

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ZOOLOGIA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Modulação do comportamento reprodutivo  
pela turbidez e por estímulos químicos  
indicadores de risco de predação no lebiste**

**RAFAELA TORRES PEREIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO EGYDIO BARRETO**

**BOTUCATU – SP**

**2018**

Modulação do comportamento reprodutivo pela turbidez e por estímulos químicos indicadores de risco de predação no lebiste

**RAFAELA TORRES PEREIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO EGYDIO BARRETO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Zoologia.

**BOTUCATU – SP**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pereira, Rafaela Torres.

Modulação do comportamento reprodutivo pela turbidez e por estímulos químicos indicadores de risco de predação no lebiste / Rafaela Torres Pereira. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodrigo Egydio Barreto

Capes: 20404000

1. Poecilia. 2. Barrigudinho (Peixe) - Reprodução.  
3. Animais - Comportamento. 4. Substância de alarme.  
5. Escolha sexual.

Palavras-chave: Predação; Reprodução; Seleção sexual;  
Sistema presa-predador; Substância de alarme.

## EPÍGRAFE

---

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

## **DEDICATÓRIA**

---

**ÀS PESSOAS MAIS IMPORTANTES DA MINHA  
VIDA: MEUS PAIS, IRMÃOS, AVÓS, MEU AMOR  
AUGUSTO E A NOSSOS FUTUROS FILHOS!**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço à (Capes), por ter financiado minha bolsa de doutorado.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia, por terem proporcionado infraestrutura para que essa tese fosse realizada. Em especial, agradeço ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, incluindo seus atenciosos funcionários Davi Müller, Garlane Martison, Iolanda Jeronimo e Tatiana Silva, que não mediram esforços para me ajudar, sempre que precisei.

Em especial, agradeço ao meu orientador Rodrigo Barreto. Agradeço por ter me acolhido, confiado e oferecido uma oportunidade tão valiosa num momento tão importante. Obrigada por contribuir efetivamente na construção de minha formação e pensamento científicos, oferecendo apoio e discussões válidas sempre que precisei. Obrigada também pela amizade e pelo incentivo em todos os momentos.

Agradeço à gentileza do professor Rafael Nóbrega, do Departamento de Morfologia, por ter cedido a estufa do seu laboratório para o procedimento de secagem da argila. Agradeço também ao professor Pedro Padilha, do Departamento de Química e Bioquímica, por ter deixado seu laboratório de portas abertas para as medições de turbidez. E sou grata ao amigo Bruno Camargo por toda ajuda nas medições de turbidez, e ao amigo Bruno Gonçalves, por ter me cedido as fotos dos peixes para a montagem dos esquemas metodológicos.

Aos amigos do Laboratório de Comportamento e Bem Estar Animal, por terem contribuído para meu crescimento profissional e pessoal. Em especial, gostaria de agradecer àqueles que me ensinaram muito, contribuindo na pesquisa apresentada nesta tese. Agradeço aos professores Dr. Gilson Volpato, Dr. Rodrigo Barreto, Dr. Helton Delicio e Dra. Percília Giaquinto pelos valiosos ensinamentos e exemplo; aos colegas de trabalho Bruno Gonçalves, Vanessa Rossi, Juliane Leutz, Graziela Valença, Fábio Zanuzzo, Fernanda Pereira, Bruno Camargo, pelas produtivas discussões sobre nossos trabalhos.

É impossível deixar de agradecer aos amigos Camila Oliveira, Suzana Gabriela, Bruno Gonçalves, Vanessa Rossi, Juliane Leutz, Mariana Pina e José Francisco Antunes. Vocês sempre estiveram ao meu lado, me incentivando e me proporcionando momentos de alegria.

Agradeço ao meu amado noivo Augusto Silveira, por todo carinho, amor e amizade. Obrigada pelo cuidado e dedicação. Obrigada por me incentivar a buscar meus sonhos, por me dar suporte nos momentos difíceis. E, principalmente, obrigada por ser o melhor companheiro que eu poderia ter, por ser um ser humano lindo, honesto e de bom coração. Eu te amo!

À toda minha família, em especial aos meus pais Cláudio Pereira e Maria Aparecida Torres Pereira, meu irmão Bruno Torres e minha irmã Fabiana Torres Pereira (*in memorian*), e avós, João Torres, Emerita Torres, José Pereira (*in memorian*) e Terezinha Pereira, que mesmo à distância se fizeram presentes. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível, obrigada por acreditarem no meu sonho, e principalmente por me incentivarem a buscá-lo. Obrigada por cada palavra de carinho e por compreenderem minha ausência em muitos momentos. Eu amo vocês!

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos médicos que cuidaram de mim, permitindo que eu continuasse minha pesquisa com qualidade de vida. Obrigada em especial ao Dr. Carlos Eduardo Cury e ao Dr. Alexandre Heimbeck. Muito obrigada!

A todos que torceram por mim, meus sinceros agradecimentos!

## **SUMÁRIO**

---

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>A. COLETA .....</b>	<b>9</b>
<b>B. ACLIMATAÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>C. TURBIDEZ DA ÁGUA.....</b>	<b>11</b>
<b>D. ESTÍMULOS QUÍMICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>E. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS .....</b>	<b>14</b>
<b>F. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>G. ANÁLISE DOS DADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>H. NOTA ÉTICA.....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

**MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO  
REPRODUTIVO PELA TURBIDEZ E  
POR ESTÍMULOS QUÍMICOS  
INDICADORES DE RISCO DE  
PREDACÃO NO LEBISTE**

## RESUMO

Os animais se comunicam utilizando sinais de diferentes modalidades sensoriais. Contudo, as condições ambientais podem afetar quais os estímulos que serão utilizados na transmissão de sinais entre os organismos. Assim, supomos que condições desfavoráveis à exibição de estímulos visuais como a turbidez da água e a presença de predador podem afetar o comportamento de peixes, como aqueles associados à reprodução. Ao mesmo tempo, podemos supor que pode haver vias alternativas para a manutenção de dado comportamento que envolva a comunicação entre organismos (como no caso da corte e da cópula). Assim, utilizando o lebiste (*Poecilia reticulata*) como modelo experimental, testamos a influência da turbidez da água e de estímulos químicos indicadores de risco de predação em seu comportamento reprodutivo. Encontramos aqui que o comportamento defensivo de lebistes é influenciado por condições de turbidez e de pistas químicas indicadoras de risco de predação, com peixes apresentando redução de atividade nessas condições. Observamos que o comportamento reprodutivo é modulado por condições de turbidez e iluminação, com peixes sendo mais ativos em água não turva com luz acesa. Por fim, ao agruparmos a execução de comportamentos defensivos e reprodutivos, sob condições de turbidez e de risco de predação, verificamos maior resposta defensiva. O lebiste é uma espécie muito estudada por seus padrões visuais associados à reprodução, porém, em situação desfavorável para o uso de estímulos visuais e sob risco de predação, eles optam por se defender, evidenciando um trade-off entre sobrevivência e reprodução.

**Palavras-chave:** predação, reprodução, seleção sexual, sistema presa-predador, substância de alarme, turbidez.

## **INTRODUÇÃO**

Os sistemas aquáticos estão sendo impactados por uma grande mudança induzida pelo homem, o aumento na turbidez da água (Davies-Colley & Smith 2001). Embora o aumento de turbidez seja comum em períodos pós chuvas, ele é causado principalmente por atividades humanas como eutrofização pelo escoamento agrícola (Tilman et al. 2001) e sedimentação por minas, pedreiras e erosão (Ehlman et al. 2015). Esses impactos são causas de preocupação, uma vez que, nessas condições, a habilidade de usar informações visuais está reduzida, o que pode alterar o comportamento e outros elementos da vida de animais aquáticos (Ehlman et al. 2015; Kimbell & Morrell 2015). Por exemplo, partículas de sedimento podem danificar as brânquias dos peixes, levando-as a processos infecciosos (Sutherland & Meyer 2007); grandes proliferações de algas podem desoxigenar a água (Bruton 1985); pode ocorrer o rompimento na comunicação dos indivíduos (van der Sluijs et al. 2011), impedindo a escolha por parceiro no contexto reprodutivo (Sundin et al. 2010) e a redução na habilidade de detectar recursos alimentares (Utne-Palm 2002). Dessa forma, fica evidente que o aumento da turbidez da água gera implicações negativas para as comunidades aquáticas mundiais, algo que vem levando a um declínio significativo das mesmas (Richter et al. 1997; Henley et al. 2000). Assim, o aumento da turbidez pode ser um fator estressante, e a forma com que a turbidez afeta as interações presa-predador depende dos efeitos que ela causa em cada um dos envolvidos (Ehlman et al. 2015).

Quando ocorrem mudanças ambientais rápidas desse tipo, são esperadas mudanças fenotípicas adaptativas nos organismos afetados (Sih et al. 2011). Assim, mudanças ambientais instantâneas devem favorecer a plasticidade ativacional, a

expressão diferencial de vários fenótipos, conforme o tipo de ambiente; enquanto mudanças ambientais que se mantêm estáveis durante o desenvolvimento dos animais levam a plasticidade desenvolvimental, a capacidade de um genótipo adotar diferentes trajetórias de desenvolvimento em diferentes ambientes (Snell-Rood 2013). Nesta tese, abordamos a plasticidade ativacional, uma vez que os peixes foram expostos à água turva e não criados nela.

Quando nos referimos à comunicação entre animais, podemos dizer que as condições ambientais são fundamentais para a transmissão de sinais sensoriais e que esses podem ser de um tipo ou de outro dependendo dessas condições (p. ex. visual e/ou químico), de forma a otimizar a eficácia de sua transmissão. Um exemplo disso são os animais aquáticos, que utilizam informações tanto visuais, quanto químicas do ambiente para realizar decisões comportamentais associadas à avaliação do risco de predação (Manassa et al. 2013), alimentação (Ferrari et al. 2012), reprodução (Lima & Dill 1990) e defesa territorial (Barreto et al. 2010; Meuthen et al. 2015).

Estímulos químicos são importantes mecanismos na detecção da presença do predador devido à natureza do estímulo e, promovem a realização de comportamento antipredatório (Chivers & Smith 1998; Kats & Dill 1998). Esses estímulos são bastante eficazes, pois diluem-se facilmente na água (Wisenden 2000; Mirza & Chivers 2003) e podem ser utilizados em situações desfavoráveis para a transmissão de sinais visuais no ambiente, como em águas turvas (Smith 1992; Jordão & Volpato 2000; Wisenden 2000; Ranaker et al. 2012, 2014) ou em períodos noturnos (Smith 1992; Wisenden 2000). Dessa forma, animais que estão sujeitos a baixas condições de visibilidade (Hartman & Abrahams 2000; Weissburg et al. 2002; Zimmer & Butman 2000; Ranaker et al. 2012,

2014), que não possuem fotorrecepção ou ainda que apresentam um sistema fotorreceptor rudimentar, como é o caso de algumas espécies de planárias (Beeching et al. 2015), são capazes de avaliar riscos.

No que diz respeito à comunicação envolvida entre os organismos durante a execução do comportamento reprodutivo em peixes, estão presentes estímulos visuais e químicos (Lima & Dill 1990, Sloman 2011, O'Connor et al. 2015), os quais são capazes de influenciar a seletividade da fêmea por um parceiro sexual (Brooks & Caithness 1995; (Shohet & Watt 2004). Em relação a esses estímulos, podemos mencionar a exibição da coloração corpórea e, ainda, os displays de corte (Pomiankowski 1987; Gwyne 1989; Lima & Dill 1990; Reynolds & Gross 1990; Magnhagen 1991; Sih 1994; Godin & Briggs 1996). De acordo com esses autores, os indivíduos que executam esses comportamentos reprodutivos estão mais vulneráveis à predação devido à sua maior atividade em busca por parceiros e cópula, o que os torna mais expostos. Dessa forma, a presença de predador pode ser configurada como uma pressão seletiva sobre o comportamento reprodutivo de peixes.

De fato, muitas estratégias reprodutivas aparecem como suposto efeito da pressão de predação (Burk 1982), e essas decisões comportamentais podem ser adaptativas (Lima & Dill 1990). Podemos citar aqui alguns exemplos de estratégias comportamentais: a diminuição de atividade, principalmente por presas mais evidentes (Lima & Dill 1990); uma menor taxa de corte em presença de predador (Farr 1975); a realização de corte conspicua em situações com baixa pressão predatória e cópula forçada em situações de risco de predação (Endler 1987, Sih 1994); a alteração na frequência ventilatória (Barreto et al. 2003; Sanches et al. 2015; Miyai et al. 2016; Pereira et al. 2017); e a mudança na

responsividade e seletividade da fêmea por um parceiro sexual (Jennions & Petrie 1997), mediada por diferentes níveis de predação (Magnhagen 1991; Sih 1994; Endler & Houde 1995; Godin & Briggs 1996; Gong & Gibson 1996).

A exposição à pressão de predação tem efeitos dramáticos em todos os aspectos da biologia animal, como fisiologia, comportamento, morfologia e traços da história de vida (Endler 1995). A predação pode ser considerada a maior força seletiva na evolução de estratégias reprodutivas nos animais (Lima & Dill, 1990). Assim, a detecção precoce de um predador tem implicações importantes para a sobrevivência da presa, pois isso permite às presas antecipar-se a um potencial ataque de predação e a usar respostas antipredatórias adequadas (Barreto et al. 2014). Ainda, a habilidade de identificar e quantificar riscos é importante para evitar a realização de comportamentos inadequados e evitar gasto energético desnecessário (Ranaker et al. 2012). Portanto, podemos dizer que as presas com capacidade de detectar riscos por meio de estímulos químicos possuem maior chance de sobreviver.

Na ausência de estímulos visuais, peixes respondem fortemente à estímulos químicos (Hartman & Abrahams, 2000; Giaquinto & Volpato 2001). Além disso, em condições de água turva, peixes utilizam estímulos sensoriais alternativos para detectar e evitar ataques de predadores (Wisenden 2000; Ehlman et al. 2015). Assim, enquanto a transferência de informação visual entre peixes é um fator importante, a visão pode ser limitante em ambientes aquáticos, promovendo o envolvimento de outras habilidades sensoriais na transferência de informações (Jordão & Volpato 2000).

Dessa forma, propomos que a efetividade de um estímulo sexual depende não só do próprio sinal, mas do sistema sensorial e das condições ambientais durante a corte.

Assim, supomos que em uma situação desfavorável para a sinalização visual, os estímulos químicos configuram uma maneira preferencial para manutenção da reprodução e que, a percepção de predadores por suas pistas químicas esteja mais facilitada como forma de evitar a predação. Nesse contexto, supomos que o comportamento reprodutivo de peixes em ambiente de água turva seja efetivamente mantido por comunicação química em detrimento da visual. Além disso, acreditamos que o comportamento reprodutivo seja mais influenciado na condição de turbidez no advento da presença de pistas químicas que indicam risco de predação. Essas ideias são os pontos norteadores dessa tese.

Considerando essas pistas químicas, no contexto do sistema presa-predador, tais estímulos indicam direta ou indiretamente uma ameaça devido à presença de um predador. Isso se dá devido à presença física de odor de predador (Kats & Dill 1998; Wisenden 2000) ou por sinais químicos de presas ameaçadas (Jordão & Volpato 2000; Barcellos et al. 2011), feridas (substância de alarme – Chivers & Smith 1998; condroitina – Mathuru et al. 2012; sangue – Barreto et al. 2013) ou mortas e em decomposição (Hussain et al. 2013; Oliveira et al. 2014).

Indiretamente, no caso de alguns peixes, durante o ataque e captura de uma presa por um predador, alguns fatores químicos putativos são supostamente liberados na água devido trauma físico das células ‘club’ presentes na epiderme da presa (Pfeiffer 1977; Chivers & Smith 1998; Wisenden 2000; Barreto et al. 2010). Tais fatores químicos informam às presas em potencial que um predador está forrageando naquele momento, sendo por isso denominados substâncias de alarme (Pfeiffer 1963; Wisenden 2000). Dessa forma, quando as presas detectam a presença dessas substâncias na água, imediatamente deflagram resposta antipredatória, conhecida como reação de alarme

(Chivers & Smith 1998). A reação de alarme pode causar uma alteração na prioridade de resposta à estímulos ambientais relevantes, como reduzir o forrageamento (Ferrari et al. 2012; Dalton & Flecker 2014) ou a defesa territorial (Barreto et al. 2010; Meuthen et al. 2015). Os tipos de resposta à essas substâncias de alarme podem variar de acordo com as condições ecológicas e com a espécie envolvida (Chivers & Smith 1998; Hartman & Abrahams 2000), de forma que podemos registrar respostas do tipo ‘dashing’, ‘freezing’, ‘shoaling’, ‘sheltering’ e ‘crypsis’ (Barreto et al. 2010).

Essas substâncias de alarme têm sido documentadas como uma característica marcante nos peixes da Superordem Ostariophysi (por exemplo, ver Pfeiffer 1977; Chivers & Smith 1998; Wisenden 2000; Giaquinto & Volpato 2001; Ide et al. 2003; Barreto et al. 2012). No entanto, essa característica tem sido notada em peixes acantopterígijs, como, por exemplo, espécies da Família Gobiidae (Smith & Smith 1989; Smith et al. 1991; Barreto et al. 2014; Pereira et al. 2017), Cichlidae (Wisenden & Sargent 1997; Brown et al. 2004; Foam et al. 2005; Barreto et al. 2010), Percidae (Pfeiffer 1963; Smith 1979) e Poeciliidae (Brown & Godin 1999; Brown et al. 2010).

O lebiste *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) é um pequeno peixe ovovivíparo originário de riachos e rios de Trinidad e Tobago e do nordeste da América do Sul (Houde 1988, Houde & Hankes 1997), que tem populações bem estabelecidas em todos os continentes, com exceção da Antártica (Deacon et al. 2011). Essa espécie é amplamente estudada no que concerne ao seu sistema reprodutivo promíscuo, em que machos estão sempre em busca de fêmeas receptivas, na tentativa de fertilizá-las (Endler 1987). Os lebistes são sexualmente dimórficos em tamanho e cor, com machos menores e possuindo alta variação nos padrões de cor (Long & Rosenqvist 1998). Essa espécie é um bom

modelo para testar as hipóteses propostas nesse trabalho, devido aos seguintes itens: 1) Há facilidade na execução dos experimentos em ambiente laboratorial devido aos animais serem pequenos, possuírem ciclo de vida relativamente rápido e serem de fácil manutenção; 2) O comportamento reprodutivo da espécie é bem caracterizado; 3) Essa espécie consegue se reproduzir bem em ambiente de cativeiro. Com base nessas características, o lebiste tem sido um bom modelo para compreender a interferência de predadores na história de vida de presas, via mecanismos evolutivos e ecológicos (Dalton & Flecker 2014).

Uma vez que estudos de reprodução desses peixes estão associados, principalmente, a estímulos visuais, o presente estudo traz novidades, pois destaca a importância das condições ambientais (visuais e químicas) no comportamento defensivo e reprodutivo de lebistes. Com base no exposto acima, essa tese possui como objetivos: 1) Avaliar se a turbidez influencia o comportamento reprodutivo do lebiste; 2) Avaliar se estímulos químicos que indicam risco de predação, como sinais de alarme, modulam o comportamento reprodutivo de lebistes em função da diminuição da percepção visual do ambiente devido variações na turbidez da água, e especificamente: investigar se a substância de alarme modula o comportamento reprodutivo de lebistes em águas turvas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a. Coleta

Indivíduos adultos de *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) foram coletados em uma lagoa localizada na Fazenda Lageado – UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (Coordenadas: 22°50'47.97"S - 48°25'40.42"O) (Fig. 1) com rede de malha 6 mm. Os exemplares capturados foram rapidamente transferidos, para fins profiláticos, para baldes com água e sal (Allyn et al. 2001; Gomes et al. 2003). Esse procedimento foi repetido várias vezes a fim de obter uma amostra de tamanho adequado. Em seguida, os animais foram transportados até o laboratório, no escuro, conforme recomendado em estudos prévios para minimizar potencialmente o estresse de transporte (Maximino et al. 2007, 2010). Um peixe adulto de neon tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956), foi comprado em loja de aquarismo e transportado até o laboratório, nas mesmas condições descritas para os lebistes.



**Figura 1** - Lagoa da Fazenda Lageado – UNESP – Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil  
(Coordenadas: 22°50'47.97"S - 48°25'40.42"O).

### **b. Aclimação**

Já em laboratório, os peixes foram acondicionados em sistema de monocultivo, em biotério, por pelo menos 30 dias antes do início dos experimentos. Nesse período, os peixes ficaram em tanques de 100 L com densidade máxima de 1 peixe/6 L, com aeração constante, recirculação sistêmica da água por meio de um filtro externo Sunsun HBL-302, temperatura da água entre 23 e 27° C, pH em torno de 7, amônia < 0,04 ppm, nitrito < 0,5 ppm. Adotamos fotofase das 06:00h às 18:00h, utilizando uma lâmpada fluorescente e um timer controlador do ciclo claro-escuro, que promoveram uma transição imediata entre a presença e ausência de iluminação. Os peixes foram alimentados diariamente (5% da biomassa) com ração extrusada para peixes tropicais Alcon Colours (42% PB).

### c. Turbidez da água

Foram realizados experimentos em água turva e não turva. A condição de turbidez foi obtida com a adição de argila neutra na água, a fim de evitar alterações no pH. O nível de turbidez da água foi mensurado (NTU – Unidades Nefelométricas de Turbidez) por meio de um turbidímetro de bancada (modelo Hach 2100P) com seu respectivo conjunto de padrões de turbidez usados como nossos referenciais. A determinação do nível de turbidez ideal para a realização dos experimentos foi de forma a ser ecologicamente relevante, uma vez que existem registros de que a turbidez pode atingir 200 NTU em estações chuvosas em Trinidad (Luyten & Liley 1985), local de ocorrência natural de *Poecilia reticulata*. Neste estudo, adotamos a classificação de turbidez da água conforme demonstrado na Tabela I (adaptado de Ehlman et al. 2015; Kimbel & Morrell 2015). Para o lebiste, a turbidez de 50 NTU é moderada e de 100 NTU elevada, atuando como indutoras de potenciais efeitos biológicos (Ehlman et al., 2015). Testamos a viabilidade de filmagem sob tais níveis de turbidez, inserindo um objeto (um pequeno cilindro colorido com 2,6 cm de diâmetro e 2,6 cm de comprimento) dentro do aquário, no lado oposto ao que a câmera era posicionada, e pudemos observá-lo sem dificuldades.

**Tabela I** - Classificação de nível de turbidez da água (adaptado de Ehlman et al. 2015; Kimbel & Morrell 2015).

Valor (NTU)	Classificação de nível de turbidez
0 - 49	Baixa
50 - 99	Moderada
≥ 100	Alta

NTU = Unidades Nefelométricas de Turbidez

Propusemos utilizar o valor de turbidez  $\geq 100$  NTU (turbidez alta). Para tal, a seguinte metodologia e proporção de argila/ L de água foi empregada: 1) Secamos os blocos de argila em estufa por 24h a 60° C; 2) Trituramos os blocos, livres de água, até reduzi-los a pó; 3) Pesamos 2 g dessa argila em pó; 4) Acrescentamos essa quantidade em cada aquário experimental (4L de água); 5) Agitamos a água com um bastão de vidro para diluir a argila por todo o aquário; 6) Coletamos uma amostra da água turva e, por fim, 7) Mensuramos a turbidez da água para confirmar se o pretendido foi alcançado.

Os valores médios de NTU registrados no primeiro experimento foram de  $0,89 \pm 0,51$  para os tratamentos com água não turva, e de  $122,78 \pm 20,46$  para os tratamentos com água turva. Já os valores médios de temperatura (°C) registrados nesse experimento foram de  $25,76 \pm 0,49$  para os tratamentos com água não turva, e de  $25,65 \pm 0,57$  para os tratamentos com água turva.

No segundo experimento, os valores médios de NTU registrados foram de  $1,61 \pm 1,50$  para os tratamentos com água não turva, e de  $119,83 \pm 12,94$  para os tratamentos com água turva. Já os valores médios de temperatura (°C) registrados nesse experimento foram de  $25,44 \pm 0,91$  para os tratamentos com água não turva, e de  $25,56 \pm 1,00$  para os tratamentos com água turva.

Por fim, no terceiro experimento, os valores médios de NTU registrados foram de  $1,22 \pm 0,65$  para os tratamentos com água não turva, e de  $115,22 \pm 22,01$  para os tratamentos com água turva. Já os valores médios de temperatura (°C) registrados nesse experimento foram de  $25,56 \pm 1,00$  para os tratamentos com água não turva, e de  $25,58 \pm 0,69$  para os tratamentos com água turva.

#### **d. Estímulos químicos**

Para os experimentos com substância de alarme (SA), o extrato de pele foi preparado conforme segue abaixo (adaptado de Giaquinto & Volpato 2001). Os peixes doadores do extrato de pele (um lebiste e um neon tetra) foram sacrificados por uma secção cervical sem o uso de anestésicos, a fim de prevenir possíveis interferências de odores químicos. Três incisões superficiais foram feitas na pele dos animais, paralelamente, de cada lado do corpo. As incisões foram feitas com cuidado, a fim de evitar a inclusão de tecido muscular ou visceral, uma vez que é suposto que a substância de alarme em peixes poecilídeos esteja presente na epiderme (Mirza et al. 2001). Os peixes foram então colocados em um béquer cada, com 500 ml de água destilada e cuidadosamente agitados durante 5 min. O conteúdo foi filtrado em papel filtro de 185 mm (40 Whatman) para remover qualquer fragmento de tecido remanescente. A solução resultante foi armazenada em alíquotas de 1 ml e congeladas à -20° C até a realização dos experimentos. De acordo com Lawrence & Smith (1989), essa temperatura permite que os estímulos de alarme preservem a capacidade de desencadear respostas de alarme. Da mesma forma que fizemos para SA, congelamos alíquotas de 1 ml de água destilada (eluente controle) sob a mesma temperatura das demais.

Um volume de 2 ml de SA ou água destilada foi cuidadosamente injetado com uma seringa na superfície da água dos aquários experimentais designados para tais testes (Gibson & Mathis 2006). Fiquei por trás de um anteparo opaco, a fim de evitar que os peixes soubessem o momento no qual as pistas químicas foram adicionadas ao aquário. Para a injeção da pista química na água foi usada uma seringa acoplada a um tubo de silicone de 3 mm de diâmetro em cada teste, os quais foram descartados imediatamente

ao fim do teste, para evitar contaminação entre os tratamentos. O volume de filtrado injetado em cada aquário é arbitrário, com estudos utilizando diferentes valores (Brown & Godin 1999; Manassa et al. 2013; Barreto et al. 2010; Ranaker et al. 2012; Barreto et al. 2014). No entanto, Lawrence & Smith (1989) observaram que pequenas quantidades de substâncias de alarme liberadas por diferentes espécies podem ser detectadas em volumes que vão de 80 L a aproximadamente 10000 L de água. Outros autores encontraram que 1 g do caracol *Pomacea paludosa* contém substância de alarme suficiente para ser detectada em um volume de mais de 250000 L de água (Snyder & Snyder 1971). Dessa forma, é justificável que tenhamos utilizado 2 ml para 4 L de água.

#### **e. Respostas comportamentais**

O comportamento dos lebistes foi quantificado a partir de análises de vídeo, em que o observador não sabia qual o tratamento estava sendo analisado. Tomamos esse cuidado para evitar vieses de análise.

Faz-se necessário mencionar de que maneira são configuradas as respostas comportamentais avaliadas nessa pesquisa. Dentre as respostas defensivas temos freezing, dashing, shoaling e slowing. O freezing é definido como o cessamento de toda a movimentação do peixe, uma espécie de “congelamento postural”, no qual o peixe se assenta no substrato (ou fundo do aquário) e permanece imóvel (Lawrence & Smith 1989; Giaquinto & Volpato 2001). O comportamento de dashing consiste em um disparo repentino de natação, aparentemente desorientada (Lawrence & Smith 1989; Giaquinto & Volpato 2001). O shoaling é uma tática antipredatória importante e comum dentre diversas espécies de peixes (Magurran 1990), consistindo em um comportamento de agrupamento entre os organismos envolvidos, a fim de potencializar o efeito ecológico

de diluição na tentativa de maximizar a sobrevivência dos indivíduos (Kimbell & Morrell 2015). Para lebistes, considera-se ‘shoaling’ o agrupamento a partir de dois indivíduos (Croft et al. 2003). E, como última resposta defensiva avaliada nesta pesquisa, temos o slowing, um comportamento muito semelhante ao freezing, porém a redução da atividade do animal ocorre na coluna d’água e não próximo ao fundo do aquário (Lawrence & Smith 1989).

Já entre as respostas reprodutivas temos corte, chasing e investimento da fêmea. O comportamento de corte é muito bem descrito em lebistes, contendo duas estratégias típicas: a corte seguida de cópula, que envolve movimentos sigmoides do corpo do macho com o objetivo de refletir os padrões de coloração do corpo e atrair a fêmea pretendida (Endler 1987); e a cópula sem corte, ou também conhecida como cópula forçada, na qual o macho tenta inseminar a fêmea sem que esta seja responsiva a ele (Endler 1987; Evans et al. 2003). A cópula forçada é mais frequente com o aumento da intensidade luminosa e do risco de predação (Endler 1987; Magurran & Seghers 1990; Magurran & Nowak 1991; Godin 1995). Ao considerarmos o comportamento de perseguição da fêmea pelo macho (chasing), temos o tempo despendido pelo macho, em segundos, nesta atividade (Reeve et al. 2014). Ainda, temos a resposta de investimento da fêmea no macho, um comportamento ainda não registrado, que aqui observamos como uma perseguição e/ou exibição que a fêmea faz para o macho, em que ela direciona sua natação para próximo dele e exhibe leves movimentos ondulatórios do corpo. Acreditamos que essa seja uma resposta comportamental que deva ser estudada com mais atenção em estudos posteriores, uma vez que todos os estudos que abordam respostas da fêmea mencionam apenas responsividade às investidas do macho (Houde 1987; Houde 1988; Houde & Endler 1990; Reynolds & Gross 1990; Endler & Houde 1995).

Outras respostas observadas são o movimento do gonopódio e a ocupação diferencial na coluna d'água. O movimento do gonopódio, considerado aqui, trata-se de um movimento oscilatório para frente e para trás do órgão copulador dos machos. Já a ocupação diferencial da coluna d'água considera a porção do aquário ocupada pelos peixes durante os procedimentos experimentais, em que avaliamos a ocorrência desse tipo de comportamento nos tratamentos que tinham como variável independente a presença ou ausência de iluminação. Nenhum desses comportamentos, investimento da fêmea no macho, movimento do gonopódio e ocupação diferencial na coluna d'água, foi registrado na literatura para *P. reticulata*.

#### **f. Procedimentos experimentais**

Os indivíduos de *Poecilia reticulata* foram colocados em aquários de vidro (4 L volume de água; 28,5 x 12 x 20 cm; 2 peixes por aquário) contendo água turva ou não turva em todos os experimentos desenvolvidos, sendo que cada tratamento foi feito separadamente dos demais. Entre os tratamentos, nós trocamos o aquário teste, utilizando sempre aquários limpos, a fim de remover qualquer estímulo químico que pudesse interferir nos tratamentos seguintes.

Antes de iniciar os experimentos, aclimatamos os peixes nos aquários experimentais por 10 minutos. Após esse período, filmamos os diferentes comportamentos dos peixes estabelecidos para análise por 15 minutos. Os primeiros 5 minutos foram descartados das análises (período de aclimação com a presença da câmera), e os demais 10 minutos foram avaliados da seguinte maneira: 5 min antes de administrar o estímulo ao aquário e 5 min após o estímulo ser administrado (adaptado de Jordão & Volpato 2000) (excluindo os primeiros 10 s pós injeção do estímulo químico na

água), para os testes com pista química; e 10 min contínuos para os testes com iluminação. Um teste com azul de metileno demonstrou que em 10 s todo o corante está espalhado no aquário. Ao considerarmos substâncias de alarme, que devem agir de forma rápida em uma determinada área, a molécula deve ser relativamente instável, de forma a evitar efeitos residuais duradouros que causariam confusão para os animais que estão no local (Schmidt-Nielsen, 2002), isso justifica o motivo de avaliarmos apenas os 5 minutos pós injeção do estímulo químico na água.

Os peixes foram alimentados em seus aquários de estoque sempre às 7 h da manhã, 1 h antes do início dos experimentos, isso foi feito a fim de evitar alterações comportamentais já descritas na literatura. Sabe-se que peixes em jejum prolongado são menos reativos a situações de risco de predação (Magnhagen 1988; Gregory 1993; Giaquinto & Volpato, 2001), sugerindo um trade-off de recursos energéticos e risco, no qual peixes em jejum prolongado apresentam-se mais dispostos a correr riscos do que peixes saciados (Dill & Fraser 1984; Höjesjö et al. 1999). Além disso, Giaquinto & Volpato (2001) encontraram que peixes alimentados exibem resposta de alarme mais elaborada, isto é, dashing seguido de freezing, enquanto peixes em jejum prolongado realizam apenas parte da resposta defensiva (dashing). Considerando a responsividade dos peixes ao risco de predação, utilizamos apenas 1 casal por aquário nos testes que envolviam reprodução, pois peixes em competição são também menos sensíveis aos riscos de predação (Dill & Fraser 1984).

O comportamento dos indivíduos foi gravado das 8 às 18 h, considerando que a atividade reprodutiva da espécie, embora apresente picos, ocorre ao longo de todo o dia

(Endler 1987; Reeve et al. 2014). As filmagens, considerando nossos diferentes grupos experimentais, foram feitas aleatoriamente, em ordem estipulada por sorteio.

Para os tratamentos com interferência reprodutiva, o casal utilizado teve os indivíduos coletados em aquários diferentes e isolados visualmente. Adotamos esse cuidado devido a ser descrito que fêmeas de *P. reticulata* conseguem distinguir os machos com que já tiveram contato, apresentando preferência por machos familiares (Griffiths & Magurran 1997); e que machos possuem preferência por fêmeas não familiares, uma vez que ao copularem com diferentes fêmeas aumentam seu sucesso reprodutivo (Kelley et al. 1999; Magurran & Ramnarine, 2004; Valero et al. 2009). A familiaridade leva em torno de 12 dias para ser estabelecida em lebistes (Griffiths & Magurran 1997; Kelley et al. 1999), por isso, mantivemos os peixes utilizados nesse estudo em grupos isolados por pelo menos 30 dias antes de iniciarmos os testes experimentais. Dessa forma, ao utilizarmos um indivíduo de cada aquário de estoque nos testes, eliminamos qualquer possibilidade de seleção sexual direcionada por familiaridade.

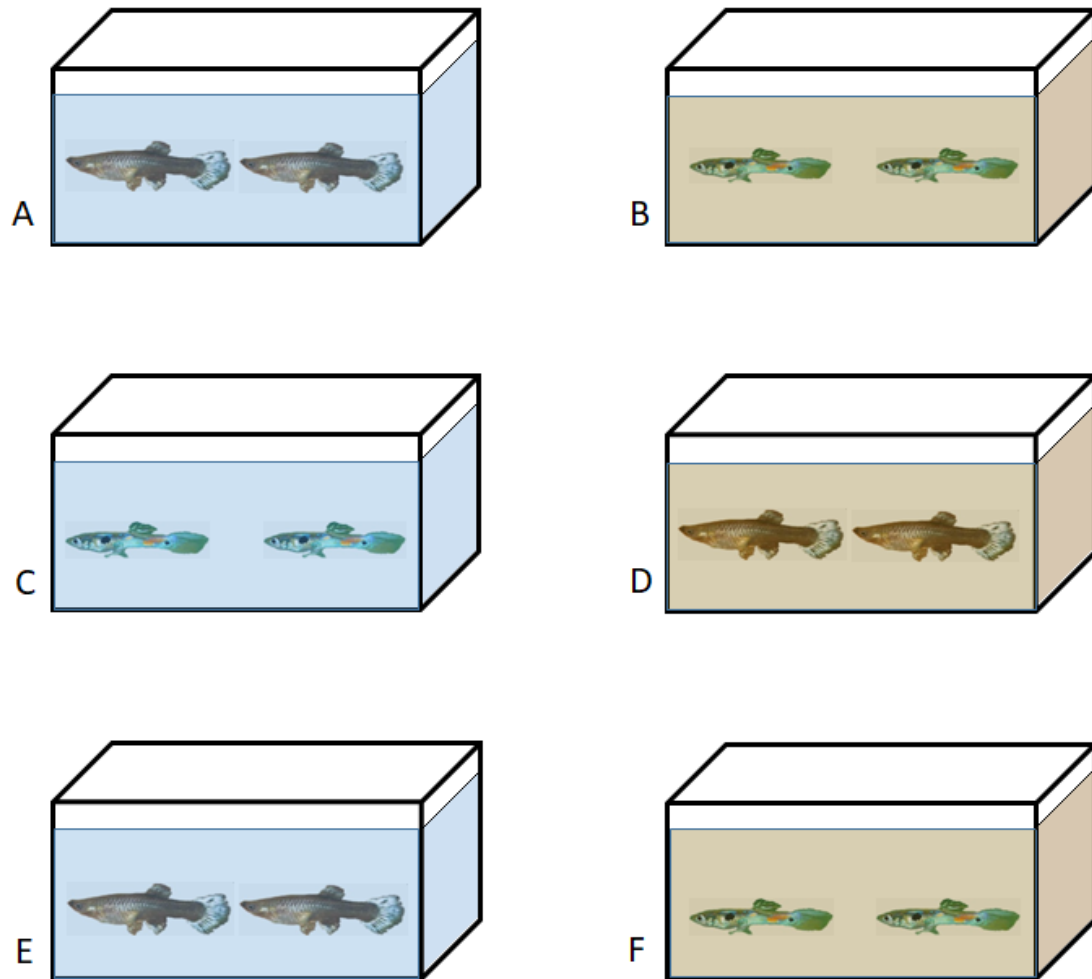
Tivemos o mesmo cuidado para os tratamentos sem interferência reprodutiva, uma vez que interações sociais entre indivíduos que vivem juntos podem representar alteração de comportamento (Evans & Magurran 1999; Wisenden, 2000; Hettyey & Pearman 2003; Candolin 2004; Valero et al. 2009). Além disso, para os tratamentos com interferência reprodutiva, nós selecionamos apenas fêmeas receptivas, isto é, excluindo dos tratamentos fêmeas com abdome e mancha anal distendidos. Esses sinais indicam estágio de desenvolvimento embrionário avançado e, portanto, um período em que a fêmea não é receptiva ao macho (Matthews & Magurran 2000; Evans et al. 2003).

É descrito na literatura que as cortes em lebistes são mais frequentes no inverno (Endler 1987), isso ocorre pois nesses períodos a incidência luminosa sobre a água é menor, o que faz com que os peixes possam efetuar mais corte sem ser detectados por predadores. Assumindo isso, mesmo considerando as condições laboratoriais controladas, realizamos os nossos testes em Junho de 2016 (inverno) para o caso de haver manutenção das condições comportamentais por ritmos biológicos sazonais.

Os delineamentos específicos de cada estudo estão relatados a seguir:

***Experimento 1 - Influência da turbidez no comportamento de resposta à substância de alarme em lebistes***

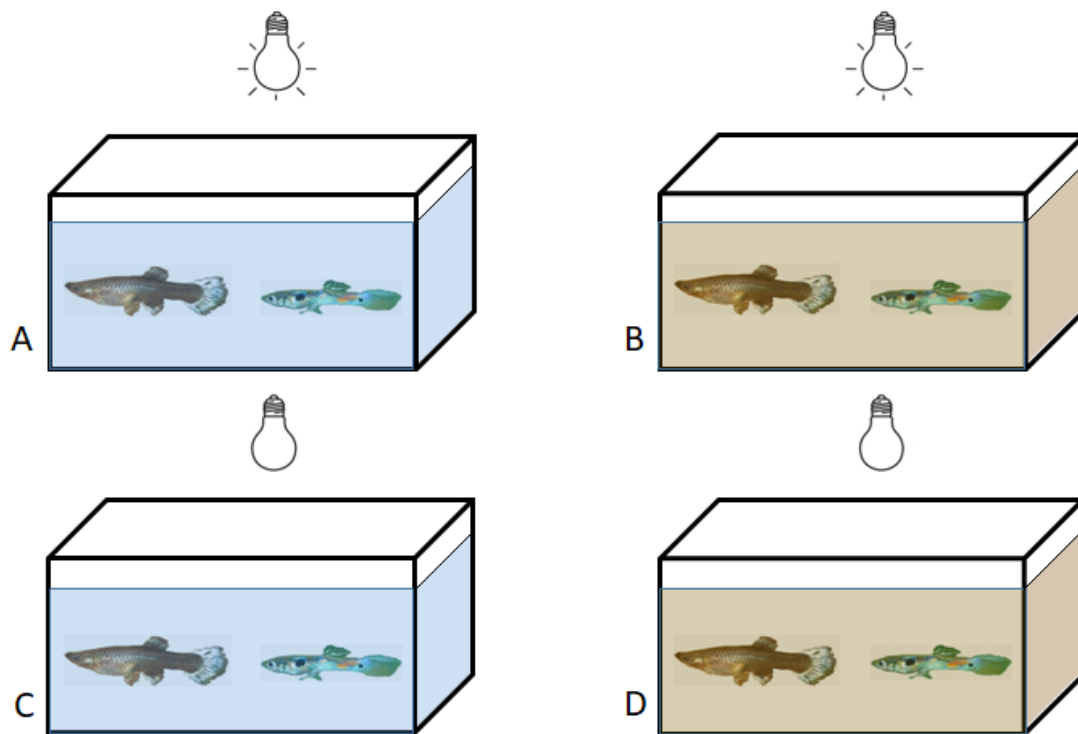
Inicialmente foi realizado esse experimento, com o intuito de verificar se a turbidez da água é capaz de modular a resposta do lebiste à substância de alarme. Para isso, temos um desenho experimental de 2 x 3: turvo ou não turvo e com substância de alarme de coespecífico, heteroespecífico ou sem substância de alarme (água destilada) (Fig. 2). Nesse experimento, cada condição possui 9 réplicas. O tamanho amostral deste experimento foi de 108 indivíduos, sendo 54 fêmeas e 54 machos. No momento da experimentação, os indivíduos foram alocados em pares, do mesmo sexo, em cada aquário (4 L volume de água; 28,5 x 12 x 20 cm; 2 peixes por aquário) a fim de evitar interferências reprodutivas, e permaneceram em aclimatação por 10 min. Em seguida, cada aquário foi filmado por 15 min, descartando os primeiros 5 min (aclimatação com câmera), e injetando o estímulo químico aos 10 min (5 min antes de administrar o estímulo ao aquário e 5 min após o estímulo ser administrado). Aqui, observamos se houve comportamento antipredatório ('freezing', 'dashing', 'shoaling' e 'slowing') por parte dos peixes.



**Figura 2** - Experimento 1 – Efeito da turbidez no comportamento de resposta à substância de alarme em lebiste. A = água não turva com substância de alarme de coespecífico, B = água turva com substância de alarme de coespecífico, C = água não turva com substância de alarme de heteroespecífico, D = água turva com substância de alarme de heteroespecífico, E = água não turva sem substância de alarme (com água destilada), F = água turva sem substância de alarme (com água destilada). Fotos dos animais de Gonçalves, BB.

***Experimento 2 - Influência da turbidez e da presença de iluminação no comportamento reprodutivo de lebistes***

A partir desse experimento poderemos avaliar se o lebiste se reproduz em água turva, visto que esse peixe é natural de riachos encachoeirados de águas claras e iluminadas (Houde 1988, Houde & Hankes 1997), ou se basta não ter acesso visual ao parceiro (ausência de iluminação) para o comportamento reprodutivo diminuir de intensidade. Para este experimento foi adotado o desenho amostral 2 x 2: turvo ou não turvo e com e sem iluminação. Cada condição possui 9 réplicas. O tamanho amostral deste experimento foi de 72 indivíduos, sendo 36 fêmeas e 36 machos. Machos e fêmeas ficaram separados até o momento do experimento ser realizado. No momento da experimentação, os casais foram colocados em aquários de vidro (4 L volume de água; 28,5 x 12 x 20 cm; 2 peixes por aquário) (Fig. 3) e permaneceram em aclimatação por 10 min. Em seguida, cada aquário foi filmado por 15 min, descartando os primeiros 5 min (aclimatação com câmera), e avaliando os 10 min restantes continuamente, já que este teste não incluiu a injeção de pista química. Para os tratamentos com ausência de iluminação foi realizada filmagem do tipo night shot (Câmera IP – Megapixel cubo IR; TecVoz), e a luz foi mantida apagada desde a aclimatação dos peixes. O comportamento reprodutivo do casal foi observado a fim de detectar frequências de corte; cópula forçada (stealer); cópula; e tempo de perseguição da fêmea feita pelo macho (chasing). Além dessas variáveis pré-estabelecidas, observamos a ocorrência de outros comportamentos, os quais nós registramos por serendipidade: investimento da fêmea no macho; movimento do gonopódio; e ocupação diferencial do aquário (peixes localizados na porção mais superficial da coluna d'água).

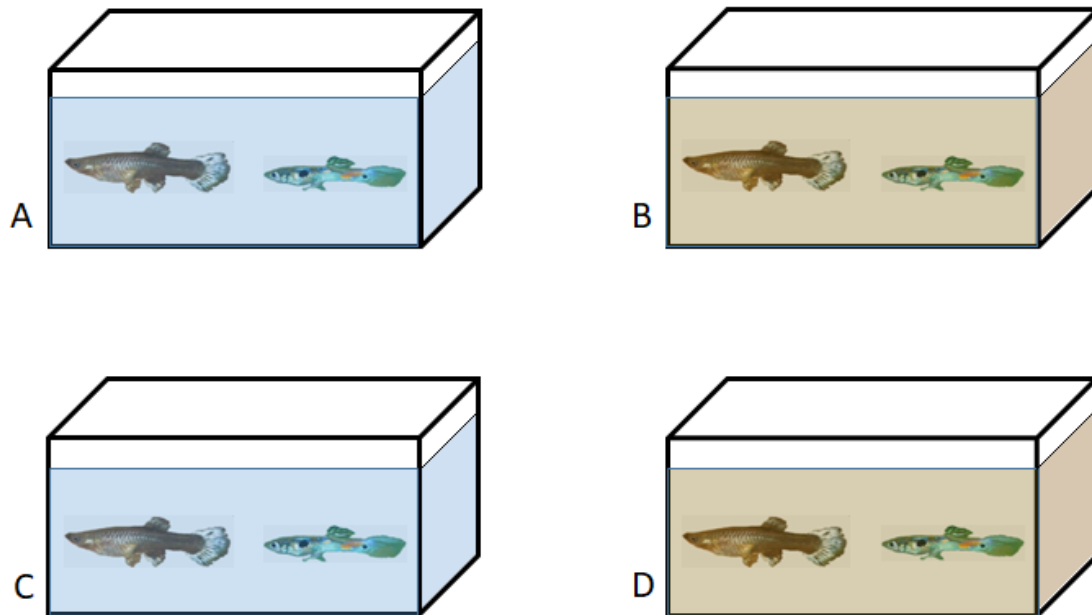


**Figura 3** - Experimento 2 – Efeito da turbidez e da presença de iluminação no comportamento reprodutivo de lebiste. A = água não turva com iluminação, B = água turva com iluminação, C = água não turva sem iluminação, D = água turva sem iluminação. Fotos dos animais de Gonçalves, BB.

**Experimento 3** - *Influência da turbidez nos comportamentos reprodutivo e de resposta à substância de alarme em lebistes*

Neste experimento, observamos se substâncias de alarme alteram o comportamento reprodutivo de lebistes. Por isso, o desenho amostral foi de 2 x 2, turvo e não turvo; com e sem substância de alarme do coespecífico (Fig. 4). Esse experimento, assim como os demais, possui 9 réplicas. O tamanho amostral deste experimento foi de 72 indivíduos, sendo 36 fêmeas e 36 machos. No momento da experimentação, os casais

foram alocados nos aquários e permaneceram em aclimatação por 10 min. Em seguida, cada aquário foi filmado por 15 min, descartando os primeiros 5 min (aclimatação com câmera), e injetando o estímulo químico aos 10 min (5 min antes de administrar o estímulo ao aquário e 5 min após o estímulo ser administrado). Assim, durante o experimento, observamos se houve comportamento antipredatório ('freezing', 'dashing', 'shoaling' e 'slowing') por parte do casal, e se isso interferiu no comportamento reprodutivo do mesmo. Para isso, foram também observadas as frequências de corte, cópula forçada (stealer), cópula, e tempo de perseguição da fêmea feita pelo macho (chasing). Além dessas variáveis pré-estabelecidas, observamos a ocorrência de outros comportamentos, os quais nós registramos por serendipidade: investimento da fêmea no macho; e movimento do gonopódio.



**Figura 4** - Experimento 3 - Influência da turbidez nos comportamentos reprodutivo e de resposta à substâncias de alarme (coespecífico) em lebistes. A = água não turva com substância de alarme de coespecífico, B = água turva com substância de alarme de coespecífico, C = água não turva sem substância de alarme (com água destilada), D = água turva sem substância de alarme (com água destilada). Fotos dos animais de Gonçalves, BB.

#### **g. Análise dos dados**

Após realizados os experimentos, os vídeos foram assistidos a fim de observar e registrar o comportamento de lebistes nas diferentes condições experimentais. Para isso, adotamos a seguinte classificação comportamental em unidades: considerando as variáveis de resposta defensiva, avaliamos freezing e slowing quanto ao tempo em segundos, e dashing e shoaling quanto à ocorrência; para as variáveis de resposta

reprodutiva, avaliamos chasing quanto ao tempo em segundos, investimento da fêmea, movimento do gonopódio e ocupação da superfície quanto à ocorrência, e corte quanto à frequência.

Em todos os experimentos constituídos de dois fatores independentes e uma variável resposta, utilizamos ANOVA de dois fatores, e quando necessário, complementamos a análise com o teste à posteriori de Newman-Keuls ou com o teste à posteriori de Fisher LSD, de forma que os testes escolhidos fossem mais adequados à distribuição dos dados. Nos casos em que os tratamentos possuíam a interferência do tempo, utilizamos ANOVA de medidas repetidas, utilizando o tempo como medida repetida, além das variáveis independentes. Em todos os testes foi considerada diferença estatística quando o valor de  $\alpha = 0,05$  (Zar, 2010). Além disso, como violamos muitas vezes a homoscedasticidade e a normalidade dos dados, fornecemos o *eta*-quadrado com o intuito de mostrar o tamanho do efeito e indicar indiretamente alguma potencial chance de erro do tipo I.

#### **h. Nota ética**

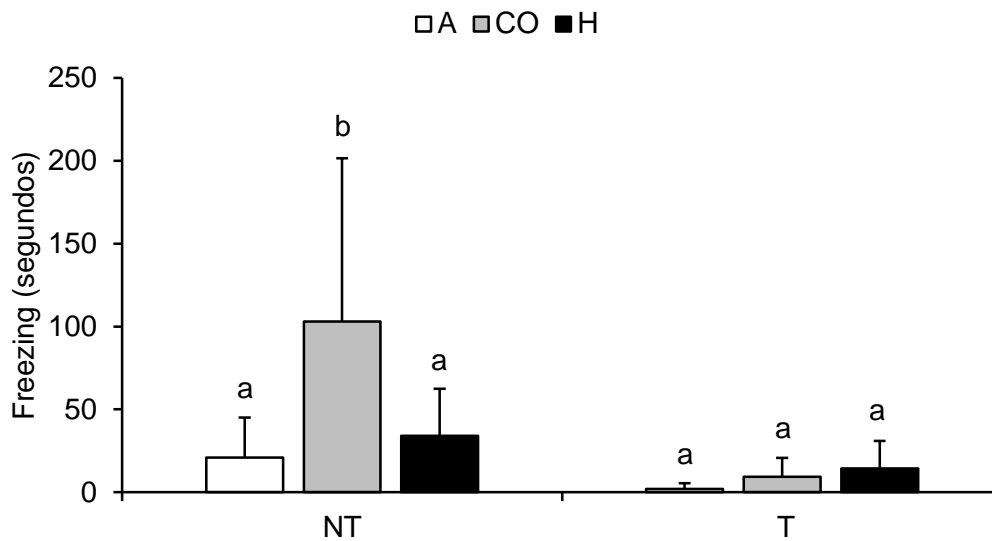
Essa tese foi realizada sob os princípios éticos em pesquisa animal, seguindo o protocolo para experimentos com uso de animais. A mesma tese foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus de Botucatu, protocolo número 689.

## RESULTADOS

Em todos os tratamentos que envolviam influência reprodutiva, nos experimentos 2 e 3, não observamos nenhuma ocorrência de stealer ou de cópula. Os demais resultados estão listados a seguir, separadamente, para cada um dos experimentos.

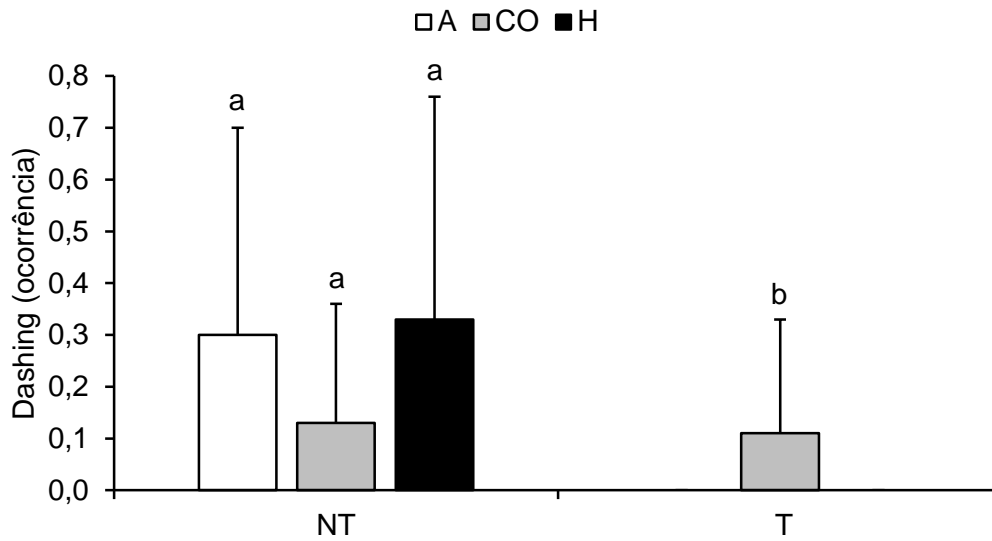
### *Experimento 1 - Influência da turbidez no comportamento de resposta à substância de alarme em lebistes*

O lebiste *Poecilia reticulata* apresenta resposta defensiva de freezing influenciada pela interação turbidez x pista química (2-Way ANOVA:  $df = 2$ ;  $F = 3,60$ ;  $P = 0,037$ ;  $\eta^2 = 0,081$ ), na qual os peixes que apresentaram maior resposta defensiva foram aqueles dos tratamentos com água não turva e com substância de alarme de coespecífico, diferindo dos demais tratamentos (Newman-Keuls:  $P < 0,05$ ) (Fig. 5).



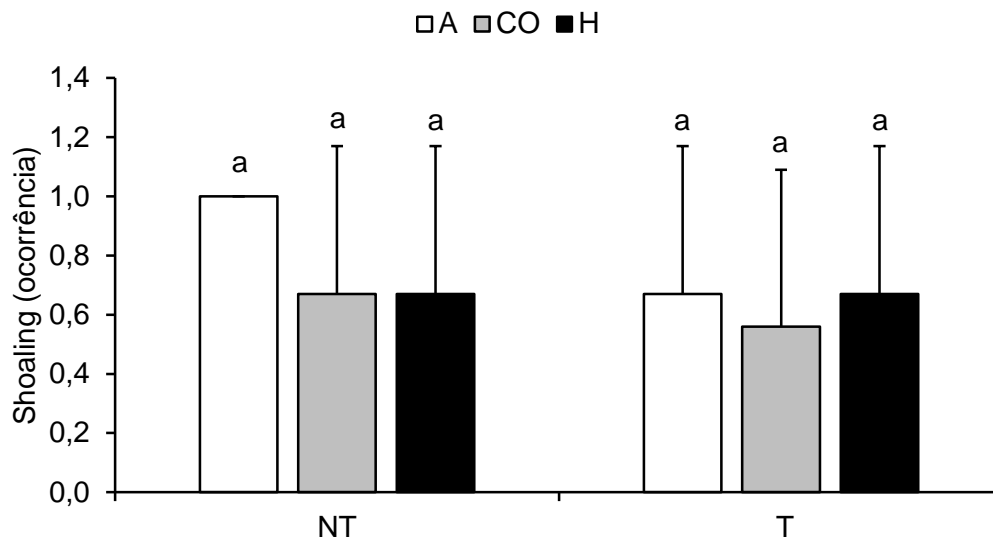
**Figura 5** - Resposta defensiva de freezing (segundos) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico, H = substância de alarme de heteroespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

O lebiste mostrou resposta defensiva de dashing influenciada pela condição de turbidez da água (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 7,48$ ;  $P = 0,009$ ;  $\eta^2 = 0,11$ ), em que os peixes mais responsivos foram aqueles dos tratamentos com água não turva (Newman-Keuls:  $P < 0,05$ ) (Fig. 6).

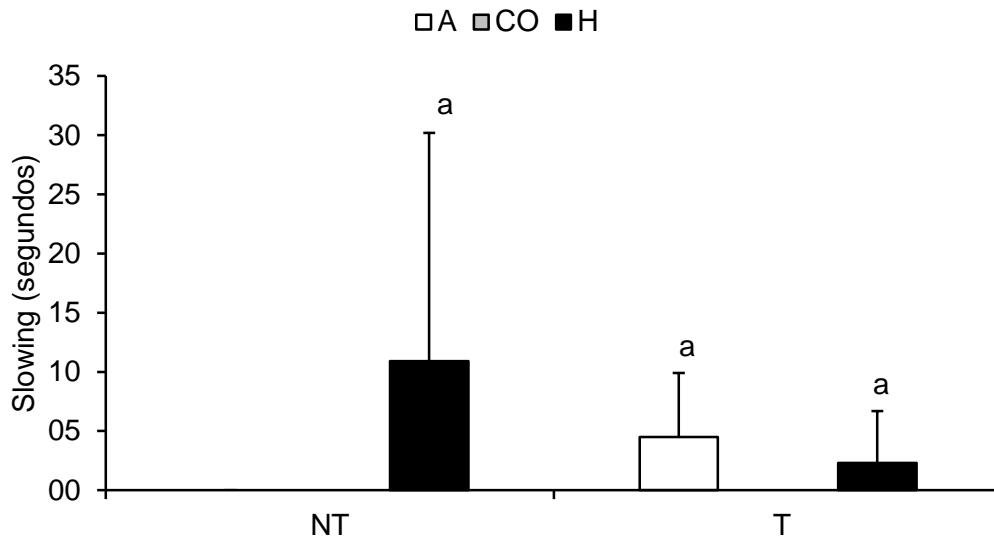


**Figura 6** - Resposta defensiva de dashing (ocorrência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico, H = substância de alarme de heteroespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

Os peixes não apresentaram resposta diferencial entre os tratamentos para as demais variáveis analisadas neste estudo, as respostas defensivas de shoaling (2-Way ANOVA:  $P > 0,05$ ) (Fig. 7) e slowing (2-Way ANOVA:  $P > 0,05$ ) (Fig. 8).



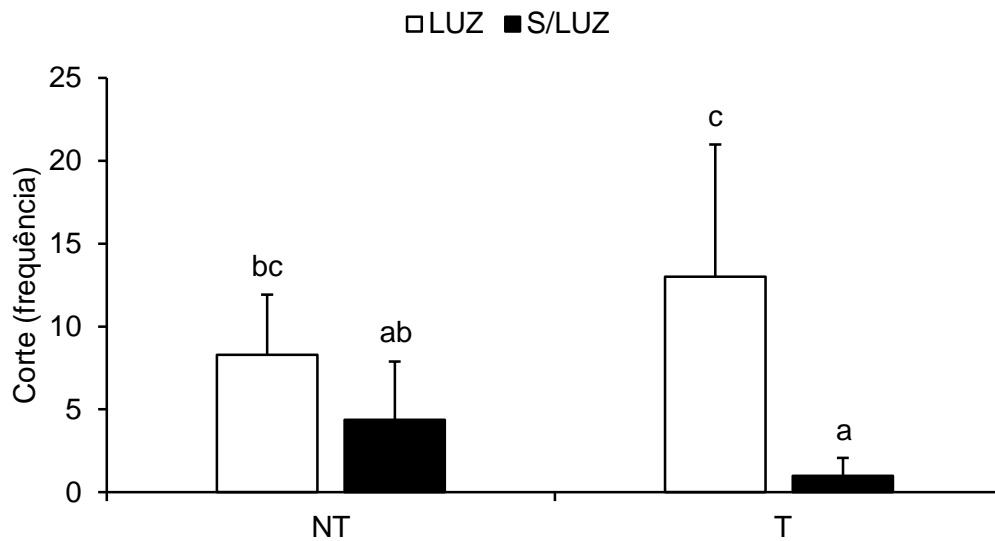
**Figura 7** - Resposta defensiva de shoaling (ocorrência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico, H = substância de alarme de heteroespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.



**Figura 8** - Resposta defensiva de slowing (segundos) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico, H = substância de alarme de heteroespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

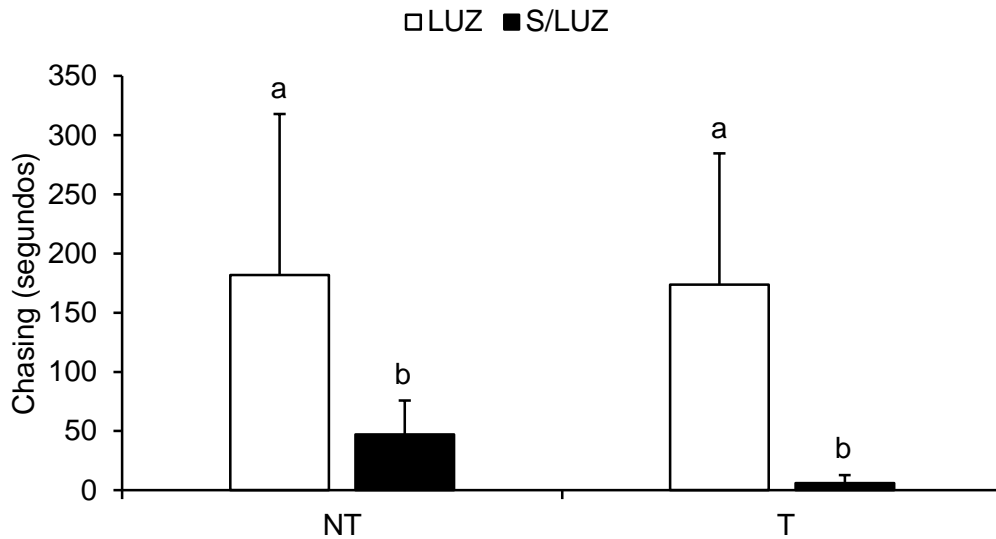
**Experimento 2** - Influência da turbidez e da presença de iluminação no comportamento reprodutivo de lebistes

O lebiste apresenta frequência de corte influenciada pela interação turbidez x iluminação (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,51$ ;  $P = 0,027$ ;  $\eta^2 = 0,05$ ), em que os tratamentos que diferiram entre si foram: água turva sem iluminação de água não turva com iluminação (Newman-Keuls:  $P = 0,016$ ), água turva sem iluminação de água turva com iluminação (Newman-Keuls:  $P = 0,0003$ ), e água turva com iluminação de água não turva sem iluminação (Newman-Keuls:  $P = 0,004$ ) (Fig. 9).



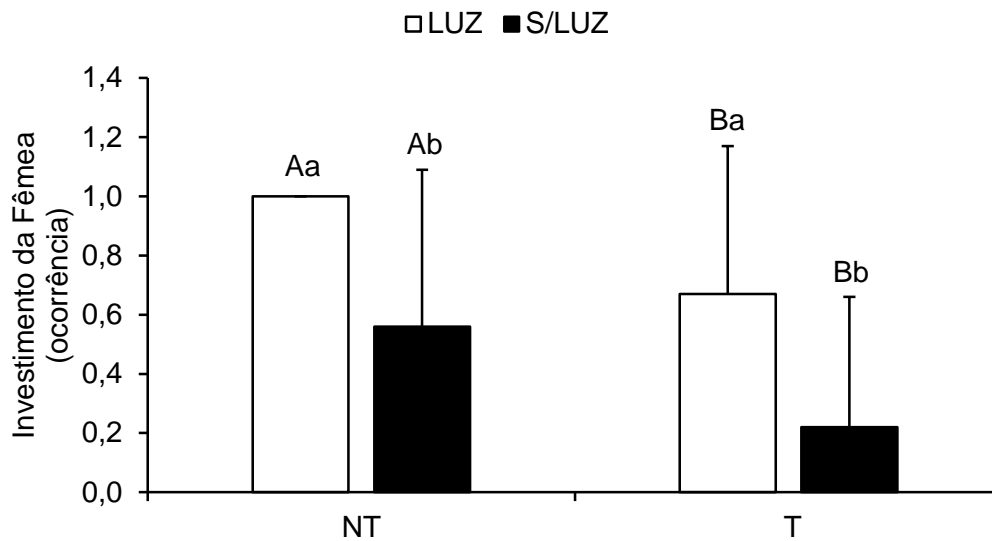
**Figura 9** - Resposta reprodutiva de corte (frequência) sob influência de turbidez e de iluminação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de iluminação: LUZ = com iluminação, S/LUZ = sem iluminação. Letras distintas significam diferença estatística.

Considerando o tempo de perseguição (chasing) que os machos despendem sobre as fêmeas, verificamos que chasing é influenciado pela condição de iluminação da água (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 21,12$ ;  $P = 0,00008$ ;  $\eta^2 = 0,24$ ), com machos realizando chasing por mais tempo em tratamentos com água iluminada (Newman-Keuls:  $P = 0,0002$ ) (Fig. 10).



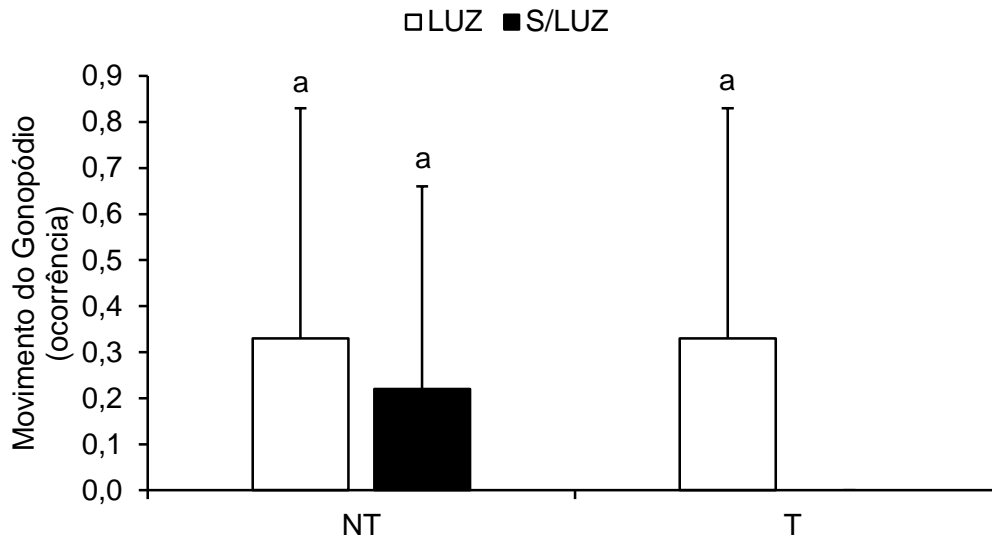
**Figura 10** - Resposta reprodutiva de chasing (segundos) sob influência de turbidez e de iluminação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de iluminação: LUZ = com iluminação, S/LUZ = sem iluminação. Letras distintas significam diferença estatística.

Observamos que as fêmeas também investem nos machos, procurando-os e se exibindo para eles. Para esta variável, investimento da fêmea, verificamos que há influência da turbidez (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,20$ ;  $P = 0,029$ ;  $\eta^2 = 0,05$ ), com fêmeas investindo mais em machos na condição de água não turva (Newman-Keuls:  $P = 0,036$ ). Há também a influência da iluminação sobre o investimento da fêmea (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 9,25$ ;  $P = 0,005$ ;  $\eta^2 = 0,08$ ), com fêmeas investindo mais em machos na condição com iluminação (Newman-Keuls:  $P = 0,006$ ) (Fig. 11).



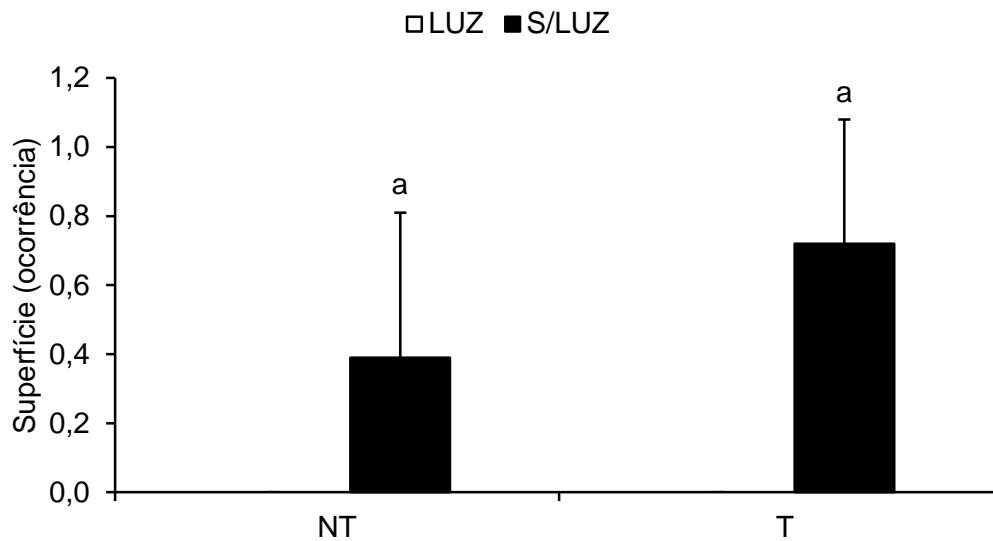
**Figura 11** - Resposta reprodutiva de investimento da fêmea (ocorrência) sob influência de turbidez e de iluminação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de iluminação: LUZ = com iluminação, S/LUZ = sem iluminação. Letras distintas significam diferença estatística.

O movimento do gonopódio dos machos não diferiu entre os tratamentos (2-Way ANOVA:  $P > 0,05$ ) (Fig. 12).



**Figura 12** - Resposta reprodutiva de movimento do gonopódio (ocorrência) sob influência de turbidez e de iluminação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de iluminação: LUZ = com iluminação, S/LUZ = sem iluminação. Letras distintas significam diferença estatística.

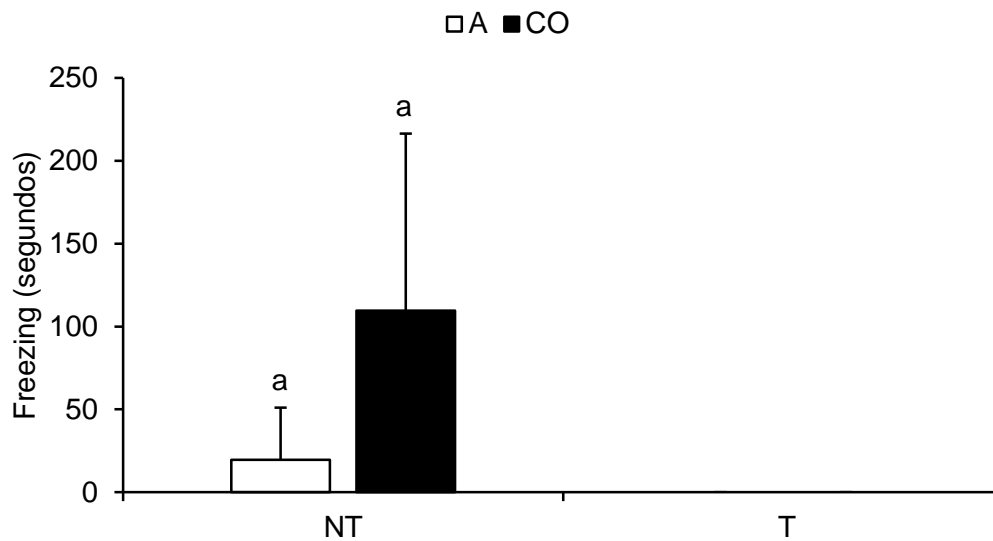
Por fim, observamos que houve diferença na ocupação do aquário de acordo com a condição de iluminação (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 36,36$ ;  $P = 0,0000009$ ;  $\eta^2 = 0,33$ ), com lebetes ficando na superfície dos aquários em condições sem iluminação (Newman-Keuls:  $P = 0,0001$ ) (Fig. 13).



**Figura 13** - Resposta de ocupação do aquário na superfície (ocorrência) sob influência de turbidez e de iluminação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de iluminação: LUZ = com iluminação, S/LUZ = sem iluminação. Letras distintas significam diferença estatística.

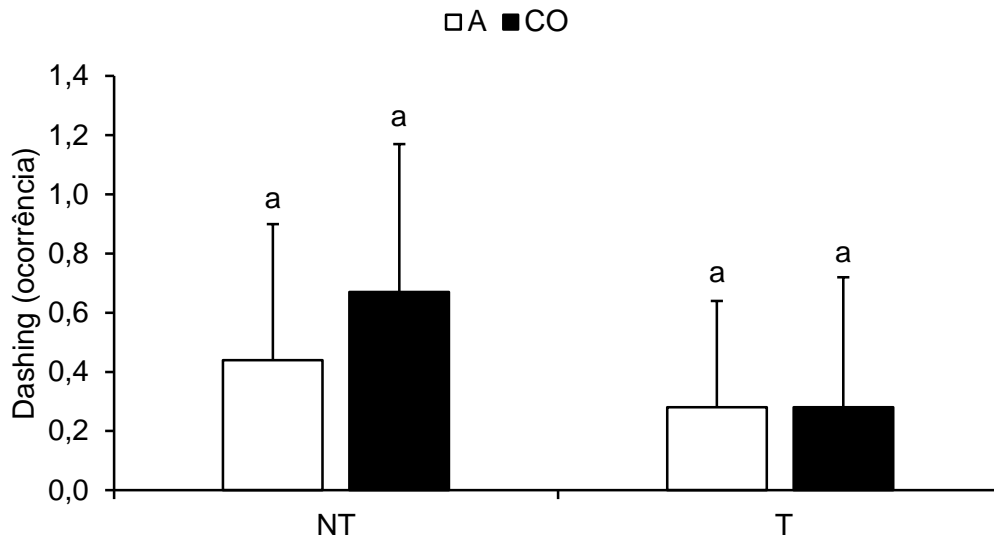
**Experimento 3** - *Influência da turbidez nos comportamentos reprodutivo e de resposta à substância de alarme em lebistes*

A resposta defensiva de freezing é influenciada pela turbidez (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 7,12$ ;  $P = 0,013$ ;  $\eta^2 = 0,15$ ), com peixes apresentando maior resposta defensiva em água não turva (Newman-Keuls:  $P = 0,013$ ) (Fig. 14).



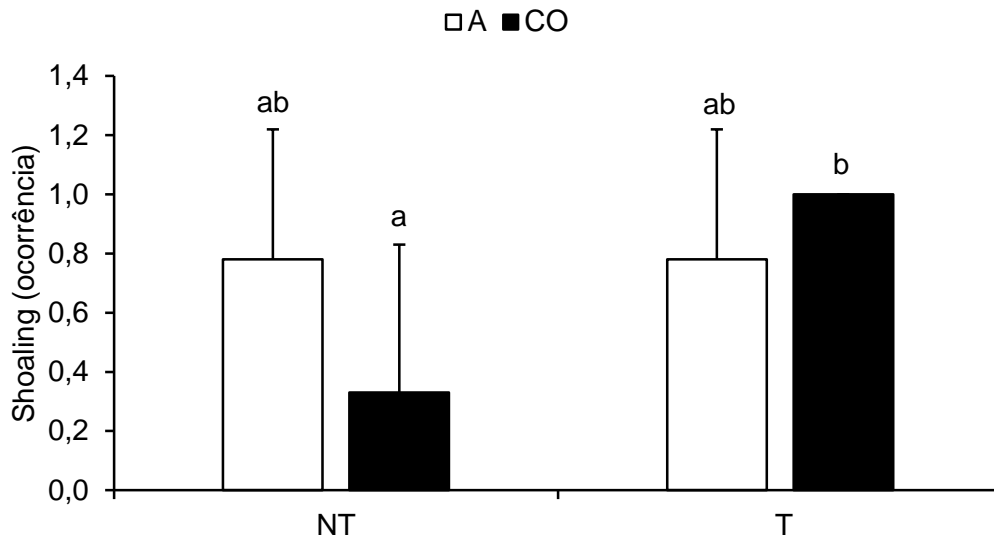
**Figura 14** - Resposta defensiva de freezing (segundos) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

A resposta defensiva de dashing não diferiu entre os tratamentos (2-Way ANOVA:  $P > 0,05$ ) (Fig. 15).



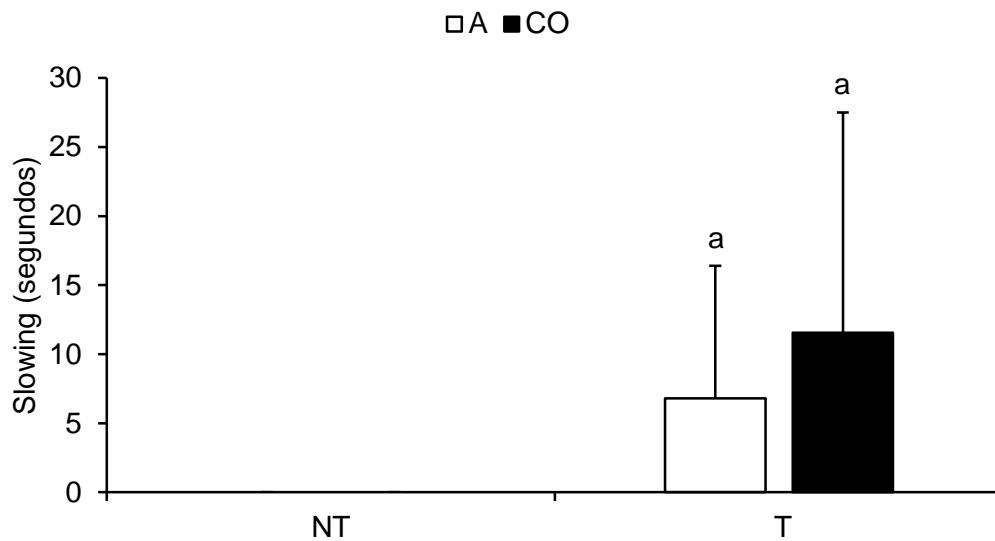
**Figura 15** - Resposta defensiva de dashing (ocorrência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

Para a resposta de agrupamento (shoaling), houve influência da interação turbidez x pista química (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,88$ ;  $P = 0,021$ ;  $\eta^2 = 0,04$ ), na qual peixes de água turva com substância de alarme de coespecífico diferiram dos peixes de água não turva com substância de alarme de coespecífico (Newman-Keuls:  $P = 0,009$ ), e peixes de água turva com água destilada diferiram de peixes de água não turva com substância de alarme de coespecífico (Newman-Keuls:  $P = 0,029$ ) (Fig. 16).



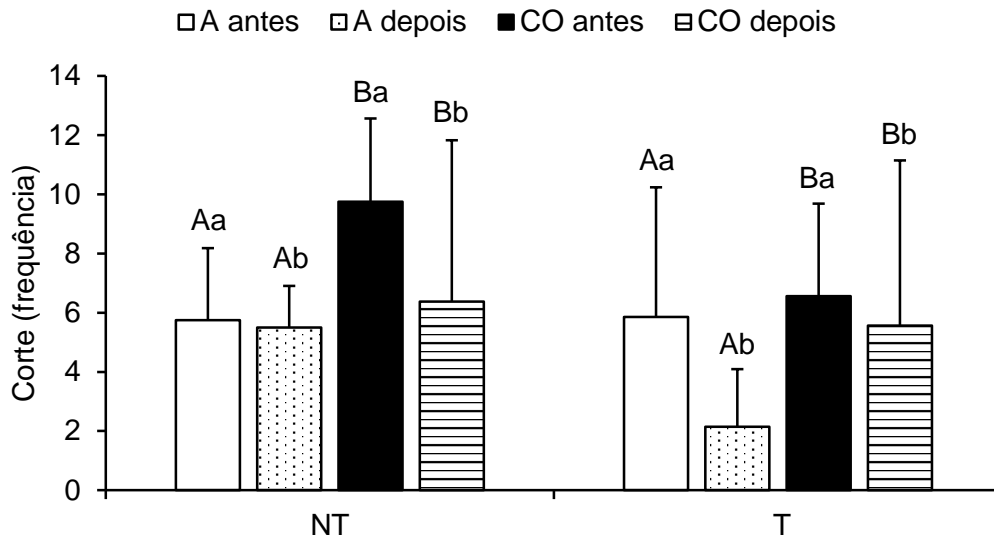
**Figura 16** - Resposta defensiva de shoaling (ocorrência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

A resposta defensiva de slowing é influenciada pela turbidez (2-Way ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,84$ ;  $P = 0,024$ ;  $\eta^2 = 0,16$ ), com peixes reduzindo mais sua atividade em condição de água turva (Newman-Keuls:  $P = 0,019$ ) (Fig. 17).



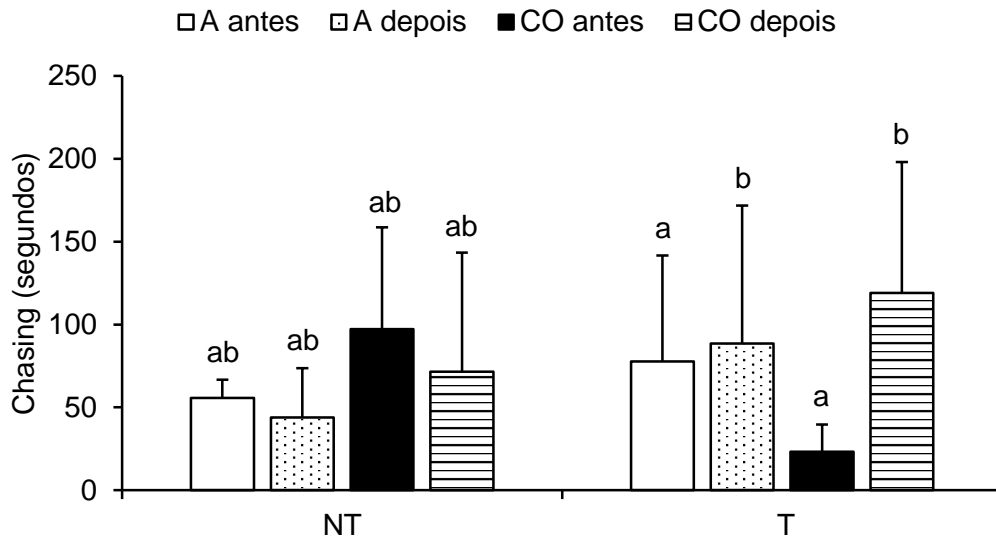
**Figura 17** - Resposta defensiva de slowing (segundos) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

Ao considerar as respostas reprodutivas, temos que: corte difere no tempo (Repeated Measures ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,73$ ;  $P = 0,024$ ;  $\eta^2 = 0,16$ ), com machos cortejando fêmeas em maior frequência antes da injeção da pista química na água (Newman-Keuls:  $P = 0,029$ ); e difere na pista química (Repeated Measures ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,01$ ;  $P = 0,033$ ;  $\eta^2 = 0,03$ ), com maior frequência de cortes em tratamentos com substância de alarme de coespecífico (Newman-Keuls:  $P = 0,042$ ) (Fig. 18).



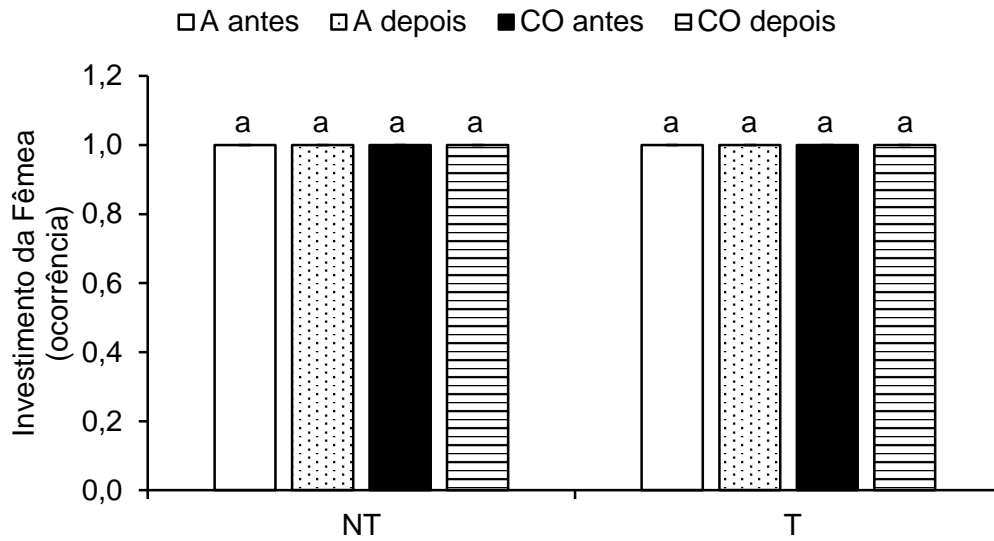
**Figura 18** - Resposta reprodutiva de corte (frequência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle) – antes e depois da injeção de pista química na água, CO = substância de alarme de coespecífico – antes e depois da injeção de pista química na água. Letras distintas significam diferença estatística.

Ao avaliarmos o tempo de perseguição (chasing), verificamos que as respostas de chasing são influenciadas pela interação tempo x turbidez (Repeated Measures ANOVA:  $df = 1$ ;  $F = 5,85$ ;  $P = 0,023$ ;  $\eta^2 = 0,15$ ), com peixes de água turva pós injeção de pista química na água realizando mais chasing que peixes de água turva antes da injeção de pista química na água (LSD test:  $P = 0,026$ ) (Fig. 19).



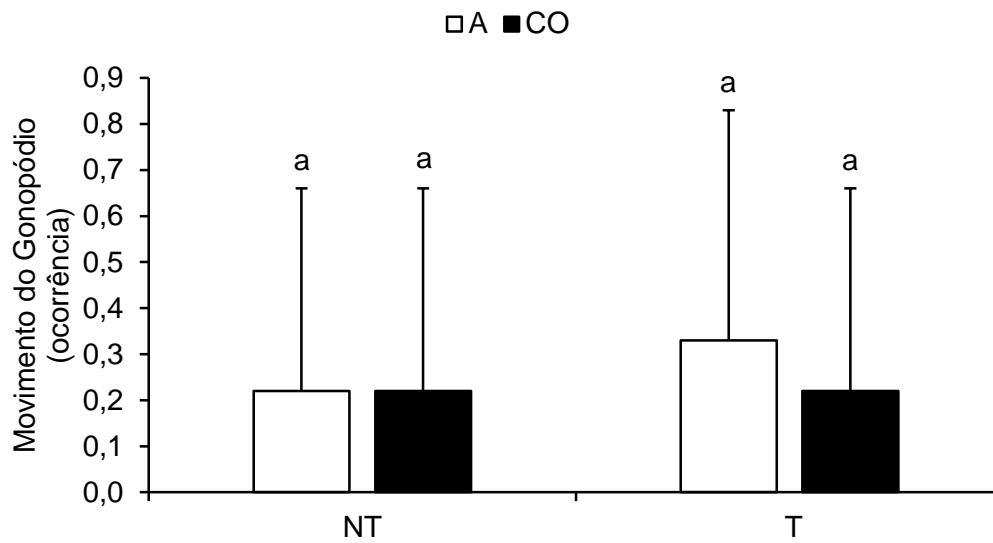
**Figura 19** - Resposta reprodutiva de chasing (segundos) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (eluyente controle) – antes e depois da injeção de pista química na água, CO = substância de alarme de coespecífico – antes e depois da injeção de pista química na água. Letras distintas significam diferença estatística.

Respostas de investimento da fêmea nos machos não diferiram entre os tratamentos, não apresentando variância entre os dados (Fig. 20).



**Figura 20** - Resposta reprodutiva de investimento da fêmea (ocorrência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (eluyente controle) – antes e depois da injeção de pista química na água, CO = substância de alarme de coespecífico – antes e depois da injeção de pista química na água. Letras distintas significam diferença estatística.

As respostas de movimento do gonopódio também não diferiram entre os tratamentos (2-Way ANOVA:  $P > 0,05$ ) (Fig. 21).



**Figura 21** - Resposta reprodutiva de movimento do gonopódio (ocorrência) sob influência de turbidez e de pistas químicas que indicam risco de predação. Condições de turbidez: NT = água não turva, T = água turva. Condições de pistas químicas: A = água destilada (elute controle), CO = substância de alarme de coespecífico. Letras distintas significam diferença estatística.

## DISCUSSÃO

Em situações que envolvem a combinação entre risco de predação e reprodução, os lebistes lidam com uma questão complexa: sobreviver ou reproduzir. Aparentemente, lebistes em risco de predação alocam energia tanto para defesa quanto para reprodução em um dilema entre sobrevivência e transferência de genes.

Considerando as respostas defensivas, no primeiro experimento, observamos que o lebiste foi mais reativo em condições de água não turva e com substância de alarme de coespecífico. Isso é explicado ao levarmos em conta que em água não turva o peixe está mais visível e, portanto, mais vulnerável ao risco de predação (Hartman & Abrahams 2000; Ranaker et al. 2012; 2014; Ehlman et al. 2015; Kimbell & Morrell 2015), e que a combinação de estímulos visuais e químicos associados a um potencial predador aumentam a qualidade de informações adquiridas pela presa, tornando-a apta a desempenhar respostas defensivas mais efetivas (Magurran 1990; Godin & Davis 1995). Em água turva, o peixe pode se “sentir mais protegido”, ou seja, a água turva pode funcionar como “abrigo” para os lebistes (Lehtiniemi et al. 2005). A habilidade de acessar informações de substâncias de alarme dá à presa vantagens na detecção de predadores em água turva (Hartman & Abrahams 2000). Dessa forma, considerando uma situação em ambiente natural, responder defensivamente, realizando movimentos desgovernados de natação (dashing) e reduzindo sua atividade próximo ao fundo (freezing), pode representar a sobrevivência do peixe em condições de risco.

Além disso, é descrito na literatura que peixes detentores de células club e, portanto, de substâncias de alarme são mais reativos à estímulos químicos de

coespecíficos (Brown & Godin 1999; Jordão & Volpato 2000; Mirza et al. 2001). É provável que os peixes codifiquem esses estímulos como ameaças mais iminentes à predação do que estímulos de heteroespecíficos. Porém, é importante salientar que peixes pertencentes a uma mesma guilda trófica devem responder a estímulos de alarme de heteroespecíficos por terem aprendido a associar esses estímulos com risco de predação (Mathis & Smith 1993; Chivers et al. 1995b). Por isso, é fundamental ter muito critério ao selecionar os heteroespecíficos para os testes experimentais, de forma que eles se adequem melhor aos objetivos propostos. Nesta tese, utilizamos um heteroespecífico de Ordem diferente, não simpátrico e não pertencente à mesma guilda trófica que o lebiste.

O lebiste não apresentou diferença no comportamento de shoaling (agrupamento) entre os tratamentos. Talvez esse comportamento seja mais expressivo na presença visual de um predador, sendo este um estímulo ainda mais evidente de risco (Jordão & Volpato 2000; Kelley & Magurran 2003). Poderia se pensar que a ausência de diferença nesta variável (shoaling) tenha sido efeito do número de indivíduos utilizado nos testes. Mas esse não foi o caso, uma vez que o comportamento de shoaling ocorre desde o agrupamento de 2 até 47 indivíduos (Croft et al. 2003), e que respostas fisiológicas de *P. reticulata* ao risco de predação não são substancialmente alteradas pelo tamanho do grupo (Dalton & Flecker 2014). Outros pesquisadores, investigando o efeito da turbidez da água, verificaram que os peixes tendem a possuir maior resposta de shoaling em tratamentos com água não turva, e isso é justificado pela dificuldade que os coespecíficos têm de se encontrar em água turva e manter a coesão do agrupamento ou porque em água turva os indivíduos possuem uma menor percepção do risco (Kimbell & Morrell 2015).

Assim, em condições de água turva, estratégias defensivas individuais podem ser mais efetivas do que estratégias defensivas em grupo (efeito de diluição) (Kimbell & Morrell 2015), embora existam pesquisadores que consideram os agrupamentos benéficos para evitar a predação, mesmo em condições de turbidez (Johannesen et al. 2014). A redução na coesão do agrupamento pode resultar na perda de uma série de vantagens associadas à sobrevivência, são elas: vigilância, sucesso de forrageamento, transferência de informação e conservação de energia (Kimbell & Morrell 2015). Os indivíduos sob risco de predação devem então fazer um balanço de custos e benefícios da proteção que um grupo garante contra os benefícios de permanecer refugiado como um indivíduo (Kimbell & Morrell 2015). Nesse contexto, vale mencionar que a familiaridade pode aumentar as respostas antipredatórias (Chivers et al. 1995a). É provável que as respostas de shoaling seriam mais frequentes se os indivíduos utilizados nos testes experimentais apresentassem familiaridade.

A resposta defensiva de slowing também não variou entre os tratamentos. Em risco de predação, a redução de atividade da presa pode significar sua sobrevivência. No entanto, é mais fácil a presa não ser detectada pelo predador quando reduz sua atividade no fundo (freezing), do que quando a redução de atividade ocorre na coluna d'água (slowing).

Até aqui, pudemos comprovar que o lebiste responde de maneira distinta quando submetido à diferentes condições ambientais (água turva e não turva) e risco de predação (substância de alarme de coespecífico, heteroespecífico e água). Passemos então a considerar o efeito da turbidez e da iluminação no comportamento reprodutivo da espécie.

No segundo experimento, verificamos que o lebiste apresenta maior atividade reprodutiva em ambientes iluminados com água não turva. Essas respostas podem estar associadas à alguns fatores da biologia comportamental da espécie.

Primeiro podemos considerar que a maior atividade reprodutiva de lebiste registrada na literatura ocorre nos períodos do amanhecer e entardecer (Endler 1987; Reynolds et al. 1993; Reeve et al. 2014), no entanto a atividade reprodutiva é verificada ao longo de todo o dia (Endler 1987; Reeve et al. 2014), o que nos mostra que a resposta encontrada nesse estudo está de acordo com a literatura no que diz respeito à atividade reprodutiva ser realizada durante o dia, evidenciando uma disparidade entre a atividade reprodutiva em períodos com e sem iluminação. Porém, devemos considerar que nosso estudo não utilizou variação de iluminação, o que poderia gerar resultados distintos dos observados. Sabe-se que os lebistes realizam maior atividade reprodutiva em momentos do dia que a intensidade luminosa não é tão acentuada, principalmente devido aos padrões conspícuos dos machos e de seus displays de corte. Em condições com luminosidade menos intensa, os machos de *P. reticulata* podem se exibir para as fêmeas com menor risco de se tornarem expostos à predadores (Reynolds et al. 1993; Long & Rosenqvist 1998). Nessas condições, o risco de predação pode ser reduzido na medida em que os machos passam a cortejar as fêmeas com menos frequência e mais próximos a elas (Long & Rosenqvist 1998). A fim de compreender de que forma uma variação no ambiente visual pode prever o comportamento de corte e influenciar a evolução de sinais entre os lebistes, faz-se necessário o aumento de estudos sobre fatores que afetam as respostas de machos e fêmeas em condições ambientais alteradas.

O segundo ponto a ser considerado nessa resposta reprodutiva em diferentes condições de iluminação e de turbidez é o de que *P. reticulata* apresenta atividade reprodutiva fortemente influenciada por estímulos visuais (Endler 1991; Hibler & Houde 2006; Kimbell & Morrell 2015). Isso é demonstrado ao observarmos a maior frequência de atividade reprodutiva em água não turva, já que machos e fêmeas precisam ver e ser vistos pelo parceiro pretendido. Isso fica claro ao observarmos os padrões de corte desempenhados pelos machos para atrair a fêmea, e as características morfológicas e de coloração dos machos que são selecionadas pelas fêmeas. Estudos evidenciaram que fêmeas selecionam machos pela quantidade de corte (Farr 1980; Houde 1987; Gong & Gibson 1996; Pilastro et al. 2007), coloração corpórea (Houde 1988; Gong & Gibson 1996; Pilastro et al. 2007), tamanho do gonopódio (Brooks & Caithness 1995), tamanho da cauda (Bischoff et al. 1985) e tamanho do corpo (Reynolds et al. 1993). Aqui é válido mencionar que a seletividade das fêmeas pelos machos mais conspícuos pode variar mediante às características do ambiente. Em ambientes com maior pressão predatória, fêmeas tendem a selecionar os machos menos conspícuos (Lima & Dill 1990; Gong & Gibson 1996). Elas adotam essa estratégia para garantir sua própria sobrevivência, uma vez que quando um predador detecta um casal de lebistes, ele tende a preferir preda a fêmea em uma relação de custo-benefício. Isso ocorre pois as fêmeas de lebiste, em geral, apresentam maior tamanho corpóreo que os machos e, portanto, são consideradas presas com maior valor lucrativo por predadores (Gong & Gibson 1996; Mirza et al. 2001). Assim, torna-se importante explorar como as dinâmicas evolutivas da seleção sexual são alteradas em sistemas expostos à diferentes níveis de predação, e como isso modifica a preferência das fêmeas por parceiros (Gong & Gibson 1996).

Ainda no segundo experimento, observamos uma resposta interessante dos peixes: verificamos que os lebistes apresentaram maior atividade na superfície dos aquários em condições com ausência de iluminação. Não encontramos registro desse comportamento na literatura. Assim, considerando a biologia da espécie, acreditamos que essa resposta comportamental possa ser reflexo de algumas questões associadas à predação. Os lebistes podem associar o período de luz apagada com períodos noturnos de seu ambiente natural, e então, manter-se mais à superfície na tentativa de escapar de predadores de fundo (Seghers 1974) em condições em que o sentido da visão de lebistes pode não ser tão privilegiado. Além disso, estar na superfície durante o dia pode representar perigo por predação aérea (Seghers 1974; Kimbell & Morrell 2015), e no período sem iluminação (noturno) essa pressão de predação seja menos intensa. Há a sugestão de que a migração de peixes, na coluna d'água, no período noturno seja devido a mudanças na temperatura e pressão hidrostática da água (Mehner 2012), mas até o presente momento, não há registro de como isso ocorre em *P. reticulata*. Aqui, faz-se necessária uma investigação mais detalhada dos padrões de migração dos lebistes na coluna d'água.

Compreendendo as respostas antipredatórias e reprodutivas da espécie, vejamos então como os lebistes se comportam quando têm que realizar, ao mesmo tempo, decisões defensivas e reprodutivas. Assim, chegamos ao terceiro experimento e, portanto, à discussão final desta tese.

Assim como no primeiro experimento, a resposta defensiva de freezing foi maior nos tratamentos com água não turva, reforçando a ideia de que a água turva pode funcionar como refúgio para os peixes, uma vez que as chances de os mesmos serem detectados por predadores visuais são menores (Lehtiniemi et al. 2005). Além disso, a

redução da atividade, por si só, confere aos peixes maiores chances de sobrevivência, uma vez que peixes que adotam esse tipo de comportamento tornam-se menos detectáveis por predadores (Burrows 1994; Burrows & Gibson 1995; Barreto et al. 2010; Barbosa-Junior et al. 2010, 2012; Cooper et al. 2012; Ranaker et al. 2012).

A resposta defensiva de *dashing*, ao contrário do encontrado no primeiro experimento, não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. O fato de a resposta de *dashing* não ser conservativa nessas condições, pode demonstrar que o *freezing* representa melhor o comportamento antipredatório da espécie. É descrito na literatura que as respostas defensivas podem ocorrer em conjunto, com *dashing* seguido de *freezing* ou *slowing*, ou então podem ocorrer isoladamente sem a necessidade do conjunto, com respostas de *freezing* ou *slowing* independentes de *dashing* (Lawrence & Smith 1989; Kimbell & Morrell 2015).

Ao considerarmos a variável de agrupamento *shoaling*, não detectamos aqui um padrão característico para os peixes. Observamos que os peixes de água turva realizaram mais *shoaling*, o que vai contra o encontrado na literatura (Kimbell & Morrell 2015). A ausência de um padrão para a execução de *shoaling* nos levantou a questão de que peixes submetidos à estímulos de reprodução e predação lidam com mudanças comportamentais na tentativa de maximizar sua sobrevivência. Respostas atípicas podem ocorrer em decorrência deste trade-off. A manutenção do agrupamento, mesmo em condições visuais desfavoráveis pode nos indicar que *P. reticulata* deve ser capaz de usar estímulos alternativos para compensar a falta de informações visuais. Estímulos olfatórios podem ser um mecanismo utilizado por lebistes para encontrar coespecíficos em água turva (Griffiths & Magurran 1999; Shohet & Watt 2004).

Como última variável defensiva avaliada neste experimento, temos o *slowing*. Observamos que os lebistes foram mais reativos quanto a essa resposta em água turva. Essa resposta é coerente ao considerarmos que a água turva pode funcionar como “abrigo” para os peixes. Nessas condições, reduzir a atividade na coluna d’água (*slowing*) não deixa o peixe tão exposto quanto em condição de água não turva.

Enfim, considerando as respostas reprodutivas avaliadas neste experimento, observamos que a corte é influenciada pela pista química e pelo tempo (antes e depois), mas não pela interação entre essas variáveis. Registramos maior frequência de corte nos tratamentos com substância de alarme de coespecífico, e nos momentos antes da injeção da pista química. Como a maior frequência de corte foi registrada antes da administração da pista química, a influência da pista química não pode ser validada. Assim, podemos dizer que para a corte, o momento de administração da pista química é fundamental, evidenciando maior frequência de corte antes da exposição ao risco de predação. Essa resposta está de acordo com os resultados de outros pesquisadores, que discutem que em risco de predação, os animais tendem a reduzir sua atividade reprodutiva a fim de não serem detectados por predadores (Hartman & Abrahams 2000; Ranaker et al. 2012; 2014; Ehlman et al. 2015; Kimbell & Morrell 2015).

Para a resposta reprodutiva de *chasing* verificamos que machos de tratamentos de água turva perseguiram as fêmeas por mais tempo no período pós injeção de pista química. Essa resposta levanta uma discussão importante. Em água turva, conforme já foi mencionado, a visibilidade é menor. Considerando isto, as chances de encontrar um parceiro reprodutivo são reduzidas. Assim, esse resultado pode representar um aproveitamento da oportunidade de obtenção de uma parceira pelo macho. Além disso,

considerando a exposição química ao risco de predação, podemos sugerir que em risco de predação, com condições visuais desfavoráveis, os machos possam alocar energia para a reprodução, a fim de garantir a perpetuação da espécie.

Em todos os tratamentos as fêmeas investiram nos machos, se exibindo ou nadando próximas a eles, mesmo quando os machos não as cortejaram, evidenciando um interesse sexual por parte das fêmeas. Essa resposta de investimento das fêmeas nos machos, ainda não foi descrita na literatura. Os registros que consideram o comportamento das fêmeas em um sentido parecido, porém não igual, abordam a receptividade das fêmeas (Houde & Endler 1990; Reynolds & Gross 1992; Matthews & Magurran 2000; Shohet & Watt 2004; Pilastro et al. 2007), e essa resposta é mediante ao comportamento prévio do macho. Aqui, mostramos o primeiro registro de que as fêmeas de *P. reticulata* investem nos machos sem necessidade de um comportamento prévio por parte destes. Como a maioria dos trabalhos sobre reprodução em lebistes aborda o comportamento dos machos para a sucessão de uma cópula (Endler 1987; Kelley et al. 1999; Evans et al. 2003; Reeve et al. 2004; Pilastro et al. 2007; Valero et al. 2009), o comportamento da fêmea é menos estudado. Dessa forma, consideramos de grande importância uma avaliação mais criteriosa desse comportamento das fêmeas, a fim de compreendermos melhor a biologia reprodutiva da espécie.

A movimentação do gonopódio registrada nesta tese também foi registrada pela primeira vez, uma vez que os trabalhos que abordam movimentação do gonopódio fazem isso demonstrando as tentativas de cópula forçada (stealer) (Endler 1987; Evans et al. 2003) ou as cópulas propriamente ditas (Endler 1987). Aqui, essa movimentação ocorreu sem que nenhuma dessas respostas estivesse envolvida. Por isso, reforçamos a sugestão

de que esta é uma variável que deve ser estudada com atenção, podendo nos revelar importantes questões ainda não conhecidas sobre a biologia de lebistes.

Ao observamos a interação das respostas, defensivas e reprodutivas, encontradas no terceiro experimento, a única resposta consistente com os experimentos prévios (experimentos 1 e 2) foi a resposta defensiva de freezing. O freezing foi mais reativo nos tratamentos com água não turva. Dentre os parâmetros que atraem a atenção de um predador, a distância de movimentação da presa pode ser o mais importante (Dill & Fraser 1984), talvez por isso o comportamento de cessar a movimentação, freezing, seja o mais adequado ao se estudar exposição ao risco de predação.

É possível que em condições de turbidez da água e em risco de predação, os peixes tenham de lidar com uma questão complexa: direcionar energia para sobrevivência, evitando a predação por respostas defensivas; ou alocar energia para a reprodução, de forma a transmitir seus genes a uma prole subsequente? A resposta parece clara quando observamos que o único comportamento consistente entre todos os experimentos, foi o freezing. Isso nos sugere que o lebiste, embora seja uma espécie muito estudada quanto a sua reprodução, prioriza a sobrevivência em condições de risco de predação. Ao considerarmos respostas defensivas e reprodutivas em conjunto, uma pode interferir na resposta da outra e vice-versa, evidenciando um trade-off entre os gastos energéticos alocados para sobrevivência e reprodução. Assim, podemos dizer que mudanças nas condições visuais de sistemas de água doce podem alterar as interações entre presas e predadores, por meio de efeitos nos sistemas de comunicação químicos entre eles.

## CONCLUSÕES

### *Experimento 1 - Influência da turbidez no comportamento de resposta à substância de alarme em lebistes*

A turbidez e o tipo de estímulo químico influenciam a resposta defensiva de lebistes:

- 1) Lebistes são mais reativos ao risco de predação em condições de água não turva;
- 2) Lebistes são mais reativos ao risco de predação em condições de estímulo químico de coespecífico;
- 3) A água turva pode ser configurada como “abrigo” para lebistes submetidos a risco de predação;
- 4) Em água turva os coespecíficos podem ter dificuldades de se encontrar para formar cardumes e mantê-los coesos, assim as estratégias defensivas individuais podem ser mais efetivas do que estratégias defensivas em grupo (efeito de diluição).

### *Experimento 2 - Influência da turbidez e da presença de iluminação no comportamento reprodutivo de lebistes*

A atividade reprodutiva de lebiste é influenciada tanto por condições de turbidez quanto de iluminação:

- 1) A frequência de cortes é maior em água não turva e iluminada;
- 2) O tempo de perseguição (chasing) realizado pelo macho é maior em água iluminada;
- 3) A fêmea investe no macho com maior frequência em água não turva e iluminada;

- 4) O lebiste fica na superfície da água em condições com ausência de iluminação.

***Experimento 3 - Influência da turbidez nos comportamentos reprodutivo e de resposta à substância de alarme em lebistes***

Em situações que envolvem a combinação entre risco de predação e reprodução, os lebistes lidam com uma questão complexa: sobreviver ou reproduzir.

O lebiste apresenta atividade reprodutiva mesmo em situações de risco de predação.

Existe um trade-off entre a energia alocada para sobrevivência e reprodução.

- 1) O lebiste é mais reativo (freezing) ao risco de predação em água não turva;
- 2) A resposta defensiva de dashing não difere entre os tratamentos;
- 3) Respostas de shoaling são mediadas pela interação entre turbidez e pista química:
  - a. Lebistes apresentam mais shoaling em água turva pós injeção de estímulo químico na água;
- 4) Respostas defensivas de slowing ocorreram apenas em água turva;
- 5) O lebiste realiza mais corte nas condições que antecedem à injeção do estímulo químico na água;
- 6) O tempo de perseguição (chasing) realizado pelos machos foi maior em água turva, pós estímulo químico de coespecífico.

## REFERÊNCIAS

Allyn ML, Sheehan RJ, Kohler CC. 2001. The effects of capture and transportation stress on White bass semen osmolality and their alleviation via sodium chloride. *Transactions of the American Fisheries Society*, Bethesda, 130(4): 706-711.

Barbosa-Junior A, Magalhães EJ, Hoffmann A, Ide LM. 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Ethologica*, 13: 119-126.

Barbosa-Junior A, Alves FL, Pereira ADF, Ide LM, Hoffman A. 2012. Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piaucu fish. *Physiology & Behavior*, 105: 784-790.

Barcellos LJG, Volpato GL, Barreto RE, Coldebella I, Ferreira D. 2011. Chemical communication of handling stress in fish. *Physiology and Behaviour*, 103(3-4): 372-375.

Barreto RE, Barbosa A, Giassi ACC, Hoffmann A. 2010. The 'club' cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 43: 75-81.

Barreto RE, Barbosa A, Hoffmann A. 2012. Ventilatory responses to skin extract in catfish. *Aquatic Biology*, 15(3): 205-214.

Barreto RE, Barbosa A, Urbinati EC, Hoffman A. 2014. Cortisol influences the antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the Frillfin goby. *Hormones and Behavior*, 65(4): 394-400.

Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL. 2003. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behavioural Processes*, 60: 235-239.

Barreto RE, Miyai CA, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL. 2013. Blood cues induce antipredator behavior in Nile Tilapia conspecifics. *PLoS ONE*, 8(1): e54642.

Beeching SC, Caroff JT, Case SL, Duda SH, Henry BE, Pristov KE. 2015. Avoidance behavior in two sympatric planaria species: effects of conspecific and heterospecific chemical alarm cues. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(6): 445-453.

Bischoff RJ, Gould JL, Rubenstein DI. 1985. Tail size and female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 17: 253-256.

Brooks R & Caithness N. 1995. Female choice in a feral guppy population: are there multiple cues? *Animal Behaviour*, 50: 301-307.

Brown GE, Elvidge CK, Macnaughton CJ, Ramnarine I, Godin JGJ. 2010. Cross-population responses to conspecific chemical alarm cues in wild Trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*: evidence for local conservation of cue production. *Canadian Journal of Zoology*, 88: 139-147.

Brown GE, Foam PE, Cowell HE, Guevara-Fiore P, Chivers DP. 2004. Production of chemical alarm cues in juvenile convict cichlids: the effect of diet, condition, and ontogeny. *Annales Zoologici Fennici*, 41: 487-499.

Brown GE & Godin JG. 1999. Chemical alarm signals in wild Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology*, 77: 562-570.

- Bruton MN. 1985. The effects of suspensoids on fish. *Hydrobiologia*, 125: 221-241.
- Burk T. 1982. Evolutionary significance of predation on sexually signalling males. *Florida Entomologist*, 65(1): 90-104.
- Burrows MT. 1994. An optimal foraging and migration model for juvenile plaice. *Evolutionary Ecology*, 8: 125-149.
- Burrows MT & Gibson RN. 1995. The effects of food, predation risk and endogenous rhythmicity on the behavior of juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Animal Behaviour*, 50: 41-52.
- Candolin U. 2004. Effects of algae cover on egg acquisition in male three-spined stickleback. *Behaviour*, 141: 1389-1399.
- Chivers DP, Brown GE, Smith RJF. 1995a. Familiarity and shoal cohesion in fathead minnows (*Pimephales promelas*) – implications for antipredator behavior. *Canadian Journal of Zoology*, 73(5): 955-960.
- Chivers DP & Smith RJF. 1998. Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience*, 5: 338-352.
- Chivers DP, Wisenden BD, Smith RJF. 1995b. The role of experience in the response of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to skin extract of Iowa darters (*Etheostoma exile*). *Behaviour*, 132: 665-674.
- Cooper WE, Lopez P, Martin J, Perez-Mellado V. 2012. Latency to flee from an immobile predator: effects of predation risk and cost of immobility for the prey. *Behavioral Ecology*, 23: 790-797.

Croft DP, Arrowsmith BJ, Bielby J, Skinner K, White E, Couzin ID, Magurran AE, Ramnarine I, Krause J. 2003. Mechanisms underlying shoal composition in the Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata*. *Oikos*, 100(3): 429-438.

Dalton CM & Flecker AS. 2014. Metabolic stoichiometry and the ecology of fear in Trinidadian guppies: consequences for life histories and stream ecosystems. *Oecologia*, 176: 691-701.

Davies-Colley RJ & Smith DG. 2001. Turbidity, suspended sediment, and water clarity: a review. *Journal of the American Water Resources Association*, 37: 1085-1101.

Deacon AE, Ramnarine IW, Magurran AE. 2011. How reproductive ecology contributes to the spread of a globally invasive fish. *PLoS ONE*, 6: e24416.

Dill LM & Fraser AHG. 1984. Risk of predation and the feeding behavior of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 16: 65-71.

Ehlman SM, Sandkam BA, Breden F, Sih, A. 2015. Developmental plasticity in vision and behavior may help guppies overcome increased turbidity. *Journal of Comparative Physiology A*, 201: 1125-1135.

Endler JA. 1987. Predation, light intensity and courtship behaviours in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behaviour*, 35: 1376-1385.

Endler JA. 1991. Variation in the appearance of guppy color patterns to guppies and their predators under differential visual conditions. *Vision Research*, 31(3): 587-608.

Endler JA. 1995. Multiple-trait coevolution and environmental gradients in guppies. *Trends in Ecology & Evolution*, 10: 22-29.

Endler JA & Houde AE. 1995. Geographic variation in female preferences for male traits in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 49: 456-468.

Evans JP & Magurran AE. 1999. Male mating behaviours and sperm production characteristics under varying sperm competition risk in guppies. *Animal Behaviour*, 58: 1001-1006.

Evans JP, Pilastro A, Ramnarine IW. 2003. Sperm transfer through forced matings and its evolutionary implications in natural guppy (*Poecilia reticulata*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78: 605-612.

Farr JA. 1975. The role of predation in the evolution of social behaviours of natural populations of the guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Evolution*, 29: 151-158.

Farr JA. 1980. Social behavior patterns as determinants of reproductive success in the guppy, *Poecilia reticulata* Peters (Pisces, Poeciliidae). An experimental study of the effects of intermale competition, female choice, and sexual selection. *Behaviour*, 74: 38-91.

Ferrari COM, Manassa RP, Dixson DL, Munday PL, McCormick MI, Meekan MG, Sih A, Chivers DP. 2012. Effects of ocean acidification on learning in coral reef fishes. *PLoS ONE*, 7(2): e31478.

Foam PE, Mirza RS, Chivers DP, Brown GE. 2005. Juvenile convict cichlids (*Archocentrus nigrofasciatus*) allocate foraging and antipredator behaviour in response to temporal variation in predation risk. *Behaviour*, 142: 129-144.

Giaquinto PC & Volpato GL. 2001. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behaviour*, 138: 1205-1214.

Gibson AK & Mathis A. 2006. Opercular beat rate for rainbow darters *Etheostoma caeruleum* exposed to chemical stimuli from conspecific and heterospecific fishes. *Journal of Fish Biology*, 69: 224-232.

Godin JGJ. 1995. Predation risk and alternative mating tactics in male Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Oecologia*, 103: 224-229.

Godin JGJ & Briggs SE. 1996. Female mate choice under predation risk in the guppy. *Animal Behaviour*, 51: 117-130.

Godin JGJ & Davis AS. 1995. Who dares, benefits: predator approach behaviours in the guppy (*Poecilia reticulata*) deters predator pursuit. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 259: 193-200.

Gomes LC, Araujo-Lima CARM, Roubach R, Urbinati EC. 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(2): 283-290.

Gong A & Gibson RM. 1996. Reversal of a female preference after visual exposure to a predator in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour*, 52: 1007-1015.

Gregory RS. 1993. Effect of turbidity on the predator avoidance behavior of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 241-246.

Griffiths SW & Magurran AE. 1997. Familiarity in schooling fish: how long does it take to acquire? *Animal Behaviour*, 53: 945-949.

Griffiths SW & Magurran AE. 1999. Schooling decisions in guppies (*Poecilia reticulata*) are based on familiarity rather than kin recognition by phenotype matching. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 45: 437-443.

Gwynne DT. 1989. Does copulation increase the risk of predation? *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 54-56.

Hartman EJ & Abrahams MV. 2000. Sensory compensation and the detection of predators: the interaction between chemical and visual information. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267: 571-575.

Henley WF, Patterson MA, Neves RJ, Lemly AD. 2000. Effects of sedimentation and turbidity on lotic food webs: a concise review for natural resource managers. *Reviews in Fisheries Science*, 8(2): 125-139.

Hettyey A & Pearman PB. 2003. Social environment and reproductive interference affect reproductive success in the frog *Rana latastei*. *Behavioral Ecology*, 14: 294-300.

Hibler TM & Houde AE. 2006. The effect of visual obstructions on the sexual behaviours of guppies: the importance of privacy. *Animal Behaviour*, 72: 959-964.

Höjesjö J, Johnsson JI, Axelsson M. 1999. Behavioural and heart responses to food limitation and predation risk: an experimental study on rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 55: 1009-1019.

Houde AE. 1987. Mate choice based on naturally occurring color pattern variation in a guppy population. *Evolution*, 41: 1-10.

Houde AE. 1988. The effects of female choice and male-male competition on the mating success of male guppies. *Animal Behaviour*, 36: 888-896.

Houde AE & Endler JA. 1990. Correlated evolution of female mating preferences and male color patterns in the guppy *Poecilia reticulata*. *Science*, 248: 1405-1408.

Houde AE & Hankes MA. 1997. Evolutionary mismatch of mating preferences and male colour patterns in guppies. *Animal Behaviour*, 53: 343-351.

Hussain A, Saraiva LR, Ferrero DM, Ahuja G, Krishna VS, Liberles SD, Korsching SI. 2013. High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 19579-19584.

Ide LM, Urbinati EC, Hoffmann A. 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *Journal of Fish Biology*, 63: 332-343.

Jennions MD & Petrie M. 1997. Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biology Review*, 72: 283-327.

Johannesen A, Dunn AM, Morrell LJ. 2014. Prey aggregation is an effective olfactory predator avoidance strategy. *PeerJ*, 2: e408.

Jordão LC & Volpato GL. 2000. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour*, 137: 681-690.

Kats LB & Dill LM. 1998. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*, 5: 361-394.

Kelley JL, Graves JA, Magurran AE. 1999. Familiarity breeds contempt in guppies – Male guppy fish increase their reproductive success by mating with unfamiliar females. *Nature*, 40: 661-662.

Kelley JL & Magurran AE. 2003. Effects of relaxed predation pressure on visual predator recognition in the guppy. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54(3): 225-232.

Kimbell HS & Morrell LJ. 2015. Turbidity influences individual and group level response to predation in guppies, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour*, 103: 179-185.

Lawrence BJ & Smith RJF. 1989. Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance. *Journal of Chemical Ecology*, 15(1): 209-219.

Lehtiniemi M, Engström-Öst J, Viitasalo M. 2005. Turbidity decreases anti-predator behavior in pike larvae, *Esox lucius*. *Environmental Biology of Fishes*, 73: 1-8.

Lima SL & Dill LM. 1990. Behavioural decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 610-640.

Long KD & Rosenqvist G. 1998. Changes in male guppy courting distance in response to a fluctuating light environment. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44: 77-83.

Luyten PH & Liley NR. 1985. Geographic variation in the sexual behaviours of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behaviour*, 95(1-2): 164-179.

Magnhagen C. 1988. Predation risk and foraging in juvenile pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum salmon (*O. keta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 592-596.

Magnhagen C. 1991. Predation risk as a cost of reproduction. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 183-186.

Magurran AE. 1990. The adaptative significance of schooling as an anti-predator defence in fish. *Annales Zoologici Fennici*, 27: 51-66.

Magurran AE & Nowak MA. 1991. Another battle of the sexes: the consequences of sexual asymmetry in mating costs and predation risk in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society London B*, 246: 31-38.

Magurran AE & Ramnarine IW. 2004. Learned mate recognition and reproductive isolation in guppies. *Animal Behaviour*, 67: 1077-1082.

Magurran AE & Seghers BH. 1990. Risk sensitive courtship in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behaviour*, 112: 194-201.

Manassa RP, Dixson DL, McCormick MI, Chivers DP. 2013. Coral reef fish incorporate multiple sources of visual and chemical information to mediate predation risk. *Animal Behaviour*, 86: 717-722.

Mathis A & Smith RJF. 1993. Intraspecific and cross-superorder responses to chemical alarm signals by brook stickleback (*Culaea inconstans*). *Ecology*, 74(8): 2395-2404.

Mathuru AS, Kibat C, Cheong WF, Shui G, Wenk MR, Friedrich RW, Jesuthasan S. 2012. Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. *Current Biology*, 22: 538-544.

Matthews IM & Magurran AE. 2000. Evidence for sperm transfer during sneaky mating in wild Trinidadian guppies. *Journal of Fish Biology*, 56: 1381-1386.

Maximino C, Brito TM, Dias CAGM, Jr. AG, Morato S. 2010. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5(2): 221-228.

Maximino C, Brito TM, Moraes FD, Oliveira FVC, Taccolini IB, Pereira PM, Colmanetti R, Lozano R, Gazolla RA, Tenório R, Lacerda RIT, Rodrigues STK, Lameirão SVOC, Pontes AAA, Romão CF, Prado VM, Jr. AG. 2007. A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, 20(4): 351-367.

Mehner T. 2012. Diel vertical migration of freshwater fishes – proximate triggers, ultimate causes and research perspectives. *Freshwater Biology*, 57: 1342-1359.

Meuthen D, Baldauf SA, Bakker TCM, Thünken T. 2015. Conspecific alarm cues affect interspecific aggression in cichlid fishes. *Hydrobiologia*, 767: 37-49.

Mirza RS, Scott JJ, Chivers DP. 2001. Differential responses of male and female red swordtails to chemical alarm cues. *Journal of Fish Biology*, 59: 716-728.

Mirza RS & Chivers DP. 2003. Influence of body size on the responses of fathead minnows, *Pimephales promelas*, to damselfly alarm cues. *Ethology*, 109: 691-699.

Miyai CA, Sanches FHC, Pinho-Neto CF, Barreto RE. 2016. Effects of predator odour on antipredator responses of Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, 165: 22-27.

O'Connor CM, Reddon AR, Odetunde A, Jindal S, Balshine S. 2015. Social cichlid fish change behaviours in response to a visual predator stimulus, but not the odour of damaged conspecifics. *Behavioural Processes*, 121: 21-29.

Oliveira TA, Koakoski G, Motta AC, Piato AL, Barreto RE, Volpato GL, Barcellos LJG. 2014. Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Hormones and Behavior*, 65(4): 340-344.

Pereira RT, Leutz JACM, Valença-Silva G, Barcellos LJG, Barreto RE. 2017. Ventilation responses to predator odors and conspecific chemical alarm cues in the frillfin goby. *Physiology & Behavior*, 179: 319-323.

Pfeiffer W. 1963. The fright reaction in North American fish. *Canadian Journal of Zoology*, 41(1): 69-77.

Pfeiffer W. 1977. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*, 1977: 653-665.

Pilastro A, Mandelli M, Gasparini C, Dadda M, Bisazza A. 2007. Copulation duration, insemination efficiency and male attractiveness in guppies. *Animal Behaviour*, 74: 321-328.

Pomiankowski A. 1987. The costs of choice in sexual selection. *Journal of Theoretical Biology*, 128: 195-218.

Ranaker L, Nilsson PA, Bronmark C. 2012. Effects of degraded optical conditions on behavioural responses to alarm cues in a freshwater fish. *PLoS ONE*, 7(6): e38411.

Ranaker L, Persson J, Jönsson M, Nilsson PA, Brönmark C. 2014. Piscivore-prey fish interactions: mechanisms behind diurnal patterns in prey selectivity in brown and clear water. *PLoS ONE*, 9(11): e102002.

Reeve AJ, Ojanguren AF, Deacon AE, Shimadzu H, Ramnarine IW, Magurran AE. 2014. Interplay of temperature and light influences wild guppy (*Poecilia reticulata*) daily reproductive activity. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111: 511-520.

Reynolds JD & Gross MR. 1990. Costs and benefits of female mate choice: is there a lek paradox? *American Naturalist*, 136: 230-243.

Reynolds JD & Gross MR. 1992. Female mate preference enhances offspring growth and reproduction in a fish, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 250: 57-62.

Reynolds JD, Gross MR, Coombs MJ. 1993. Environmental conditions and male morphology determine alternative mating behaviours in Trinidadian guppies. *Animal Behaviour*, 45: 145-152.

Richter BD, Braun DP, Mendelson MA, Master LL. 1997. Threats to imperiled freshwater fauna. *Conservation Biology*, 11(5): 1081-1093.

Sanches FHC, Miyai CA, Pinho-Neto CF, Barreto RE. 2015. Stress response to chemical alarm cues in Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, 149: 8-13.

Schmidt-Nielsen K. 2002. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. 5 ed., São Paulo, Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda, p. 611.

Seghers BH. 1974. Geographic variation in the responses of guppies (*Poecilia reticulata*) to aerial predators. *Oecologia*, 14(1/2): 93-98.

Shohet AJ & Watt PJ. 2004. Female association preferences based on olfactory cues in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55: 363-369.

Sih A. 1994. Predation risk and the evolutionary ecology of reproductive behaviour. *Journal of Fish Biology*, 45: 111-130.

Sih A, Ferrari MCO, Harris DJ. 2011. Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change. *Evolutionary Applications*, 4: 367-387.

Sloman KA. 2011. *The diversity of fish reproduction: an Introduction*. In: Farrell AP (ed.) *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Academic Press. San Diego US, pp. 613-615.

van der Sluijs I, Gray SM, Amorim MCP, Barber I, Candolin U, Hendry AP, Krahe R, Maan ME, Utne-Palm AC, Wagner HJ, Wong BBM. 2011. Communication in troubled waters: responses of fish communication systems to changing environments. *Evolutionary Ecology*, 25(3): 623-640.

Smith RJF. 1979. Alarm reaction of Iowa and johnny darters (*Etheostoma*, Percidae, Pisces) to chemicals from injured conspecifics. *Canadian Journal of Zoology*, 57: 1278–82.

- Smith RJF. 1992. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2: 3-63.
- Smith RJF, Lawrence BJ, Smith MJ. 1991. Cross-reaction to skin extract between two gobies, *Asterropteryx semipunctatus* and *Brachygobius sabanus*. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 2253–2259.
- Smith RJF & Smith MJ. 1989. Predator-recognition behaviour in two species of gobies, *Asterropteryx semipunctatus* and *Gnatholepis anjerensis*. *Ethology*, 83: 19–30.
- Snell-Rood EC. 2013. An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Animal Behaviour*, 85: 1004-1011.
- Snyder NFR & Snyder HA. 1971. Defenses of the Florida apple snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour*, 40: 175-215.
- Sundin J, Berglund A, Rosenqvist G. 2010. Turbidity hampers mate choice in a pipefish. *Ethology*, 116(8): 713-721.
- Sutherland AB & Meyer JL. 2007. Effects of increased suspended sediment on growth rate and gill condition of two Southern Appalachian minnows. *Environmental Biology of Fishes*, 80(4): 389-403.
- Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio C, Dobson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger WH, Simberloff D, Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292: 281-284.

Utne-Palm AC. 2002. Visual feeding of fish in a turbid environment: physical and behavioural aspects. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35(1-2): 111-128.

Valero A, Magurran AE, Garcia CM. 2009. Guppy males distinguish between familiar and unfamiliar females of a distantly related species. *Animal Behaviour*, 78: 441-445.

Weissburg MJ, Ferner MC, Pisut DP, Smee DL. 2002. Ecological consequences of chemically mediated prey perception. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10): 1953-1970.

Wisenden BD. 2000. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355: 1205-1208.

Wisenden BD & Sargent RC. 1997. Antipredator behaviour and suppressed aggression by convict cichlids in response to injury-released chemical cues of conspecifics but not to those of an allopatric heterospecific. *Ethology*, 103: 283-291.

Zar, J.H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Fifth edition. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice - Hall, p.944.

Zimmer RK & Butman CA. 2000. Chemical signaling processes in the marine environment. *The Biological Bulletin*, 198: 168-187.