



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aqüicultura da UNESP - CAUNESP



**ESCOLHA DE SUBSTRATO PARA A CONSTRUÇÃO DE
NINHO NA TILÁPIA-DO-NILO: ASSOCIAÇÃO COM
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E DE BEM-ESTAR**

FRANCINE ZOCOLER DE MENDONÇA

JABOTICABAL, SP

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aqüicultura da UNESP - CAUNESP



**ESCOLHA DE SUBSTRATO PARA A CONSTRUÇÃO DE NINHO
NA TILÁPIA-DO-NILO: ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS
FISIOLÓGICOS E DE BEM-ESTAR**

Francine Zocoler de Mendonça

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas

Laboratório de Comportamento Animal IBILCE - UNESP

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Aqüicultura.

JABOTICABAL, SP

2010

M539e Mendonça, Francine Zocoler de
Escolha de substrato para a construção de ninho na tilápia-do-
nilo: associação com parâmetros fisiológicos e de bem-estar /
Francine Zocoler de Mendonça. -- Jaboticabal, 2010
v, 89 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura, 2010

Orientadora: Eliane Gonçalves de Freitas

Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Marcelo Simão
da Rosa, Silvia Mitiko Nishida, Marisa Fernandes de Castilho

Bibliografia

1. Peixe. 2. Comportamento Agressivo. 3. Comportamento
reprodutivo. 4. Hormônios. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de
Aqüicultura.

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu querido marido, Rodrigo Damasco Daud, pelo carinho, compreensão e pelo apoio persistente, principalmente nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, Enoch e Maria de Lourdes, pelo exemplo de vida, pela educação, carinho, incentivo e ajuda durante toda minha formação.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Eliane Gonçalves de Freitas, pela oportunidade e ensinamentos que foram fundamentais para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Prof. Dr. Rui de Oliveira por me aceitar em seu laboratório, possibilitar minha convivência com seu grupo de pesquisa durante minha estadia em Lisboa e pela oportunidade de apreender mais sobre a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Franciesco Langeani Neto e ao Prof. Dr. Wagner Cotroni Valente pelas valiosas críticas e sugestões concedidas no exame de qualificação.

À Prof^a Dr^a Irene Bastos Franceschini Vicentini, pelo incentivo, paciência e ajuda com o pedido da bolsa sanduíche.

Aos atuais e ex-companheiros de Laboratório (em ordem alfabética): André, Adriana, Ângelo, Bianca, Camila, Cristiani, Fábio, Fabrício, Maristela, Tatiana e Thaís. Todos contribuíram para o desenvolvimento da tese, seja nas discussões, trocas de informações e na realização dos experimentos.

Aos companheiros do ISPA e / IGC (Lisboa, Portugal): Ana Catarina, Alexandre, Diana, Fábio, Filipa, Joana, João, Lisa, Magda, Miguel, Margarida, Marta, Tânia, Teresa, Sara, Silvia, por todas as críticas, sugestões e ajuda com a pesquisa. Em

especial, a Ana Sofia pelo ensinamento das técnicas laboratoriais para as análises dos hormônios e pelas análises dos RIAs. Ao David pelas sugestões e ajuda com o software Observer, com as análises estatísticas e com os documentos finais para finalização do estágio. A Helena pelas dicas de análises do comportamento. A Leonor, pelas valiosas discussões. Ao Nuno Ramos por toda eficiência com a documentação para a bolsa, visto e estadia. Ao Luis, pela ajuda com a instalação do Observer. Às minhas amigas Eduarda e Olinda pela paciência, ensinamentos, discussões, ajuda com o software Observer e com as análises estatísticas, pela amizade e companheirismo. Agradeço a todos pelo carinho e atenção durante minha estadia em Lisboa.

À Maria Madalena Zocoller Borba, pelo incentivo e carinho.

Ao Carlos Eduardo Souza e à Roselene S. C. Ferreira (ambos do IBILCE/ UNESP) pela importante ajuda na coleta de dados, na manutenção dos animais e dos equipamentos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez (Laboratório de Bioquímica, IBILCE/ UNESP) pelo empréstimo do freezer para manutenção das amostras de plasma.

Ao Ginaldo Vieira dos Santos (UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil) pela ajuda com o preparo dos substratos.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação do CAUNESP pelos ensinamentos durante as disciplinas.

FINANCIAMENTO:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNPq (bolsa de doutorado, processo: 140098/2007-0)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAPES (bolsa sanduíche, processo: BEX 4056/08-6)

SUMÁRIO

1. Resumo Geral.....	01
2. Abstract.....	03
3. Introdução Geral.....	05
4. Estudo I (Escolha de substrato para a construção de ninho em machos de tilápia-do-nilo).....	14
5. Estudo II (O tipo de substrato afeta o desempenho reprodutivo na tilápia-do-nilo).....	27
6. Estudo III (Efeito do tipo de substrato sobre as interações agonísticas e níveis hormonais em ciclídeo).....	47
7. Considerações Finais.....	75
Anexo (Manuscrito submetido ao Journal of Fish Biology).....	77

1. RESUMO GERAL

A tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), é uma das espécies de peixes que utilizam o substrato para construir ninho. Porém, muitas vezes são mantidas em tanques ou aquários sem substrato. Em estudo anterior, foi verificado que a presença de substrato reduz o desenvolvimento das gônadas, aumenta a agressividade, mas não afeta o crescimento. Assim, foi avaliada a escolha do peixe por diferentes substratos (areia, areia + concha, pedra e vazio – sem substrato removível) para medir o bem-estar e o efeito de tais substratos no comportamento reprodutivo e agressivo da tilápia-do-nilo. Os objetivos deste trabalho foram: testar a escolha de substrato para a construção de ninho na tilápia-do-nilo (Estudo I); testar o efeito do substrato sobre o desempenho reprodutivo (frequência e latência para construção de ninho, frequência e latência para a desova e índice gonadossomático) e indicadores bioenergéticos (taxa de crescimento específico e índice hepatossomático) (Estudo II); e testar o efeito do tipo de substrato no desafio social por meio dos níveis de esteróides sexuais (testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11KT)), e no cortisol plasmático como um indicador de estresse (Estudo III). A escolha de substrato foi testada em grupos (1 macho e 2 fêmeas) formados por animais adultos. Os machos escolheram o substrato de areia para a construção do ninho. Os indicadores reprodutivos e bioenergéticos também foram avaliados nos mesmos substratos utilizados no Estudo I, mas cada tipo de substrato foi colocado em aquários separados, consistindo 4 tratamentos. Em cada réplica foram utilizados 2 machos e 3 fêmeas, mantidos durante 12 dias ou até 48 horas após a primeira desova. A frequência de desova foi maior no substrato de areia do que no sem substrato removível. Já a frequência de construção de ninho, foi menor no substrato

de pedra quando comparado com areia e areia+concha. Os demais indicadores reprodutivos e os indicadores de gasto energético foram similares entre os tratamentos. O desafio social e os níveis hormonais foram testados nos quatro substratos, utilizados nos experimentos anteriores. Foram coletadas 3 amostras de sangue dos machos: amostra 1 = depois de 7 dias de isolamento social; amostra 2 = 24 horas após a introdução de fêmeas; amostra 3 = 1 hora depois da introdução do macho. Foi analisado o nível hormonal (T, 11Kt e cortisol) na amostra 2 menos a amostra 1, e amostra 3 menos amostra 1 para obter os níveis do basal reprodutivo e do desafio social, respectivamente. Não houve interação estatística entre o tipo de substrato, nível reprodutivo e desafio social na concentração dos hormônios. Entretanto, os níveis de 11Kt foram maiores nos substratos de areia e areia+concha do que no sem substrato. Os níveis de T foram mais altos no desafio social. Houve redução dos níveis de cortisol da condição reprodutiva quando comparado com o desafio social. A frequência de ataques de alta intensidade foi maior no substrato de areia em relação aos mantidos no aquário com substrato de areia + concha, enquanto os sem substrato apresentaram maior frequência em relação aos pertencentes ao substrato de areia + concha e pedra. Concluímos que um substrato leve e simples (areia) é o tipo de substrato preferido para a construção de ninho, o qual aumenta a reprodução e a 11KT (hormônio reprodutivo em peixe) indicando estimulação para a reprodução. Por outro lado, o tipo de substrato afeta o comportamento agressivo, mas este não é seguido por mudanças hormonais. Assim, concluímos que um substrato simples (areia) é um bom substrato para criação e manutenção da tilápia-do-nilo para aqüicultura.

PALAVRAS – CHAVE: peixe; comportamento agressivo; comportamento reprodutivo; hormônios.

2. ABSTRACT

The Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), is one of fish species which use build nest on bottom substrate. However, this species are usually reared in tanks or aquarium without substrate. We verified the influence of substrate on reducing of gonad development, enhance aggressiveness, but growth is not affected. Thus, we tested the fish choice for different substrates (sand, sand + shell, stone and empty - without substrate) in order to access welfare and the effects of such substrates on reproductive and aggressive behavior of Nile tilapia. Our goals in this study were: test the substrate choice to nest building (Study I); test the substrate effect on the reproductive fitness (frequency and latency to nest building, frequency and latency to spawning and gonadosomatic index) and on the bioenergetic indicators (specific growth rate and hepatosomatic index) (Study II); and test the influence of substrate type on the social challenge by analyzing sexual steroid levels (testosterone (T) and 11 – ketotestosterone (11KT)), and serum cortisol as a stress indicator (Study III). The substrate choice was tested in groups made by 1 male and 2 females adult fish. Sand substrate was significantly chosen by males to built nest. The reproductive and bioenergetics indicators were also evaluated for the same substrate used in the Study I, but each substrate type was kept in separated aquaria, performing 4 treatments. Groups of 2 males and 3 females were kept until 12 days or until 48 hours after the first spawning. The frequency of spawning was higher in the sand substrate than in no substrate treatment. The frequency of nesting was lower in the stone substrate than in sand and sand + shell substrates. The others reproductive and energetic indicators were similar between the treatments. The social contest and hormone levels were tested in the four substrates used in the former experiments. We collected 3 blood samples from males: sample 1 = after 7-days social isolation;

sample 2 = 48 hours after female introduction and sample 3 = 1 hour after male introduction. We analyzed hormonal levels (T, 11KT and Cortisol) in sample 2 less sample 1, and sample 3 less sample 1 in order to access reproductive basal levels and social levels, respectively. No differences among substrate type and reproductive and social levels of hormones were observed. However, 11 Kt levels were higher in fish kept in the sand and sand + shell substrates than those kept in no substrate treatment. The T level was higher during the social challenge. Cortisol level in reproductive condition was reduced when compared to social challenge levels. The frequency of high intensity attacks was higher in the sand substrate than sand + shell substrate, while the fishes kept in no substrate treatment showed higher frequency than fish kept in aquarium with sand + shell and stone substrates. We concluded the preferred substrate type to build nest is soft and simple substrate (sand), in which spawning is improved and hormonal 11KT (a reproductive hormone in fish) indicates reproductive stimulation. On the other hand, substrate type affect aggressive behavior, but it is not followed by hormonal changes. In this way, we conclude that simple substrate (sand) is a good substrate to keep and house Nile tilapia for aquaculture purposes.

KEY – WORDS: fish; aggressive behaviour; reproductive behaviour; hormones.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente há uma crescente preocupação com o bem-estar dos animais de criação (Bracke & Hopster, 2006), e entre esses estão inclusos os peixes, que são amplamente usados na alimentação humana, na pesca esportiva, na aquariorfilia e na pesquisa científica (Huntingford *et al.*, 2006; Galhardo & Oliveira, 2006; Volpato *et al.*, 2007). Essa preocupação torna importante a definição de bons parâmetros indicadores de bem-estar que auxiliem na melhora das condições de criação e manutenção dos animais.

Vários estudos têm utilizado indicadores fisiológicos de estresse para medir bem-estar em peixes. Por exemplo, indicadores de estresse primário - aumento do cortisol e da adrenalina; secundário - alterações da glicemia, do glicogênio hepático e do hematócrito; e terciário - diminuição do crescimento, da reprodução e da resistência às doenças (Wendelaar-Bonga, 1997). Em relação ao comportamento, pode ser considerada como resposta imediata ao estressor a fuga ou a imobilização. Caso a fuga não seja possível, são observadas alterações no padrão natatório, alteração no comportamento anti-predatório, alteração do comportamento alimentar, aumento da procura de abrigo, alterações na aprendizagem e na agressividade (Schreck *et al.*, 1997 *apud* Galhardo & Oliveira, 2006). Entretanto, alterações fisiológicas e comportamentais são dois processos interligados. Como observado por Barreto *et al.* (2009), a frequência e a latência de ataques para a imagem no espelho podem prever níveis basais de indicadores fisiológicos de estresse na tilápia-do-nilo. Assim, o estresse age alterando processos fisiológicos que por sua vez afetam a variedade de comportamento.

As alterações fisiológicas e comportamentais são respostas a algum agente estressor que tende a desequilibrar a homeostase do animal. Esses agentes podem

ser de inúmeros tipos: de natureza física (transporte, confinamento ou manipulação), de natureza química (baixo teor de oxigênio, pH reduzido) e aqueles percebidos pelos animais (presença de predadores ou de co-específicos estranhos), conforme apresentado por Barton, 1997 *apud* Galhardo & Oliveira, 2006. Outras alterações ambientais, como mudanças de temperatura e redução de abrigos, também podem ser consideradas fatores estressores. De fato, alterações no ambiente interferem diretamente no comportamento e fisiologia do animal (Sneddon *et al.*, 2006).

A ausência de certos elementos ambientais é outro fator que pode levar à supressão de um determinado comportamento natural de uma espécie e, portanto, ser um redutor de bem-estar (Bracke & Hopster, 2006). Mendonça (2006) observou que a impossibilidade de realizar um determinado comportamento pode ser compensado por outro de maneira exagerada quando machos de tilápia-do-nylo, privados de construir ninhos, emitiram maior número de ataques de alta intensidade para os co-específicos. Nesse caso, provavelmente o ninho pode ter funcionado como regulador da agressividade.

As funções do ninho podem variar conforme a espécie. Além da função já citada, pode atuar como sítio de acasalamento, sítio de cuidado com a prole, reduzir a interferência de co-específicos e hetero-específicos no momento da desova, e como elementos da seleção sexual (Fryer & Iles, 1972; Mckaye *et al.*, 1993; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). Outros fatores relevantes e que devem ser considerados é que a falta de ninho pode causar instabilidade da hierarquia social, diminuir o comportamento sexual, gerar comportamento no vácuo e inatividade de machos territoriais, como ocorre em *Oreochromis mossambicus* (Galhardo *et al.*, 2008; Galhardo *et al.*, 2009).

Várias espécies de peixes, incluindo os ciclídeos, usam o substrato para a construção de ninho e reprodução (James & Bruton, 1992; Mckaye *et al.*, 1993; Stauffer *et al.*, 2005). Algumas dessas espécies apenas limpam o substrato para a desova, outras podem escavar o substrato para construção de ninho, ou ainda, podem modificar o tipo de ninho de acordo com o substrato disponível. *Tilapia zilli*, por exemplo, pode limpar uma superfície horizontal de uma rocha para colocar e fertilizar os ovos, pode construir depressões rasas em substratos de areia ou construir câmaras profundas em substratos de argila (Bruton & Gophen, 1992). A tilápia-do-nylo é outra espécie que pode escavar o substrato para a construção de um ninho circular (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998) tanto em substratos de areia como em pedriscos (observação pessoal feita em aquários). O macho dessa espécie constrói o ninho retirando substratos com a boca e depositando-os longe e ao redor de um ponto central, defende o ninho contra intrusos e corteja as fêmeas para desova, que ocorre dentro do ninho (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998).

Apesar da importância do substrato para o desenvolvimento do comportamento de construção de ninho e reprodução das espécies, ainda não é conhecido o substrato ideal para a criação e manutenção dos animais. Na prática da aquariofilia, as pedras e os cascalhos de pedriscos são amplamente utilizados, porém apresentam uma grande variação de peso e tamanho. Além disso, alguns sistemas da piscicultura mantêm ciclídeos em ausência de substratos removíveis, ou seja, no próprio fundo da caixa d' água ou do tanque de alvenaria, o que impossibilita os animais de construir ninho. Essa condição provavelmente prejudica o bem estar, uma vez que priva o animal de exibir parte de seu comportamento natural.

Mendonça (2006) observou que a privação da construção de ninho aumenta os comportamentos agressivos em machos de tilápia-do-nilo. Porém, os animais apresentaram maior taxa de crescimento nessa condição. Essa situação é contraditória, pois crescimento acelerado favorece o produtor, mas não significa que o animal esteja bem, mesmo crescendo mais. De fato, Volpato *et al.* (2007) propõem que a melhor maneira de ofertar uma situação adequada de bem-estar para peixes é verificando o que o peixe prefere. Assim, testes de preferência são necessários para se oferecer boas condições de produção.

Em situações naturais, os ciclídeos podem selecionar o substrato para a construção do ninho (James & Bruton, 1992; Ochi *et al.*, 2001; Workman *et al.*, 2004). Na espécie *Auchenoglanis occidentalis* (Siluliformes, Claroteidae), os animais reaproveitam ninhos já construídos e selecionam ninhos de acordo com a quantidade de partículas grossas no substrato (*e.g.* conchas e pedaços de conchas de moluscos) (Ochi *et al.*, 2001). Assim, testes de escolha em diferentes substratos permitem conhecer o tipo mais adequado para a manutenção dos animais em sistemas artificiais.

Um determinado tipo de substrato pode ocasionar diferentes respostas na reprodução e afetar a agressividade em peixes (Mendonça, 2006). Se isso ocorre, é possível que o tipo de substrato também afete a intensidade do desafio social em machos, provocando mudanças hormonais, como previsto na “hipótese do desafio” (Wingfield, 1990). Esta hipótese postula que os andrógenos podem estar presentes na circulação sanguínea em três níveis: (1) nível homeostático, sendo a secreção dos andrógenos em nível basal; (2) basal reprodutivo, aumento dos andrógenos suficiente para a reprodução (*e.g.* gametogênese, expressão de características sexuais secundárias, e expressão do comportamento reprodutivo); (3) nível

fisiológico máximo, resposta a um estímulo ambiental, tal como interações de machos e presença de fêmeas receptivas (Wingfield *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 2002).

Considerando que situações de desafio social aumentam os níveis de andrógenos em vertebrados (Wingfield *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 2002; Hirschenhause *et al.*, 2004), é possível que o tipo de substrato possa afetar, indiretamente os níveis desses andrógenos. De fato, Mendonça (2006) observou, também, que machos dominantes de tilápia-do-nilo privados de construir ninho apresentaram índice gonadossomático reduzido, sugerindo redução nos níveis de andrógenos. É provável que ocorram alterações hormonais em resposta às alterações comportamentais causadas pelo tipo de substrato, ou seja, pela expressão ou não do comportamento de construção de ninho e pela variação dos níveis de agressividade.

O comportamento de construção de ninho na tilápia-do-nilo é natural da espécie e diminui a agressividade, portanto pode ser considerado um dos fatores que possibilitem bem-estar nessa espécie, apesar de diminuir o seu crescimento (Mendonça, 2006). Entretanto, um substrato mais leve do que o utilizado por Mendonça (2006), como areia, por exemplo, poderia reduzir o gasto energético com as escavações e aumentar a taxa de crescimento na tilápia-do-nilo, além de permitir a construção de ninho sem prejudicar a prontidão reprodutiva do macho. Dessa forma, este estudo testou se a tilápia-do-nilo escolhe substratos mais leves, onde a construção de ninho pode ser facilitada.

Além desse teste, parâmetros reprodutivos e bioenergéticos foram verificados para contribuir na inferência do bem-estar em peixes. Assim, foi testado o efeito do substrato sobre o potencial reprodutivo, níveis de hormônios e gasto de

energia na tilápia-do-nilo, relacionando se a escolha realizada pelo peixe é associada à condição de maior desempenho em termos de crescimento e reprodução. Portanto, a tese geral foi de que o substrato afeta o bem-estar na tilápia-do-nilo, o comportamento social, os níveis de esteróides sexuais e a resposta ao estresse, além de causar diferentes respostas na reprodução e no gasto de energia. Para a defesa da tese proposta foram realizados três estudos experimentais com os seguintes objetivos:

Estudo I: Avaliar se há preferência de substrato para a construção de ninho na tilápia-do-nilo.

Estudo II: Avaliar o efeito do substrato sobre o desempenho reprodutivo (frequência e latência para construção de ninho, frequência e latência para a desova e índice gonadossomático) e sobre indicadores bioenergéticos (taxa de crescimento específico e índice hepatossomático).

Estudo III: Avaliar o efeito do substrato sobre o comportamento agressivo e o desafio social, por meio dos níveis de esteróides sexuais (T e 11Kt) e do cortisol plasmático como um indicador de estresse.

O presente estudo poderá contribuir para proporcionar melhor bem-estar em peixes mantidos em sistemas de criação e colaborar na manutenção de reprodutores de tilápia-do-nilo na piscicultura, pois a construção de ninho faz parte do comportamento reprodutivo da espécie. É oportuno destacar que a tilápia-do-nilo é uma espécie com grande importância na aquicultura mundial (FAO, 2009), é de fácil manejo em laboratório e constitui um ótimo modelo para estudos de comportamento reprodutivo em peixes. Por todas essas características é relevante conhecer os fatores que podem modular o seu comportamento.

2.1. Referências

- Barreto, R. E., Volpato, G. L., Faturid, C. B., Giaquinto, P. C., Gonçalves-de-Freitas, E. & Castilho, M. F. (2009).** Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar. Freshw. Behav. Phy* . 42: 109–118.
- Bracke, M. B. M. & Hopster, H. (2006).** Assessing the importance of natural behavior for animal welfare. *J. Agr. Environ. Ethics*. 19: 77–89.
- Bruton, M. N. & Gophen, M. (1992).** The effect of environmental factors on the nesting and courtship behaviour of *Tilapia zillii* in Lake kinneret (Israel). *Hydrobiologia* 239: 171-178.
- FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations.** <<http://www.fao.org>>. (Acessado em 2009).
- Fryer, G. & Iles, T. D. (1972).** The cichlid fishes of the great lakes of Africa. T.F.H. publications, Neptune City, pp. 105-172.
- Galhardo, L., Almedia O. & Oliveira R. F. (2009).** Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 120: 224-230.
- Galhardo, L., Correia, J. & Oliveira, R. F. (2008).** The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*). *Animal Welfare* 17: 239-254.
- Galhardo, L. & Oliveira, R. (2006).** Bem – estar animal: Um conceito legítimo para peixes? *Rev. Etol.* 8: 51-61.
- Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. (1998).** Sneaking behavior of the Nile tilapia. *Boletim Técnico do CEPTA*. 11: 71-79.
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, A. V. M. & Oliveira, R. F. (2004).** A test of the ‘challenge hypothesis’ in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Anim. Behav.* 68: 741-750.

Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandoe, P. & Turnbull, J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *J. Fish Biol.* 68: 332-372.

James, N. P. N. & Bruton, M. N. (1992). Alternative life-history traits associated with reproduction in *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) in small water bodies of the eastern Cape, South Africa. *Env. Biol. Fish.* 34: 379-392.

McKaye, K. R., Howard, J. H., Stauffer, J. R., Morgan, R. P. & Shonhiwa, F. (1993). Sexual selection and genetic-relationships of a sibling species complex of bower building cichlids in lake Malawi, Africa. *Jpn. J. Ichthyol.* 40: 15-21.

Mendonça, F. Z. (2006). Efeito da privação de ninho sobre a agressividade e o sucesso de acasalamento em machos de tilápia-do-Nilo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 43 p.

Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei, Cichlidae). *Rev. Bras. Zool.* 25: 413-418.

Ochi, H., Kanda, T. & Yanagisawa, Y. (2001). Nest building and brooding behaviour of the bagrid catfish, *Auchenoglanis occidentalis* (Valenciennes, 1840), in Lake Tanganyika. *Copeia* 2: 566-570.

Oliveira, R. F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L. A. & Canário, A. V. M. (2002). Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B: 203-215.

Sneddon, L. U., Hawkesworth S., Braithwaite, V. A. & Yerbury, J. (2006). Impact of environmental disturbance on the stability and benefits of individual status within dominance hierarchies. *Ethology* 112: 437- 447.

Stauffer, J.R., Kellogg, K.A., McKaye, K.R. (2005). Experimental evidence of female choice in lake Malawi cichlids. *Copeia.* 3: 657-660.

Volpato, G. L., Gonçalves-de-Freitas, E. & Castilho, M. F. (2007). Brief review and new insights on the concept of fish welfare. *Dis. Aquat. Org.* 75: 165-171.

Wendelaar-Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Wingfield, J. C., Hegner, R. E., Dufty A. M. Jr & Ball, G. F. (1990). The ‘Challenge Hypothesis’: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *Am. Nat.* 136: 829–846.

Workman, R. D., Hayes, D. B. & Coon, T. G. (2004). Spawning habitat selection by rainbow trout in the Pere Marquette River, Michigan. *J. Great Lakes Res.* 30: 397-406.

4. ESTUDO I

Escolha de substrato para a construção de ninho em machos de tilápia-do-nilo

Artigo submetido como “brief communication” para a revista Journal of Fish Biology. De acordo com as normas da revistas, o manuscrito não é dividido em tópicos (Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão), embora o conteúdo de tais tópicos estejam presentes. A versão submetida está no Anexo e passará por modificações de acordo com sugestões dos revisores.

Escolha de substrato para a construção de ninho em machos de tilápia-do-nilo

Este estudo está de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (www.cobea.org.br) e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP (protocolo 064-06).

Running title: Escolha de substrato na tilápia-do-nilo.

Tipo do artigo: *Brief Communication*

Resumo

A escolha de substrato (areia, areia + concha, pedra e sem substrato removível) foi testado em 15 grupos (1 macho e 2 fêmeas) formados por animais adultos de tilápia-do-nilo. Os machos não demonstraram escolha para permanecer em um determinado tipo de substrato antes da construção de ninho, mas escolheram o substrato de areia para a construção do mesmo.

Palavras-chave: teste de preferência, bem-estar, ninho, ciclídeo

A preocupação com o bem-estar animal tem motivado as pesquisas para melhorar as condições de manutenção de peixes de cativeiro (*e.g.* Huntingford *et al.*, 2006). Enquanto pesquisas extensivas têm sido dedicadas a identificar indicadores fisiológicos e bioquímicos de bem-estar de peixes, trabalhos recentes tem enfatizado o comportamento para revelar o *status* de bem-estar (Dawkins, 2006; Duncan, 2006; Volpato *et al.*, 2007; Volpato *et al.*, 2009). Dessa forma, testes de escolha são um modo apropriado para determinar o que é importante para o peixe e outros animais não humanos (Volpato *et al.*, 2007; Volpato *et al.*, 2009), pois eles indicam o que o animal quer. Neste estudo, foi investigada a preferência por substrato em um ciclídeo.

Várias espécies de peixes forrageiam no substrato e inspecionam a superfície para remover pequenas partículas com a boca (Hart, 1993). Em adição, algumas espécies de peixes, notavelmente membros da família Cichlidae, usam o substrato para a construção de ninhos (Fryer & Iles, 1972). Na tilápia-do-nilo, por exemplo, o macho remove substrato com a boca, escavando uma área circular (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Tais associações com o substrato sugerem que o comportamento do peixe pode ser afetado por este fator físico do ambiente. De fato, algumas espécies de peixe ajustam seu comportamento de acordo com o substrato e o contexto comportamental. Por exemplo, o bagre *Auchenoglanis occidentalis* (Valenciennes, 1840), seleciona substrato para reprodução (cujo ninho também é um local de cuidado com a prole) de acordo com a qualidade das conchas de moluscos (Ochi *et al.*, 2001). *Merlangius merlangus* (L.) (Gadidae) prefere substratos mais complexos (com estruturas emergentes) em contexto com risco de predação, mas, tal preferência muda para o substrato de areia em animais grandes, provavelmente porque é o melhor lugar para camuflagem (Atkinson *et al.*, 2004). O tipo de substrato também pode afetar a distribuição do habitat de algumas espécies de peixes, como *Platichthys flesus* (L.) (Pleuronectidae) (Carl *et al.*, 2008). Assim, a composição e complexidade do substrato pode ser um importante aspecto

da vida dos peixes que pode contribuir para o enriquecimento ambiental em condições de cativeiro.

Neste trabalho, foi descrita a escolha de substrato pela tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), um ciclídeo amplamente utilizado na aquicultura mundial. Nesta espécie, os machos constroem um ninho circular no substrato para a desova. Assim, a escolha de substrato foi investigada nos machos em um contexto reprodutivo.

Dezenove grupos formados por um macho (média \pm desvio padrão, peso: 66,96 g \pm 17,66 g e comprimento padrão: 12,88 cm \pm 1,10 cm, n = 19) e duas fêmeas (média \pm desvio padrão, peso: 55,79 g \pm 13,72 g e comprimento padrão: 12,32 cm \pm 0,97 cm, n = 38) foram estabelecidos no período da tarde, no primeiro dia de observação, e foram mantidos até a detecção do primeiro ninho (todos os machos construíram ninho em até cinco dias). O fundo do aquário teste foi dividido em quatro partes com igual tamanho, cada uma composta por um tipo de substrato: areia; areia + conchas de bivalves (referido aqui como concha) com média (\pm desvio padrão) da área das conchas de 216,97 \pm 127,61 mm² (n = 18); pedra, e vazio (sem substrato removível), perfazendo quatro níveis de complexidade, definidas pelo tamanho da partícula, textura, forma e peso. As partículas de substrato (até mesmo as pedras) eram suficientemente pequenas para que os machos pudessem removê-las com a boca. De fato, observações *ad libitum* em outros grupos de tilápia-do-nilo revelaram que, quando apenas um tipo de substrato está disponível, os machos constroem ninho em todos eles.

O peso do substrato foi obtido por meio de 10 amostras (de 32 ml cada) do peso seco de cada substrato: média \pm desvio padrão, areia (55,96 \pm 1,60 g), concha (56,03 \pm 3,16 g) e pedras (59,14 \pm 2,19g) (one-way ANOVA, n = 10, $P < 0,001$). Areia e concha apresentaram pesos similares (LSD, n = 10, $P > 0,05$), e ambos eram mais leves que as pedras (LSD, n = 10, $P_{\text{areia}} < 0,01$, $P_{\text{concha}} < 0,01$).

Um aquário de vidro (600 x 600 mm de base e 400 mm de altura) foi usado para a realização do teste de escolha. O fundo foi dividido por partes de vidro com 100 mm de altura, e o substrato foi adicionado até 30 mm de altura. Uma peça de vidro (30 mm de altura) foi adicionada no quadrante sem substrato para a profundidade ser a mesma dos outros quadrantes. A posição de cada substrato foi aleatorizado para cada grupo de peixe evitando que a escolha pudesse ser influenciada pela posição espacial, como recomendado por Volpato *et al.* (2007). Todos os dias foram realizadas observações de 20 min no período da manhã (~08:30 horas) e 20 min a tarde (~14:30 horas). Durante cada período de observação, dez inspeções eram feitas a cada dois minutos, para registro de qual substrato o peixe estava. Quando o primeiro ninho foi detectado, o tipo de substrato foi registrado e as observações eram interrompidas. Este desenho experimental resultou em diferentes números de observações entre os grupos. Deste modo, a frequência de ocupação foi corrigida para posterior análise estatística. Em 4 dos 19 grupos, um ninho foi detectado na primeira observação, assim, a posição dos peixes foi registrada para 15 réplicas.

Um filtro biológico cilíndrico (78 mm de diâmetro) foi fixado no meio do aquário, promovendo aeração contínua da água (o filtro foi colocado no centro do aquário para promover uniformidade na distribuição de água e ar para os quatro quadrantes). A água foi mantida com valores apropriados de amônia (~0,25 ppm), pH (~7,5) e temperatura ($27,53 \pm 0,62$ °C). O fotoperíodo foi de 12 horas de luz (das 7:00 as 19:00 horas). Foi oferecida ração para peixes tropicais na proporção de 2 % da biomassa (1% de manhã e 1% à tarde). O alimento foi oferecido sempre depois dos períodos de observação e foi distribuído de forma homogênea entre os quadrantes para evitar interferência na escolha do peixe.

Todas as manipulações foram precedidas por anestesia com benzocaína (como recomendado por Gontijo *et al.*, 2003) na proporção de 3 mg/ml. Os peixes foram sexados por meio de inspeção da papila genital corada com azul de metileno, para destacar a abertura

do oviduto nas fêmeas (*e.g.* Carvalho & Gonçalves-de-Freitas, 2008). Os animais foram identificados por diferentes cortes feitos na nadadeira caudal (*e.g.* Fernandes & Volpato, 1993; Höglund *et al.*, 2005).

A posição dos animais foi registrada de acordo com a posição do olho do peixe em relação a cada quadrante. O ninho foi definido como uma área escavada em algum dos três substratos, como descrito previamente (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998; Volpato *et al.*, 2004; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). Como as escolhas dos machos poderiam ser influenciadas pela posição das fêmeas, analisamos a posição de ambos, machos e fêmeas. A proporção de ocupação foi transformada por raiz quadrada do arco-seno (Quin & Keough, 2002), satisfazendo assim os critérios para ANOVA, com base nos testes de skewness, kurtosis e homocedasticidade (Ha & Ha, 2007). A frequência média relativa de ocupação dos substratos foi comparada entre os sexos (fator do grupo) por *two-way* ANOVA para medidas repetidas (Zar, 1999). As frequências da construção de ninho em cada substrato foram comparadas através do teste de proporção de Goodman, considerando a dependência entre as variáveis (Goodman, 1965).

A frequência de permanência em cada substrato era quantificada para cada peixe em cada réplica, e os dados das fêmeas foram somados em cada réplica. A média da frequência relativa de ocupação foi similar entre os substratos para machos e fêmeas (*two-way* ANOVA, $n = 15$, $P > 0,05$; Fig. 1A). Entretanto, os machos construíram ninho exclusivamente no substrato de areia ou concha, mas um maior número de machos escolheu o substrato de areia para construção dos ninhos (teste de Goodman, $n = 19$, $P < 0,05$; Fig. 1B). Embora, fêmeas isoladas possam construir ninho (Castro *et al.*, 2009), elas não construíram ninho neste estudo. Não foi observada desova no quadrante sem substrato.

Os resultados indicam que machos de tilápia-do-nilo constroem ninhos nos substratos mais leves, mas eles preferem substrato menos complexo. O contexto no qual o peixe

encontrava (i.e., construção ou não de ninho) também exerceu um papel na escolha por um substrato específico, aparecendo apenas no contexto de construção de ninho.

No esturjão (*Acipenser transmontanus*), a preferência para a areia é associada com forrageamento (Bennett *et al.*, 2007) e, em *Merlangius merlangus*, com comportamento anti-predatório (Atkinson *et al.*, 2004). Na tilápia-do-nilo, uma explicação diferente é possível. Machos dessa espécie defendem território e constroem ninho no substrato para a reprodução (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Tais comportamentos podem explicar porque machos escolhem substrato que podem ser removidos com a boca, em vez de nenhum substrato, ainda que a desova ocorra na ausência de substrato (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). De fato, Galhardo *et al.* (2008) demonstraram que o bem-estar é afetado pela falta de substrato em machos de *Oreochromis mossambicus*, com redução geral das atividades, do comportamento territorial e aparecimento de comportamento no vácuo.

Dos três substratos removíveis, somente dois (areia e concha) foram escolhidos pelos machos, indicando que aspectos além de possível remoção são importantes na escolha do substrato. Por que os machos preferem areia para construir os ninhos? Os machos escolheram os substratos mais leves, sugerindo que o peso do substrato afeta a escolha entre machos de tilápia-do-nilo, o que é importante considerar, pois eles removem substrato com a boca. Isto é relevante já que pode promover um menor consumo de energia do que construir ninho em um substrato mais pesado, como as pedras. De fato, machos de tilápia-do-nilo em ausência de substrato apresentam um maior crescimento do que machos mantidos em substrato de pedra (Mendonça, 2006). Entretanto, como areia e concha apresentam peso similar, outras causas também podem estar envolvidas com a preferência. Primeiro, substratos menos complexos (como areia) podem facilitar a construção de ninho. Segundo, embora os machos sejam capazes de remover com a boca todos os três substratos do teste (areia, concha e pedra), traços

sutis relacionados com a granulometria podem ser envolvidos, questão que pode ser respondida em futuras investigações.

A existência de preferência por substrato pelos machos indica que os materiais escolhidos (areia e concha) podem ser utilizados para enriquecer o ambiente de espécies em cativeiro. Assumindo a definição de bem-estar em peixes baseada na preferência como sendo: “... o estado interno de um peixe quando ele está sob condições que foram livremente escolhidas” (Volpato *et al.* 2007; p. 170), o fato desses substratos serem escolhidos sugere que eles são apropriados para melhorar o bem-estar em peixes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Carlos Eduardo de Sousa e Ginaldo Vieira dos Santos (ambos da UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil) pelo suporte técnico. A Leonor Galhardo (ISPA, Portugal) pelas críticas e sugestões na versão prévia deste manuscrito. Esta pesquisa foi financiada pelo CNPq 140098/2007-0 (Mendonça FZ).

Referências

- Atkinson, C. J. L., Bergmann, M. & Kaiser, M. J. (2004). Habitat selection in whiting. *Journal of Fish Biology* **64**, 788-793. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00340.x
- Bennett, W. R., Edmondson, G., Williamson, K. & Gelley, J. (2007). An investigation of the substratum preference of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) eleutheroembryos. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 539-542. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.01003.x
- Carl, J. D., Sparrevohn, C. R., Nicolajsen, H. & Stottrup, J. G. (2008). Substratum selection by juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.): effect of ephemeral filamentous macroalgae. *Journal of Fish Biology* **72**, 2570–2578. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01866.x
- Carvalho, T. B. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 807-812.
- Castro, A. L. S., Gonçalves-de-Freitas, E., Volpato, G. L. & Oliveira, C. (2009). Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **42**, 368-374. doi: 10.1590/S0100-879X2009000400009
- Dawkins, M. S. (2006). Through animal eyes: What behaviour tells us. *Applied Animal Behaviour Science* **100**, 4-10. doi: 10.1016/j.applanim.2006.04.010
- Duncan, I. J. H. (2006). The changing concept of animal sentience. *Applied Animal Behaviour Science* **100**, 11-19. doi: 10.1016/j.applanim.2006.04.011
- Fernandes, M. O. & Volpato, G. L. (1993). Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology & Behaviour* **54**, 319-23. doi: 10.1016/0031-9384(93)90117-X
- Fryer, G. & Iles, T. D. (1972). Breeding habits, In *The cichlid fishes of the great lakes of Africa* (Fryer, G. & Iles, T. D., eds.), pp. 105-172. Neptune City: T.F.H. publications.

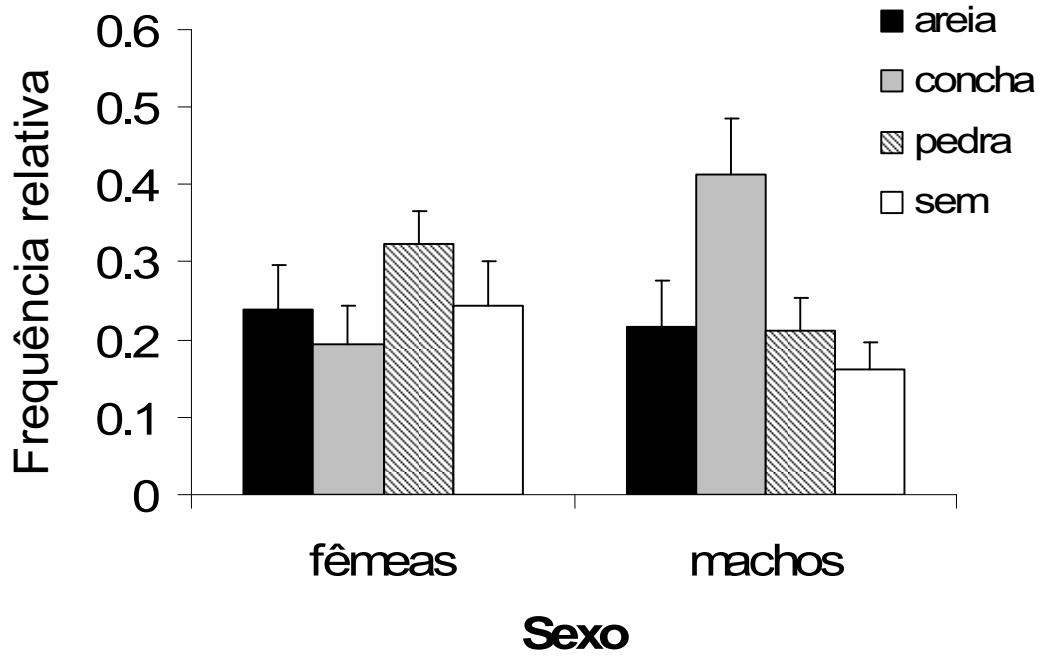
- Galhardo, L., Correia, J. & Oliveira, R. F. (2008). The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*). *Animal Welfare* **17**, 239-254.
- Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. (1998). Sneaking behavior of the Nile tilapia. *Boletim Técnico do CEPTA* **11**, 71-79.
- Gontijo, A. M. de M. C., Barreto, R. E., Speit, G., Reyes, V. A. V., Volpato, G. L. & Salvadori, D. M. F., (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research* **534**, 165-172. doi: 10.1016/S1383-5718(02)00276-0
- Goodman, L. A. (1965). On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Techometrics* **7**, 247-254.
- Ha, R. R. & Ha, J. C. (2007). *Integrative Statistics for Behavioral Sciences*, Boston: Pearson Custom Publishing.
- Hart, P. J. B. (1993). Teleost foraging: facts and theories, In *Behaviour of Teleost Fishes* (Pitcher, T. J., ed.), pp. 253-279. New York: Chapman & Hall.
- Höglund, E., Bakke, M. J., Øverlic, O., Winberg, S. & Nilsson, G. E. (2005). Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation. *Aquaculture* **249**, 525-531. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.028
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandoe, P. & Turnbull, J. F. (2006) Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology* **68**, 332–372. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.01046.x.
- Mendonça, F. Z. (2006). Efeito da privação de ninho sobre a agressividade e o sucesso de acasalamento em machos de tilápia-do-nilo. *Master Thesis*, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil – 43p.
- Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei, Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **25**, 413-418.

- Ochi, H., Kanda, T. & Yanagisawa, Y. (2001). Nest building and brooding behaviour of the bagrid catfish, *Auchenoglanis occidentalis* (Valenciennes, 1840), in Lake Tanganyika. *Copeia* **2**, 566-570.
- Quin, G. P. & Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for Biologists*, Cambridge University Press, 537 pp., Cambridge.
- Volpato, G. L., Duarte, C. R. A. & Luchiari, A. C. (2004). Environmental color affects Nile tilapia reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* **37**, 479-483. doi: 10.1590/S0100-879X2004000400004.
- Volpato, G. L., Gonçalves-de-Freitas, E. & Castilho, M. F. (2007). Insights into the concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms* **75**, 165-171.
- Volpato, G. L., Giaquinto, P. C., Fernandes-Castilho, M., Barreto, R. E. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2009). Animal welfare: from concepts to reality. *Oecologia Brasiliensis* **13**, 5-15.
- Zar, J. (1999). *Biostatistical Analyses*. Printice Hall. 663 pp. New Jersey.

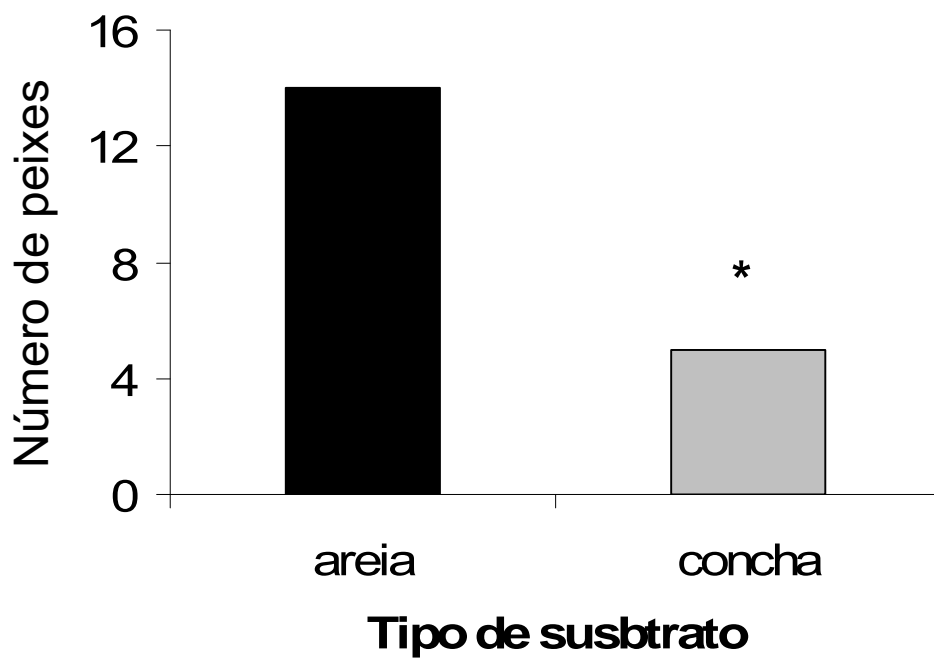
Legenda da figura

Fig. 1. Escolha de substrato em adultos de tilápia-do-nilo. A) Média da frequência relativa \pm erro padrão ($n = 15$) de peixes residentes nos respectivos substratos antes da construção de ninho. Proporção dos valores transformados pela raiz quadrada do arco-seno, 2-way ANOVA para medidas repetidas ($P = 0,06$). B) Número de machos que construíram ninho em cada substrato ($n = 19$). *indica diferença estatística (teste binomial de Goodman, $P < 0,05$).

A) Antes da construção de ninho



B) Ninhos



5. ESTUDO II

**O tipo de substrato afeta o desempenho reprodutivo na
tilápia-do-nilo**

O tipo de substrato afeta o desempenho reprodutivo na tilápia-do-nilo

Este estudo está de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (www.cobea.org.br).

Running title: substrato, reprodução e gasto de energia na tilápia-do-nilo

Tipo do artigo: *full paper*

Resumo

Em muitas espécies de ciclídeos, os machos escavam o substrato com a boca para a construção de ninhos (sítios de acasalamento), ocasionando gasto de energia. A hipótese testada foi que o tipo de substrato afeta o gasto energético e, conseqüentemente, o comportamento reprodutivo. Assim, foi avaliado o efeito do tipo de substrato sobre indicadores reprodutivos (índice gonadossomático (IGS), latência e porcentagem de construção de ninho, latência e porcentagem de desova e número de ovos incubados) e bioenergéticos (taxa de crescimento específico (TCE) e índice hepatossomático (IHS)) de machos de *Oreochromis niloticus*. Foram utilizados 4 tipos de substratos: areia (n=10), areia+concha (n=9), pedra (n=9) e sem substrato (n=10), sendo areia e areia+concha de mesmo peso e ambos mais leves que pedra. Os substratos foram individualizados em aquários de 140 l, cada um contendo grupos de 2 machos e 3 fêmeas, mantidos durante 12 dias ou até 48 horas após a primeira desova. Os grupos foram observados diariamente para registro da construção de ninho e da desova. Não houve diferença nos valores da TCE e do IHS (ANOVA, TCE P=0,17; IHS P=0,95), indicando que o tipo de substrato não afeta o gasto energético nos machos de tilápia-do-nilo. O IGS (ANOVA, P=0,49), a latência para a

construção de ninho (Kruskal-Wallis, $P=0,13$) e para desova (ANOVA, $P=0,75$) e a porcentagem de ovos incubados (Teste G, $P=0,349$) foram similares entre os tratamentos. Entretanto, a porcentagem de construção de ninho foi maior em areia e areia+concha do que em pedra (Teste G, $P<0,0001$). Já a porcentagem de animais que desovaram foi menor no sem substrato (Teste G, $P=0,001$), indicando que a presença de substrato facilita a reprodução. Assim, concluímos que o tipo de substrato influencia o comportamento reprodutivo, mas não afeta o gasto energético na tilápia-do-nilo.

Palavras-chave: comportamento reprodutivo, ninho, cichlidae, desova, crescimento.

Introdução

O comportamento reprodutivo dos animais geralmente é formado por várias etapas, como a competição por acesso a sítios de acasalamento (território), construção de ninho, reconhecimento e atração de parceiros (corte), liberação de gametas e cuidado com a prole (Liley & Stacey, 1983; Andersson, 1994). Essas etapas podem variar conforme a espécie ou de acordo com a disponibilidade de recursos no ambiente. Algumas espécies, por exemplo *Astyanax fasciatus*, apenas liberam os gametas na água e não realizam algum tipo de cuidado parental; outras, como o *Aequidens vittatus*, utilizam a superfície de folhas para colocarem seus ovos e cuidarem da prole (Keenleyside & Bietz, 1981). Existem ainda, outras espécies que constroem seus ninhos, os quais podem ser simples depressões no substrato, *e.g.* *Oreochromis niloticus* (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998), ou ninhos mais elaborados, *e.g.* o túnel de algas construído pelo *Gasterosteus aculeatus* (Giles, 1984).

O ninho para os peixes pode ser um sítio de acasalamento, sítio de cuidado com a prole (Fryer & Iles, 1972; Mckaye et al., 1993), redutor da agressividade (Mendonça, 2006), além de ser um elemento da seleção sexual, pois em algumas espécies de peixes, o tamanho do ninho pode influenciar a escolha das fêmeas por parceiros sexuais (Mc Kaye et al., 1990; Nelson, 1995; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). Além disso, machos que investem mais em ninhos têm maior sucesso de acasalamento (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). Assim, o ninho desempenha várias funções dentro do contexto reprodutivo.

A reprodução e as etapas envolvidas no comportamento reprodutivo representam um consumo de energia significativo na vida dos animais, sendo necessárias reservas energéticas para alcançar o sucesso reprodutivo (Krebs & Davies, 1993). De acordo com Grantner & Taborsky (1998) a simples atividade de construção de ninho é dispendiosa em termos energéticos para o animal (*e.g.* *Neolamprologus pulcher*). De fato, Mendonça (2006), observou que machos de *Oreochromis niloticus* apresentaram maior taxa de crescimento

quando mantidos em condição de privação de construção de ninho. Porém, apresentaram menor índice gonadossomático do que os machos mantidos na presença de substrato (pedriscos) para a construção de ninho.

O Estudo I (Escolha de substrato para a construção de ninho em machos de tilápia-do-nilo) evidenciou que o macho de tilápia-do-nilo prefere construir ninhos em substratos mais leves como areia do que em pedras, como o utilizado por Mendonça (2006). Nesse caso, é possível que substratos mais leves, *e.g.* areia, reduzam o gasto energético com as escavações e aumentam a taxa de crescimento na tilápia-do-nilo, além de permitir a construção de ninho que é um comportamento natural da espécie. Além disso, os animais mantidos em substratos mais leves apresentaram maiores níveis plasmáticos de 11KT (Estudo III - Efeito do tipo de substrato sobre as interações agonísticas e níveis hormonais em ciclídeo), o que poderia indicar aumento do desempenho reprodutivo em machos de tilápia-do-nilo nessas condições. Dessa forma, foi testado o efeito do substrato sobre o desempenho reprodutivo (frequência e latência para construção de ninho, frequência e latência para a desova e índice gonadossomático) e indicadores bioenergéticos (taxa de crescimento específico e índice hepatossomático).

A espécie escolhida para este estudo foi a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), um ciclídeo africano com reprodução poligínica, na qual os machos disputam território e formam arenas reprodutivas (Baerends & Baerends van Roon, 1950; Lowe-McConnell, 1958). Os machos constroem ninhos circulares, removendo substrato com a boca e depositando-os ao redor de um ponto central. As fêmeas são atraídas para a reprodução que acontece dentro do ninho (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Além disso, a tilápia-do-nilo é uma espécie de grande importância na aquicultura mundial (FAO, 2009), o que torna relevante conhecer os fatores que podem modular seu gasto de energia e seu comportamento reprodutivo. Sendo de

fácil manejo em laboratório, também constitui um ótimo modelo para estudos de comportamento em peixes.

Material e Métodos

Manutenção dos peixes

Os exemplares de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), utilizados nesse estudo foram criados em um tanque de 185 m³. Quinze dias antes do experimento, os peixes foram transferidos para o laboratório e mantidos em caixas de 500 l (ca.1 peixe/5 l), com água não clorada, temperatura de ~27°C e fotoperíodo de 12 horas (iniciando as 7:00 h) para ajustes às condições de estudo. Filtros biológicos e aeração constante mantiveram a qualidade da água. Os peixes foram alimentados com ração (32 % de proteína bruta), oferecida duas vezes ao dia (~8:00 h e ~16:00 h) até a saciação.

Delineamento experimental

O efeito do tipo de substrato sobre indicadores reprodutivos e bioenergéticos foi testado em quatro tipos de substrato individualizados: areia (n=10), areia+concha (n=9), pedra (n=9) e sem substrato removível (n=10). Para comparar o peso entre os substratos (areia, areia+concha e pedra) foram pesadas 10 amostras de 32 ml cada (média ± desvio padrão: areia 55,96 ± 1,60 g, areia+concha 56,03 ± 3,16 g e pedra 59,14 ± 2,19g; *one-way* ANOVA, n = 10, P < 0,001). Areia e areia+concha apresentaram pesos similares (Fisher LSD, n = 10, P > 0,05), e ambas mais leves que pedra (LSD, n = 10, P_{areia} < 0,01, P_{areia+concha} < 0,01). Assim, as variações do peso e da complexidade de cada substrato tornam-os adequados para avaliar indicadores bioenergéticos e reprodutivos. Além disso, são encontrados em ambientes naturais e amplamente usados em criação e na aquariofilia (observação pessoal).

O experimento foi formado por 4 diferentes tratamentos, cada um com um tipo de substrato. Cada réplica, em cada tratamento, foi constituída de 2 machos e 3 fêmeas. As fêmeas eram menores que os machos (aproximadamente 1 cm) para manter o padrão natural da espécie (Tabela 1). Os animais permaneceram agrupados até 48 horas após a ocorrência da primeira desova ou, no máximo, por 12 dias, pois em estudo anterior (Mendonça, 2006) foi verificado que esse período é suficiente para inferir gasto de energia e para que ocorra reprodução em laboratório.

Condições experimentais

Foram utilizados aquários (60 cm X 60 cm X 40 cm, ~ 140 l) com as paredes laterais e posterior cobertas com plástico azul para evitar o contato visual dos animais em aquários vizinhos. A cor azul foi escolhida porque reduz o estresse (Volpato & Barreto, 2001) e melhora a reprodução (Volpato et al., 2004) na tilápia-do-nilo. As observações eram realizadas pela parte frontal, a qual permaneceu descoberta durante todo experimento. Em cada tratamento foi adicionado 8 l de substrato (areia, areia+concha e pedra).

Os peixes foram alimentados com ração comercial (32% de proteína), na proporção de 2 % da biomassa, 1% no início da manhã e 1 % no final da tarde. A temperatura da água foi de $27,09 \pm 0,61$ °C (média \pm desvio padrão) e o fotoperíodo foi de 12 horas, iniciando as 7:00 h. A qualidade da água foi mantida por filtro biológico e aeração constante, e a cada 2 dias 1/3 da água do aquário era renovada. O pH foi de 7,5 e a amônia total de 0,007 ppm.

Todas as manipulações dos animais foram precedidas por anestesia (benzocaína 3 mg/l). Os animais foram identificados por pequenos cortes na nadadeira caudal como em Fernandes & Volpato (1993) e Hoglund et al. (2005). Esse método não afeta o comportamento e não causa problemas de locomoção para o animal, como já verificado em

experimentos anteriores em nosso laboratório (observação pessoal). A sexagem foi realizada por meio da inspeção da papila genital corada com azul de metileno, o que evidencia a abertura do oviduto na papila genital da fêmea (ex. Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). No final do experimento, os peixes foram mortos por dose letal de benzocaína (18 mg/l) para realização das biometrias, confirmação do sexo e da maturidade sexual (com base nas descrições de Babiker & Ibrahim (1979) e Paiva et al. (1988)).

Desempenho reprodutivo

Foram utilizados como indicadores de desempenho reprodutivo a frequência de ninhos construídos e a latência (em dias) para construção do primeiro ninho, assim como a frequência de desova, a latência (em dias) para a primeira desova e o número de ovos incubados.

Os ovos foram retirados da boca das fêmeas 48 horas após a desova. Para isso, as fêmeas foram removidas cuidadosamente dos aquários com uma rede de malha fina e colocadas em um balde com anestésico (dose letal), sendo os ovos removidos da boca com um pincel fino e colocados em uma placa de Petri para contagem. Caso algum animal soltasse os ovos, esses eram capturados na malha da rede ou dentro do balde de anestesia.

Além desses indicadores também foi calculado o índice gonadossomático (IGS) como indicador da condição reprodutiva do animal (Babiker & Ibrahim, 1979). Sendo, **(IGS= (peso fresco da gônada / peso fresco corporal). 100)**.

Indicadores bioenergéticos

Para avaliar o efeito do tipo do substrato sobre as reservas energéticas foi calculada a taxa de crescimento específico (TCE), segundo Wootton (1998) (**TCE = (lnPeso final -**

InPeso inicial / Δt). 100, sendo $\Delta t = 12$ dias), e o índice hepatossomático (IHS), de acordo com Bruslé & Anadon (1996) (**IHS= (peso fresco do fígado / peso fresco corporal). 100**).

Além da observação diária para verificar as desovas, foi realizada uma avaliação qualitativa diária da condição geral do grupo. Os animais foram observados para verificação de possíveis ferimentos decorrentes dos ataques. Além disso, foi verificado se havia dominância de um dos animais no grupo através da observação da cor do corpo e da íris, que são mais claras nos dominantes (Falter, 1987; Volpato et al., 1989; Volpato et al., 2003), e pela defesa de território no substrato, que é feita pelo dominante (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998).

Análise dos dados

A frequência de construção de ninhos, de desovas e o número de ovos incubados foram transformados em porcentagem e comparados por teste G. Para esse teste, inicialmente verificou-se a diferença entre os quatro tratamentos (nível de significância $P = 0,05$). Quando os dados apresentaram diferença foram realizadas comparações pareadas, sendo o nível de significância corrigido pela equação de Bonferroni ($\alpha = 0,05/\text{número de tratamentos}$) (Zar, 1999).

O IGS, a TCE e o IHS foram comparados por *one-way* ANOVA, a latência para a construção de ninho e a latência para desova foram comparadas por Kruskal-Wallis (Zar, 1999; Vieira, 2006). O nível de significância adotado nesses testes foi $P = 0,05$. Foi aplicado o teste F_{max} para avaliar a homocedasticidade de variância e a normalidade foi avaliada pelos valores de skewness e kurtosis (Ha & Ha, 2007). Para as análises desses parâmetros foram

utilizados os dados dos dois machos presentes em cada réplica. As réplicas com desova foram excluídas de cada tratamento.

Resultados

Em todas as réplicas de todos os tratamentos, um dos machos do grupo apresentava características de dominância.

A frequência de desova foi maior no substrato de areia do que na condição sem substrato (Figura 1) e a frequência de construção de ninho (teste G, $p < 0,005$ e $\alpha < 0,017$), comparada apenas entre os três substratos removíveis, foi menor no substrato de pedra (44%, $n=9$) quando comparado com areia (90%, $n=10$) e areia+concha (89%, $n=9$).

O número de ovos incubados pelas fêmeas (teste G, $p > 0,05$) foi similar entre os tratamentos (média \pm desvio padrão: areia ($n=3$) $255,33 \pm 56,90$; areia+concha ($n=2$) $286 \pm 97,58$; pedra ($n=2$) $152,5 \pm 7,78$ e sem substrato removível ($n=1$) 159). A latência para a construção de ninho, latência para desova, IGS, IHS e TCE também foram similares entre os tratamentos (Tabela 2).

Discussão

Os peixes construíram mais ninhos nos substratos de areia e areia+concha quando comparados com o substrato de pedras. Esses resultados assemelham-se aos encontrados no teste de preferência (Estudo I), pois os substratos escolhidos para a primeira construção de ninho foram os mesmos (areia e areia+concha, sendo o de areia com maior frequência). Padrão semelhante foi encontrado por James & Bruton (1992) para a espécie *Oreochromis mossambicus*. Segundo os autores, características do ambiente também podem influenciar indicadores reprodutivos. A construção de ninho pode depender do material do substrato e a

freqüência de desova pode ser influenciada por características físicas do ambiente, independente das condições corporais dos peixes

Neste estudo, a freqüência de desova foi maior no substrato de areia do que no tratamento sem substrato. Provavelmente, a presença do substrato preferido (areia) estimule o comportamento reprodutivo quando comparado com um ambiente faltando elementos para a realização do comportamento. Essa diferença deixa de ser significativa quando comparado o grupo sem substrato com os demais (areia+concha e pedra). De fato, Mendonça & Gonçalves-de-Freitas (2008) também verificaram que a freqüência de desova na tilápia-do-nilo é a mesma na presença de substrato de pedra e na ausência de substrato. Em termos de sucesso de desova, aparentemente o substrato interfere apenas quando comparado dois extremos: o preferido para construção de ninho com a impossibilidade de desenvolvimento do comportamento. A tilápia-do-nilo desova em qualquer situação, mesmo sem substrato (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). No entanto, prefere substrato mais leve e menos complexo (Estudo I), o qual estimula mais intensamente a desova.

A ausência de diferença estatística na latência para a construção de ninho e na latência para desova indica que esses comportamentos não são adiados e nem extintos devido ao tipo de substrato. Assim, conclui-se que o tipo de substrato não afeta a capacidade reprodutiva, mas afeta o desempenho.

O número de ovos produzidos não foi afetado pelo tipo de substrato. Esse indicador reprodutivo é relacionado com as condições gerais das fêmeas, indicando que houve o mesmo investimento reprodutivo nos diferentes grupos e, portanto, não houve efeito do tipo de substrato. De acordo com Barbiker & Ibrahim (1979), a fecundidade das fêmeas de *Oreochromis niloticus* é correlacionada com o tamanho do corpo e com a idade. Neste estudo, as fêmeas apresentaram tamanhos e pesos iniciais diferentes. Entretanto, esses fatores não interferiram na quantidade de ovos produzidos. As fêmeas com menor peso foram as do

tratamento areia, que tiveram a porcentagem de desova semelhante à areia+concha e à pedra. Provavelmente outros fatores ambientais, que causam prejuízos no crescimento, afetem esses parâmetros mais diretamente.

O IGS dos machos não foi influenciado pelo substrato. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Mendonça (2006), pois o IGS dos dominantes foi maior na presença de substrato, mesmo após eles terem reproduzido. No presente estudo consideramos a condição geral do grupo independente do *rank* social, dessa forma, o substrato não interferiu no IGS dos machos quando analisados em grupo, levando em conta apenas a presença de diferentes substratos.

Na tilápia-do-nilo, a atividade de construção de ninho está associada a um maior IGS para o dominante e a um menor crescimento e menor IHS em machos mantidos nessas condições, quando comparado a condições com privação de construção de ninho (Mendonça, 2006). Neste estudo, não verificamos maior consumo de energia relacionado ao tipo de substrato, indicando que a construção de ninho por si só não interfere no gasto de energia. Entretanto, a frequência de construção de ninho foi maior nos substratos mais leves (*e.g.* areia e areia+concha) e, provavelmente, o peso mais leve do substrato requeira menos esforço do animal que, dessa forma, consome igual energia quando comparado ao substrato de pedra que é mais pesado. Nesse tratamento o número de ninhos construídos foi menor, porém o esforço em cavar pode ser maior, já que o substrato é mais pesado, consumindo igual quantidade de energia que no substrato de areia e areia+concha. Em resumo, concluímos que o tipo de substrato afeta o comportamento reprodutivo, mas não afeta o gasto energético na tilápia-do-nilo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Rodrigo Damasco Daud (UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil) e a Thaís Billalba Carvalho (UFAM, Manaus, AM, Brasil) pelas sugestões no texto e nas análises estatísticas. A Carlos Eduardo de Sousa e a Roselene Costa Ferreira (ambos da UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil) pela ajuda na coleta de dados e manutenção dos animais.

Referências

- Andersson, M. (1994). Sexual Selection. New Jersey, Princeton University Press, XX+599p.
- Babiker, M. M. & Ibrahim, H. (1979). Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. *Journal of Fish Biology* 14: 437-448.
- Baerends, G. P. & Baerends van Roon, J. M. (1950). An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes. *Behavior Supply* 1: 1-243.
- Bruslé, J., Anadon, G. G. (1996). The structure and function of fish liver. In: Munshi, J. S. D., Dutta, M. H. (Eds.), *Fish Morphology-Horizon of New research*. Balkema, Rotterdam, pp. 77-93.
- Falter, U. (1987). Description des patrons de coloration chez *Oreochromis niloticus* (L.) (Teleostei: Cichlidae). *Annales de la Société Royale de Zoologie Belge* 117: 201-219.
- FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. <<http://www.fao.org>>. (Acessado em 2009).
- Fernandes, M. O., Volpato, G. L. (1993) Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology and Behavior* 54: 319-323
- Fryer, G., Iles, T. D. (1972). *The cichlid fishes of the great lakes of Africa*. T.F.H. publications, Neptune City, pp. 105-172.

Giles N., 1984. Implications of parental care of offspring for the anti-predator behaviour of adult male and female three-spined stickbacks, *Gasterosteus aculeatus* L. In: Potts, G.W., Wootton, R.J. (Eds.), Fish Reproduction: Strategies and Tactics. Academic Press, London, pp. 275-287.

Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. (1998). Sneaking behavior of the Nile tilapia. Boletim Técnico do CEPTA 11: 71-79.

Grantner, A., Taborsky, M. (1998). The metabolic rates associated with resting and with the performance of agonistic, submissive and digging behaviours in the cichlid fish *Neolamprologus pulcher* (Pisces: Cichlidae). Journal of Comparative Physiology B 168: 427-433.

Ha, R. R. & Ha, J. C. (2007). Integrative Statistics for Behavioral Sciences, Boston: Pearson Custom Publishing. 325 p.

Höglund, E., Bakke M. J., Øverlic O., Winberg S., Nilsson G. E. (2005). Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation. Aquaculture 249: 525-531.

James, N. P. N. & Bruton, M. N. (1992). Alternative life-history traits associated with reproduction in *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) in small water bodies of the eastern Cape, South Africa. Environmental Biology of Fishes 34: 379-392.

Keenleyside, M. H. A. & Bietz, B. F. (1981). The reproductive behavior of *Aequidens vittatus* (Pisces, Cichlidae) in Surinam, South-American. Environmental Biology of Fishes 6: 87-94.

Krebs, J. R., Davies, N. B. (1993). An Introduction to Behavioural Ecology. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 175-207.

- Liley, N. R. & Stacey, N. E. (1983). Hormones, pheromones and reproductive behavior in fish. In *Fish Physiology*, Volume IXB, Behavior and Fertility Control. (W. S. Hoar; D. J. Randall & E. M. Donaldson, eds). Academic Press, New York. pp. 1-63.
- Lowe-McConnell, M. (1958) Breeding behaviour patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). *Proceedings of the Zoological Society of London* 132:1-31.
- McKaye, K. R., Louda S. M. & Stauffer, J. R. (1990). Bower size and male reproductive success in a cichlid fish lek. *The American Naturalist* 135: 597-613.
- McKaye, K. R., Howard, J. H., Stauffer, J. R., Morgan, R. P., Shonhiwa, F. (1993). Sexual selection and genetic-relationships of a sibling species complex of bower building cichlids in lake Malawi, Africa. *Japanese Journal of Ichthyology* 40: 15-21.
- Mendonça, F. Z. (2006). Efeito da privação de ninho sobre a agressividade e o sucesso de acasalamento em machos de tilápia-do-nilo. Master Thesis, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil – 43p.
- Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei, Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 25: 413-418.
- Nelson, M. C. (1995). Male size, spawning pit size and female mate choice in a lekking cichlid fish. *Animal Behaviour* 50: 1587-1599.
- Paiva, P., Verani, J. R., Mainardes-Pinto, C. S. R. & Tabata, Y. A. (1988). Studies on the growth and reproduction in the cichlid *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) in an earthen pond. *Boletim do Instituto de Pesca* 15: 109-114.
- Vieira, S. (2006). *Análise de Variância (ANOVA)*. São Paulo, Editora Atlas S. A, 204p.
- Volpato, G. L. & Barreto, R. E. (2001). Environmental blue light prevents stress in Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 1041-1045.

Volpato, G. L., Duarte, C. R. A. & Luchiari, A. C. (2004). Environmental color affects Nile tilapia reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 37: 479-483.

Volpato, G. L.; Frioli P. M. A. & Carrieri, M. P. (1989). Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanism. *Boletim de Fisiologia Animal* 13: 7-22.

Volpato, G. L.; Luchiari, A. C.; Duarte, C. R. A.; Barreto, R. E. & Ramanzini, G. C. (2003). Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1659-1663.

Wootton, R. J. (1998). *Ecology of Teleost Fishes*. Chapman & Hall, London, 404p.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 663 p.

Tabela 1

Média (\pm erro padrão) do comprimento e peso dos animais no início do experimento, nos diferentes substratos. O número entre parênteses indica o número de réplicas.

Variáveis	Sexo	Tipo de Substrato				ANOVA one-way
		Areia	Areia+Concha	Pedra	Sem substrato removível	
Comprimento padrão inicial (cm)	Machos	11,35 \pm 0,20 (20)	11,67 \pm 0,13 (18)	11,88 \pm 0,11 (18)	11,62 \pm 0,13 (20)	F=2,27 P=0,09
	Fêmeas	10,28 \pm 0,10 ^b (30)	10,93 \pm 0,15 ^a (27)	10,78 \pm 0,13 ^a (27)	10,44 \pm 0,14 ^b (30)	F=7,91 P=0,0001
Peso inicial (g)	Machos	47,80 \pm 2,60 (20)	51,68 \pm 1,85 (18)	54,19 \pm 1,91 (18)	53,24 \pm 7,89 (20)	F=1,83 P=0,15
	Fêmeas	36,83 \pm 1,28 ^b (30)	42,35 \pm 1,80 ^a (27)	40,48 \pm 1,35 ^{ab} (27)	39,10 \pm 1,76 ^{ab} (20)	F=2,85 P=0,04

Letras diferentes indicam diferença estatística. LSD, $p < 0,048$.

Tabela 2

Indicadores reprodutivos^I e de gasto energético^{II} (média ± erro padrão) nos diferentes substratos. O número entre parênteses indica o número de réplicas.

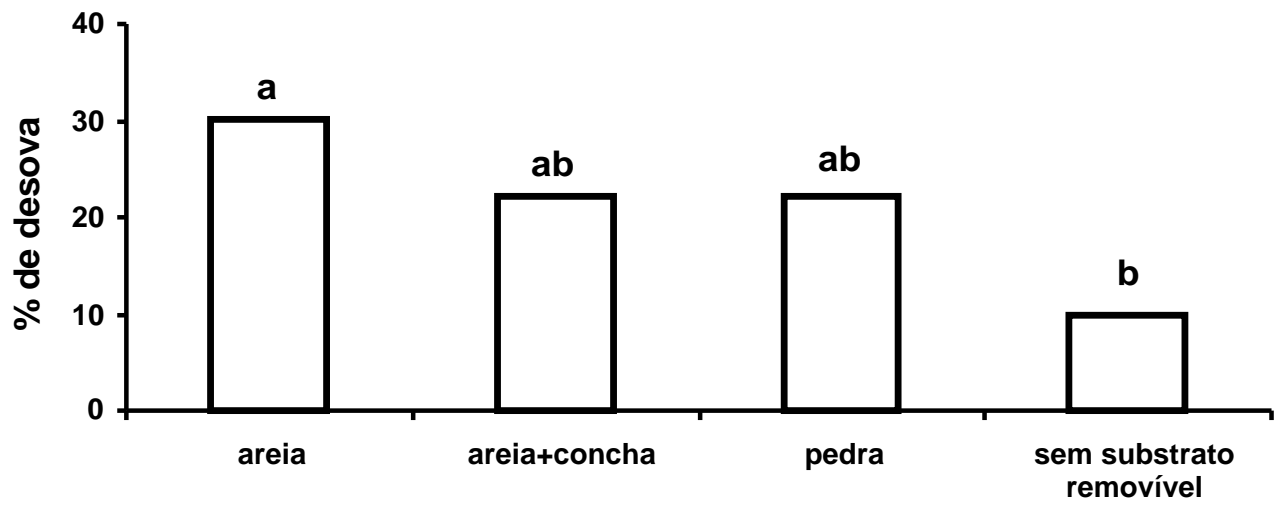
Variáveis	Tipo de substrato				Valor da estatística
	Areia	Areia+concha	Pedra	Sem substrato removível	
Latência para a construção de ninho (em dias) ^I	2,00±0,24 (9)	7,00±1,65 (8)	2,50±0,65 (4)	-	H=4,11; P=0,13
Latência para a desova (em dias) ^I	9,33±2,67 (3)	12,50±1,50 (2)	10,00±0,50 (2)	9 (1)	H=2,19; P=0,53
Índice gonadossomático ^I	0,52±0,08 (14)	0,46±0,06 (14)	0,48±0,06 (14)	0,57±0,07 (18)	F=0,46; P=0,71
Índice hepatossomático ^{II}	2,25±0,20 (14)	2,55±0,18 (14)	2,49±0,26 (14)	2,55±0,17 (18)	F=0,64; P=0,59
Taxa de crescimento específico ^{II}	0,35±0,23 (14)	0,38±0,14 (14)	0,20±0,30 (14)	0,37±0,11 (18)	F=0,16; P=0,92

Kruskal-Wallis (H); ANOVA *one-way* (F).

Legenda da Figura

Figura 1. Porcentagem de desovas em cada tipo de substrato (Areia, n= 10; Areia+Concha, n= 9; Pedra, n= 9; Sem substrato removível, n= 10). Letras diferentes indicam diferença estatística (teste G, $p < 0,05$ e $\alpha < 0,012$).

Figura 1



6. ESTUDO III

Efeito do tipo de substrato sobre as interações agonísticas e níveis hormonais em ciclídeo

**Trabalho realizado sob co-orientação do Prof.
Dr. Rui Filipe Nunes Pais de Oliveira da
Unidade de Investigação de Eco-Etologia do
Instituto Superior de Psicologia Aplicada –
Lisboa, Pt.**

Efeito do tipo de substrato sobre as interações agonísticas e níveis hormonais em ciclídeo

Este estudo está de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (www.cobea.org.br).

Running title: Efeito do substrato no desafio social de peixes

Tipo do artigo: *full paper*

Resumo

De acordo com a hipótese do desafio, o grau de interação agressiva está associado aos níveis de andrógenos em vertebrados. Portanto, as situações que promovem aumento nas interações agressivas podem aumentar, também, os níveis de andrógenos plasmáticos. Para alguns ciclídeos, a presença e o tipo de substrato podem ocasionar diferentes respostas na reprodução e no comportamento agressivo. Assim, foi avaliado o efeito do tipo de substrato sobre o desafio social em machos dominantes de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e sobre os níveis de andrógenos (11-cetotestosterona (11Kt) e testosterona (T)) e do cortisol plasmático (como indicador de estresse). Foram testados 4 tratamentos de acordo com o tipo de substrato: areia (n = 15), areia+concha (n = 13), pedra (n = 14) e sem substrato (n = 14). Foram realizadas 3 coletas de sangue para as dosagens hormonais 1^a) após 7 dias de isolamento social para aferir os níveis hormonais basais dos machos; 2^a) após 48 horas da primeira coleta para inferir níveis basais reprodutivos na presença de fêmeas; e 3^a) após 24 horas da segunda para inferir níveis de desafio social provocado pela disputa territorial com outro macho. Foi comparada a variação dos níveis hormonais entre as coletas 2 e 3 com os

níveis obtidos logo após o isolamento. A frequência de ataques de alta intensidade foi maior nos animais mantidos no substrato de areia do que no aquário com substrato de areia + concha, enquanto os sem substrato removível apresentaram maior frequência em relação aos pertencentes ao substrato de areia + concha e pedra. Os níveis plasmáticos de 11KT foram maiores nos peixes mantidos nos substratos de areia e areia+concha do que na condição sem substrato. Não houve diferença significativa nos níveis de T e cortisol para os tipos de substratos. Entretanto, os níveis de T foram maiores após a interação com as fêmeas do que após a interação com machos. Os níveis de cortisol foram menores após a interação com as fêmeas do que nas interações com machos. Com base em nossos resultados, pode-se concluir que o substrato interfere no comportamento agressivo e nos níveis de 11Kt em machos dominantes de *O. niloticus*. Entretanto, apenas o contexto social modula a liberação de testosterona e cortisol.

Palavras-chave: agressividade, ninho, 11-cetotestosterona, testosterona, cortisol

Introdução

A expressão do comportamento dos animais está intimamente ligada aos recursos ambientais disponíveis. Em peixes, por exemplo, o substrato pode ter diferentes funções de acordo com a espécie, ou até mesmo dentro da mesma espécie. Algumas espécies usam o substrato para o comportamento anti-predatório (Atkinson et al., 2004), enquanto outras dependem do substrato para a alimentação (Hart, 1993) e para a construção de ninho (Fryer & Iles, 1972). Além disso, a falta de substrato pode quebrar a estabilidade da hierarquia social, diminuir o comportamento sexual, gerar comportamento no vácuo e inatividade de machos territoriais (e.g. *Oreochromis massambicus*, Galhardo et al., 2008; Galhardo et al., 2009).

Em ambientes aquáticos naturais, o comportamento das espécies presentes no local é relacionado com o tipo de substrato. Nesses ambientes é comumente encontrado o substrato de areia ou areia misturada com conchas de moluscos. Já os peixes em ambientes de criação são mantidos em diferentes substratos ou até mesmo sem a presença deles. As pedras e os cascalhos são amplamente usados na aquariofilia, enquanto na piscicultura geralmente os tanques são desprovidos de substrato, onde os animais ficam em contato direto com o fundo do tanque (observação pessoal). Nesse caso, o repertório comportamental do animal pode ser alterado e a ausência de um determinado comportamento pode ser compensada por outro de forma exagerada. De fato, Mendonça (2006) observou que, na tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), a ausência de substrato e a conseqüente falta de construção de ninho aumentam os ataques de alta intensidade.

Para a tilápia-do-nylo o substrato tem valor no comportamento reprodutivo, pois o macho constrói um ninho circular no substrato, retirando pedriscos com a boca e depositando-os longe e ao redor de um ponto central. O macho defende o ninho contra intrusos e corteja fêmeas para desova, que ocorre dentro do ninho (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Assim, um determinado tipo de substrato pode ocasionar diferentes respostas na reprodução e

afetar a intensidade do desafio social em machos, provocando mudanças hormonais, como previsto na “hipótese do desafio” (Wingfield, 1990). Esta hipótese postula que os andrógenos podem estar presentes na circulação de vertebrados em três níveis: (1) basal não reprodutivo, correspondendo ao nível homeostático, cuja secreção permanece em níveis basais. No início da estação reprodutiva, os níveis dos andrógenos aumentam do basal não reprodutivo para o basal reprodutivo (2), que é suficiente para a reprodução (ex. gametogênese, expressão de características sexuais secundárias e expressão do comportamento reprodutivo). O nível máximo (3), é observado em resposta a um estímulo ambiental, tal como interações de machos e presença de fêmeas receptivas, quando os andrógenos podem aumentar até o nível fisiológico máximo (Wingfield, 1990; Oliveira et al., 2002).

Com base na hipótese de que em situações de desafio social os níveis dos andrógenos são aumentados (Wingfield et al., 1990; Oliveira et al., 2002; Hirschenhaue et al., 2004), é possível que o tipo de substrato possa causar variação nos níveis de testosterona e 11-cetotestosterona na tilápia-do-nylo, uma vez que esses andrógenos são relacionados ao comportamento agressivo e reprodutivo (Ros et al., 2004; Munro & Pitcher, 1983). É provável ainda, que ocorram alterações hormonais em resposta às alterações comportamentais causadas pelo tipo de substrato, ou seja, pela expressão ou não do comportamento de construção de ninho e pela variação dos níveis de agressividade.

Além disso, o desafio social e a impossibilidade de expressar um comportamento natural da espécie (construir ninho) podem gerar estresse para os indivíduos mantidos nesse contexto (Alvarenga & Volpato, 1995; Bracke & Hopster, 2006; Volpato et al., 2007; Barreto et al., 2009). Como consequência, poderia ocorrer um aumento nos níveis de cortisol devido ao contexto comportamental gerado pelo tipo de substrato.

Com base nas hipóteses acima mencionadas, o objetivo foi avaliar o efeito do substrato no comportamento agressivo e no desafio social em machos dominantes de tilápia-

do-nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio de análises dos níveis de esteróides sexuais (11-cetotestosterona e testosterona) e do cortisol plasmático como indicador de estresse. De acordo com Mendonça (2006), os níveis de agressividade em machos de tilápia-do-nilo são maiores em condições de ausência substrato. De acordo com Mendonça et al. (submetido), os machos de tilápia-do-nilo preferem construir ninhos em substratos mais leves e menos complexos. Dessa forma, foram escolhidos substratos com a mesma variação na complexidade e peso de pesquisas anteriores para testar as hipóteses propostas.

Material e Métodos

Manutenção dos peixes

Os exemplares de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) utilizados nesse estudo foram criados em um tanque de alvenaria de 185 m³. Quinze dias antes dos experimentos, os peixes foram transferidos para o laboratório e mantidos em caixas de 500 L (ca.1 peixe/5 L) com água não clorada, temperatura de ~27°C e fotoperíodo de 12 horas (iniciando as 7:00 h). Filtros biológicos e aeração constante mantiveram a qualidade da água. Os peixes foram alimentados com ração comercial (32 % de proteína), oferecida duas vezes ao dia até a saciação.

Delineamento experimental

Para avaliar o efeito do substrato no comportamento agressivo e nos níveis de 11-cetotestosterona (11Kt), testosterona (T) e de cortisol plasmático de machos dominantes, o experimento foi subdividido em 3 etapas: **Etapa I:** machos adultos, com peso e comprimento padrão semelhantes (Tabela 1) foram isolados durante sete dias em aquários contendo um tipo de substrato (areia, n = 15 , areia+concha, n = 13 , pedra, n = 14 e sem substrato removível n

= 14). No sétimo dia, foi realizada a **primeira coleta** de sangue para a análise dos três hormônios, determinando os valores basais não reprodutivos dos andrógenos. **Etapa II:** No oitavo dia, três fêmeas foram colocadas em cada aquário. Foram selecionadas fêmeas menores que o macho residente para manter o padrão natural da espécie e assim, garantir a dominância. Depois do período de 24 h (nono dia), foi realizada uma **segunda coleta** de sangue do macho para determinar os níveis basais reprodutivos dos andrógenos e para avaliar o nível do cortisol plasmático. Após a coleta de sangue, o macho foi novamente colocado no aquário contendo as fêmeas. **Etapa III:** Após 24 h da coleta anterior (décimo dia), foi realizado o desafio social com a intrusão de um macho, cerca de 1 cm menor que o residente (Tabela 1). Os animais foram agrupados por 1 h e nos 10 primeiros minutos foi realizada uma filmagem para análise do comportamento agressivo. Após a filmagem, os machos residentes foram removidos dos aquários para a **terceira coleta** de sangue, para determinar os níveis fisiológicos máximos em resposta ao desafio social, e o nível de cortisol plasmático. Depois desse procedimento, todos os animais foram mortos pra a confirmação do sexo e da maturidade sexual, com base nas descrições de Babiker & Ibrahim (1979) e Paiva et al. (1988).

Condições experimentais

Para verificar possíveis influências do peso do substrato no desempenho das lutas, foi amostrado o peso de cada substrato por meio de 10 amostras de 32 ml do peso seco: (média \pm desvio padrão) areia ($55,96 \pm 1,60$ g), concha ($56,03 \pm 3,16$ g) e pedras ($59,14 \pm 2,19$ g) (*one-way* ANOVA, $n = 10$, $P < 0,001$). Areia e areia+concha apresentaram pesos similares (LSD, $n = 10$, $P > 0,05$), e ambos eram mais leves que as pedras (LSD, $n = 10$, $P_{\text{areia}} < 0,01$, $P_{\text{areia+concha}} < 0,01$).

Foram utilizados aquários com ~ 140 l, contendo 8 l de substrato nos tratamentos de areia, concha, pedra e sem substrato removível. Todos os aquários tiveram as laterais cobertas

com plástico azul para evitar o contato visual dos animais. A cor azul foi escolhida porque reduz o estresse (Volpato & Barreto, 2001) e melhora a reprodução (Volpato et al., 2004) na tilápia-do-nylo. Durante a etapa I, os aquários foram cobertos nas quatro laterais, enquanto nas etapas II e III, a parte frontal foi descoberta para observação dos animais. Entretanto, foi utilizado papel cartão azul de maior tamanho que a lateral do aquário, a fim de evitar o contato visual entre os animais de aquários vizinhos.

Os peixes foram alimentados com ração comercial (32% de proteína bruta), na proporção de 2 % da biomassa, sendo 1% no início da manhã e 1 % no final da tarde. Porém, 24 horas antes das coletas de sangue não foi oferecido alimento, de acordo com a recomendação de Barreto (2002). A temperatura da água foi de $26,66 \pm 2,08$ °C (média \pm desvio padrão) e o fotoperíodo foi de 12 h, iniciando as 07 h. A qualidade da água foi mantida por filtro biológico e aeração constante. O pH manteve-se em 7,5 e os valores de amônia tóxica, em ppm, foram iguais a zero.

Os animais foram identificados por pequenos cortes na nadadeira caudal como em Fernandes & Volpato (1993) e Hoglund et al. (2005). Esse método não afeta o comportamento e não causa problemas de locomoção para o animal, como já verificado em experimentos anteriores em nosso laboratório (observação pessoal). A sexagem foi realizada por meio da inspeção da papila genital corada com azul de metileno, o que evidencia a abertura do oviduto na papila genital da fêmea (ex. Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). Todas as manipulações foram precedidas por anestesia, a qual consistiu da imersão dos peixes em água contendo benzocaína. Foi utilizado 3 mg/l para as biometrias, marcações e sexagem, 9 mg/l para a coleta de sangue e 18 mg/l como dose letal.

Registro e análise do comportamento

O *rank* social dos machos foi definido pela frequência total de ataques e por análise qualitativa da coloração corporal. O macho dominante apresenta coloração clara do corpo (ausência de faixas longitudinais escuras) e da íris (Falter, 1987; Volpato et al., 1989; Volpato et al., 2003), e também defende território no fundo do aquário (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998).

Para quantificação do comportamento agressivo, os animais foram filmados por 10 min., a qual iniciou após a introdução do macho menor. Os animais permaneceram nessa condição por 1 h. No final foram feitas amostragem qualitativas dos machos e o residente foi removido para a coleta de sangue. A interação foi quantificada pela frequência de itens agressivos de acordo com o etograma abaixo, baseado nas descrições de Falter (1983) e Alvarenga & Volpato (1995). Foram quantificados os ataques totais emitidos pelo dominante aos outros animais do grupo e, posteriormente, foram analisados os ataques de alta intensidade (frontal, lateral, paralelo e ondulação). Esses ataques são emitidos com contato direto ou indireto (um animal provoca o deslocamento de água para a linha lateral do oponente). Todos os parâmetros comportamentais foram quantificados com o uso do software The Observer – Noldus 5.0, no Instituto Superior de Psicologia Aplicada – Lisboa, Pt.

Etograma das unidades agressivas

Ameaça: um peixe se aproxima de outro, geralmente com a boca aberta e com as nadadeiras eriçadas, sem atacar o oponente.

Ameaça Lateral Simultânea: caracterizado pelo nado lento em trajetória circular dos dois animais, geralmente com as nadadeiras eriçadas.

Perseguição: um animal nada em direção ao outro, acompanhando sua trajetória. Pode culminar em ataque do perseguidor ou numa natação mais rápida do animal perseguido, distanciando-se do oponente.

Lateral: Um animal se aproxima de outro e ataca a região lateral do oponente com mordidas ou golpes com a boca aberta.

Frontal: dois animais se orientam frontalmente, justapõem as mandíbulas e se empurram, ondulando vigorosamente a região caudal do corpo.

Paralelo: dois animais posicionam-se lado a lado, voltados para o mesmo sentido ou em sentidos opostos. Ondulam simultaneamente o corpo sem que ocorra contato físico direto.

Ondulação: animal movimentava seu corpo no sentido antero-posterior, movendo a cauda de um lado para o outro e descrevendo movimentos ondulatórios. Esse padrão é semelhante ao confronto paralelo, porém é emitido por apenas um indivíduo.

Coleta e análise de hormônios

Antes da coleta de sangue, os animais permaneceram no anestésico até a perda postural, que é caracterizada pela falta de reação motora a estímulos, porém com a manutenção da ventilação, como descrito por Iwama et al. (1989), como estágio II de anestesia. O sangue foi coletado por punção caudal (0,5 ml por coleta), utilizando-se seringa de 1 ml heparinizada. Em seguida, o sangue foi centrifugado em 3000 rpm / 10 minutos, e o plasma retirado e congelado a - 80° C para posterior análise dos hormônios. As medidas de T (Scott et al., 1984), 11KT (Kime & Manning, 1982) e cortisol foram feitas através de radioimunoensaio. A precisão dos coeficientes de variação intra e inter-ensaios foi de 4,16 e 9,71% para 11KT; 2,30 e 4,29% para T e de 4,28 e 5,86% para o cortisol. As análises bioquímicas foram realizadas no Instituto Superior de Psicologia Aplicada – Lisboa, Pt.

Análise dos dados

Inicialmente foi verificada a presença de valores discrepantes nas amostras. Em seguida, a normalidade foi avaliada pelos valores de skewness e kurtosis e a homocedasticidade pelo teste de F Max (HA & Ha, 2007). A frequência total de ataques para verificar o *rank* social foi comparada entre o residente e intruso, para cada substrato, através de teste-t dependente. Foi utilizado *one-way* ANOVA para comparar os comportamentos agressivos e biometrias nos diferentes substratos. Os dados de comportamentos para verificação do *rank* e os para comparação do comportamento agressivo foram primeiramente transformados (raiz quadrada do valor + 0,5) antes da realização dos testes. Foi aplicado o teste de correlação de Spearman (Siegel & Castellan, 2006) para relacionar o comportamento agressivo (frequência total das unidades agressivas do residente) com os níveis de 11Kt, T e cortisol obtidos na terceira coleta de sangue.

Os hormônios foram comparados pela diferença entre as coletas, sendo: basal reprodutivo = coleta 2 - coleta 1 e desafio social = coleta 3 - coleta 1. O teste usado para essa comparação foi ANOVA em medidas repetidas (dois fatores repetidos: basal reprodutivo e desafio social; variável categórica: tipo de substrato). No grupo sem substrato, a 11Kt e T apresentaram variâncias de 4,21 e 6,27, respectivamente.

Quando necessário, as análises foram complementadas com o teste *a posteriori* Fisher LSD. Foi adotado $p \leq 0,05$ para significância estatística. Todos os testes paramétricos foram baseados em Zar (1999) e Vieira (2006).

Resultados

Todos os machos residentes apresentaram o corpo e a íris mais claras que os intrusos, além de defenderem o território no fundo do aquário, independente do tipo de substrato presente. Essas características indicam dominância do macho residente. Além disso, os

residentes emitiram frequência total de ataques superior em relação aos intrusos, em todos os tratamentos (Tabela 2). A frequência total de ataques dos dominantes para todos os animais do grupo foi similar entre os tratamentos (ANOVA, $F = 0,20$; $p = 0,90$). Já a frequência de ataques de alta intensidade diferiu significativamente (ANOVA, $F = 5,61$; $p = 0,002$; Figura 1), sendo que na areia os animais emitiram maior frequência de ataque em relação aos mantidos no aquário com substrato de areia + concha, enquanto os sem substrato apresentaram maior frequência em relação aos pertencentes ao substrato de areia + concha e pedra (LSD, $p < 0,02$). Não foi observada correlação significativa entre o comportamento agressivo do dominante com os níveis hormonais de 11Kt, T e cortisol, em nenhum dos substratos estudados (Correlação de Spearman, $r < 0,51$; $p > 0,06$).

Não houve interação estatística entre o tipo de substrato e a diferença das coletas (basal reprodutivo e desafio social) na concentração de 11Kt (ANOVA, $F = 2,45$; $p = 0,07$), porém, houve efeito do substrato nos níveis de 11Kt, independente da coleta (ANOVA, $F = 3,10$; $p = 0,034$). A variação de 11Kt foi maior nos substratos de areia e areia+concha do que no sem substrato (LSD, $p < 0,02$; Figura 2).

Também não houve interação do tipo de substrato com o basal reprodutivo e desafio social na T (ANOVA, $F = 8,97$; $p = 0,15$) e no cortisol (ANOVA, $F = 0,25$; $p = 0,09$), entretanto, houve diferença entre o basal reprodutivo e o desafio social, independente do tipo de substrato (T: ANOVA, $F = 8,97$; $p = 0,004$; Cortisol: ANOVA, $F = 8,88$; $p = 0,004$). Os valores de T aumentaram mais do basal reprodutivo para o desafio social (LSD, $p = 0,004$; Figura 3). Os níveis de cortisol foram mais altos na coleta 1 em relação as coletas subsequentes (Figura 3). Além disso, os níveis de cortisol do basal reprodutivo foram mais baixos quando comparado com os do desafio social (LSD, $p = 0,03$, Figura 3).

Discussão

O tipo de substrato modula o comportamento agressivo e os níveis de 11Kt em machos dominantes. Porém, os níveis plasmáticos de T e cortisol são mediados apenas pelo contexto social.

Os animais apresentaram igual frequência de ataques totais, porém, não apresentaram o mesmo resultado para os ataques de alta intensidade, indicando que o perfil dos confrontos não foi o mesmo entre os animais mantidos em diferentes substratos. Esses resultados foram similares aos encontrados por Mendonça (2006), que observou aumento de unidades de alta intensidade na ausência de substrato. No presente estudo, os dominantes do grupo sem substrato removível também foram mais agressivos quando comparados aos do grupo pedra e areia+concha. Essas diferenças não podem ser atribuídas às condições prévias ao confronto ou à perda de dominância, pois todos os machos isolados eram maiores que os demais animais do grupo e tinham a dominância prévia do território, sendo que tais características são importantes para decisão do *rank* social em ciclídeos (Beeching, 1992; Chellappa et al., 1999). Além disso, as análises da cor do olho, da defesa de território e dos ataques de residentes e intrusos confirmaram que todos os residentes foram os dominantes do território, ou seja, as diferenças ocorridas não foram relacionadas com a hierarquia social.

Como discutido por Mendonça (2006), o aumento nos ataques de alta intensidade no grupo sem substrato pode ser devido ao tempo disponível para as lutas, pois os animais não podem construir ninho nessa condição. Além disso, animais em condições reprodutivas dedicam parte do seu tempo à defesa de território e construção de ninho (Wootton, 1998), o que reduz o tempo disponível para lutas. Outra explicação dada por Mendonça (2006) é que o ninho poderia ter função de sinalizador de território, pois o macho dominante de tilápia-donilo defende o ninho e ataca os intrusos dentro de seu limite (Lowe-McConnell, 1958). Desse modo, a presença de ninho poderia ser uma representação mais evidente do território e reduzir

a interferência de co-específicos. Assim, os intrusos invadiriam com menor frequência um território com marcações, e conseqüentemente receberiam menor número de ataques.

O número de ataques de alta intensidade na condição sem substrato foi similar ao substrato de areia. Isso poderia ser explicado pelo valor do território, isto é, a presença do substrato preferido. Como observado no Estudo I (Escolha de substrato para a construção de ninho em machos de tilápia-do-nilo), areia é o substrato escolhido para a construção de ninho, podendo representar um recurso mais valioso para o macho e isso explicaria um aumento nos ataques nesse tipo de substrato. Os recursos mais valiosos são disputados com maior agressividade entre os animais, como já verificado por Maynard-Smith & Parker (1976).

Neste estudo, as diferenças encontradas entre o comportamento agressivo não podem ser atribuídas ao gasto de energia gerado com a construção de ninho. O substrato de pedra foi o mais pesado do teste e animais desse tratamento apresentaram o mesmo número de ataques dos animais mantidos no substrato de areia + concha, que é mais leve que a pedra e de mesmo peso que a areia. Assim, o peso do substrato não influenciou o desempenho dos animais nas lutas.

Embora, o andrógeno 11Kt faça parte do eixo que regula os comportamentos agressivos e sexuais (Borges et al., 1998) e a presença de hormônios reprodutivos levarem a um aumento do comportamento agressivo (Francis et al., 1993; Ros et al, 2004), não foi observado um padrão e correlação no nível desse hormônio com o comportamento agressivo em relação ao tipo de substrato. Apesar disso, houve um aumento desse hormônio nos substrato de areia e areia+concha quando comparados ao sem substrato, sendo que isso pode ser relacionado com a preferência de substrato e conseqüentemente com a motivação para a construção de ninho, uma vez que, areia e areia + concha foram os únicos substratos escolhidos para a construção de ninho no Estudo I. Assim, a escavação de ninho no substrato preferido pode estimular a

liberação de 11Kt e conseqüentemente aumentar a desova (Estudo II- O tipo de substrato afeta o desempenho reprodutivo na tilápia-do-nilo).

A ausência de associação entre o tipo de substrato e a T e cortisol, indica que o substrato não tem efeito sobre a liberação desses hormônios. Além disso, não houve correlação desses hormônios com o comportamento agressivo, sugerindo que as diferenças no comportamento não foram influenciadas pela liberação dos mesmos.

Por outro lado, ocorreram diferenças na liberação de T e cortisol de acordo com o contexto social. A T aumentou do basal (animal isolado) para o desafio social quando comparada do basal para o basal reprodutivo. Esses resultados estão de acordo com a hipótese do desafio proposta por Wingfield (1990). Nessa teoria é postulado que no início da estação reprodutiva os hormônios estão em seus níveis basais e depois, são elevados para o basal-reprodutivo, que é suficiente para a reprodução (gametogênese, desenvolvimento de características sexuais secundárias e comportamento reprodutivo). Em resposta a estímulos ambientais, tais como interação entre macho-macho e presença de fêmeas receptivas, os hormônios podem aumentar chegando à níveis fisiológicos máximos (Wingfield, 1990). Além disso, pode ocorrer uma associação dos níveis dos andrógenos e *status* social em grupos com instabilidade social (Oliveira et al., 2002). Neste estudo, foi verificado que os hormônios aumentaram com a instabilidade social gerada pela intrusão do macho. Após a intrusão das fêmeas, pode ter ocorrido uma instabilidade social, porém o hormônio foi medido após 24 h, e os hormônios provavelmente já estavam em níveis mais baixos (Oliveira et al., 2001). Além disso, a hierarquia social já estava estável, pois já é conhecido que na tilápia-do-nilo o estabelecimento da hierarquia acontece, aproximadamente, 40 min após a formação do grupo (Carvalho & Gonçalves-de-Freitas, 2008).

Oliveira (1995) sugeriu diferenças funcionais para a T e 11Kt. O primeiro andrógeno pode ser relacionado na manutenção do indivíduo em um estado de alerta comportamental,

permitindo uma mudança rápida para comportamentos mais agressivos. Já o segundo, pode estar mais envolvido com o desenvolvimento dos gametas e na diferenciação e manutenção dos caracteres sexuais secundários. Essas diferentes funções podem estar relacionadas com o fato da 11Kt ter sido maior nos substratos escolhidos para a construção de ninho (areia e areia+concha) e a testosterona apresentar uma relação direta com o contexto social, ou seja, relacionada com o *status* do macho.

Interações sociais em peixes podem estimular um aumento nos níveis de cortisol (Barcelos et al., 1999), assim como observado neste estudo, o cortisol manteve o mesmo perfil da T, ou seja, foi mais alto no desafio social do que na condição reprodutiva. A disputa territorial e o comportamento agressivo são conhecidos como agentes estressores em peixes (Alvarenga & Volpato, 1995; Barreto et al., 2009). Os valores negativos do cortisol estão associados à redução do cortisol após as interações, quando comparado com o animal isolado. Com isso, concluímos que o isolamento social provoca elevação do cortisol, sugerindo que o animal fica mais estressado quando está em isolamento social do que em situações de interações sociais. De fato, já é conhecido que o isolamento social aumenta o cortisol em ciclídeos (Earley et al., 2006), pois se trata de uma espécie social. Assim, o cortisol aumenta durante situações de instabilidade social, porém esses níveis não ultrapassam os de um animal isolado.

Com base em nossos resultados, pode-se concluir que o substrato interfere no comportamento agressivo e nos níveis de 11Kt em machos dominantes de *Oreochromis niloticus*. Entretanto, apenas o contexto social modula a liberação de testosterona e do cortisol, os quais não sofrem efeito dos níveis de agressividade decorrentes do tipo de substrato.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Olinda Almeida e a Eduarda Cabral (ambas do ISPA, Lisboa, Portugal) pelas sugestões e auxílio nas análises dos dados. A Ana Sofia (ISPA, Lisboa, Portugal), pelo treinamento de extração hormonal e pela dosagem dos hormônios. A Thaís Billalba Carvalho (UFAM, Manaus, AM, Brasil) e a Rodrigo Damasco Daud (UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil) pelas sugestões no texto e nas análises estatísticas. A Roselene Costa Ferreira e a Carlos Eduardo de Sousa (ambos da UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil) pela ajuda na coleta de dados e manutenção dos animais. Esta pesquisa foi financiada pelo CNPq 140098/2007-0 e pela CAPES (BEX 4056/08-6).

Referências

- Alvarenga, C. M. D. & Volpato, G. L. (1995). Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology & Behavior* 57: 75-80.
- Atkinson, C. J. L., Bergmann, M. & Kaiser, M. J. (2004). Habitat selection in whiting. *Journal of Fish Biology* 64, 788-793. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00340.x
- Babiker, M. M. & Ibrahim, H. (1979). Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. *Journal of Fish Biology* 14: 437-448.
- Barcellos, L. J. G. , Nocolaiewsky, S., Souza, S. M. G. & Lulhier, F. (1999). The effect of stocking density and social interactions on acute stress response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture Research* 30: 887-892.
- Barreto, R. E. (2002). Estressor social facilita estresse na tilápia-do-nilo? Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. 38p.
- Barreto, R. E., Volpato, G. L., Faturid, C. B., Giaquinto, P. C., Gonçalves-de-Freitas, E. & Castilho, M. F. (2009). Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 42: 109–118.
- Beeching, S. C. (1992). Visual assessment of relative body size in a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Ethology* 90: 177-186.
- Borges, R. A., Oliveira, R. F., Almada, V. C. and Canário, V. M. (1998). Short-term social modulation of 11-ketotestosterone urinary levels in males of the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus* during male-female interaction. *Acta Ethologica* 1: 43- 48.
- Bracke, M. B. M. & Hopster, H. (2006). Assessing the importance of natural behavior for animal welfare. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 19: 77–89.
- Carvalho, T. B. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Biology* 68: 807-812.
- Chellappa, S., Yamamoto, M. E., Cacho, M. S. R. F., Huntingford, F. A. (1999) Prior residence, body size and the dynamics of territorial disputes between male freshwater angelfish. *Journal of Fish Biology* 55: 1163–1170.
- Earley, R. L., Edwards, J. T., Aseem, O., Felton, K., Blumer, L. S., Karom, M., Grober, M. S. (2006). Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*). *Physiology Behaviour* 88: 353-63.
- Falter, U. (1983). Les comportements agonistiques de *Sarotherodon niloticus* (Pisces, Cichlidae) et al signification évolutive de l'incubation buccale. *Bulletin de la Classe des Sciences* 69: 566-593.
- Falter, U. (1987). Description des patrons de coloration chez *Oreochromis niloticus* (L.) (Teleostei: Cichlidae). *Annales de la Société Royale de Zoologie Belge* 117: 201-219.
- Fernandes, M. O., Volpato, G. L. (1993) Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology and Behavior* 54: 319-323.

- Francis, R. C.; Soma, K. & Fernald, R. D. (1993). Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences of the United States* 90: 7794-7798.
- Fryer, G. & Iles, T. D. (1972). Breeding habits, In *The cichlid fishes of the great lakes of Africa* (Fryer, G. & Iles, T. D., eds.), pp. 105-172. Neptune City: T.F.H. publications.
- Galhardo, L., Almedia O. & Oliveira R. F. (2009). Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *Applied Animal Behaviour Science* (in press).
- Galhardo, L., Correia, J. & Oliveira, R. F. (2008). The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*). *Animal Welfare* 17: 239-254.
- Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. (1998). Sneaking behavior of the Nile tilapia. *Boletim Técnico do CEPTA* 11: 71-79.
- Ha, R. R. & Ha, J. C. (2007). *Integrative Statistics for Behavioral Sciences*, Boston: Pearson Custom Publishing. 325 p.
- Hart, P. J. B. (1993). Teleost foraging: facts and theories, In *Behaviour of Teleost Fishes* (Pitcher, T. J., ed.). New York: Chapman & Hall. pp. 253-279.
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canario, A. V. M. & Oliveira, R. F. (2004). A test of the 'challenge hypothesis' in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Animal Behaviour* 68: 741-750.
- Höglund, E., Bakke M. J., Øverlic O., Winberg S., Nilsson G. E. (2005). Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation. *Aquaculture* 249: 525-531.
- Iwama, G. K., McGeer, J. C. & Pawluk, M. P. (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout.

Canadian Journal of Zoology 67: 2065-2073.

Kime, D.E. & Manning, N.J. (1982). Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout *Salmo trutta*. *General and Comparative Endocrinology* 48: 222-231.

Lowe-McConnell, R. (1958). Observation on the biology of *tilapia nilotica* linné in east Africa waters (Pisces: Cichlidae). *Revue de Zoologie et Botanique Africaines* 57: 129-170.

Maynard-Smith, J. & Parke, G. A. (1976). The logic of asymmetric contest. *Animal Behaviour* 24: 159-175.

Mendonça, F. Z. (2006). Efeito da privação de ninho sobre a agressividade e o sucesso de acasalamento em machos de tilápia-do-nilo. Master Thesis, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil – 43p.

Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei, Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 25: 413-418.

Munro, A. D. & Pitcher, T. J. (1983). Hormones and agonistic behaviour in teleosts. In: Rankin, J. C., Pitcher, T.J. & Duggan, R. T., (Eds.). *Control processes in fish physiology*. Croom Helm, London, pp. 155-175.

Oliveira, R. F. (1995). Etologia social e endocrinologia comportamental da tilápia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). Tese de doutorado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa 488p.

Oliveira, R. F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L. A. & Canário, A. V. M. (2002). Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132 B: 203-215.

Oliveira, R. F., Lopes, M., Carneiro, L. A., Canário, A. V. M. (2001). Watching fights raises fish hormone levels. *Nature* 409: 475.

Paiva, P.; Verani, J.R.; Mainardes-Pinto, C.S.R. & Tabata, Y.A. (1988). Studies on the growth

and reproduction in the cichlid *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) in an earthen pond. *Boletim do Instituto de Pesca* 15: 109-114.

Ros, A. F. H., Bruintjes, F., Santos, R. S., Canário, A. V. M. & Oliveira, R. F. (2004). The role of androgens in the trade-off between territorial and parental behavior in the Azorean rockpool blenny, *Parablennius parvicornis*. *Hormones and Behavior* 46: 491-497.

Scott, A.P., Mackenzie, D.S. & Stacey, N.E. (1984). Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. *General and Comparative Endocrinology* 56: 349-359.

Siegel, S. & Castellan Jr., N. J. (2006). *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento*. Porto Alegre, Artimed, 448p.

Vieira, S. (2006). *Análise de Variância (ANOVA)*. São Paulo, Editora Atlas S. A, 204p.

Volpato, G. L. & Barreto, R. E. (2001). Environmental blue light prevents stress in Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 1041-1045.

Volpato, G. L., Frioli, P. M. A. & Carrieri, M. P. (1989). Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanism. *Boletim de Fisiologia Animal* 13: 7-22.

Volpato, G. L., Duarte, C. R. A. & Luchiari, A. C. (2004). Environmental color affects Nile tilapia reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 37: 479-483.

Volpato, G. L., Gonçalves-de-Freitas, E. and Castilho, M. F. (2007). Insights into the concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms* 75: 165-171.

Volpato, G. L., Luchiari, A. C., Duarte, C. R. A., Barreto, R. E. & Ramanzini, G. C. (2003). Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1659-1663.

Wingfield, J. C., Hegner, R. E., Dufty A. M. Jr & Ball, G. F. (1990). The 'Challenge Hypothesis': theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *The American Naturalist* 136: 829–846.

Wootton, R. J. (1998). *Ecology of Teleost Fishes*. Chapman & Hall, London, pp. 159-195.

Zar, J. (1999). *Biostatistical Analyses*. Printice Hall, New Jersey.

Tabela 1

Comprimento padrão e peso (média \pm erro padrão) de machos residentes e intrusos comparados nos diferentes substratos. O número entre parênteses indica o número de réplicas.

Biometrias	Tipos de substratos				<i>one-way</i> ANOVA
	Areia	Areia+Concha	Pedra	Sem substrato removível	
Comprimento (cm)					
Residente	12,55 \pm 0,25 (15)	12,57 \pm 0,25 (13)	12,68 \pm 0,28 (14)	12,41 \pm 0,28 (14)	F=0,20; p=0,89
Intruso	11,79 \pm 0,22 (15)	11,86 \pm 0,19 (13)	11,48 \pm 0,24 (14)	11,33 \pm 0,24 (14)	F=1,22; p=0,32
Fêmeas	11,16 \pm 1,29 (45)	10,85 \pm 0,72 (39)	10,91 \pm 0,87 (42)	10,59 \pm 1,18 (42)	F=2,15; p=0,09
Peso (g)					
Residente	68,40 \pm 4,12 (15)	69,52 \pm 4,31 (13)	72,01 \pm 4,75 (14)	62,64 \pm 4,79 (14)	F=0,11; p=0,95
Intruso	54,24 \pm 2,54 (15)	50,58 \pm 3,19 (13)	51,13 \pm 3,13 (14)	48,11 \pm 3,36 (14)	F=0,72; p=0,54
Fêmeas	44,38 \pm 13,75 (45)	40,80 \pm 7,51 (39)	41,92 \pm 8,77 (42)	39,62 \pm 10,24 (42)	F=1,65; p=0,18

Tabela 2

Resultados do Teste-t pareado para total de ataques (10 min^{-1}) de residentes e intrusos (media \pm erro padrão) em cada substrato. O número entre parênteses indica o número de réplicas.

	Tipos de Substratos			
	Areia (12)	Areia+concha (13)	Pedra (13)	Sem substrato removível (13)
Residente	46,75 \pm 4,97	47,69 \pm 7,61	45,77 \pm 7,17	41,15 \pm 5,99
Intruso	10,0 \pm 2,83	7,25 \pm 2,05	5,25 \pm 1,77	4,25 \pm 1,94
Teste-t pareado	t=6,56; p<0,001	t=7,26; p<0,001	t=7,86; p<0,001	t=7,08; p<0,001

Legenda das figuras

Figura 1. Média (\pm erro padrão) da frequência de ataques de alta intensidade emitida pelo dominante nos diferentes substratos (Areia, n = 12; Areia+Concha, n = 13; Pedra, n = 13; Sem substrato removível, n = 13). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, p = 0,002).

Figura 2. Média (\pm erro padrão) da variação de 11KT nos diferentes tipos de substratos (Areia, n = 15; Areia+Concha, n = 13; Pedra, n = 14; Sem substrato removível, n = 14). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA dependente; p = 0,034).

Figura 3. Média (\pm erro padrão) dos níveis hormonais reprodutivos (n = 56) e do desafio social para todos os substratos (n = 56). Asterisco indica diferença estatística significativa (ANOVA dependente, p < 0,004).

Figura 1

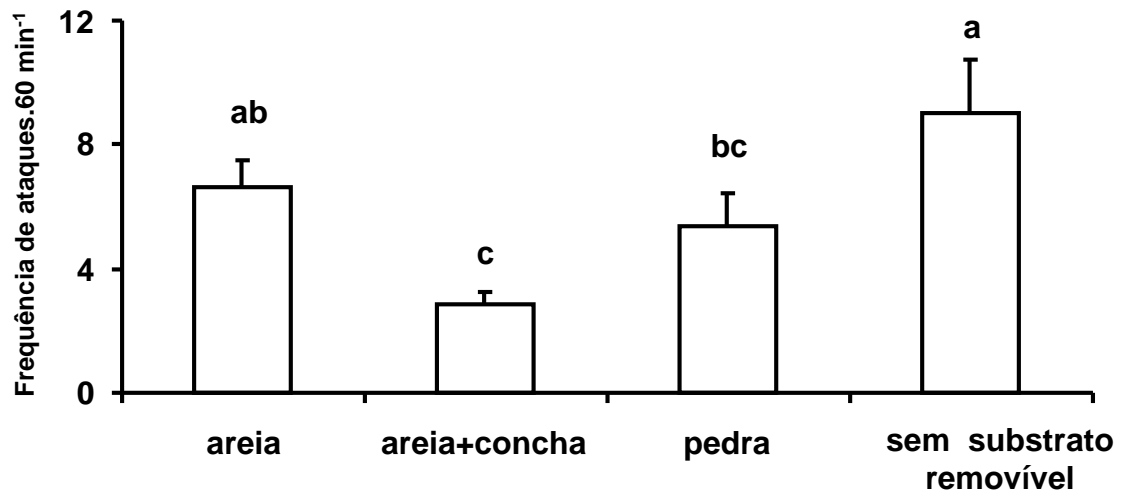


Figura 2

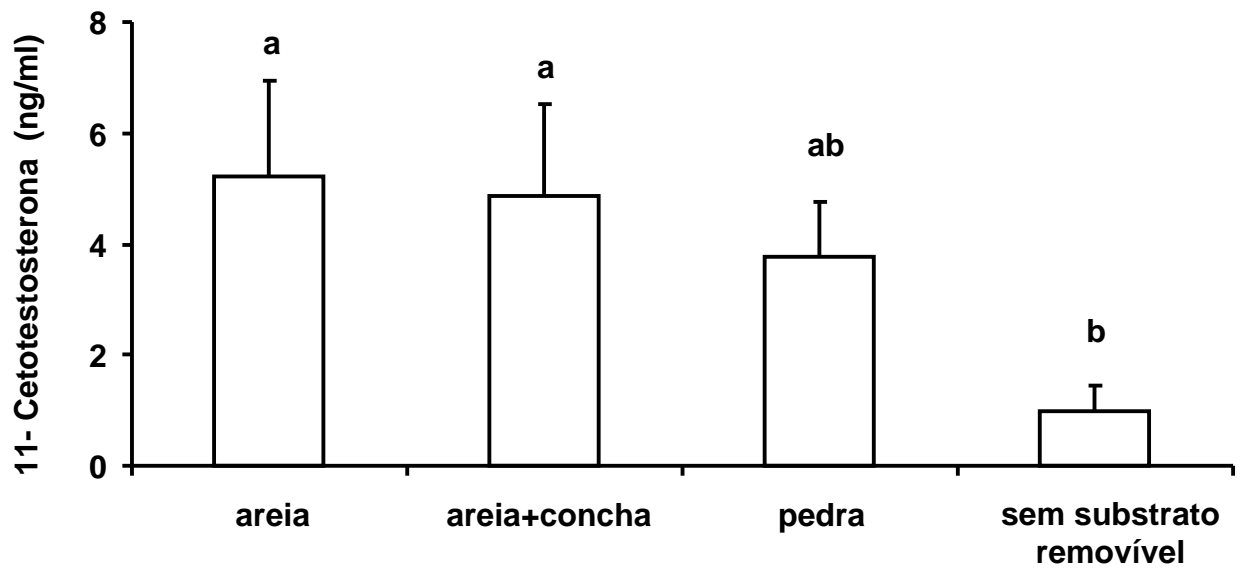
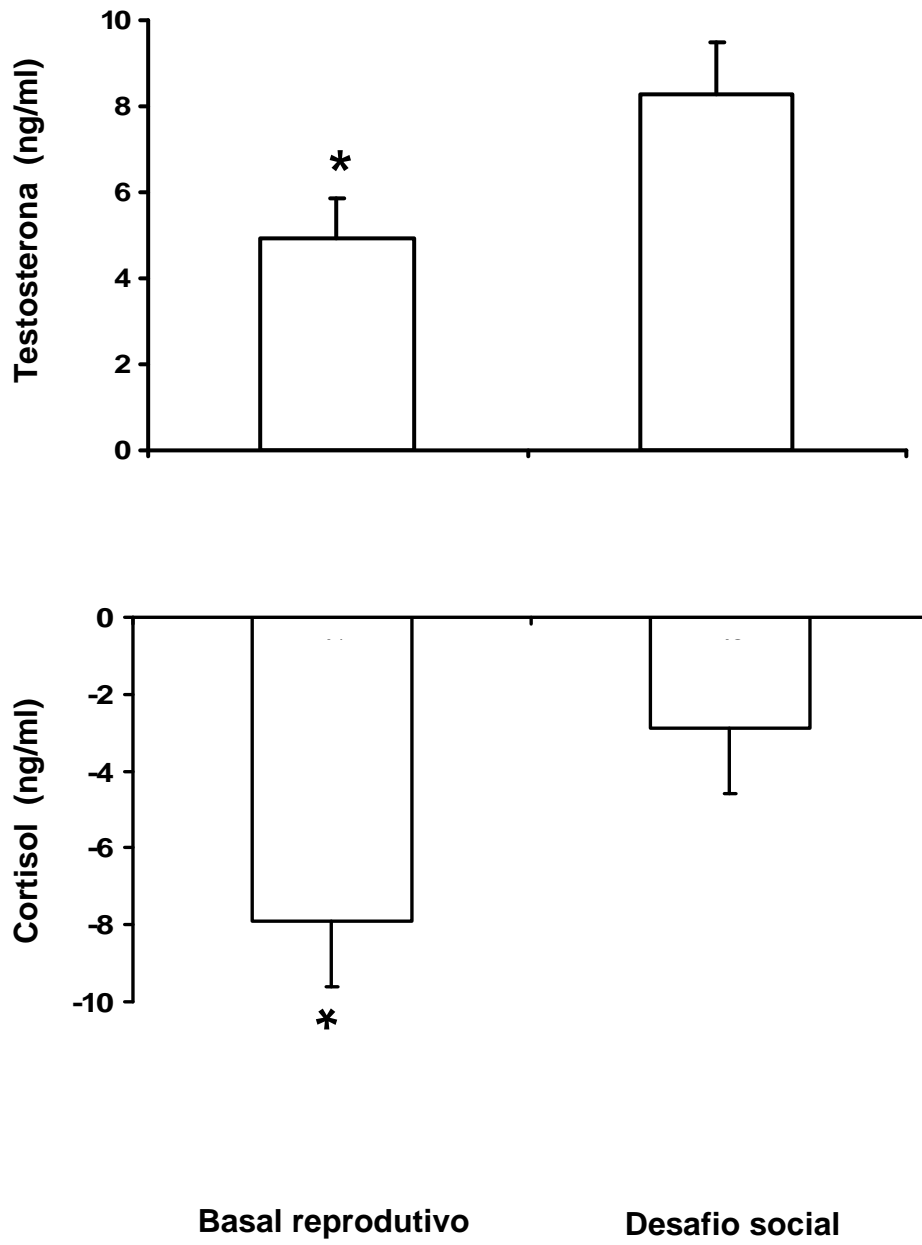


Figura 3



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi testada a tese geral de que o substrato afeta o bem estar na tilápia-do-nilo, o comportamento social, os níveis de esteróides sexuais e o estresse social, além de causar diferentes respostas na reprodução e no gasto de energia. Para testar essas hipóteses foram realizados três estudos que resultaram nas seguintes conclusões:

Estudo I – o macho de tilápia-do-nilo tem preferência por substrato de areia para a construção de ninho;

Estudo II - o tipo de substrato influencia parâmetros reprodutivos, tais como a maior frequência de construção de ninho nos substratos de areia e areia+concha e maior frequência de desova no substrato de areia em relação ao sem substrato removível. Porém, o tipo de substrato não interfere no gasto de energia;

Estudo III - o substrato de areia e a ausência de substrato aumentam os ataques de alta intensidade. Além disso, os substratos de areia e areia+concha aumentam os níveis de 11Kt em machos dominantes de *Oreochromis niloticus*. Entretanto, apenas o contexto social modula a liberação de testosterona e cortisol, sendo em maiores níveis no desafio social do que em condição reprodutiva. Além disso, os machos apresentaram os maiores níveis de cortisol plasmático após o isolamento social.

De modo geral, o tipo de substrato interfere na escolha do macho (estudo I) e, conseqüentemente, influencia seu comportamento e bem-estar (estudo I, II, III). Além disso, pode desencadear diferentes respostas hormonais (estudo III), comportamentais (estudo I, II e III) e afetar a reprodução (estudo II) na tilápia-do-nilo.

Os resultados deste estudo mostram a importância de uma variável do ambiente na vida dessa espécie. Dessa forma, alguns sistemas de criação, sejam eles com interesse comercial ou de pesquisa, devem levar em conta a presença e o tipo de substrato considerando as condições de bem-estar da espécie.

ANEXO

1 **Substratum choice for nesting in male Nile tilapia**

2

3 F. Z. Mendonça^a, E. Gonçalves-de-Freitas^{b*}, R. S. Costa-Ferreira^c and G. L. Volpato^d.

4

5 ^aGraduate program in Aquaculture, Aquaculture Center (CAUNESP), University of São Paulo
6 State (UNESP), Brazil. E-mail: franzocoler@yahoo.com.br

7 ^{a,b}Laboratory of Animal Behaviour, Department of Zoology and Botany, Instituto de
8 Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE, UNESP, CAUNESP, R. Cristóvão
9 Colombo, 2265, Jd. Nazareth, Cep 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail:
10 elianeg@ibilce.unesp.br

11 ^c Laboratory of Ichthyology - Department of Zoology and Botany, Instituto de Biociências,
12 Letras e Ciências Exatas - IBILCE, UNESP, CAUNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jd.
13 Nazareth, Cep 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail:
14 roselene@ibilce.unesp.br

15 ^dLaboratory of Animal Physiology and Behaviour, Department of Physiology, Instituto de
16 Biociências, UNESP, CAUNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. E-mail: volpgil@gmail.com

17 ^{a,b,d}Research Center on Animal Welfare (RECAW, CNPq)

18

19 *Corresponding Author

20

21 This study is in agreement with the precepts of the Brazilian College for Animal
22 Experimentation (COBEA) (www.cobea.org.br) and was approved by the Ethical Committee

23 for Animal Experimentation, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP
24 (protocol 064-06).

25

26 **Running title:** Substratum choices in Nile tilapia

27

28 Article type: *Brief Communication*

29

30 **Abstract**

31 Substratum choice (sand, sand + shell, stones and empty) was tested in 15 groups (1 male and
32 2 female) of adult Nile tilapia. Male did not show clear choice for substratum before nesting,
33 but chose sand for dig nest. These results show males prefer dig nest on light and less
34 complex substratum.

35

36 **Keywords:** preference tests, welfare, nest, cichlid

37 Welfare concerns have motivated a search for better conditions for maintaining captive fish
38 (e.g. Huntingford *et al.*, 2006). While an extensive research effort has been devoted to
39 identifying physiological and biochemical indicators of fish welfare, recent reports have
40 emphasized fish behaviour in revealing welfare status (Dawkins, 2006; Duncan, 2006;
41 Volpato *et al.*, 2007; Volpato *et al.*, 2009). Accordingly, choice tests are seen as providing a
42 suitable way to determine what is important for fish and other non-human animals (Volpato
43 *et al.*, 2007; Volpato *et al.*, 2009), as they represent the animal wants. In the present study,
44 the choice for substratum preference was investigated in a cichlid fish.

45 Several fish species forage on the bottom, where they inspect the surface by removing
46 small particles with the mouth (Hart, 1993). In addition, some fish species, notably the
47 Cichlidae, use the bottom for building nests (Fryer & Iles, 1972). In Nile tilapia, for example,
48 the male removes substratum with its mouth, digging and rounding out an area in the bottom
49 to build a nest (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Such association with the substratum
50 suggests that fish behaviour would be affected by its physical properties. In fact, some fish
51 species adjust their behaviour according to the substratum type and the behavioural context.
52 For example, the bagrid catfish, *Auchenoglanis occidentalis* (Valenciennes, 1840), selects
53 substrata for breeding (nest being a brood site) according to the quantity of mollusc shells
54 (Ochi *et al.*, 2001). Small gadoid whiting, *Merlangius merlangus* (L.) (Gadidae), prefer more
55 complex substratum (with emergent structure) in predation risk context but, such a preference
56 change for sand substrate in large whiting, probably a better site for camouflage (Atkinson *et*
57 *al.*, 2004). Substrate type can also affect habitat distribution of some fish species, as
58 flounders, *Platichthys flesus* (L.) (Pleuronectidae) (Carl *et al.*, 2008). Thus, substratum
59 composition and complexity might be an important aspect of fish life that could contribute to
60 the environmental enrichment of cultured fish.

61 In this paper, substratum choices of a widely distributed cultured fish, the Nile tilapia
62 *Oreochromis niloticus* (L.), was described. In such nest-digging fish, the males build the
63 spawning site - a saucer-like depression in the bottom. Thus, substrate choice was
64 investigated in males of this species in a reproductive context.

65 Nineteen groups composed of one male (mean \pm S.D., weight: 66.96 g \pm 17.66 g and L_S :
66 12.88 cm \pm 1.10 cm, n = 19) and two females (mean \pm S.D., weight: 55.79 g \pm 13.72 g and
67 L_S : 12.32 cm \pm 0.97 cm, n = 38) were established on the afternoon of the first day and
68 observations were continued until detection of a nest (all males nested within five days). The
69 bottom of the test aquarium was divided into four equal-sized areas, each composed of either
70 sand, bivalve shells (mean \pm S.D area of shells = 216.97 \pm 127.61 mm², n = 18) + sand
71 (referred to as “shell”), stones, or empty (no substratum), performing 4 levels of complexity,
72 defined by particle size, texture, shape and weight. Substratum particles (even stones) were
73 sufficiently small that males could remove them with the mouth. In fact, our *ad libitum*
74 observations in other Nile tilapia groups have revealed that when provided access to only one
75 type of substratum, males will build nests in any one of these test substrata. Substratum
76 weight was obtained by weighing ten dried 32-ml samples of each substratum: mean \pm S. D.
77 of sand (55.96 \pm 1.60 g), shell (56.03 \pm 3.16 g) and stones (59.14 \pm 2.19g) (one-way ANOVA,
78 n = 10, $P < 0.001$). Sand and shell had similar weights (Least Significant Difference Test
79 (LSD), n = 10, $P > 0.05$), and both were lighter than stones (LSD, n = 10, $P_{\text{sand}} < 0.01$, $P_{\text{shell}} <$
80 0.01).

81 A glass aquarium (600 x 600 mm base; 400 mm high) was used to test choices. The
82 bottom was divided by glass partitions (100 mm high), and substratum was added to a depth
83 of 30 mm. A glass piece (30 mm high) was added to the quadrant lacking substratum to
84 match the bottom depth in the other quadrants. The position of substratum types was
85 randomly rotated for each group of fish to avoid spatial bias, as recommended by Volpato *et*

86 *al.* (2007). Each day, 20 min observations were carried out in the morning (~0830 hours) and
87 afternoon (~1430 hours). During each observation period, ten inspections were performed at
88 two-min intervals to register the substratum each fish was associated with. When a nest was
89 detected, the substratum type was noted and observations were stopped. This experimental
90 design resulted in different numbers of observations among groups. Thus, the frequency of
91 occupancy was corrected accordingly for statistical analyses. In four out of 19 groups, a nest
92 was detected at the first observation; thereafter, fish position was registered for the remaining
93 15 groups.

94 A cylindrical biofilter (78 mm in diameter) fixed to the middle of the aquarium provided
95 continuously aerated water (filter was kept at the centre to provide uniformly distributed
96 water among the 4 quadrants). Water quality was maintained at appropriate values of
97 ammonium (~0.25 ppm), pH (~7.5) and temperature (27.53 ± 0.62 °C). A light-dark cycle
98 was provided by turning on the light at 0700 and off at 1900 hours. An amount of 2%
99 biomass of food (ration for tropical fish) was offered daily, always after each behavioural
100 observation. Food was distributed homogeneously on the water surface to avoid interfering
101 with fish substratum choice.

102 Fish manipulations were preceded by anaesthesia with benzocaine (as recommended by
103 Gontijo *et al.*, 2003) at 3 mg/ml. Fish were sexed by inspection of genital papillae after
104 staining with methylene blue to highlight the female oviduct opening (*e.g.* Carvalho &
105 Gonçalves-de-Freitas, 2008). The animals were identified by different cuts made on the
106 upper part of the tail fin (*e.g.* Fernandes & Volpato, 1993; Höglund *et al.*, 2005).

107 Fish position was registered based on the placement of the fish's eye inside the substratum
108 quadrant. A nest was defined as an excavated area in any of the three substrata sufficient to
109 allow nesting, as previously described (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998; Volpato *et al.*,
110 2004; Mendonça & Gonçalves-de-Freitas, 2008). As male position could be biased by female

111 location, we analyzed the position of both males and females. Proportion-of-occupancy values
112 were arcsin-square-root transformed (Quin & Keough, 2002), and thus satisfied criteria for
113 ANOVAs based on tests for skewness, kurtosis and homoscedastic distribution (Ha & Ha,
114 2007). The mean relative frequencies of occupancy in the substrata were then compared
115 between sex (group factor) by two-way ANOVA for repeated measures (Zar, 1999).
116 Frequencies of fish nesting in each substratum were compared using Goodman's proportion
117 test, which consider dependence between variables (Goodman, 1965).

118 Frequency of permanence in each substratum was quantified for each fish in each group,
119 and the data for females were pooled per group. The mean relative frequency of occupancy
120 was similar among substrata for males and females (two-way ANOVA, $n = 15$, $P > 0.05$; Fig.
121 1A). Moreover, males built nests exclusively on either sand or shell substrata, but a higher
122 number of males chosen sand as a nesting substratum (Goodman's test, $n = 19$, $P < 0.05$; Fig.
123 1B). Although isolated Nile tilapia females could dig nest (Castro et al., 2009), they did not
124 build nest in this study. Spawning was not observed on the empty quadrant.

125 Results indicate that males of Nile tilapia nested on two lighter substrata, but they prefer
126 less complex substratum. Fish context (i.e., nesting or not nesting) also played a role in the
127 choice for a specific substratum, choice emerging only in the nesting context.

128 In sturgeon (*Acipenser transmontanus*), preference for sand is associated with
129 foraging (Bennett *et al.*, 2007) and, in whiting, to anti-predator behaviour (Atkinson *et al.*,
130 2004). In Nile tilapia, a different explanation is possible. Nile tilapia males defend territory
131 and build nests for mating (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Such behaviour might
132 explain why the males chose a substratum that could be removed by mouth, instead of non
133 substratum, even though spawning occurs under substratum deprivation (Mendonça &
134 Gonçalves-de-Freitas, 2008). In fact, Galhardo *et al.* (2008) showed welfare is adversely

135 affected by the absence of substrate in *Oreochromis mossambicus* male, which has reduction
136 in general activity, decreasing in territorial behaviour and emergence of vacuum behaviour.

137 From the three removable substrata, only two (sand and shell) were chosen by the
138 males, indicating that aspects besides removability are important in choice of substratum.
139 Why did males prefer sand for nesting? Males chose the lighter substratum, suggesting that
140 substratum weight affects choice among male Nile tilapias, what is reasonable given they nest
141 by removing substrata with the mouth. This is interesting because it may impose a smaller
142 energetic cost than dig on heavier substrate, as stones in this study. In fact, Nile tilapia males
143 tested on substratum deprivation had small specific growth rate than males on stone
144 substratum conditions (Mendonça, 2006). However, because shell and sand had similar
145 weight, other cues might also be involved in preference. First, less complex substratum (as
146 sand) could facilitate nest digging. Second, although males are capable of removing all the
147 three substrata (sand, shell and stones) by mouth, more subtle granulometric traits could be
148 involved, a question that warrants further investigation.

149 The existence of male substrata preferences argues that these chosen materials (sand and
150 shell) should be used to enrich the environment of this species in captivity. Assuming a
151 preference-based definition of fish welfare as "... the internal state of a fish when it remains
152 under conditions that were freely chosen" (Volpato *et al.*, 2007, p. 170), the fact that these
153 substrata are chosen by the fish suggests that they are likely to improve fish's welfare.

154 The authors thank Mr. Carlos Eduardo de Sousa and Mr. Ginaldo Vieira dos Santos (both
155 from UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil) by technical support. Also thank MSc.
156 Leonor Galhardo (ISPA, Portugal) by critical suggestions on the previous version of this
157 manuscript. The research was supported by CNPq proc. N° 302022/2006-6 (Volpato GL) and
158 140098/2007-0 (Mendonça FZ).

159

160

References

161 Atkinson, C. J. L., Bergmann, M. & Kaiser, M. J. (2004). Habitat selection in whiting.
162 *Journal of Fish Biology* **64**, 788-793. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00340.x

163 Bennett, W. R., Edmondson, G., Williamson, K. & Gelley, J. (2007). An investigation of the
164 substratum preference of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) eleutheroembryos.
165 *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 539-542. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.01003.x

166 Carl, J. D., Sparrevohn, C. ., Nicolajsen, H. & Stottrup, J. G. (2008). Substratum selection by
167 juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.): effect of ephemeral filamentous macroalgae. *Journal*
168 *of Fish Biology* **72**, 2570–2578. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01866.x

169 Carvalho, T. B. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Sex group composition, social interaction,
170 and metabolism in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 807-812.

171 Castro, A. L. S., Gonçalves-de-Freitas, E., Volpato, G. L. & Oliveira, C. (2009). Visual
172 communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Brazilian*
173 *Journal of Medical an Biological Research* **42**, 368-374. doi: 10.1590/S0100-
174 879X2009000400009

175 Dawkins, M. S. (2006). Through animal eyes: What behaviour tells us. *Applied Animal*
176 *Behaviour Science* **100**, 4-10. doi: 10.1016/j.applanim.2006.04.010

177 Duncan, I. J. H. (2006). The changing concept of animal sentience. *Applied Animal Behaviour*
178 *Science* **100**, 11-19. doi: 10.1016/j.applanim.2006.04.011

179 Fernandes, M. O. & Volpato, G. L. (1993). Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social
180 stress and carbohydrate metabolism. *Physiology & Behaviour* **54**, 319-23. doi: 10.1016/0031-
181 9384(93)90117-X

182 Fryer, G. & Iles, T. D. (1972). Breeding habits, In *The cichlid fishes of the great lakes of*
183 *Africa* (Fryer, G. & Iles, T. D., eds.), pp. 105-172. Neptune City: T.F.H. publications.

184 Galhardo, L., Correia, J. & Oliveira, R.F. (2008). The effect of substrate availability on
185 behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis*
186 *mossambicus*). *Animal Welfare* **17**, 239-254.

187 Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. (1998). Sneaking behavior of the Nile tilapia.
188 *Boletim Técnico do CEPTA* **11**, 71-79.

189 Gontijo, A. M. de M. C., Barreto, R. E., Speit, G., Reyes, V. A. V., Volpato, G. L. &
190 Salvadori, D. M. F., (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet
191 assay results. *Mutation Research* **534**, 165-172. doi: 10.1016/S1383-5718(02)00276-0

192 Goodman, L. A. (1965). On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions.
193 *Techometrics* **7**, 247-254.

194 Ha, R. R. & Ha, J. C. (2007). *Integrative Statistics for Behavioral Sciences*, Boston: Pearson
195 Custom Publishing.

196 Hart, P. J. B. (1993). Teleost foraging: facts and theories, In *Behaviour of Teleost Fishes*
197 (Pitcher, T. J., ed.), pp. 253-279. New York: Chapman & Hall.

198 Höglund, E., Bakke, M. J., Øverlic, O., Winberg, S. & Nilsson, G. E. (2005). Suppression of
199 aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan
200 supplementation. *Aquaculture* **249**, 525-531. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.028

201 Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandoe, P. &
202 Turnbull, J. F. (2006) Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology* **68**, 332–372.
203 doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.01046.x.

204 Mendonça, F. Z. (2006). Efeito da privação de ninho sobre a agressividade e o sucesso de
205 acasalamento em machos de tilápia-do-nilo. *Master Thesis*, UNESp, São José do Rio Preto,
206 SP, Brazil – 43p.

207 Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008). Nest deprivation and mating success in
208 Nile tilapia (Teleostei, Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **25**, 413-418.

209 Ochi, H., Kanda, T. & Yanagisawa, Y. (2001). Nest building and brooding behaviour of the
210 bagrid catfish, *Auchenoglanis occidentalis* (Valenciennes, 1840), in Lake Tanganyika. *Copeia*
211 **2**, 566-570.

212 Quin, G. P. & Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for*
213 *Biologists*, Cambridge University Press, 537 pp., Cambridge.

214 Volpato, G. L., Duarte, C. R. A. & Luchiari, A. C. (2004). Environmental color affects Nile
215 tilapia reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* **37**, 479-483. doi:
216 10.1590/S0100-879X2004000400004.

217 Volpato, G. L., Gonçalves-de-Freitas, E. & Castilho, M. F. (2007). Insights into the concept
218 of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms* **75**, 165-171.

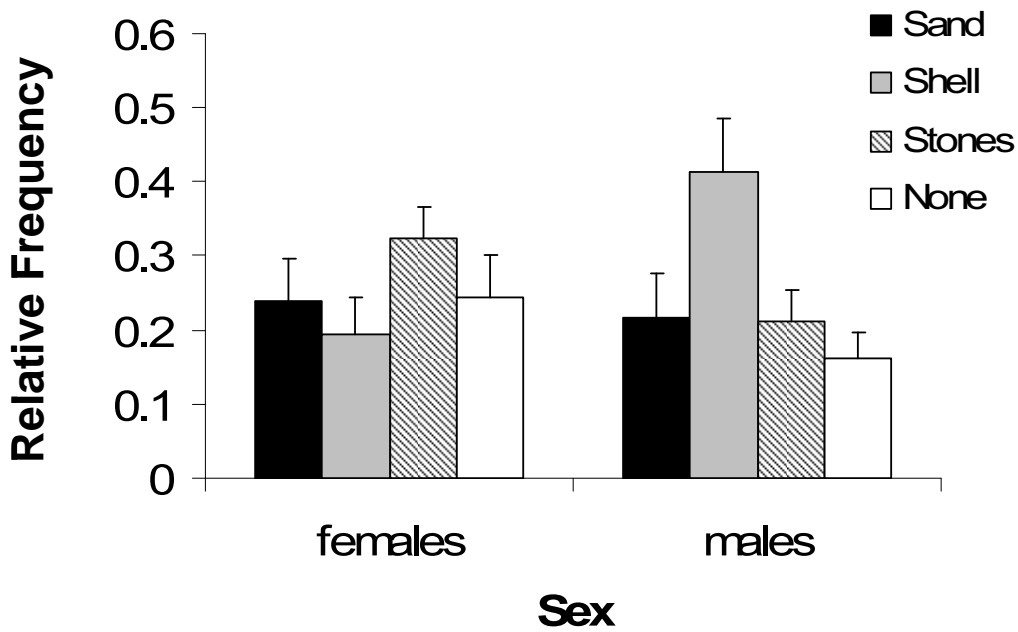
219 Volpato, G. L., Giaquinto, P. C., Fernandes-Castilho, M., Barreto, R. E. & Gonçalves-de-
220 Freitas, E. (2009). Animal welfare: from concepts to reality. *Oecologia Brasiliensis* **13**, 5-15.

221 Zar, J. (1999). *Biostatistical Analyses*. Printice Hall. 663 pp. New Jersey.

222 Figure Caption

223 Fig. 1. Substratum choice in Nile tilapia adults. A) Mean relative frequency \pm SE (n = 15) of
224 fish residence in the respective substratum prior to nesting. Proportion values were arcsin-
225 square-root-transformed to allow 2-way ANOVA for repeated measures ($P = 0.06$). B)
226 Number of males building nests in the respective substratum (n = 19). *indicates significant
227 statistical difference (Goodman's binomial test, $P < 0.05$).

A) Before Nesting



B) Nesting

