

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Efeito de estímulos visuais e químicos do sexo
oposto na reprodução da tilápia-do-Nilo**

André Luis da Silva Castro

Jaboticabal-SP
Brasil
2004

Efeito de estímulos visuais e químicos do sexo oposto na reprodução da tilápia-do-Nilo.

André Luis da Silva Castro

Orientador: Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato

Dissertação apresentada ao Centro de Aqüicultura da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura – Área de Concentração Aqüicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
2004

DEDICO

À minha família: meus pais Raul e Eloisa; minhas irmãs Patrícia e Jussara; o sobrinho Luan e a avó Maria. Por todo o amor, carinho, apoio, motivação e suporte psicológico e econômico. Vocês são parte de mim.

“Nossas vidas são tecidas pelo mesmo fio dos nossos sonhos”

William Shakespeare

Agradecimentos

- À orientadora e amiga, Prof^a. Dr^a Eliane Gonçalves de Freitas, pela dedicação, motivação, responsabilidade e competência. Seus ensinamentos ficarão para sempre.
- Ao Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato, pelas sugestões e por permitir meu ingresso ao Caunesp, atuando como orientador.
- Ao Prof. Dr. Classius de Oliveira, que participou como co-orientador, estando sempre à disposição.
- À Dr^a Adelina Francisco Ferreira pelo auxílio na análise histológica e confecção das pranchas.
- Ao Gustavo A. P. Ciocca e Fausto Nomura, por fotografarem as gônadas das tilápias.
- À Prof^a Dr^a Denise de Cerqueira R. Feres, por permitir o uso do estereomicroscópio com sistema de captação de imagens digital (Processo FAPESP 01/07944-7) e Dr^a Sonia Maria Oliani, do microscópio com captação de imagens digital.
- Ao Bioterista Carlos Eduardo de Sousa, pela ajuda sempre prestativa, amiga e engraçada.
- À Thaís Billalba Carvalho pelo incansável auxílio na aplicação dos testes estatísticos.
- À Bióloga Roselene S. C. Ferreira pela ajuda na montagem do experimento.
- Ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto, pela identificação da espécie *Oreochromis niloticus*;
- Ao Biólogo Jaime José Gimenez pelo auxílio na captura dos peixes;
- Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e o técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior, pela orientação e auxílio na confecção de lâminas histológicas.
- Aos estatísticos Dr. Antonio José Manzato e Dr^a Adriana Barbosa Santos, por solucionarem dúvidas.
- Ao Sr. Otávio Pissolato, proprietário da Fazenda Santa Maria, pela doação dos peixes;
- Aos novos e antigos companheiros de estágio: Aline, Tatiane, Fabrício, Márcio e Thais, por ajudarem na parte prática do trabalho e através das discussões semanais.
- Ao amigo Fábio de Faria e Souza Campos, sempre presente e prestativo.
- Ao amigo Rodrigo Zieri, pela ajuda no preparo das lâminas.
- Aos amigos Alessandro (china) e Michel (xera), pela hospedagem em Jaboticabal.
- À Professora de inglês Denise, pela revisão do *abstract*.
- Àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
EXPERIMENTO 1.....	9
EXPERIMENTO 2.....	10
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

A reprodução dos peixes é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. As interações entre machos e fêmeas podem afetar esse eixo, desencadeando respostas fisiológicas, como a secreção de hormônios reprodutivos e o desenvolvimento das gônadas, e comportamentais, como corte, perseguição, desova e espermição nos membros participantes. Dessa forma, a comunicação visual e química com um peixe do sexo oposto pode modular a reprodução. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito da comunicação visual e química com o sexo oposto na reprodução da tilápia-do-Nilo. Para isso, quatorze casais de tilápia-do-Nilo foram mantidos em cada uma das seguintes condições, que variaram apenas quanto ao tipo de comunicação permitida entre o casal: 1) comunicação visual; 2) comunicação química; 3) comunicação química e visual; 4) isolados (sem qualquer contato entre o casal). O comportamento reprodutivo e o desenvolvimento das gônadas dos machos e fêmeas foram analisados e comparados entre as condições. A comunicação visual com o peixe do sexo oposto aumentou a frequência de ondulação (corte) em machos e fêmeas, induziu desova em fêmeas e aumento do IGS em machos. A comunicação química não teve efeito sobre os parâmetros analisados. Conclui-se que a comunicação visual com o sexo oposto é o principal fator de estimulação social na reprodução na tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: reprodução, comportamento, comunicação visual e química, tilápia-do-Nilo.

ABSTRACT

Hypothalamic-Hypophysis-Gonad is the main neural-hormonal axis regulating fish reproduction. Such axis may be affected by male-female interactions stimulating physiological responses (as hormonal releasing and gonad development) and behavioral responses (as courtship, chasing and spawning) among the interacting animals. Thus, visual and chemical communication between opposite sex may modulate fish reproduction. This study checked the effect of visual and chemical male-female interaction in the Nile tilapia. Thus, fourteen couples were studied in four different conditions of communication: 1) only visual contact; 2) only chemical contact; 3) chemical and visual contact; 4) no sensorial contact (isolated). The reproductive behavior and gonad development were analyzed and compared among the conditions. The visual communication with the opposite sex raised the frequency of undulation (a courtship movement) in males and females, induced spawning in females and risen GSI in males. The chemical communication did not affect such parameters. It was concluded that the male-female visual communication is the main social stimulation factor on Nile tilapia reproduction.

Key words: reproduction, behavior, visual and chemical communication, Nile tilapia.

INTRODUÇÃO

Os peixes exibem uma variedade de comportamentos reprodutivos que compreendem desde a simples liberação de gametas na água até padrões elaborados, envolvendo migração reprodutiva, defesa territorial, construção de ninho, comportamento de corte e cuidado parental (Liley & Stacey, 1983). Essa variedade de comportamentos reprodutivos reflete diferentes adaptações aos ambientes sociais e físicos ocupados por cada espécie (Liley, 1982).

O comportamento reprodutivo é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Francis *et al.*, 1993), que é influenciado por fatores endógenos e exógenos (Stacey, 1984). Os fatores exógenos, como fotoperíodo, temperatura, pH, salinidade e pluviosidade, preparam o animal para que a reprodução ocorra quando as condições ambientais forem adequadas (Liley, 1982). Já os fatores endógenos iniciam e medeiam alterações hormonais, gonadais e morfológicas, determinando assim quando os fatores exógenos serão funcionais (Stacey, 1984).

Os esteróides gonadais são os principais fatores endógenos responsáveis pela regulação do comportamento reprodutivo em peixes (Liley & Stacey, 1983). Além de serem fatores causais do comportamento, são também modulados por interações co-específicas (Oliveira *et al.*, 2002). Essa relação entre hormônios e comportamento é bi-direcional, ou seja, assim como os hormônios modulam o comportamento reprodutivo dos peixes, o

comportamento reprodutivo modula o nível de hormônios em co-específicos (Oliveira *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 1998; Crews, 1998).

Dessa forma, as interações intraespecíficas desempenham função importante na reprodução dos peixes. Por exemplo, interações agonísticas aumentam o nível de andrógenos em machos que estejam apenas assistindo confrontos entre outros indivíduos da mesma espécie, sem participar da luta (Oliveira *et al.*, 2001). Em *Oreochromis mossambicus*, exibir comportamento de corte a uma fêmea causa um aumento nos níveis de hormônios esteróides do macho (Oliveira *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 1998). Assim, tanto interações entre animais de mesmo sexo como entre animais de sexo oposto podem afetar o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Durante essas interações, informações tácteis, visuais, químicas, acústicas e elétricas podem ser transmitidas, evidenciando que a fisiologia reprodutiva dos peixes pode ser afetada por várias vias sensoriais. Essas informações podem ter diferentes efeitos, de acordo com cada espécie (Crews, 1998).

Em algumas espécies, os machos produzem um som, o qual facilita o reconhecimento específico durante a corte e acelera a desova na fêmea (Myrberg *et al.*, 1965; Marshall, 1972). No gênero *Onchorhynchus*, o contato visual com a fêmea e a vibração corporal por ela produzida induzem espermição em machos (Satou *et al.*, 1987). A frequência de ovulação em fêmeas de *Tilapia macrocephala* (Aronson, 1945), *Trichogaster trichopterus* (Kramer, 1972) e *Oreochromis mossambicus* (Silverman, 1978a, 1978b) é

maior quando estas podem ver o macho co-específico. O contato visual com o macho também acelera o desenvolvimento ovocitário em fêmeas de *Brachydanio rerio* (Eaton & Farley, 1974).

Essa comunicação intersexual também ocorre por meio de feromônios, que são liberados na água e detectados por via olfativa (Liley & Stacey, 1983). Em várias espécies os feromônios induzem resposta reprodutiva no parceiro sexual, podendo induzir comportamento de corte e acasalamento, construção de ninho, espermição, ovulação ou desova, além de fornecer informações sobre o estado de maturação do peixe (Liley & Stacey, 1983). Esses feromônios podem ainda modular os níveis hormonais de co-específicos (Oliveira *et al.*, 2002). Nos ciprinídeos, a pregnenolona liberada na urina da fêmea sincroniza a ovulação com a produção de esperma do macho (Dulka *et al.*, 1987). A fêmea libera a pregnenolona horas antes de ovular, o que induz nos machos comportamentos de corte e espermição, aumento do nível de gonadotrofinas e da produção de esperma (Dulka *et al.*, 1987).

Os peixes da família Cichlidae exibem comportamento reprodutivo complexo, de longa duração, associado a uma organização social também complexa em relação a outros teleósteos (Baerends & Baerends van Roon, 1950). Há várias evidências de estimulação social na reprodução dos ciclídeos, afetando o desenvolvimento das gônadas (Gonçalves, 1993), a secreção de hormônios (Borges *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2001) e os neurônios da área pré-óptica no hipotálamo (Francis *et al.*, 1993).

A tilápia-do-Nilo é um ciclídeo africano, cujos machos estabelecem uma hierarquia de dominância por meio de interações agressivas (Gonçalves, 1993). O macho dominante constrói um ninho circular escavando o substrato com a boca, defende-o contra intrusos e corteja fêmeas para o acasalamento (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). A desova da tilápia-do-Nilo ocorre dentro do ninho e, em seguida, a fêmea recolhe os ovos na boca e afasta-se do ninho para a incubação (Gonçalves, 1993).

Gonçalves (1993) observou que o desenvolvimento das gônadas é mais rápido em machos dominantes do que em submissos de tilápia-do-Nilo e, portanto, há um efeito das interações entre machos sobre a reprodução dessa espécie. Além disso, Gonçalves-de-Freitas (1999) observou que a presença da fêmea estimula a construção de ninho pelos machos em menos de 24 horas após introdução das fêmeas no aquário, evidenciando efeito da interação macho-fêmea no comportamento reprodutivo. As perguntas que seguiram essa observação foram: como o macho percebe a fêmea? O macho também afeta o comportamento da fêmea? Se isso ocorre, por quais vias sensoriais os animais são estimulados?

De acordo com Souza *et al.* (1998), informações químicas afetam o comportamento reprodutivo da tilápia-do-Nilo. Esses autores observaram que os machos dominantes aumentam a frequência de perseguição a fêmeas injetadas com o hormônio pregnenolona (que é liberada na urina), intensificando o comportamento de corte. No entanto, não se sabe se há

liberação natural desse feromônio durante a reprodução dessa espécie ou se o macho é apenas capaz de detectá-lo.

É possível que informações visuais também tenham efeito sobre o comportamento da tilápia-do-Nilo, pois esses animais apresentam mudança na coloração corporal durante a reprodução (Lowe-McConnell, 1958; Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Além disso, de acordo com Fernald (1984), os ciclídeos africanos habitam originariamente águas claras e têm a visão como uma das principais modalidades sensoriais. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito de estímulos visuais e/ou químicos do sexo oposto sobre o desenvolvimento das gônadas e o comportamento reprodutivo da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A tilápia-do-Nilo foi escolhida por apresentar facilidade no manejo, manutenção e reprodução em condições de laboratório, ter grande interesse na aquicultura mundial e ser uma espécie adequada para testar hipóteses sobre mecanismos de controle da reprodução em peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos Gerais

O experimento foi realizado no Laboratório de Comportamento Animal, do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP de São José do Rio Preto-SP, no período de agosto de 2002 a março de 2003. Os exemplares de tilápia-do-Nilo utilizados foram capturados em uma represa no município de União Paulista-SP e mantidos em tanques de alvenaria na mini-estação de Piscicultura da UNESP. Antes do experimento, os peixes foram levados para o laboratório e mantidos em caixas-d'água de cimento amianto de 500 L (1peixe/5 L), por um período mínimo de quinze dias para aclimatação (com fotoperíodo de 12L:12D, temperatura 27° C e alimentação em excesso).

Delineamento Experimental

O delineamento experimental consistiu em avaliar o comportamento reprodutivo e o desenvolvimento das gônadas de casais de tilápia-do-Nilo mantidos em quatro condições de comunicação entre macho e fêmea: apenas visual, apenas química, química e visual e sem comunicação (isolado). Para isso foram realizados dois experimentos. O primeiro para testar se o isolamento causa regressão das gônadas, para padronização da condição reprodutiva dos peixes e, o segundo, para testar as hipóteses principais sobre comunicação entre os casais e seus efeitos na reprodução.

Experimento 1. Efeito do isolamento sobre as gônadas

O objetivo deste experimento foi testar se o isolamento padroniza a condição reprodutiva da tilápia-do-Nilo, pois, a coleta aleatória dos peixes na caixa d'água poderia selecionar animais em diferentes condições reprodutivas. Nesse caso, o isolamento prévio poderia ser uma forma de padronizar a condição inicial de desenvolvimento reprodutivo dos peixes, uma vez que em várias espécies o isolamento provoca regressão das gônadas (Coward *et al.*, 1998).

Os peixes foram coletados aleatoriamente da caixa d'água, anestesiados com Benzocaína (2:5000), sexados pelo método de coloração da papila genital com azul de metileno (Afonso & Lebouté, 1993).

Foram utilizados 32 exemplares de tilápia-do-Nilo com $10,55 \pm 0,66$ cm de comprimento padrão e peso de $42,90 \pm 8,4$ g. Oito machos e oito fêmeas foram isolados durante cinco dias e, ao término desse período, mortos por overdose letal de anestésico (benzocaína; 20:5000). Ao mesmo tempo, oito casais foram coletados aleatoriamente da caixa d'água e imediatamente mortos por overdose letal de benzocaína. Todos os peixes foram pesados, medidos e dissecados ventralmente para retirada das gônadas e cálculo do Índice Gonadossomático [IGS= (peso úmido das gônadas/peso úmido corporal). 10^2]. O IGS é um bom indicador de desenvolvimento gonadal para machos e fêmeas de tilápia-do-Nilo (Babiker & Ibrahim, 1979).

Posteriormente, o IGS dos animais isolados e não isolados foi comparado através do teste t de Student para amostras independentes.

Experimento 2. Efeito de estímulos visuais e químicos do sexo oposto na reprodução

Foram utilizados peixes adultos com comprimento padrão de $9,9 \pm 0,46$ cm e peso $35,1 \pm 4,76$ g (n=112). Quatorze casais de tilápia-do-Nilo foram mantidos durante cinco dias em cada uma das quatro condições experimentais descritas abaixo, nas quais variaram apenas a natureza sensorial do contato entre macho e fêmea. De acordo com Little *et al.* (2000), o tempo de pareamento de cinco dias é suficiente para que a desova ocorra em casais dessa espécie. As condições experimentais descritas a seguir estão esquematizadas na Figura. 1.

- **COMUNICAÇÃO VISUAL (V)**: dois aquários pareados e encostados um no outro permitindo apenas contato visual entre o macho de um aquário com a fêmea do outro (Fig. 1A);
- **COMUNICAÇÃO QUÍMICA (Q)**: um aquário dividido ao meio por um anteparo opaco impedindo contato visual entre o macho, em um compartimento, e a fêmea presente no outro compartimento. Um cano de PVC conduziu a água do compartimento do macho ao compartimento da fêmea, através da pressão da entrada de oxigênio, a uma vazão média de 3 litros por minuto. A circulação da água entre os compartimentos foi

garantida por três orifícios de 1,5 cm de diâmetro na região inferior do anteparo. Cotovelos de PVC acoplados a esses orifícios impediram contato visual do casal (Fig 1B);

- **COMUNICAÇÃO QUÍMICA + VISUAL (QV):** semelhante à condição COMUNICAÇÃO QUÍMICA, porém, o anteparo central utilizado foi um vidro transparente, que permitiu também a comunicação visual do casal (Fig. 1C);
- **ISOLADO (I):** dois aquários pareados e encostados um no outro com um anteparo opaco entre eles, impedindo qualquer comunicação entre o macho e a fêmea (Fig. 1D).

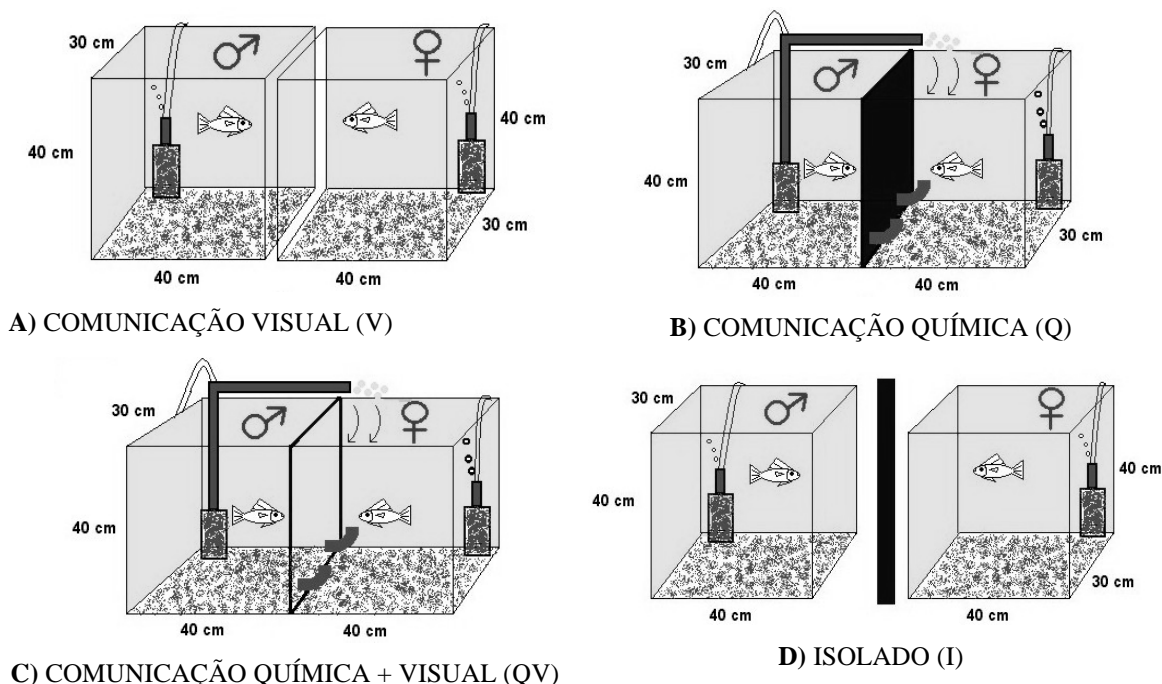


Figura 1. Condições experimentais utilizadas. Foram testadas quatorze réplicas para cada condição. Os animais permaneceram nessas condições durante cinco dias.

As paredes laterais e posteriores de todos os aquários foram cobertas com plástico azul para evitar a comunicação visual entre peixes de aquários adjacentes. A cor foi escolhida por reduzir o estresse na tilápia-do-Nilo (Volpato & Barreto, 2001). A temperatura da água nos aquários foi controlada para $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por termostatos individuais e o fotoperíodo para 12L:12D, iniciando às 7:00 h. O fundo dos aquários foi coberto por uma camada de 1,5 cm de cascalho de rio para permitir a construção de ninhos.

Os animais foram alimentados com ração para peixes tropicais (28% P.B.), na proporção de 2% da biomassa, dividida em duas vezes ao dia (uma hora antes do início e do final do período de luz). Um filtro biológico foi utilizado em cada aquário para a oxigenação e manutenção da qualidade da água.

Análise do comportamento reprodutivo

Foram quantificados três itens do comportamento reprodutivo da tilápia-do-Nilo: corte, desova e construção de ninho.

Corte

Cada réplica foi filmada durante 15 minutos no 2° e 4° dias de experimento. Uma vez que o pico da atividade reprodutiva da tilápia-do-Nilo ocorre entre 13:00 e 17:00 h (Gonçalves, 1993; Baroiller *et al.*, 1997), as filmagens foram realizadas nesse período. Através da análise de *videotape* a frequência de ondulação de cada peixe foi quantificada. O comportamento ondulatório faz parte do comportamento de corte da tilápia-do-Nilo e é

descrito por Gonçalves-de-Freitas (1999) como uma ondulação vigorosa do corpo do animal no sentido ântero-posterior. Durante a fase reprodutiva, a tilápia-do-Nilo se aproxima de um parceiro sexual e realiza ondulações (Gonçalves-de-Freitas, 1999). A ondulação difere dos movimentos de natação por ser mais intensa. Cada evento comportamental foi registrado quando o peixe começava e terminava a ondulação, independentemente da duração ou intensidade dos movimentos. A frequência dos eventos de ondulação do 2º e 4º dias foi somada e apresentada como um único período de 30 minutos.

Ninhos e desova

Os aquários foram inspecionados duas vezes por dia (no início da manhã e final da tarde) para registrar a construção de ninhos e a ocorrência de desovas. O comprimento e largura dos ninhos construídos foram medidos ao final do experimento e suas áreas calculadas. Os animais que construíram dois ninhos tiveram a área dos ninhos somadas. A ocorrência de desovas foi constatada a partir da observação de fêmeas realizando cuidado intrabucal.

Análise das Gônadas

Os peixes foram mortos e suas gônadas retiradas para cálculo do IGS, como descrito no experimento 1. As gônadas dos machos e fêmeas foram fixadas em Bouin e conservadas em álcool 70 %. Foram sorteados oito casais

de cada condição experimental para a realização da histologia das gônadas, as quais foram processadas segundo técnicas histológicas de rotina e incluídas em paraplast. Foram preparadas lâminas permanentes com cortes de 3 e 5 μm de espessura nos ovários (devido à grande dimensão dos ovócitos) e de 3 μm nos testículos, todos corados com Hematoxilina-Eosina.

O objetivo da análise histológica foi avaliar os estádios de maturação dos testículos e ovários e compará-los entre as condições experimentais, trabalho realizado sob orientação do Prof. Dr. Classius de Oliveira (Departamento de Biologia - UNESP de São José do Rio Preto; CAUNESP).

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas separadamente para os machos e para as fêmeas, comparando-os entre as quatro condições. Os dados discrepantes (*outliers*) foram retirados e substituídos pela média das amostras (Volpato, 2001). Em seguida foi aplicado o teste de Shapiro Wilk (Zar, 1999) para testar a normalidade das amostras e, então, proceder aos testes paramétricos ou não paramétricos para análise dos dados.

Os dados de IGS e área dos ninhos foram comparados por análise de variância (*one-way* ou *two-way* ANOVA), completados com o teste de Mínima Diferença Significativa (LSD test) para comparações múltiplas (Zar, 1999). A frequência de construção de ninhos foi comparada pelo teste do qui-

quadrado para amostras múltiplas (Zar ,1999). A frequência de ondulação foi comparada por teste de Kruskal-Wallis, completada com Tukey. Para se atribuir qualquer diferença estatística o nível de significância utilizado foi de 0,05.

RESULTADOS

Experimento 1. Efeito do isolamento sobre as gônadas

Não houve diferença do IGS entre animais isolados e não isolados, tanto para os machos (isolados $=0,69\pm0,20$ %; não isolados $=0,61\pm0,25$ %; $t=0,70$, $p=0,50$) quanto para fêmeas (isoladas $=3,07\pm0,94$ %; não isoladas $=3,34\pm0,98$ %; $t=-0,56$, $p=0,58$). Uma vez que o isolamento não afetou o IGS na tilápia-do-Nilo, não foi necessário isolar previamente os animais para conduzir o experimento 2.

Experimento 2. Efeito de estímulos visuais e químicos do sexo oposto na reprodução

Medidas de peso e comprimento

O peso e comprimento padrão dos peixes foram semelhantes tanto nos machos quanto nas fêmeas utilizados no experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm desvio padrão de peso (g) e comprimento padrão (cm) de machos e fêmeas de tilápia-do-Nilo. Não houve diferença significativa de peso (machos $F_{(3,52)}=0,93$, $p=0,93$; fêmeas $F_{(3,52)}=0,25$, $p=0,85$) e comprimento (machos $F_{(3,52)}=0,78$, $p=0,50$; fêmeas $F_{(3,52)}=0,54$, $p=0,65$) entre as condições (one-way, ANOVA).

Condição	Machos		Fêmeas	
	Comprimento (cm)	Peso	Comprimento (cm)	Peso
Visual	10,14 \pm 0,28	36,09 \pm 3,78	9,90 \pm 0,41	34,27 \pm 5,16
Química + Visual	10,25 \pm 0,26	37,57 \pm 3,27	9,95 \pm 0,51	33,92 \pm 5,24
Química	10,32 \pm 0,41	37,57 \pm 4,78	9,94 \pm 0,48	34,53 \pm 4,96
Isolado	10,30 \pm 0,39	37,28 \pm 4,43	9,75 \pm 0,44	32,96 \pm 5,02

Análise do comportamento

Em ambos os sexos, os animais das condições com contato visual com o parceiro apresentaram frequência de ondulação significativamente maior do que os animais das condições sem contato visual (Kruskall-Wallis; $p<0,01$; machos $H_{(3,56)}=38,10$; fêmeas $H_{(3,56)}=19,40$, Fig. 2). Em todas as condições as ondulações ocorreram frequentemente próximas a uma das faces do aquário e, nos aquários com contato visual, a ondulação ocorreu preferencialmente em direção ao parceiro sexual.

Animais de ambos os sexos construíram ninhos em todas as condições. No entanto, não houve diferença significativa na frequência de machos

($\chi^2=0,02$, $p=0,99$) e nem de fêmeas ($\chi^2=0,04$, $p=0,99$) que construíram ninhos entre as condições (Fig. 3A e B). Nas réplicas onde ocorreram desova, 100% das fêmeas e 83% dos machos construíram ninho. Nas réplicas onde ocorreu desova e ambos os sexos construíram ninho, 75% destes estavam próximos à divisória do aquário, formando ninhos contíguos, semelhantes a um único ninho.

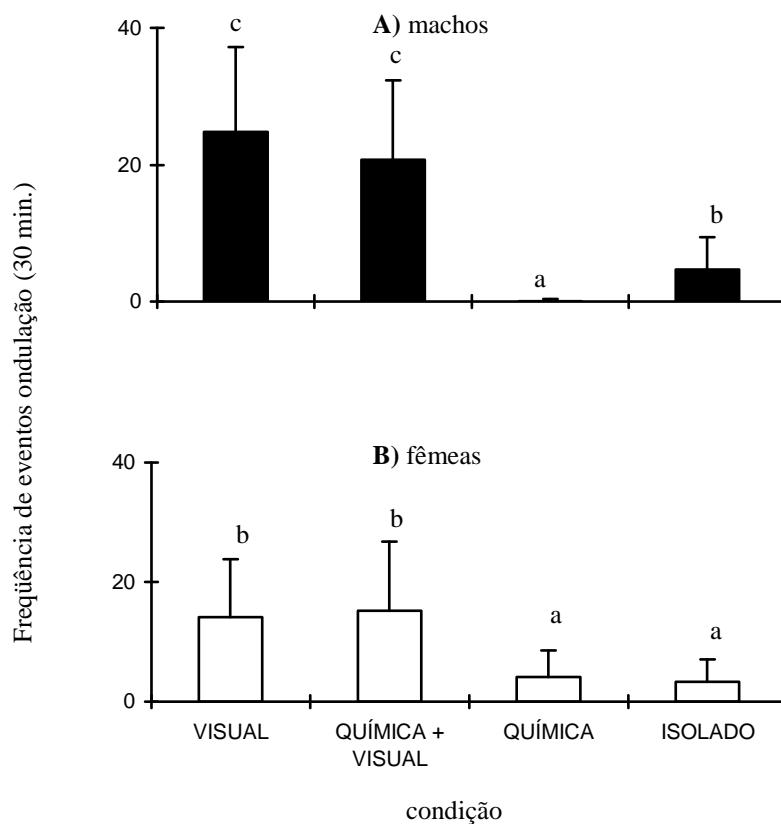


Figura 2. Frequência média (\pm desvio padrão) de eventos de ondulação dos machos (A) e fêmeas (B) nas quatro condições ($n=14$); letras distintas representam diferença estatística entre as condições (Kruskall-Wallis completado com Tukey).

Também não foi encontrada diferença na área dos ninhos construídos por machos (*one-way* ANOVA, $F_{(3,22)}=2,46$, $p=0,08$) e fêmeas (*one-way* ANOVA, $F_{(3,16)}=0,86$, $p=0,48$), entre as condições (Fig. 3C e 3D).

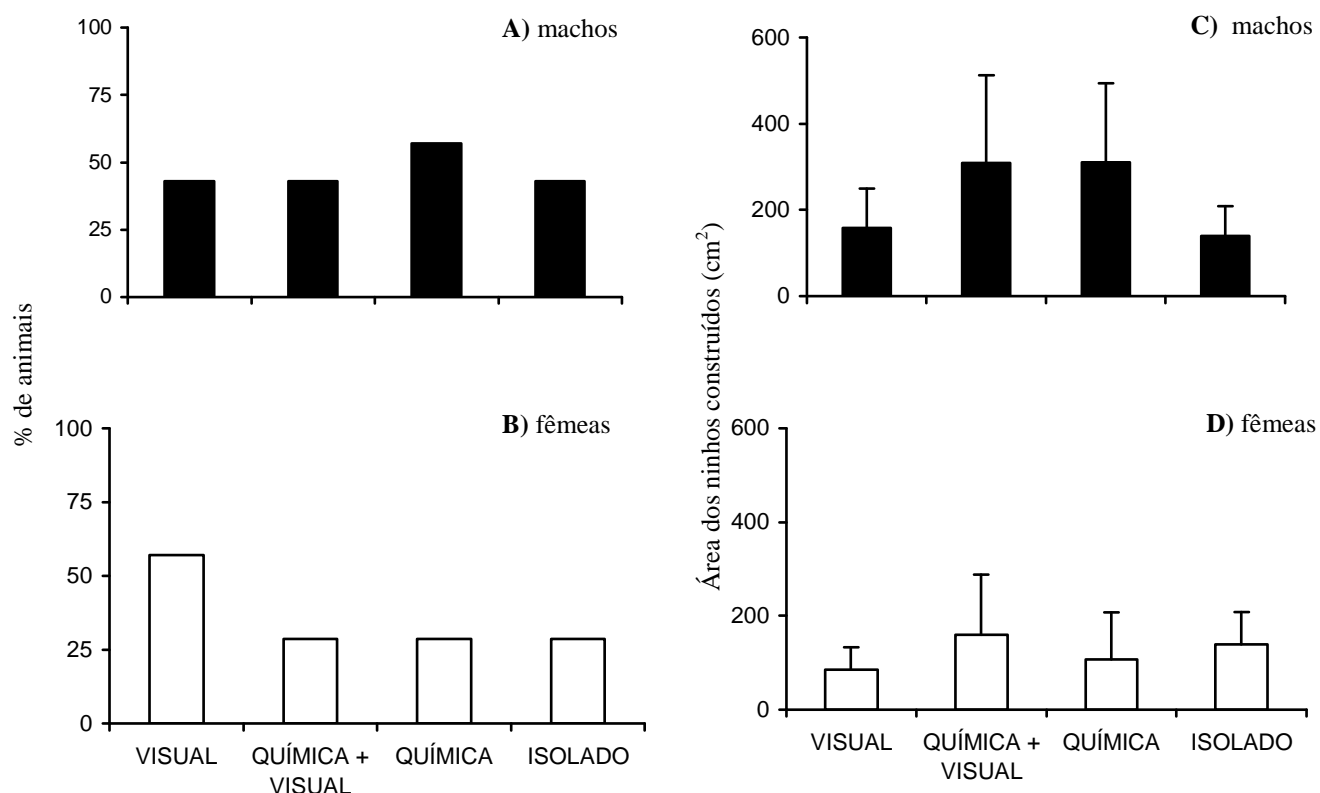


Figura 3. A e B - Porcentagem de animais que construíram ninhos (qui-quadrado para amostras múltiplas; $p>0,05$). C e D - média \pm desvio padrão da área dos ninhos construídos (*one-way* ANOVA, $p>0,05$).

Ocorreu desova em três réplicas nas condições V e QV. Uma das desovas foi constatada no quarto dia de experimento e as demais no último dia. Não foi confirmada a ocorrência de espermição pelos machos. Segundo Gonçalves (1993), após a desova e espermição há uma diminuição do IGS da

tilápia-do-Nilo. Por isso, o IGS dos machos e fêmeas das réplicas onde houve desova foram retirados das comparações de IGS.

Gônadas

Não houve diferença significativa no IGS dos machos e fêmeas entre as condições (*one-way* ANOVA; machos $F_{(3,46)}=2,04$, $p>0,12$ e fêmeas $F_{(3,46)}=1,16$, $p>0,33$). No entanto, quando separados os animais que construíram e não construíram ninho, foi encontrada diferença significativa no IGS dos machos (*two-way* ANOVA, $F_{(3,42)}=4,05$; $p<0,01$), figura 4A.

O IGS dos machos que não construíram ninho foi semelhante entre as condições ($p>0,46$). Dentro das condições, o IGS dos machos que construíram ninho foi maior do que os que não construíram apenas nas condições V e QV ($p<0,04$).

Entre as fêmeas que construíram e não construíram ninho, não foi encontrada diferença significativa no IGS, dentro de cada condição e entre elas (*two-way* ANOVA; $F_{(2,32)}=1,06$, $p=0,35$; Figura 4B). Como foram retirados o IGS das réplicas nas quais houve desova, a condição QV ficou com um número de fêmeas que construíram ninho ($n=1$) insuficiente para a análise estatística.

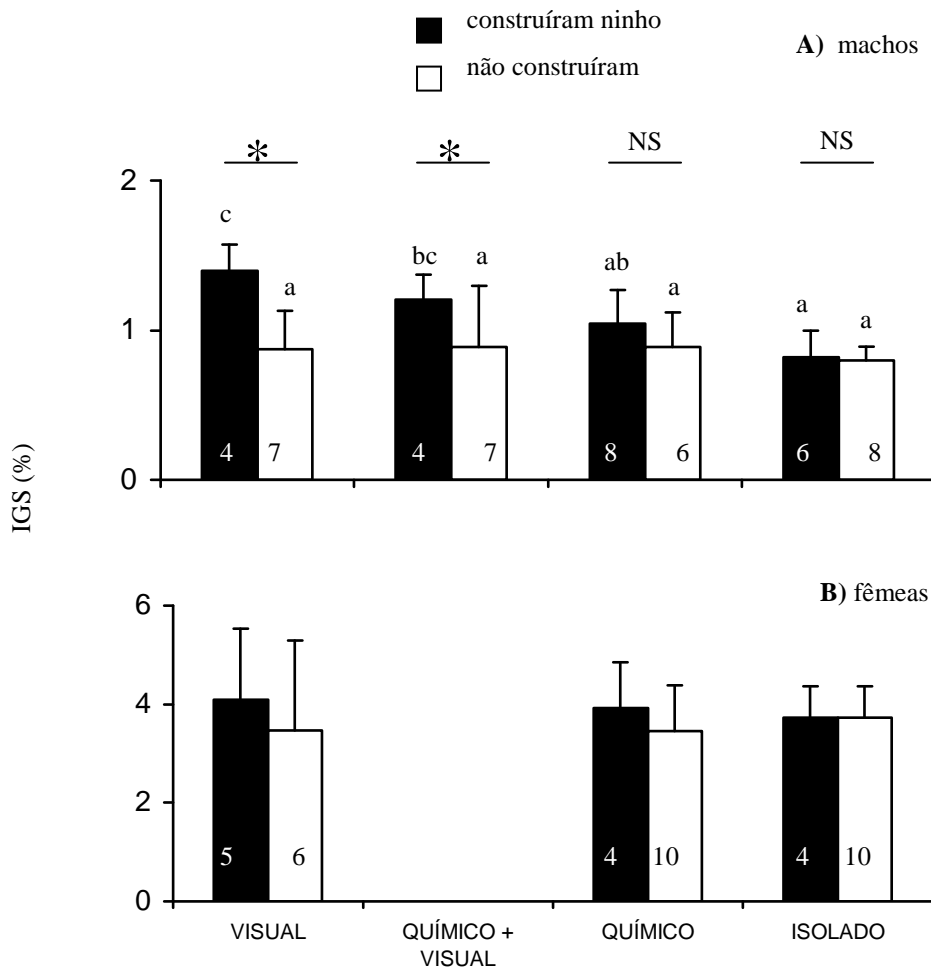


Figura 4. Média (\pm desvio padrão) do IGS de machos (A) e fêmeas (B) que construíram e não construíram ninho. Letras distintas representam diferenças entre as condições (*two-way* ANOVA completado com *LSD test*). As linhas sobre as barras comparam os animais dentro de cada condição. * = $p < 0,05$; NS = não significativo. Os números dentro das barras indicam o número de réplicas. Nas fêmeas, a condição QV apresentou número insuficiente de réplicas para análise estatística.

Análise Histológica

A análise histológica constatou que todas as gônadas analisadas estavam maduras e morfológicamente prontas para a reprodução, de acordo com os critérios utilizados por Babiker & Ibrahim (1979). Os testículos apresentaram diferentes estádios de células espermáticas, formando uma linha para o túbulo seminífero, repleto de espermatozóides livres (Fig. 5). Os ovários apresentaram ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento e grande número de ovócitos maduros grandes, com vitelogênese completa, observáveis tanto na estereoscopia (Fig 6), quanto na microscopia óptica (Fig. 7).

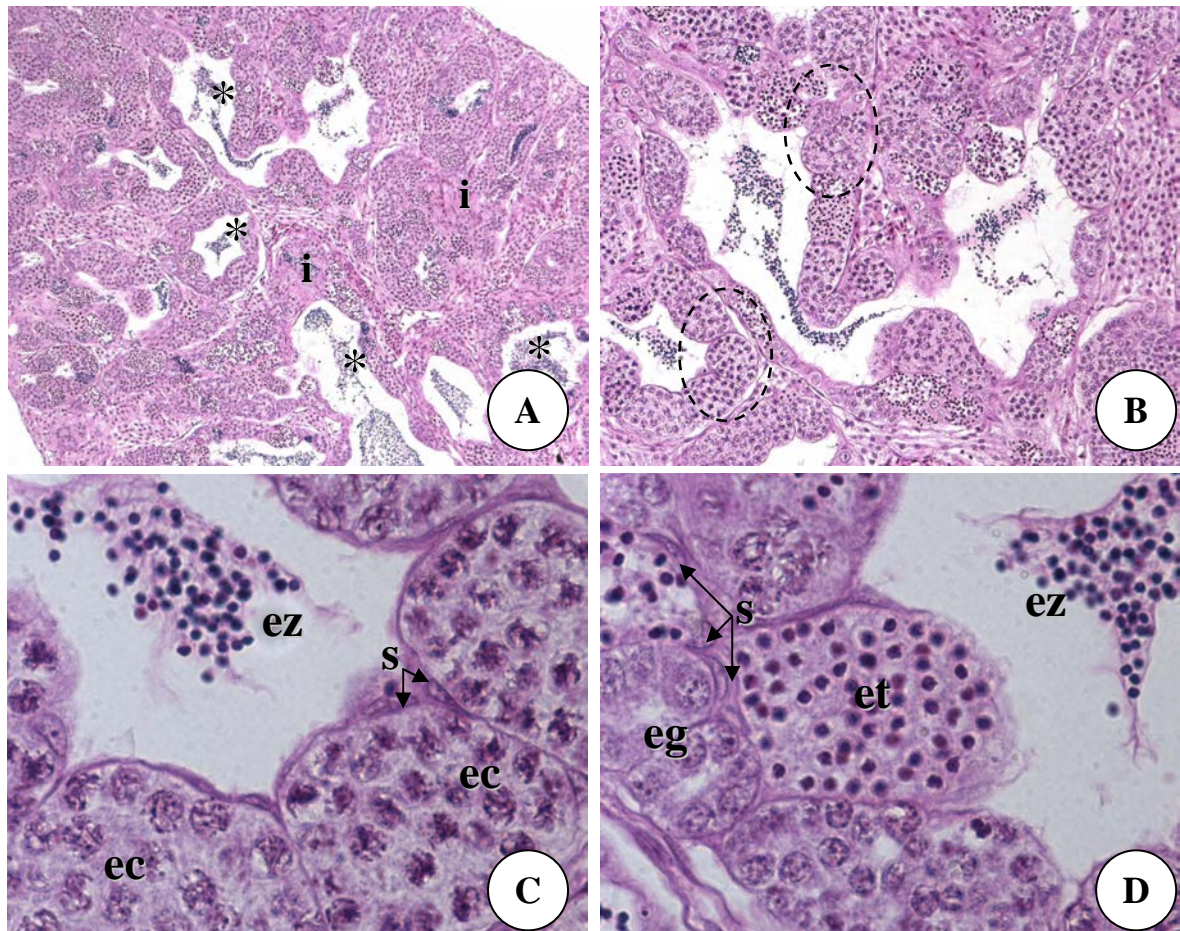


Figura 5. Secções transversais de testículo de *Oreochromis niloticus*. **A)** Aspecto geral dos túbulos seminíferos com células germinativas em diferentes estádios de diferenciação. Os túbulos com estádios de diferenciação mais adiantados estão repletos de espermatozóides (*), apresentando lume amplo; (i) regiões de tecido intersticial. **B)** Túbulo seminífero seccionado longitudinalmente, contendo todos os tipos celulares da espermatogênese e espermatozóides livres no lume. As linhas pontilhadas evidenciam a organização cística no interior dos túbulos. **C) e D)** Presença de células de Sertoli (s) e células germinativas: espermatogônias (eg), espermatócitos (ec), espermátides (et) e espermatozóides (ez).

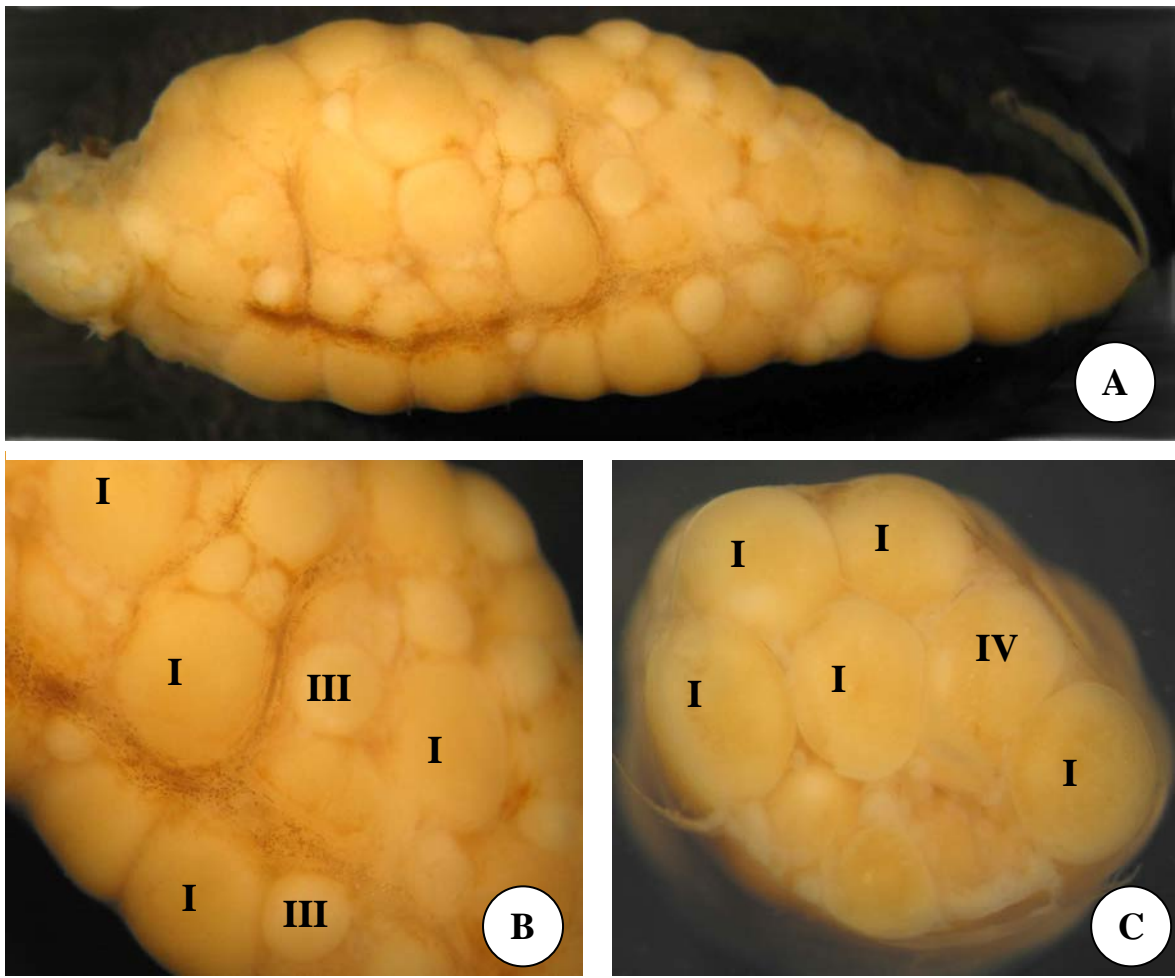


Figura 6. **A)** aspecto macroscópico de um ovário de *Oreochromis niloticus* apresentando ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento; região cranial voltada para a esquerda – 9x **B)** detalhe do ovário, mostrando ovócitos maduros (IV) ou vitelogênicos em fase final, com grande volume, contrastando com ovócitos menores (III) – 12x **C)** corte transversal do ovário mostrando grande concentração de ovócitos maduros (IV) – 14x.

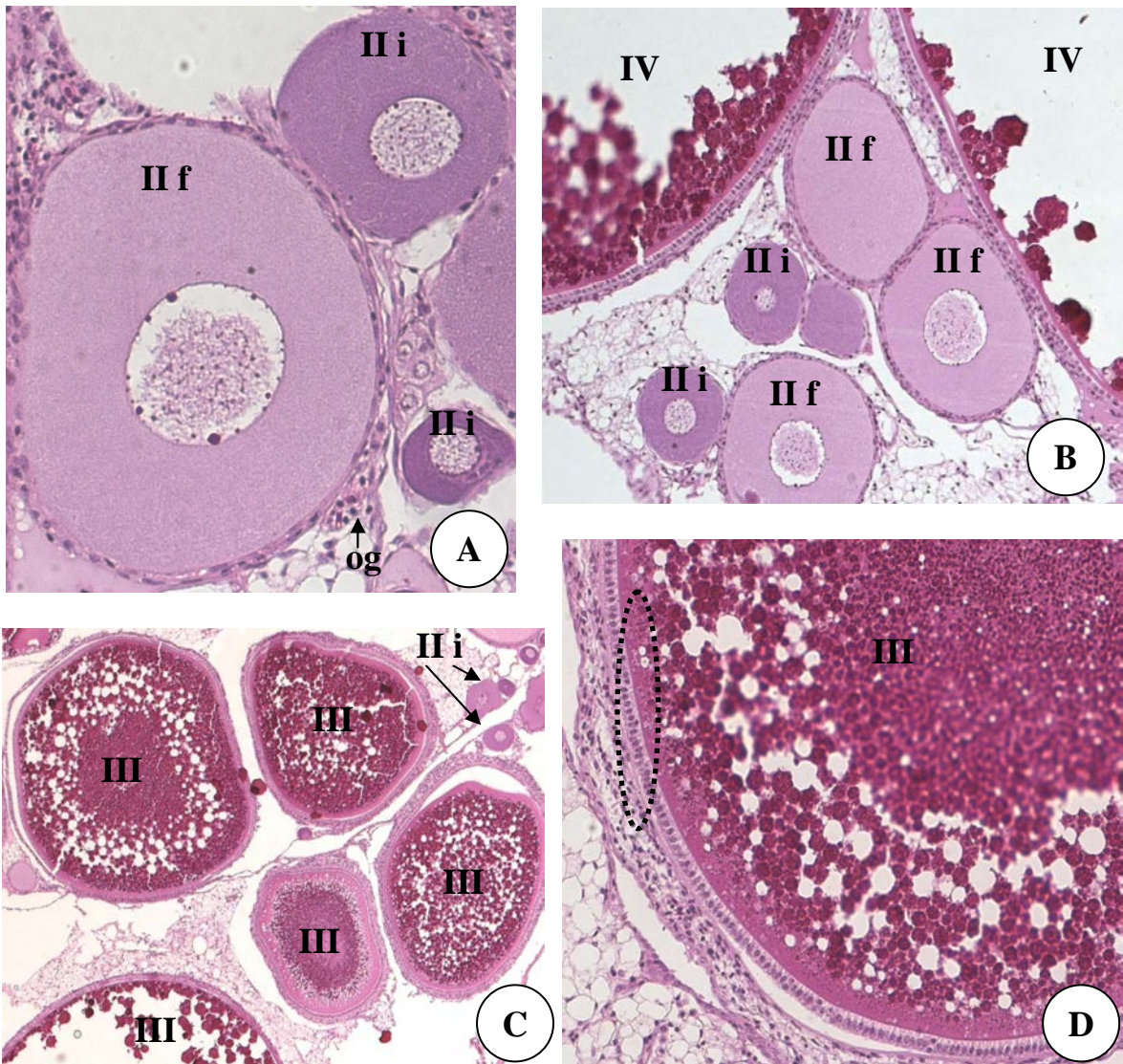


Figura 7. Secções transversais de ovário de *Oreochromis niloticus* mostrando as diferentes fases da ovogênese **A**) presença de ovogônias (og) e ovócitos na fase II (perinucleolar) inicial (II i) e final (II f) - 200x **B**) ovócitos na fase II e ovócitos vitelogênicos maduros (IV) - 100x **C**) ovócitos vitelogênicos na fase III (III) - 50x **D**) detalhe de um ovócito na fase III, repleto de grânulos de vitelo, com um envoltório folicular bem desenvolvido (linha pontilhada) - 200x.

DISCUSSÃO

Este estudo constatou que a comunicação visual entre parceiros sexuais afeta a corte em ambos os sexos, o IGS em machos e a desova em fêmeas, modulando o comportamento reprodutivo na tilápia-do-Nilo. Essa conclusão é sustentada pelos resultados referentes à frequência de ondulação em ambos os sexos, frequência de desova das fêmeas e IGS dos machos que construíram ninho.

A metodologia empregada mostrou-se adequada para testar as hipóteses propostas neste estudo. Os resultados do experimento 1 demonstraram que o isolamento não é suficiente para reduzir as gônadas na tilápia-do-Nilo, ao contrário do que é registrado para outras espécies de peixe (por exemplo *Tilapia zillii*, Coward *et al.*, 1998). Assim, o isolamento prévio não foi necessário para padronizar a condição reprodutiva dos peixes no início do segundo experimento.

Em todos os grupos do segundo experimento havia um fluxo de água no aquário imposto pelo filtro biológico. Porém, a velocidade do fluxo era maior nos aquários com comunicação química. Esse fato, no entanto, não afetou a resposta dos animais, pois, resultados semelhantes foram encontrados em condições com e sem comunicação química (Figs. 2 a 4).

A construção de ninhos por machos e fêmeas foi observada nas quatro condições (V, QV, Q e I) estudadas. Segundo Lowe-McConnell (1958), em ambiente natural apenas os machos dessa espécie constroem ninho. No

entanto, Gonçalves-de-Freitas & Nishida (1998) observaram que, depois de construído o ninho pelo macho dominante, a fêmea permanece no ninho retirando substrato com a boca, contribuindo para o aumento do tamanho final do ninho. O presente estudo demonstrou que a fêmea também é capaz de construir ninho, independentemente de estimulação social, já que animais isolados também construíram ninhos em frequência semelhante às outras condições (Fig. 3B). Isso pode refletir a plasticidade do comportamento reprodutivo da tilápia-do-Nilo, relatada por Duponchelle & Legendre (2001).

O comportamento ondulatório faz parte do repertório comportamental de ciclídeos, em contextos reprodutivos ou agonísticos (Baerends & Baerends van Roon, 1950). Na tilápia-do-Nilo, a ondulação corporal faz parte do comportamento pré-desova, tanto em fêmeas como em machos (Gonçalves-de-Freitas, & Nishida, 1998). Além disso, Gonçalves-de-Freitas (1999) observou que a frequência desse comportamento é aumentada pela presença de fêmeas. No presente estudo, esse comportamento também apareceu em animais isolados. Como esse comportamento faz parte da corte, é esperado que seja aumentado em virtude da percepção de um parceiro reprodutivamente ativo, o que foi verificado nas condições onde houve comunicação visual (V e QV). Nessas condições, a ondulação ocorreu frequentemente em direção ao peixe do sexo oposto, sustentando o efeito da comunicação visual na corte da tilápia-do-Nilo. A comunicação química não foi suficiente para aumentar a frequência da ondulação e, portanto, esse estímulo isoladamente não modula a corte na tilápia-do-Nilo.

O IGS é um bom indicador do estado funcional das gônadas (Babiker & Ibrahim, 1979), mas associado à análise histológica permite uma melhor avaliação da condição reprodutiva. No presente estudo, machos e fêmeas apresentaram as gônadas no mesmo estágio de maturação (maduros), com células em vários estádios de desenvolvimento (Figs. 5 a 7).

A construção de ninhos é um indicador de prontidão para a reprodução, pois, na natureza, o macho primeiro constrói o ninho e depois corteja fêmeas (MacBay, 1961). Por isso, avaliamos o IGS de 2 subgrupos (animais que construíram e não construíram ninho) dentro de cada condição, já que na comparação total não foi encontrada diferença significativa entre as condições. O resultado revelou que o contato visual com a fêmea (condições V e QV) afeta o IGS dos machos que construíram ninho (Fig.4). Como os animais estavam no mesmo estágio de maturação e a espermatogênese na tilápia-do-Nilo é contínua (Babiker & Ibrahim, 1979), o aumento do IGS pode refletir aumento na produção e volume de sêmen (Jalabert & Zohar, 1984). Fato análogo foi constatado em *Carassius auratus* (Kinguio) e *Cyprinus carpio* (carpa comum), no qual a natureza do estímulo é química (Dulka *et al.*, 1987; Stacey *et al.*, 1994). O aumento de sêmen nessas espécies é induzido pela exposição à pregnenolona liberada por fêmeas ovulando, fator que controla o comportamento sexual do macho (Stacey *et al.*, 1994). O aumento do IGS também pode significar um aumento nos níveis de andrógenos do macho (Yaron *et al.*, 1983) e a modulação desses hormônios por meio de estímulos visuais tem sido relatada para outros ciclídeos (Oliveira *et al.*, 1996;

Oliveira *et al.*, 2001). Em *Oreochromis mossambicus*, por exemplo, as interações macho-fêmea modulam os níveis de 11-ketotestosterona do macho (Borges *et al.*, 1998).

A comunicação química não afetou o IGS dos machos, sendo semelhante ao IGS do grupo isolado (Fig. 4). Apesar disso, não é possível descartar o efeito da estimulação química no comportamento da tilápia-do-Nilo, uma vez que essa espécie utiliza a comunicação química no reconhecimento da hierarquia de dominância (Giaquinto & Volpato, 1997). Além disso, os ciclídeos têm a capacidade de responder a uma série de compostos esteroidais (Robinson *et al.*, 1998). Souza *et al.* (1998), por exemplo, mostraram que machos de tilápia-do-Nilo perseguem fêmeas injetadas com pregnenolona. No entanto, não se sabe se a fêmea libera naturalmente feromônios esteroidais.

Os resultados indicaram que a comunicação química e/ou visual não têm efeito sobre o IGS das fêmeas (Fig. 4B). Porém, a comunicação visual teve efeito sobre a desova. Ainda que as desovas tenham ocorrido em baixa frequência nas condições V e QV, não houve desova nas demais condições (Q e I) indicando que o contato visual com o macho estimula o comportamento de desova na fêmea. No gênero *Oreochromis*, o contato da fêmea com machos territoriais ocorre no período próximo à maturação final dos ovócitos (Silverman, 1978 a). Assim, o estímulo visual do macho na tilápia-do-Nilo atuaria como um fator desencadeador da ovulação na fêmea, uma vez que a

desova ocorre poucas horas após a ovulação (Aronson, 1951, para *Tilapia macrocephala*).

Não há registro anterior de desova em fêmeas de *O. niloticus* sem contato com o macho. Porém, em outros ciclídeos como *Tilapia macrocephala* (Aronson, 1945), *Pterophyllum scalare* (Chien, 1973) e *O. mossambicus* (Silverman, 1978a) a desova ocorre em fêmeas isoladas por longos períodos (mínimo de 60 dias). Esses trabalhos indicam que, a longo prazo, as fêmeas de ciclídeos são capazes de desovar se as condições reprodutivas estiverem adequadas. Dessa forma, é possível que a desova não seja inibida nas demais condições para a tilápia-do-Nilo, mas que seja acelerada pela estimulação visual do macho.

A comunicação visual com o sexo oposto parece ser o principal fator na modulação do comportamento reprodutivo da tilápia-do-Nilo. Estímulos mecânicos também podem estar envolvidos já que ocorre contato físico entre macho e fêmea nas interações agressivas e reprodutivas. Mas, a importância dos estímulos visuais é sustentada pelo fato dessa espécie habitar águas claras (Lowe-McConnell, 1958), possuir visão desenvolvida (Fernald, 1984), mudar a coloração corporal durante a reprodução, ter hábito diurno e apresentar um padrão elaborado de corte (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998), fatores geralmente efetivos no processo de seleção sexual.

REFERÊNCIAS

- Afonso, L.O. B. & Lebouté, E.M. (1993) Métodos para sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus*. *Anais do IV Encontro Rio-Grandense de Técnicos em Aqüicultura*. Porto Alegre. pp. 100-103.
- Aronson, L.R. (1945) Influence of the stimulus provided by the male cichlid fish, *Tilapia macrocephala* on the spawning frequency of the female. *Physiological Zoology*, 18:403-415.
- Aronson, L.R. (1951) Factors influencing the spawning frequency in the female cichlid fish *Tilapia macrocephala*. *American Museum Novitates*, 1484:1-26.
- Babiker, M.M. & Ibrahim, H. (1979) Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. *Journal of Fish Biology*, 14:437-448.
- Baerends, G.P. & Baerends van Roon, J.M. (1950) An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes. *Behavior Suppl.* 1:1-243.
- Baroiller, J.F. Desprez, D., Carteret, Y., Tacon, P., Hoareau, M.C., Mélard, C. & Jalabert, B. (1997) Influence of environmental and social factors on the reproductive efficiency in three tilapia species, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* and the red tilapia (Red Florida strain). In *Proceedings of the fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture* (K. Filtzsimmons, ed.). Orlando, U.S.A., pp.158-252.
- Borges, A.R.; Oliveira, R.F.; Almada, V.C. & Canario, V.M. (1998) Short term modulation of 11-ketotestosterone levels in males of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* during male-female interactions. *Acta ethologica*, 1(1-2):43-48.
- Chien, A.K. (1973) Reproductive behaviour of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae) II. Influence of male stimuli upon the spawning rate of females. *Animal Behaviour*, 21:457-463.

- Coward, K.; Bromage, N.R. & Little, D.C. (1998) Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate-spawning *Tilapia zillii*. *Journal of Fish Biology* 52:152-165.
- Crews, D. (1998) The evolutionary antecedents to love. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8):751-764.
- Dulka, J.G.; Stacey, N.E.; Sorensen, P.W. & Van der Kraak, G.J. (1987) A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature*, 325:251-253.
- Duponchelle, F. & Legendre, M. (2001) Rapid phenotypic changes of reproductive traits in response to experimental modifications of spatial structure in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Living Resources*, 14:145-152.
- Eaton, R.C. & Farley, R.D. (1974) Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia* 1: 195-204.
- Fernald, R.D. (1984) Vision and behavior in an african cichlid fish. *American Scientist*. 72:58-65.
- Francis, R.C.; Soma, K; Fernald, R.D. (1993) Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7794-7798.
- Giaquinto, P.C. & Volpato, G.L. (1997) Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiol.Behav.*, 62: 1333-1338.
- Gonçalves, E. (1993) Estratégias territoriais e reprodutivas da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, SP. 147 p.
- Gonçalves-de-Freitas, E. (1999) Investimento reprodutivo e crescimento em machos de tilápia-do-Nilo. *Tese de doutorado*. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, SP. 49p.
- Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S.M. (1998) Sneaking behaviour of the Nile tilapia. *Boletim Técnico do CEPTA*, 11:71-79.

- Jalabert, B. & Zoar, Y. (1984) Reproductive physiology in cichlid fishes, with particular reference to *Tilapia* and *Sarotherodon*. In *The Biology and Culture of Tilapias* (R.S.V. Pullin & Lowe-McConnell eds.). Manila, the Philippines. ICLARM, pp. 129-139.
- Kramer, D.L. (1972) The role of androgens in the parental behavior of the blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pisces, Belontiidae). *Animal Behaviour* 20:798-807.
- Liley, N.R. (1982) Chemical communication in Fish. *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Sciences*, 39:22-35.
- Liley, N.R.; Stacey, N.E. (1983) Hormones, pheromones and reproductive behavior in fish. In *Fish Physiology*, Volume IXB, Behavior and Fertility Control. (W. S. Hoar; D. J. Randall & E. M. Donaldson, eds). Academic Press, New York. pp. 1-63.
- Little, D.C.; Coward, K.; Bhujel, R.C.; Pham, T.A. & Bromage, N.R. (2000) Effect of broodfish exchange strategy on the spawning performance and sex steroid hormone levels of *Oreochromis niloticus* broodfish in hapas. *Aquaculture*, 186:77-88.
- Lowe-McConnell, M. (1958) Breeding behaviour patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 132:1-31.
- Macbay, L. G. (1961) The biology of *Tilapia nilotica* Linnaeus. *Proc. Conf. Southeast Assoc. Game Fish Comm.*, 15:208-218.
- Marshall, J.A. (1972) Influence of male sound production on oviposition in female *Tilapia mossambica* (Pisces, Cichlidae). *Bull. Ecol. Soc.*, 53:29.
- Myrberg, A.A.J.; Kramer, E. & Heinecke, P. (1965) Sound production by Cichlid Fishes. *Science*, 149:555-558.
- Oliveira, R.F.; Almada, V.C. & Canario, A.V.M. (1996) Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Hormones and Behavior*, 30:2-12.

- Oliveira, R.F.; Hirschenhauser, K.; Carneiro & Canario, A.V.M. (2002) Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132:201-215.
- Oliveira, R.F.; Lopes, M.; Carneiro, L.A. & Canario, A.V.M. (2001) Watching fights raises fish hormone levels. *Nature*, 409:475.
- Robinson, R.R.; Fernald, R.D & Stacey, N.E. (1998) The olfactory system of a cichlid fish responds to steroidal compounds. *Journal of Fish Biology*, 53:226-229.
- Satou, M.; Takeuchi, H.; Takei, K.; Hasegawa, T.; Okumoto, N & Ueda, K. (1987) Involvement of vibrational and visual cues in eliciting spawning behaviour in male himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *Animal Behaviour*, 35:1556-1558.
- Silverman, H. I. (1978a) Effects of different levels of sensory contact upon reproductive activity of adult male and female *Sarotherodon* (Tilapia) *mossambicus* (Peters); Pisces:Cichlidae. *Animal Behaviour*, 26:1081-1090.
- Silverman, H. I. (1978b) Changes in male courting frequency in pairs of the cichlid fish, *Sarotherodon* (Tilapia) *mossambicus* with unlimited or with only visual contact. *Behavioral Biology*, 23:189-196.
- Souza, S.M.G.; Lucion, A.B. & Wassermann, G.F. (1998) G.F. Influence of 17 α 20 β -hidroxy-4-pregnen-3-one injected into a post-ovulatory female on the reproductive behavior of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A:759-763.
- Stacey, N.E. (1984) Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In *Fish Reproduction, Strategies and Tactics*, Potts, G.W & Wootton (eds). Academic Press, London, pp. 207-222.
- Stacey, N.; Zheng, W. & Cardwell, J. (1994) Milt production in common carp (*Cyprinus carpio*): stimulation by a goldfish steroid pheromone. *Aquaculture*, 127:265-276.

- Volpato, G.L. (2001) *Ciência: da filosofia à publicação*. 3 ed. Jaboticabal. Funep. 216p.
- Volpato, G. L. & Barreto, R.E. Environmental blue light prevents stress in the Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34:1041-1045.
- Yaron, Z.; Ilan, Z.; Bogolnaya, A. & Vermaak, J.F. Steroid hormones in two Tilapia species: *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. *Annals of International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, Israel, pp. 41-42, 1983.
- Zar, J. (1999) *Biostatistical Analysis*. 4 th edn. New Jersey: Prentice Hall.