelas Ilhas da Madeira, de Itacuruçá, de Jaguanum e diversas outras ilhotas.

Os cavalos-marinhos foram coletados através de mergulho livre, na praia da Urca ( $n= 52$ ), situada no lado oeste da baía de Guanabara (Sola e Paiva, 2001) sob as coordenadas 22°56'33,71" S - 43°09'27,77" W, e nas praias da Raposa ( $n = 2$ ) e Tapera ( $n=2$ ), localizadas na ilha Guaíba, situada na baía de Sepetiba sob 23°00'00.33"S - 44°02'23.03"O e

23°00'07.39"S - 44°02'50.88"O (Fig. 1), e transportados em sacos plásticos com água do próprio local de coleta até o laboratório de Comportamento Animal e Conservação da Universidade Santa Úrsula. Após os experimentos, todos os indivíduos foram devolvidos ao mesmo local de coleta (Licença SISBio 25663-6). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Santa Úrsula (CEUAUSU00004) e seguiu todos os procedimentos padrões adotados pelos Princípios Éticos em Pesquisa Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação (CONCEA).

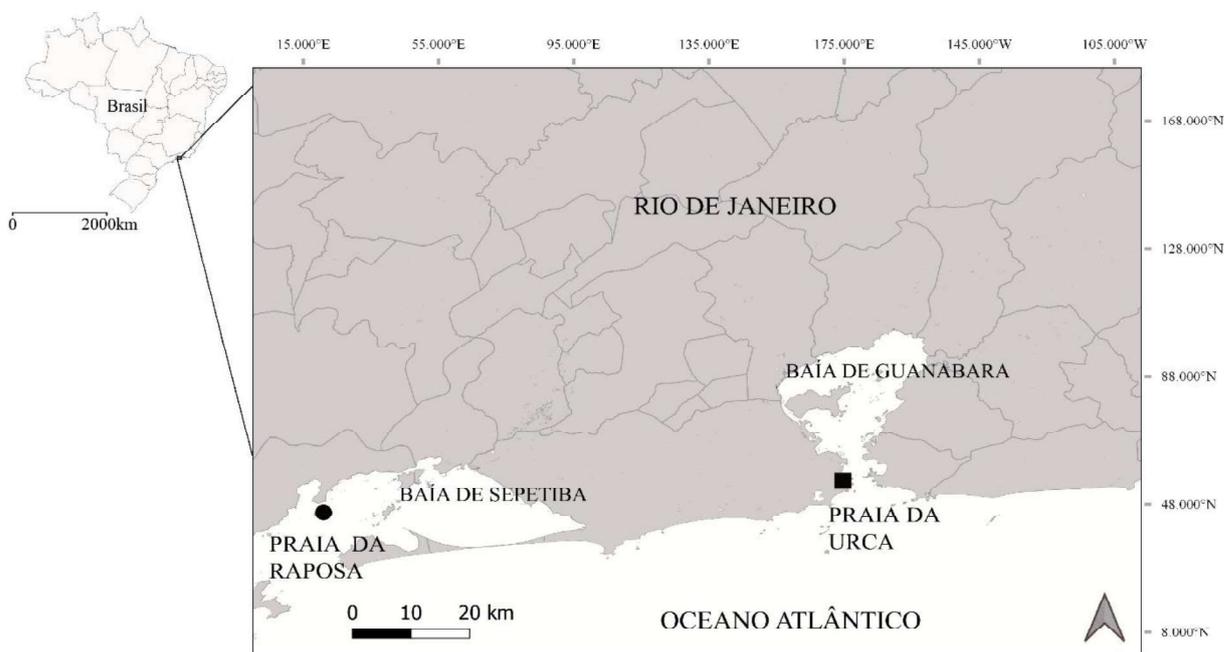


Fig. 1: Localização de coleta dos indivíduos de *Hippocampus reidi*. Praia da Urca (Quadrado) e Praia da Raposa e Tapera (Círculo).

Todos os indivíduos coletados foram aclimatados e isolados em uma bateria de aquários de vidro de 51 x 41 x 25,5 cm, onde previamente foram realizados testes semanais para avaliar as condições de temperatura, pH, salinidade, nitrito e amônia, sendo mantidas em condições ideais (pH entre 8,0 e 8,2, nitrito e amônia de 0 a 0,25 ppm, salinidade variando entre 30 e 34, temperatura entre 24 e 27°C) e aeração constante.

Os aquários utilizados são interligados em um único sistema, com a mesma água circulando entre eles, evitando um possível estresse provocado por uma mudança na qualidade da água durante experimentos de socialização. Os cavalos-marinhos foram alimentados diariamente com *Artemia salina* e mantidos isolados por 48hs antes de cada experimento. Os experimentos foram conduzidos após constatar que os animais

aparentemente não exibiam comportamentos característicos de estresse, como a natação em movimentos estereotipados e alta frequência respiratória (>40 batimentos operculares por minuto) (submetido).

Para detectar a biofluorescência, os animais foram observados em uma câmara escura localizada dentro do próprio laboratório, onde as filmagens foram realizadas por fora do aquário com as câmeras Canon EOS 5DmarkII e lentes Canon EF 16-35mm *f*/2.8 USM e Nikon 3200. Uma iluminação específica, com duas lanternas de 1600 lúmens, com os respectivos filtros de excitação e barreira *NightSea* foram utilizados para a captura dos vídeos. Os indivíduos foram aclimatados 24 horas antes de cada experimento, a fim de eliminar os efeitos de estresse referente à iluminação, onde foram submetidos às mesmas condições de iluminação utilizadas no experimento durante dois períodos de 15 minutos, com intervalo de 1 hora entre os períodos.

Nos tratamentos ( $n = 28$ ) o indivíduo estímulo, do sexo oposto, foi inserido no mesmo aquário do indivíduo focal, e filmados por 5 minutos após o início da socialização. Os comportamentos de corte foram qualificados de acordo com Mattle e Wilson (2009) e quantificados de acordo com o tempo de exibição. Todos os indivíduos focais foram identificados através do desenho da coroa, utilizando o software I3s, de acordo com a metodologia de Freret-Meurer et al. (2013) para que não houvesse repetição de indivíduos.

Durante a análise dos vídeos, foram selecionados seis frames, sendo três de cada lado do corpo do indivíduo focal, correspondendo a períodos diferentes da interação, início (0 – 2:30 min), meio (2:31 – 3:30 min) e fim (3:30 – 5:00 min), respectivamente. Essas imagens foram classificadas por meio do software PhotoQuad, onde a biofluorescência foi qualificada de acordo com a cor e quantificada na cabeça e tronco do animal, totalizando 100 pontos em cada parte do corpo.

O controle dos experimentos foi realizado sob as mesmas condições de iluminação do tratamento, onde outros indivíduos ( $n = 28$ ), foram observados sozinhos durante cinco minutos e foi realizado o mesmo método de quantificação e qualificação da biofluorescência na cabeça e tronco para posterior comparação.

Os comportamentos registrados durante os experimentos e os controles foram descritos em um etograma quantificando o tempo dos comportamentos, sendo a média e o desvio padrão representados por  $X \pm DP$ .

Para avaliar se existiu diferença significativa entre os comportamentos exibidos entre os grupos experimentais e controle, utilizamos o test *t de student*, realizado no software

Instat, considerando que os dados passaram no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se existia relação entre as partes do corpo com exibição de biofluorescência dos animais utilizados nos grupos experimental e controle, foi realizada uma correlação de *Pearson* no software RStudio.

A dissimilaridade dos indivíduos em relação à biofluorescência foi testada através do Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) no software CANOCO, e análise de variância permutacional foi utilizada para investigar a diferença entre a biofluorescência vermelha para os experimentos (tratamento x controle) e os sexos, realizado no software RStudio. O nível de significância utilizado nas análises foi de 95%.

## RESULTADOS

Foi realizado um total de 56 réplicas, dos quais 28 foram experimentos e 28, controles. Tanto no tratamento, quanto no controle, foram utilizadas 14 fêmeas focais e 14 machos focais.

Durante os tratamentos, as fêmeas realizaram dez comportamentos, sendo repouso o mais frequente, com tempo médio de exibição de  $77,2s \pm 48,7s$ , seguido de natação com  $56,2s \pm 38,6s$  e *interaction*, representado com média de  $52,6s \pm 47,1s$ . Os machos do tratamento também apresentaram dez comportamentos diferentes, tal como os mesmos comportamentos mais frequentes, onde repouso foi representado pela média de  $91,4s \pm 56,6s$ , seguido de natação com  $56,6s \pm 47s$  e *interaction* com  $52,9s \pm 42,2s$  do tempo médio (Fig. 2).

Já nos controles foram observados apenas três comportamentos para ambos os sexos, em que as fêmeas exibiram o comportamento de natação com média de  $167,5s \pm 63,1s$ , seguido de repouso, com média de  $132s \pm 62,8$  e  $0,5s$  de forrageamento; enquanto os machos apresentaram média de  $191,5s \pm 81s$  do tempo em repouso,  $105,9s \pm 78,4s$  exibindo o comportamento de natação, seguido de  $2,64s \pm 5,8$  de forrageamento (Fig. 3) (Tabela I).

Indivíduos que participaram do tratamento apresentaram um maior repertório comportamental (10 comportamentos), enquanto os indivíduos controle apresentaram apenas três comportamentos (repouso, natação e caça). De acordo com o teste de Mann-Whitney, houve diferença significativa ( $p = 0,0387$ ;  $U' = 125,00$ ) entre o número de comportamentos exibidos entre os indivíduos submetidos ao tratamento e ao controle. Não houve diferença significativa entre os comportamentos exibidos por machos e fêmeas do tratamento ( $t = 0,065$ ;  $p = 0,95$ ) e do controle ( $U' = 5,000$ ;  $p < 0,99$ ).

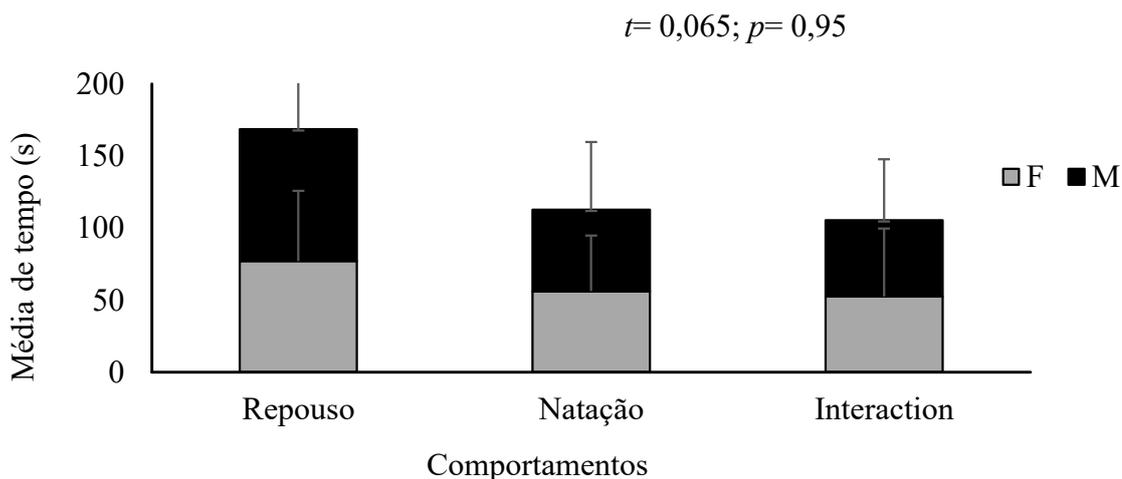


Fig. 2: Duração (s) dos comportamentos mais exibidos por machos e fêmeas *Hippocampus reidi* durante o tratamento.

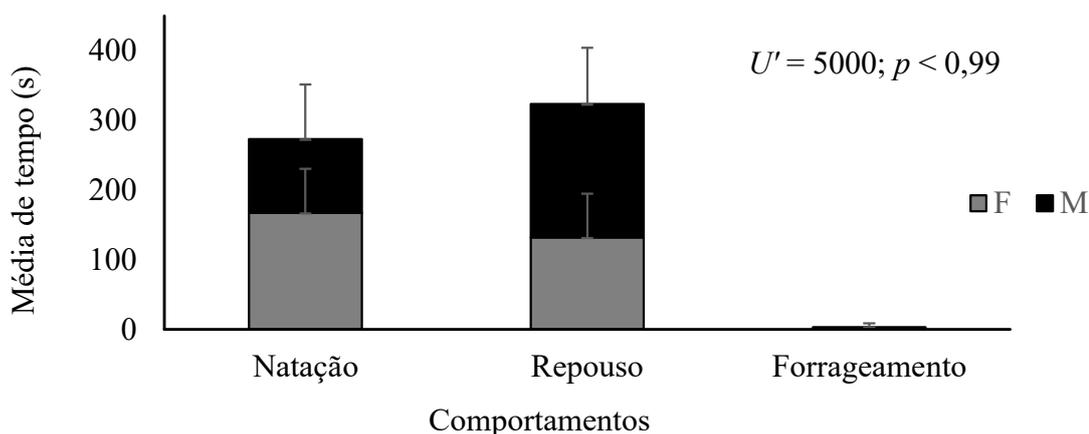


Fig. 3: Duração (s) dos comportamentos exibidos por machos e fêmeas *Hippocampus reidi* durante o controle.

Tabela I- Etograma, com a média e desvio-padrão do tempo (s) de exibição de cada comportamento realizado pelos indivíduos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* durante os experimentos para investigação do contexto de ocorrência de biofluorescência.

Comportamento	Descrição	Tratamento Média $t$ (s)	Tratamento Desv. Pad.	Controle Média $t$ (s)	Controle Desv. Pad.
<i>Interaction</i>	Macho e fêmea orientados de frente um para o outro	44,4	42,5	0,0	0,0
<i>Jack- Knifing</i>	Macho aproxima-se da fêmea com as nadadeiras dorsal e peitoral vibrando rapidamente	1,8	7,3	0,0	0,0
<i>Promenading</i>	Indivíduos entrelaçam as caudas	43,3	66,5	0,0	0,0

<i>Rubing</i>	Macho esfrega a bolsa incubadora em alguma parte do corpo da fêmea	4,9	9,5	0,0	0,0
Repouso	Indivíduo no substrato, sem movimentação, com a cauda retraída ou esticada, sem movimentar a nadadeira dorsal e peitoral	92,1	56,1	161,7	77,3
Natação	Movimentação pela coluna d'água, com movimento das nadadeiras dorsal e peitorais.	56,4	46,0	136,7	76,5
Nado sincronizado de fundo	Indivíduos de sexos opostos se movimentam no fundo do aquário sincronizados, por meio do movimento de suas nadadeiras	21,1	26,6	0,0	0,0
Movimento sincrônico	Indivíduos se movimentam sincronizados em torno do substrato com a cauda tocando o mesmo	4,7	11,6	0,0	0,0
Caça	Olhos direcionados para a presa, com o indivíduo em movimento ou não, sucção e ingestão do alimento	2,3	6,2	1,6	4,4
Comportamento agonístico	Aproximação ao indivíduo do sexo oposto; dorso apoiado lateralmente no substrato e click	28,9	47,1	0,0	0,0

A biofluorescência observada durante esses experimentos foi nas cores verde e vermelha. A coloração verde foi exibida principalmente nos olhos, sendo registrada em 82% dos machos, incluindo controle e tratamento, e 89,3% de fêmeas. No tronco, a biofluorescência verde foi exibida em apenas dois machos e duas fêmeas, sendo um controle e um tratamento para ambos os sexos. A biofluorescência vermelha foi registrada em 100% dos indivíduos, para ambas as partes do corpo dos indivíduos utilizados no experimento.

A coloração vermelha esteve presente na cabeça e no tronco de todos os indivíduos, variando o percentual de cobertura e a intensidade da coloração. Fêmeas do tratamento apresentaram média de  $41,3 \pm 25$  % da cabeça com biofluorescência vermelha,  $0,9 \pm 0,8$  % verde e  $57,8 \pm 24,5$  % sem biofluorescência. O tronco foi representado pela média de  $38,3 \pm 26,7$ % vermelho,  $0,04 \pm 0,1$ % verde e  $61,6 \pm 26,7$ % sem biofluorescência. Já as fêmeas do controle exibiram na cabeça, a média de  $40,2 \pm 20,1$ % de coloração vermelha,  $0,7 \pm 0,7$ %

verde, e  $59,1 \pm 20,5\%$  sem biofluorescência, e no tronco média de  $39,9 \pm 26,6\%$  de biofluorescência vermelha, 0% de verde, e  $60 \pm 26,6\%$  sem biofluorescência.

O percentual médio de cobertura de biofluorescência na cabeça dos machos utilizados nos tratamentos foi de  $51,5 \pm 19,8\%$  de coloração vermelha,  $1 \pm 1\%$  de verde, e  $47,4 \pm 19,3\%$  sem biofluorescência, e no tronco  $53,1 \pm 24\%$  vermelho,  $0,03 \pm 0,1\%$  verde e  $46,9 \pm 24\%$  sem biofluorescência. No controle os machos exibiram na cabeça a média de  $63,8 \pm 22,4\%$  de coloração vermelha,  $0,8 \pm 0,8\%$  verde e  $35,4 \pm 22,7\%$  sem biofluorescência, e no tronco  $59,6 \pm 28,5\%$  de biofluorescência vermelha,  $0,1 \pm 0,4\%$  de cor verde e  $40,3 \pm 28,5\%$  sem biofluorescência.

Quanto à biofluorescência vermelha, as partes do corpo (cabeça e tronco) estão altamente correlacionadas tanto para machos ( $r = 0,88$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig.4) como para fêmeas ( $r = 0,90$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig.5), para controle e tratamento, conforme indicado pela correlação de *Pearson*.

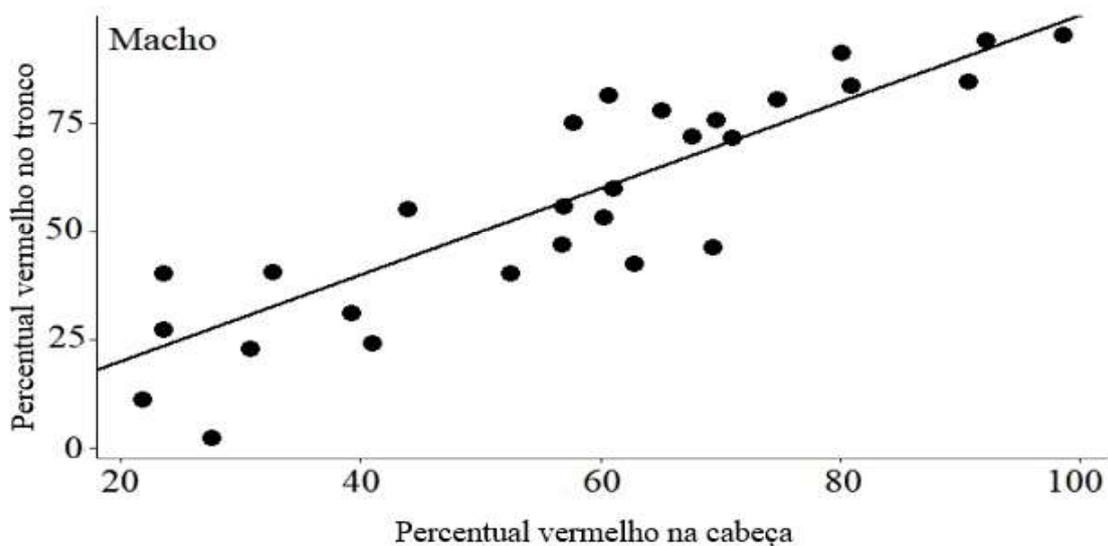


Fig. 4: Correlação de *Pearson* da biofluorescência vermelha entre partes do corpo de machos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*.

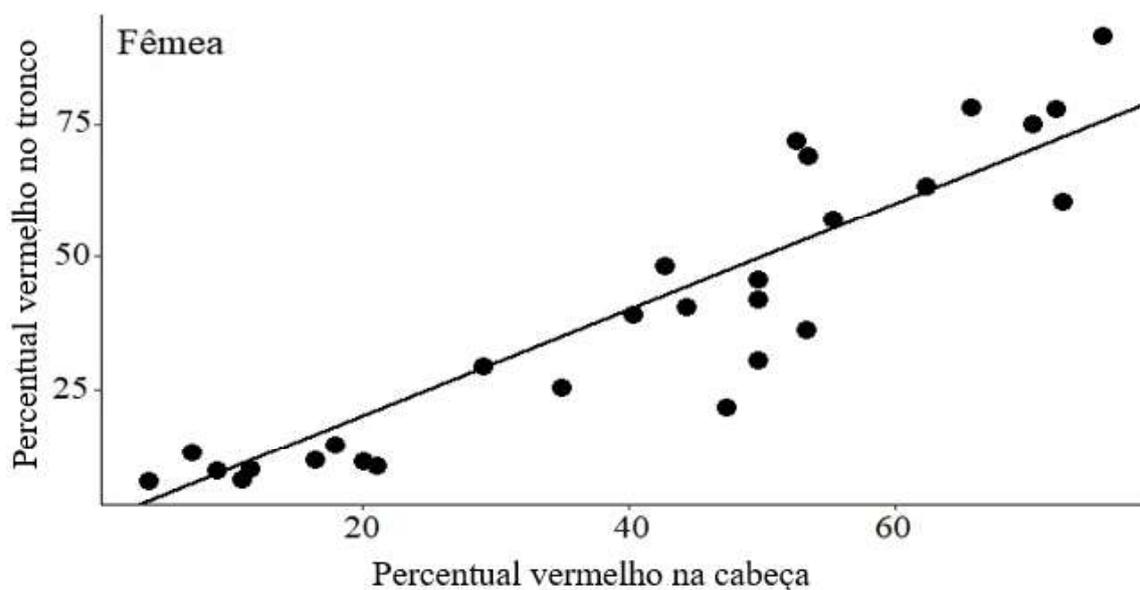


Fig. 5: Correlação de *Pearson* da biofluorescência vermelha entre partes do corpo de fêmeas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*.

Não houve separação dos indivíduos referentes ao tratamento e ao controle para nenhum dos sexos em relação à biofluorescência vermelha, como indicado pela análise de NMDS (Valor de estresse = 0,01) (Fig.6).

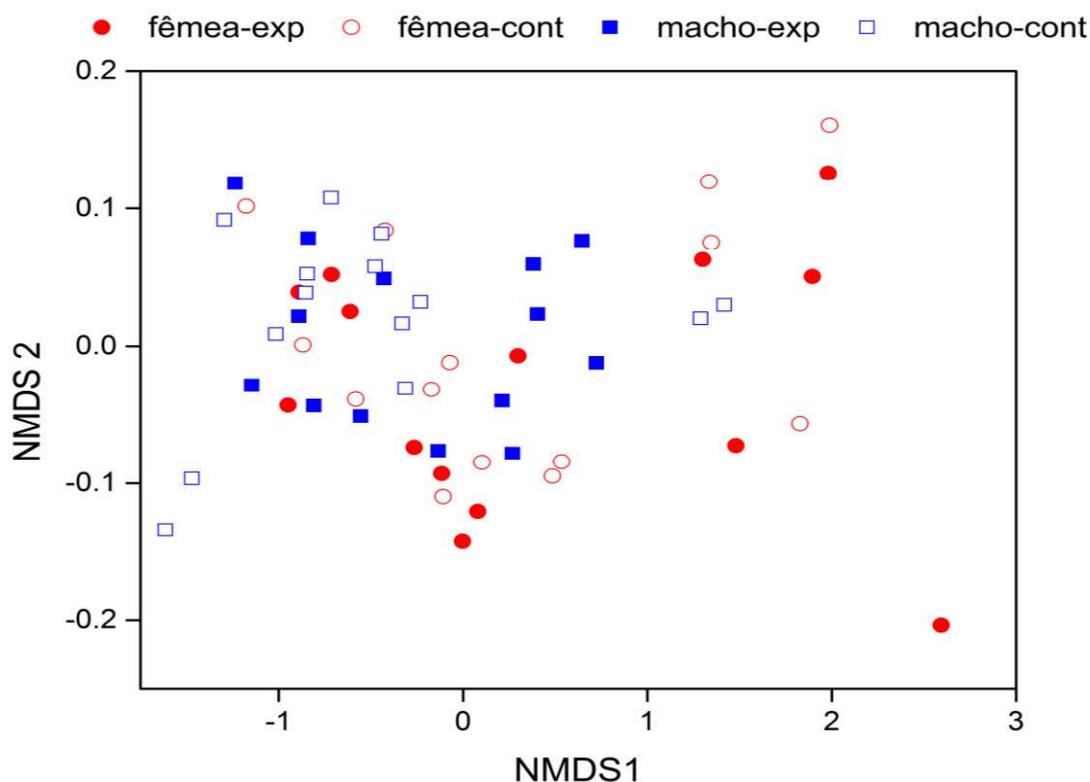


Fig. 6: O Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) analisando a biofluorescência vermelha nos cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* machos e fêmeas dos indivíduos referentes ao tratamento e ao controle.

A coloração verde não foi analisada pois a única parte do corpo dos animais que exibiram essa fluorescência foram os olhos, e, já que o percentual de cobertura é feito de forma aleatória, assumimos que os dados seriam subestimados.

Não foi encontrada uma variação significativa entre sexos (PERMANOVA,  $F = 7,870$ ;  $p = 0,09$ ), nem entre os indivíduos submetidos ao tratamento e ao controle (PERMANOVA,  $F = 0,714$ ;  $p = 0,40$ ).

## DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou a biofluorescência dos cavalos-marinhos de *Hippocampus reidi* em laboratório durante o comportamento de corte. Esses animais são sedentários e apresentam um display reprodutivo composto de diversos comportamentos bem descritos na literatura (Lourie et al., 1999). Quando comparamos o repertório comportamental houve uma diferença significativa entre animais submetidos ao tratamento e ao controle, com os primeiros apresentando um maior repertório comportamental que o controle e presença de displays exibidos apenas durante a corte, além da ausência de comportamento estereotipado. Já nos indivíduos do controle, houve um número restrito de comportamentos, ausência de displays típicos de corte e ausência de comportamento estereotipado. A ausência de comportamento estereotipado durante o experimento indicou que os animais estavam aclimatados. Além disso, a maior complexidade comportamental dos animais submetidos ao tratamento, tal como a presença de comportamento típico de corte indicou um efeito positivo da presença de coespecíficos como estímulo reprodutivo. Portanto, o experimento conduzido se mostrou adequado para que a biofluorescência pudesse se manifestar durante a corte nos experimentos de tratamento.

Foi observada, tanto para indivíduos do tratamento quanto do controle, a exibição de duas colorações de biofluorescência: verde e vermelho, como já registrado anteriormente para a mesma espécie (Vaccani et al., 2019) e para outras espécies de cavalos-marinhos (Sparks et al., 2014, Brauwer, 2018). Além das colorações exibidas, foi observado que esses animais foram capazes de modificar o padrão e a intensidade de fluorescência ao longo do tempo. Essas mudanças são controladas por cromatóforos, células responsáveis pela distribuição desses pigmentos fluorescentes em peixes, que contraem e expandem de acordo com a intensidade desejada. Wucherer et al. (2012) observaram que essas células podem ser controladas por meio do sistema nervoso e hormonal. Os cavalos-marinhos são conhecidos por sua capacidade de mudança de coloração do corpo para diversas funções, inclusive

durante a corte, isso reforça a ideia de que a comunicação intraespecífica pode ocorrer de acordo com a intensidade e variação de cores fluorescentes e não fluorescentes, possivelmente sendo ambas complementares em diferentes situações de comunicação. É relevante ressaltar que o presente estudo não mediu a intensidade, apenas o percentual de presença de fluorescência ao longo do tronco, cauda e da cabeça dos animais.

A coloração fluorescente verde foi restrita aos olhos dos animais, especificamente ao redor da íris, e ocorreu tanto no tratamento, quanto no controle. Já ao redor dos olhos, foi exibida a coloração vermelha. Esse padrão de coloração dos olhos se manteve igual tanto no tratamento como no controle, o que indica que a biofluorescência exibida ao redor e nos olhos não tem função de corte para a espécie estudada. De acordo com Andrews et al. (2007), a coloração vermelha é mais frequente perto dos olhos das espécies que se alimentam de pequenas presas que possuem olhos, o que corrobora os resultados encontrados, já que os cavalos-marinhos são predadores visuais. Acredita-se que esse padrão de biofluorescência nos olhos varie de acordo com a espécie observada, inclusive dentro da mesma família, já que o peixe cachimbo *Corythoichthys nigripictus* exibiu um padrão de coloração vermelha na parte superior da íris (Meadows et al., 2014). Bruce (2009) propôs que a fluorescência ao redor dos olhos pode não atuar como um sinal para o observador, e sim como uma fonte de luz para gerar reflexos nos olhos de presas, porém mais estudos experimentais são necessários para confirmar tal hipótese.

A fluorescência vermelha é comum em peixes criptobênticos (Michielis et al., 2008), apresentando variações no padrão de cada espécie. Os resultados do presente estudo indicam que a coloração vermelha é predominante nos cavalos-marinhos da espécie *H. reidi* tanto no corpo como na cabeça. Meadows et al. (2014) registraram a presença dessa coloração em concentração principalmente na região da cabeça e ao redor dos olhos, em pequenos peixes com corpo transparente.

A biofluorescência da cabeça e tronco foram altamente correlacionadas, tanto para machos como para fêmeas, o que indica que para os cavalos-marinhos da espécie *H. reidi* estudados não há uma parte com funcionalidade mais importante para o contexto de corte. Além disso, ambas as áreas do corpo também apresentam biofluorescência com mesmo padrão de cobertura, corroborando Meadows et al. (2014), que relatou sobre a fluorescência vermelha estar presente em muitas partes do corpo.

Nossos dados indicaram que não houve diferença entre a biofluorescência exibida pelo tratamento e controle para ambos os sexos. Esse resultado sugere que *H. reidi* não utilize a

biofluorescência durante a corte. É possível que esse resultado seja explicado devido à história de vida desse animal. Essa espécie estudada é tipicamente diurna, e já são conhecidos por uma mudança de coloração como display inicial da corte, onde machos e fêmeas exibem uma coloração esbranquiçada para o parceiro reprodutivo, além de um complexo repertório comportamental com elevado investimento de tempo e, conseqüentemente, de energia (Oliveira et al., 2010.).

Não foi encontrada diferença significativa no padrão de biofluorescência exibido pelos animais submetidos ao controle e ao tratamento, porém de acordo com a Análise de Variância Permutacional, o valor de significância encontrado entre a biofluorescência vermelha de machos e fêmeas, independente do experimento, foi bem próximo do limite. Esse resultado sugere que ao aumentar o número amostral observado pode ser encontrada uma diferença significativa na expressão da coloração vermelha entre os sexos.

A coloração corporal desempenha um papel importante na ecologia dos peixes, então se sugere que a biofluorescência seja utilizada em outros contextos, não necessariamente em comunicação intraespecífica, como por exemplo a camuflagem, já que a coloração vermelha é bem descrita para algas e corais (Field et al., 2006; Ben-Zvi et al., 2014), além de outras espécies bentônicas (Michiels et al., 2008), as quais são usadas pelo cavalos-marinho como ponto de ancoragem.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pôde-se concluir que os cavalos-marinhos *H. reidi* apresentam as fluorescências verde e vermelha, entretanto as mesmas parecem não ser importantes para a corte em indivíduos dessa espécie. Existe uma necessidade de observação comportamental tanto em campo como em ambiente controlado buscando entender um pouco mais sobre essa biofluorescência exibida por diferentes grupos de animais marinhos e terrestres.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, K; Reed, SM; Masta, SE. 2007. Spiders fluoresce variably across many taxa. *Biology Letters*, 3(3), 265–267. doi:10.1098/rsbl.2007.0016
- Anthes, N; Theobald, J; Gerlach, T; Meadows, MG; Michiels, NK. Diversity and Ecological Correlates of Red Fluorescence in Marine Fishes. *Front Ecol Evol*. 2016. 4:126. doi:10.3389/fevo.2016.00126

- Ben-Zvi, O; Eyal, G; Loya, Y. 2014. Light-dependent fluorescence in the coral *Galaxea fascicularis*. *Hydrobiologia*, 759(1), 15–26. doi:10.1007/s10750-014-2063-6
- Bradbury, JW; Vehrencamp, SL. 1998. Principles of animal communication. Sinauer Associates, Inc., New York, NY. 882p.
- Brauwer, M; Hobbs, JA; Ambo-Rappe, R; Jompa, J; Harvey, ES; McIlwain, JL. Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. *Conservation Biology*. 2018. 32:706-715. doi:10.1111/cobi.13033
- Bruce, C. 2009. Fish that see red. *New Sci.* 202, 20. doi:10.1016/S0262-4079(09)61441
- Buchanan-Smith, HM. 2005. Recent advances in color vision research. *American Journal of Primatology*, 67: 393-398.
- Cunha, C. de L. da N; Rosman, PCC; Ferreira, AP; Monteiro, CN; Monteiro, T. 2006. Hydrodynamics and water quality models applied to Sepetiba Bay. *Continental Shelf Research*, 26(16), 1940–1953. doi:10.1016/j.csr.2006.06.010
- Dusenbery, DB. 1992. Sensory ecology: How Organisms Acquire and Respond to Information. W.H. Freeman & Company, New York, NY. 558 p.
- Field, SF; Bulina, MY; Kelmanson, IV; Bielawski, JP; Matz, MV. 2006. Adaptive evolution of multicolored fluorescent proteins in reef-building corals. *J.Mol.Evol.* 62,332–339. doi:10.1007/s00239-005-0129-9
- Gruber, DF; Loew, ER; Deheyn, DD; Akkaynak, D; Gaffney, JP; Smith, WL; Davis, MP; Stern, JH; Pieribone, VA; Sparks, JS. 2016. Biofluorescence in Catsharks (Scyliorhinidae): Fundamental Description and Relevance for Elasmobranch Visual Ecology. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep24751
- Haddock, SHD; Heine JN. 2005. *Scientific blue-water diving*. CA: California Sea Grant.
- Haddock, SHD; Mastroianni, N; Christianson, LM. 2009. A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum Ctenophora. *Proceedings of the royal society*, 82: 20151055.
- IUCN – International Union for Conservation of Nature. Red List of Threatened Species. 2010. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>
- Kirk, JTO. 2011. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge: University Press. 649 p.
- Lourie, SA ; Vicent, ACJ ; Hall, HJ. 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Londres: Project Seahorse.

- Mazel, CH; Cronin, TW; Caldwell, RL; Marshall, NJ. 2004. Fluorescent enhancement of signaling in a Mantis shrimp. *Science*, 303: 51.2.
- Meadows, MG; Anthes, N; Dangelmayer, S; Alwany, MA; Gerlach, T; Schulte, G; Sprenger, D; Theobald, J; Michiels, NK. 2014. Red fluorescence increases with depth in reef fishes, supporting a visual function, not UV protection. *Proc.R.Soc.B* 281:20141211. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1211>
- Michiels, N; Anthes, N; Hart, N; Herler, J; Meixner, A; Schleifenbaum, F; Schulte, G; Siebeck, U; Sprenger, D; Wucherer, M. 2008. Red fluorescence in reef fish: a novel signalling mechanism? *BMC Ecology*, 8: 16.
- Oliveira, TPR; Castro, ALC; Rosa, IL. 2010. Novel sex-related characteristics of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. *Neotropical Ichthyology*, 8(2), 373–378. doi:10.1590/s1679-62252010000200017
- Silva Filho, LCR. Análise da Gestão Costeira em Baías: o caso da baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2015.
- Sola, MCR; Paiva, PC. 2001. Variação temporal da macrofauna bentônica sublitoral da praia da Urca (RJ) após a ocorrência de ressacas. *Revista Brasileira de Oceanografia*, 49 (1-2): 137-142.
- Sparks, JS; Schelly, RC; Smith, WL; Davis, MP; Tchernov, D; Pieribone, VA; Gruber, DF. 2014. The covert World of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. *PLoS One*, 9: e83259.
- Vaccani, AC; Freret-Meurer, NV; Bertoncini, AA; Santos, LN. 2019. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. *PLoS ONE* 14(8): e0220561.
- Valentin, J; Tenenbaum, D; Bonecker, A; Bonecker, S; Nogueira, C; Paranhos, R; Villac, MC. 1999. Caracteristiques hydrobiologiques de la Baie de Guanabara (Rio de Janeiro, Brésil). *Journal de Recherche Océanographique*, 24(1): 33-41.
- Wucherer, MF; Michiels, NK. A fluorescent chromatophore changes the level of fluorescence in a reef fish. *PLoS One*. 2012;7 :e37913. doi: 10.1371/journal.pone.0037913

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho registrou pela primeira vez a biofluorescência exibida pelo cavalo-marinho *Hippocampus reidi* em ambiente natural e controlado. Essa biofluorescência

apresentou um padrão nas colorações verde e vermelho, como descrito na literatura para outras espécies da família Syngnathidae. Experimentos conduzidos sugerem que tal comportamento não é utilizado durante o processo de corte. Existe uma grande necessidade de observação comportamental em ambiente natural e em cativeiro para entendermos melhor a funcionalidade dessa coloração exibida por esses animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, KE; Owens, IPF; Marshall, NJ. Fluorescent Signaling in Parrots. *Science*. 2002; 295:92.
- Brauwer, M; Hobbs, JA; Ambo-Rappe, R; Jompa, J; Harvey, ES; Mcilwain, JL. Biofluorescence as a survey tool for cryptic marine species. *Conservation Biology*. 2018. 32:706-715. doi:10.1111/cobi.13033
- Kirk, JTO. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge: University Press; 2011. 649 p.
- Lim, ML; Land, MF; Li, D. 2007 Sex-specific UV and fluorescence signals in jumping spiders. *Science* 315, 481. doi:10.1126/science.1134254
- Lourie, SA; Vicent, ACJ; Hall, HJ. 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Londres: Project Seahorse.
- Mazel, CH; Cronin, TW; Caldwell, RL; Marshall, NJ. 2004. Fluorescent enhancement of signaling in a Mantis shrimp. *Science*, 303: 51.2.
- Michiels, N; Anthes, N; Hart, N; Herler, J; Meixner, A; Schleifenbaum, F; Schulte, G; Siebeck, U; Sprenger, D; Wucherer, M. 2008. Red fluorescence in reef fish: a novel signalling mechanism? *BMC Ecology*. 8:16.
- Sparks, JS; Schelly, RC; Smith, WL; Davis, MP; Tchernov, D; Pieribone, VA; Gruber, DF. 2014. The covert World of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. *PLoS One*. 9(1):e83259.
- Vaccani, AC; Freret-Meurer, NV; Bertoncini, AA; Santos, LN. 2019. Shining in the dark: First record of biofluorescence in the seahorse *Hippocampus reidi*. *PLoS ONE* 14(8): e0220561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220561>