

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

NINHO OU ESCONDERIJO?

FUNÇÃO DA ESCAVAÇÃO DE SUBSTRATO EM CICLÍDEOS

Fernanda Pereira Corbeira da Silva

Botucatu – SP

2015

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

NINHO OU ESCONDERIJO?

FUNÇÃO DA ESCAVAÇÃO DE SUBSTRATO EM CICLÍDEOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aluna: Fernanda Pereira Corbeira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato

Botucatu – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Fernanda Pereira Corbeira da.

Ninho ou esconderijo? Função da escavação do substrato
em ciclídeos / Fernanda Pereira Corbeira da Silva. -
Botucatu, 2015

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

Orientador: Gilson Luiz Volpato

Capes: 20404000

1. Peixe - Reprodução. 2. Peixe - Ninhos. 3. Tilápia-
do-Nilo - Comportamento. 4. Peixe - Alimentação. 5. Peixe
- Genética.

Palavras-chave: escavação; ninho; peixes; refúgio.

Ao meu filho, Leonardo, minha maior
razão para fazer o melhor que posso.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Gilson, por seu empenho constante em minha formação como cientista (até a último momento desta tese) e por compreender minha ausência durante o começo da maternidade.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio constante, pelo convívio agradável e construtivo que me fez crescer ao longo do tempo e das experiências que tivemos.

A esta universidade, pela oportunidade de cursar o doutorado e pelo suporte necessário para isso. A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos demais, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Sumário

<i>Estudo 1: A escavação é exclusivamente para a reprodução?</i>	1
Resumo	2
Introdução	2
Material & Métodos	3
Resultados	3
Discussão	5
Agradecimentos	6
Referências	6
Apêndice	8
<i>Estudo 2: Peixes com fome escavam mais?</i>	9
Resumo	10
Introdução	10
Material & Métodos	10
a) Peixes e condições de alojamento	10
b) Delineamento	11
c) Procedimentos específicos	12
d) Análise dos dados	13
Resultados	13
Discussão	16
Referências	18
<i>Estudo 3: Ninho ou esconderijo?</i>	19
Resumo	20
Introdução	20
Material & Métodos	21
a) Peixes e condições de alojamento	21
b) Delineamento	21
c) Procedimentos específicos	22
d) Análise dos dados	24
Resultados	25
Discussão	29
Referências	30

Resumo

Atualmente, a função das depressões que machos de muitas espécies de ciclídeos escavam no substrato é para atração de fêmeas para a reprodução. Assim, tais depressões têm sido consideradas um fenótipo estendido dos machos, ou seja, representam um carácter a mais, pelo qual a fêmea pode escolher o melhor macho. Assim, é esperado que somente os machos escavem e, sobretudo, em contextos reprodutivos. No entanto, em nosso estudo 1 vimos que tanto machos quanto fêmeas sexualmente imaturos já escavam essas depressões e que esse comportamento surge também na ausência da interação com coespecíficos e num período restrito da ontogenia. Isso ocorreu tanto para a domesticada tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) quanto para o selvagem cará (*Geophagus brasiliensis*). Isso sugere que o comportamento de escavar tenha uma forte determinação genética e outra função biológica relevante além da reprodução. No estudo 2, investigamos na tilápia-do-Nilo se essa outra função poderia ser a busca por alimento, uma vez que os padrões motores na escavação e no forrageamento do substrato são semelhantes. Contudo, vimos que a resposta de peixes com fome não satisfaz as predições dessa hipótese. A fome do peixe não influenciou a frequência com que machos e fêmeas escavaram e nem o tamanho de suas escavações. Finalmente, no estudo 3 mostramos que as escavações de machos e fêmeas servem como refúgio, pois suas características permitem que os peixes se escondam dentro delas, a presença de uma toca no aquário reduz drasticamente a frequência de escavação, as escavações são posicionadas mais distantes de áreas abertas (perigo) e os peixes ficam dentro das escavações durante período de inatividade noturna. Isso indica que as escavações podem ter função de abrigo para evitar perigos potenciais.

A ciência não progride quando os modelos são confirmados pela investigação, mas quando certas anomalias forçam os cientistas a questioná-los.

(Rubem Alves, “Filosofia da Ciência: introdução ao jogo e suas regras”, 1981)

Estudo 1:

A escavação é exclusivamente para a reprodução?

Resumo

Atualmente aceita-se que as escavações de muitos ciclídeos poligínicos sejam feitas por machos sexualmente maduros para atrair fêmeas. Entretanto, aqui mostramos que: (1) machos e fêmeas sexualmente imaturos já escavam essas depressões no substrato e (2) o surgimento do comportamento de escavação independe da interação com coespecíficos, mas surge em período específico do desenvolvimento, aparentemente sendo um comportamento inato. Esses achados foram similares para a domesticada tilápia-do-Nilo e para o selvagem cará. Assim, tais escavações possivelmente possuam outra função biológica além da atração de parceiros sexuais.

Introdução

Muitas espécies de peixes escavam depressões no substrato. Em espécies poligínicas que formam arenas de exibição, como a amplamente conhecida tilápia-do-Nilo, os machos escavam para atrair fêmeas para a reprodução (Lowe-McConnell 1958), sendo as escavações chamadas de ninho. A interação visual com fêmeas estimula o macho a escavar (Gonçalves-de-Freitas & Nishida 1998) e as fêmeas visitam mais frequentemente as maiores escavações (Mackaye *et al.* 1990). Os machos maiores têm prioridade para escavação e produzem escavações de maior tamanho (Kvarnemo 1995). Além disso, o investimento do macho na construção do ninho é a pista mais importante para a escolha sexual da fêmea (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas 2008). De fato, tais escavações têm sido propostas como um fenótipo estendido dos machos (Schaedelin & Taborsky 2006, York *et al.* 2015). Isso é aceitável em espécies poligínicas, nas quais os machos atraem o máximo de fêmeas que conseguem, e as fêmeas escolhem os melhores machos (Alcock 2011). Entretanto, há registro de fêmeas escavando depressões quando socialmente isoladas (Castro *et al.* 2009) ou, num contexto reprodutivo, limpando as depressões escavadas pelos machos (Gonçalves-de-Freitas & Nishida 1998).

Assim, neste estudo acompanhamos o desenvolvimento ontogenético do comportamento de escavar de dois ciclídeos: a espécie domesticada tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, e a espécie selvagem cará, *Geophagus brasiliensis*.

Dessas observações obtivemos fortes indícios de que esse comportamento deve ter ao menos outra função além de sua participação no contexto reprodutivo.

Material & Métodos

Após reprodução espontânea em laboratório, separamos as larvas dos pais quando iniciaram a natação-livre e as mantivemos em aquários 50 L sem substrato por 40 dias. Seleccionamos os peixes maiores, por apresentarem maior chance de sobrevivência, e isolamos cada um num aquário (3 L) com substrato (camada de areia de 2 cm; Ø do maior grão $\cong$ 1 mm). A temperatura da água foi de $26,9 \pm 0,21$ °C, pH = $7,16 \pm 0,08$, nitrito = $0,20$ ppm $\pm 0,20$ e amônia = $0,003 \pm 0,001$ ppm.

Observamos diariamente cada peixe até detectarmos sua primeira escavação (Figura 1). Em até 3 dias, medimos o tamanho do peixe e da escavação e os eutanasiámos com benzocaína (~320 mg/L) para determinação do sexo e estágio macroscópico de maturação gonadal (segundo metodologia de Vazzoler 1996, Apêndice 1).

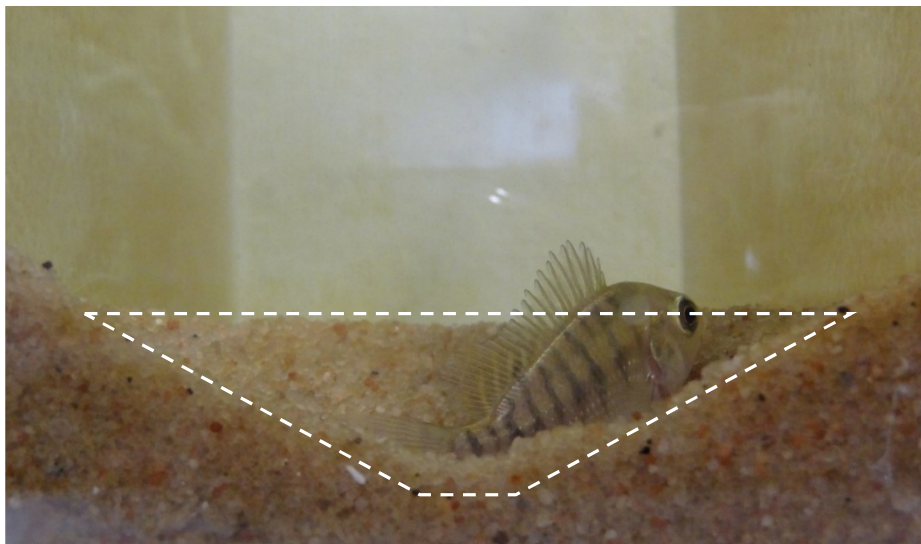


Figura 1. Uma tilápia-do-Nilo jovem dentro da sua escavação.
A linha pontilhada indica os limites internos da depressão.

Resultados

O comportamento de escavar surgiu na 22^a semana para *G. brasiliensis* e na 24^a semana para *O. niloticus* (Figura 2). A distribuição do surgimento desse

comportamento, entretanto, coincidiu para as duas espécies, terminando na 26ª semana. Além disso, gônadas maduras não foram necessárias para a escavação em ambas as espécies (Figura 2 – quadro em detalhe). O comprimento-padrão dos peixes no surgimento da escavação foi $5,05 \text{ cm} \pm 0,44 \text{ cm}$ (*O. niloticus*) e $3,06 \text{ cm} \pm 0,41 \text{ cm}$ (*G. brasiliensis*).

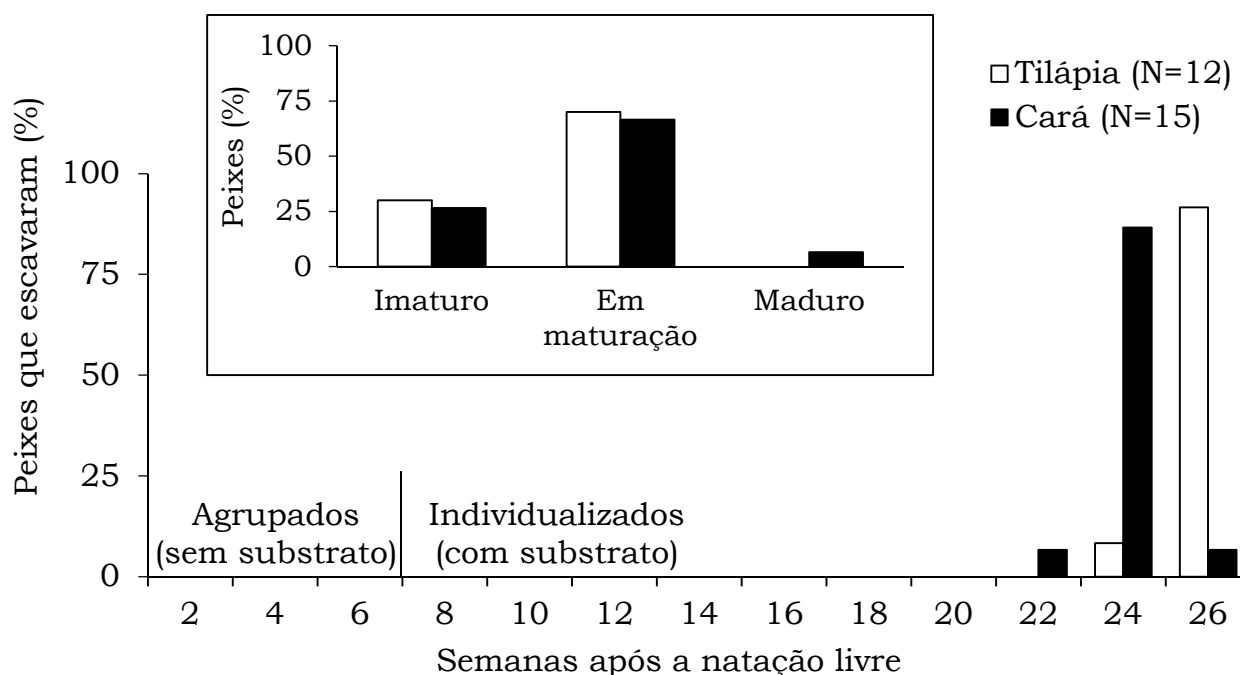


Figura 2. Período de ocorrência da primeira escavação.

Percentual de peixes que escavaram ao longo de 26 semanas de observações diárias. No quadro em detalhe, percentual de peixe em cada estágio de maturação gonadal.

Com o selecionamos as maiores larvas para este estudo, a amostra ficou enviesada com maior número de machos: 2 fêmeas e 8 machos de *O. niloticus* (2 peixes não foram sexados) e 1 fêmea e 14 machos de *G. brasiliensis*. Apesar disso, essas fêmeas iniciaram o comportamento de escavação no mesmo período que os machos. Após o surgimento da primeira escavação, 1 fêmea de tilápia estava imatura e a outra em maturação; a fêmea do cará estava em maturação.

O diâmetro da borda da escavação foi $2,1 \pm 0,46$ vezes maior que o comprimento-padrão de *O. niloticus* e $2,01 \pm 0,38$ vezes maior que o comprimento-padrão de *G. brasiliensis*. O menor peixe a escavar tinha ~2 mm de abertura de boca. Ou seja, no momento da primeira escavação, a abertura de boca dos peixes era, pelo menos, duas vezes maior que a partícula de areia.

Discussão

O ideia de que em muitos ciclídeos o comportamento de escavar é um fenótipo estendido do macho, pelo qual os machos atraem fêmeas, se coaduna com o fato dos machos escavem no período reprodutivo. Porém, aqui detectamos que os machos também escavam fora do período e do contexto reprodutivo e que a escavação é também feita por fêmeas. O comportamento de escavar surge num período restrito do desenvolvimento desses animais, independentemente se é espécie domesticada (*Oreochromis niloticus*) ou selvagem (*Geophagus brasiliensis*). Assim, sugerimos que fatores genéticos possam estar determinando o surgimento do comportamento de escavar nesses ciclídeos e que esse comportamento tenha também função não reprodutiva.

A participação de fêmeas maduras na escavação iniciada por machos já foi relatada para *O. niloticus* (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Mais tarde, Castro *et al.* (2009) relataram que fêmeas adultas isoladas escavam, sem requerer interação com machos, o que foi atribuído à ausência de componentes estruturais no ambiente. Nós reforçamos que fêmeas escavam, mas mostramos que a maturidade sexual não é necessária nem para as fêmeas e nem para os machos escavarem. Além disso, a frequência de fêmeas que escavam pode ser ainda maior que a reportada aqui, pois nossa amostragem favoreceu os machos.

A clara concentração do surgimento da escavação entre a 22^a e a 26^a semanas sugere uma programação na ontogenia. A experiência trazida pela interação com o substrato, bem como a limitação do tamanho dos grãos de areia em relação ao tamanho da boca dos peixes poderiam ser fatores não genéticos envolvidos. Porém, não detectamos quaisquer prenúncios de escavação antes da 22^a semana. A primeira escavação detectada já era maior que o peixe, mostrando que o comportamento surge em sua totalidade na primeira vez. Como nessa fase a boca dos peixes era, ao menos, duas vezes maior que o diâmetro do grão de areia, é plausível que eles já pudessem manipular o substrato em semanas anteriores. Mais ainda, a tilápia tem sido domesticada no Brasil há mais de 40 anos e seu padrão de escavação foi muito similar ao da espécie nativa selvagem, sendo ambas pertencentes a diferentes gêneros. Assim, a conclusão mais parcimoniosa é que a escavação seja um comportamento inato desses animais.

Portanto, a função biológica do comportamento de escavar parece se estender além do contexto reprodutivo. Uma possibilidade é que as escavações decorram do forrageamento no substrato ou que sejam usadas como refúgio.

Agradecimentos

Nós agradecemos Daniela José de Oliveira e Mario Luis Orsi pela ajuda na identificação do sexo e estágio de maturação gonadal dos peixes.

Referências

- Alcock J (2009) Animal behavior: an evolutionary approach. 9th Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland-MA, USA.
- Castro ALS, Gonçalves-de-Freitas E, Volpato GL & Oliveira C (2009) Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) Brazilian Journal of Medical and Biological Research 42(4): 368-374.
- Gonçalves-de-Freitas E & Nishida SM (1998) Sneaking behavior of the Nile tilapia. Boletim Técnico Cept 11: 71-79.
- Kvarnemo C (1995) Size-assortative nest choice in the absence of competition in males of the sandy goby, *Pomatoschistus minutus*. Environmental Biology of Fishes 43: 233-239.
- Lowe-McConnell RH (1958) Breeding behavior patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). Proceedings of the Zoological Society of London 132: 1-31.
- McKaye KR, Louda SM & Stauffer JR (1990) Bower size and male reproductive success in a cichlid fish lek. The American Naturalist 135(5): 597-613.
- Mendonça FZ & Gonçalves-de-Freitas E (2008) Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei: Cichlidae). Revista Brasileira de Zoologia 25(3): 413-418.

- Schaedelin FC & Taborsky M (2006) Mating craters of *Cyathopharynx furcifer* (Cichlidae) are individually specific, extended phenotypes. *Animal Behaviour* 72: 753-761.
- Vazzoler A E A M (1996) *Biologia da reprodução de teleósteos: teoria e prática*. EDUEM: 169p.
- York RA, Patil C, Hulsey D, Anoruo O, Streelman JT & Fernald RD (2015) Evolution of bower building in Lake Malawi cichlid fish: phylogeny, morphology, and behavior. *Frontiers in Ecology and Evolution* 3: 1-13.

Apêndice

Estágios de maturação gonadal (extraído na íntegra do livro de Vazzoler 1996).

Imaturo. Os ovários são filiformes, translúcidos, de tamanho muito reduzido, colocados bem junto da parede dorsal, ocupando menos de 1/3 da cavidade celomática, sem sinais de vascularização, com ovidutos longos, não se observando ovócitos a vista desarmada. Os testículos são reduzidos, filiformes, translúcidos, com posição semelhante à dos ovários.

Em maturação. Os ovários ocupam cerca de 1/3 a 2/3 da cavidade celomática, têm oviduto mais curto, exibindo intensa rede capilar; a vista desarmada observam-se grânulos opacos (ovócitos) pequenos e médios. Os testículos apresentam-se desenvolvidos, com forma lobulada, e sua membrana rompe-se sob certa pressão, eliminando esperma leitoso, viscoso.

Maduro. Ovários ocupando quase toda a cavidade celomática, túrgidos, e a olho nu observam-se ovócitos grandes, opacos e/ou translúcidos, cuja frequência varia com o progresso da maturação; os ovidutos encontram-se ocupados pelos ovócitos. Testículos apresentam-se túrgidos, esbranquiçados, ocupando parte da cavidade celomática; com fraca pressão rompe-se sua membrana, fluindo esperma menos viscoso que no estágio anterior.

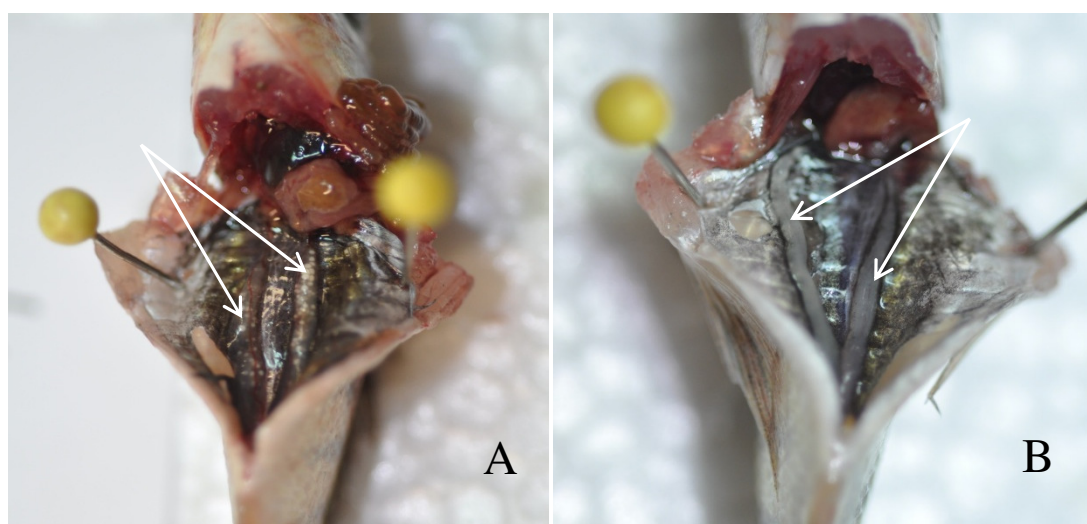


Figura A1. Aparência macroscópica de ovários (A) e testículos (B) de tilápia-do-Nilo em maturação. Dados de uma fêmea e um macho com 5,2 e 5,0 cm de comprimento padrão, ambos na 24ª semana após início da natação livre.

Estudo 2:

Peixes com fome escavam mais?

Resumo

Aqui testamos se a fome do peixe afeta o comportamento de escavar. Para isso, submetemos adultos de tilápia-do-Nilo a uma das 3 condições: saciado, em jejum leve e em jejum moderado. Não houve efeito da fome na frequência ou tamanho das escavações. Mas os peixes que ficaram em jejum mais severo demoraram para escavar.

Introdução

A tilápia-do-Nilo é um dos muitos ciclídeos que revolvem o substrato de fundo em busca de detritos dos quais se alimenta (Oso *et al.* 2006). Para forragear no substrato, os peixes abocanham uma porção dele e cospem o que não for alimento. Para escavar o substrato para construção de ninhos, as tilápias também abocanham e cospem o substrato (Galhardo *et al.* 2008). Assim, essa semelhança motora entre os comportamentos de forrageio e de escavar sugere que uma das funções da escavação seja para alimentação. Assim, investigamos o pressuposto básico de que peixes com mais fome escavariam mais. Embora essa função da escavação possa ser atribuída para o gênero *Geophagus* (do grego, *gea* = terra e *phagein* = comer), numa tentativa de generalização um pouco maior, investigamos se ela também se aplica a outro ciclídeo, a tilápia-do-Nilo. Ressaltamos que na tilápia a função da escavação (formando depressões evidentes) não tem sido atribuída à alimentação, mas à reprodução.

Material & Métodos

a) Peixes e condições de alojamento

Adultos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram mantidos em grupos mistos de machos e fêmeas em tanques internos (~1 peixe 5 L⁻¹). A fotofase era das 07:00 h às 19:00 h, por meio de luz branca fluorescente (~350 Lux). A água foi mantida com aeração constante, temperatura ~26°C, pH ~6,6, amônia total <0.02 mg L⁻¹ e nitrito <0.2 mg L⁻¹. Os peixes eram alimentados uma vez ao dia com ração comercial. Os tanques não possuíam substrato de fundo.

b) Delineamento

No 1º dia, os peixes foram socialmente isolados em aquários (40 x 20 x 20 cm) sem substrato de fundo e supridos com 1 filtro biológico. No 2º dia, todos receberam alimento em excesso (quantidade de ração equivalente a 5% de seu peso vivo) e confirmamos que todos ingeriram a taxas similares ($2,09 \pm 1,02$; $2,12 \pm 0,68$ e $2,04 \pm 0,56$; Kruskal-Wallis, $p = 0,713$). No 3º dia, os animais permaneceram nos mesmos aquários e foram aleatoriamente incluídos num dos seguintes tratamento alimentares (Figura 1): saciados, que receberam ração 4 vezes ao dia (08:30 h, 11:30 h, 14:30 h e 17:30 h); jejum+, que permaneceram em jejum por 24 h; ou jejum++, que permaneceram em jejum de 48 h. No 4º dia, os peixes foram transferidos para os aquários (60 x 40 x 40 cm) com substrato de pedra (~3 mm diâmetro), mantendo cada um no respectivo tratamento alimentar até o fim do 5º dia. Assim, o jejum dos peixes com restrição alimentar foi se intensificando com o passar do tempo. No 4º e no 5º dias observamos todos os aquários 4 vezes por dia (nos horários referidos acima) para registrarmos a ocorrência de escavações. Após a última observação do 5º dia, oferecemos 5% do peso vivo em ração para todos os peixes e, em seguida, registramos as dimensões das escavações, a biometria, o sexo e a cor do olho (estresse) dos peixes, além da qualidade da água.

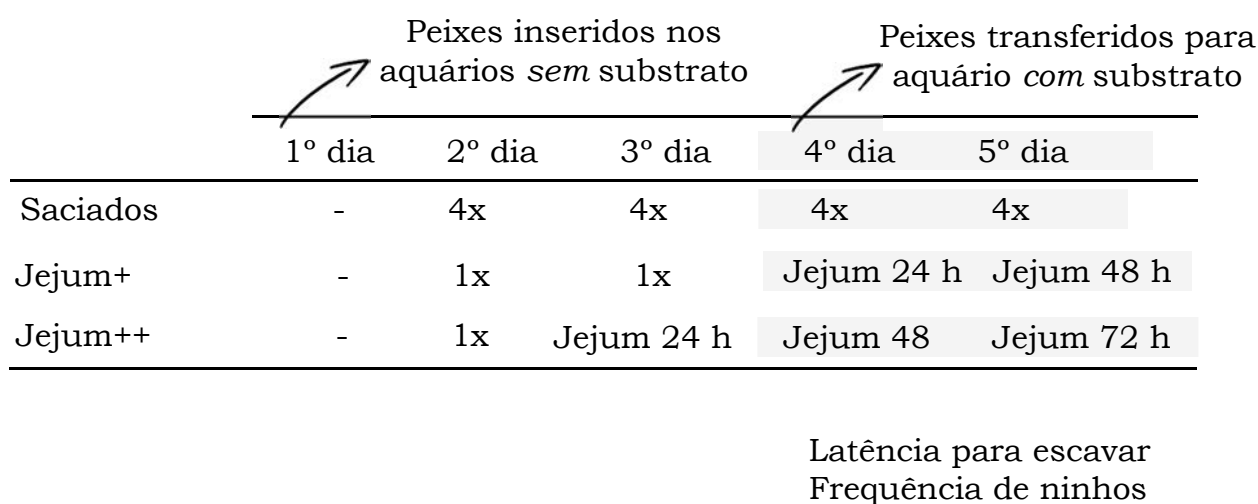


Figura 1. Esquema do delineamento experimental.

Analizamos 45 peixes nos tratamentos saciado e jejum++ e 29 no tratamento jejum+. O comprimento padrão e o peso desses animais, bem como as proporções entre os sexos, não diferiram entre os tratamentos (Tabela 1).

c) Procedimentos específicos

Escavação. Consideramos escavação as depressões circulares ou ovais presentes no substrato, de tamanho próximo ao do peixe ou maior que este.

Tamanho da escavação. Após as observações, medíamos o maior diâmetro ao nível da borda e a altura das escavações (do ponto mais profundo à borda).

Medidas dos peixes. Após a última observação, medimos o comprimento-padrão e o peso dos peixes. O sexo foi determinado instilando sobre o poro genital do peixe o corante azul de metileno, que evidencia a abertura do oviduto, indicando ser fêmea (Afonso & Lebouté 1993, Carvalho & Gonçalves-de-Freitas 2008). Esses dados não diferiram entre tratamentos (Tabela 1). A cor do olho (estresse) foi medida de acordo com Freitas *et al.* (2014).

Qualidade da água. A qualidade da água dos aquários foi medida ao final das observações e não foi diferente entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1: Biometria e sexo dos animais do estudo

<i>Tratamento</i>	¹ <i>Peso (g)</i>	¹ <i>Comprimento-padrão (cm)</i>	² <i>Sexo</i>
Saciado	21,52 ± 3,35	8,56 ± 0,40	20 ♀ e 25 ♂
Jejum+	20,88 ± 2,04	8,56 ± 0,40	14 ♀ e 15 ♂
Jejum++	21,14 ± 3,34	8,58 ± 0,44	21 ♀ e 24 ♂

Dados médios ± desvio-padrão medidos no final das observações. ¹One-way Anova (p = 0,357, F = 1,10). ²Teste de proporção de Goodman (p > 0,05).

Tabela 2: Parâmetros da água dos aquários do estudo.

<i>Tratamento</i>	¹ <i>Temperatura (°C)</i>	² <i>PH</i>	² <i>Amônia (ppm)</i>	² <i>Nitrato (ppm)</i>
Saciado	26,71 ± 0,51	7,35 ± 0,19	0,003 ± 0,005	0,29 ± 0,53
Jejum+	26,96 ± 0,49	7,39 ± 0,14	0,002 ± 0,003	0,26 ± 0,29
Jejum++	26,67 ± 0,53	7,38 ± 0,18	0,004 ± 0,004	0,20 ± 0,34

Dados médios ± desvio-padrão medidos uma vez ao final das observações. ¹One-way Anova (p = 0,357, F = 1,10). Variáveis químicas realizadas pelo LabConTest®.

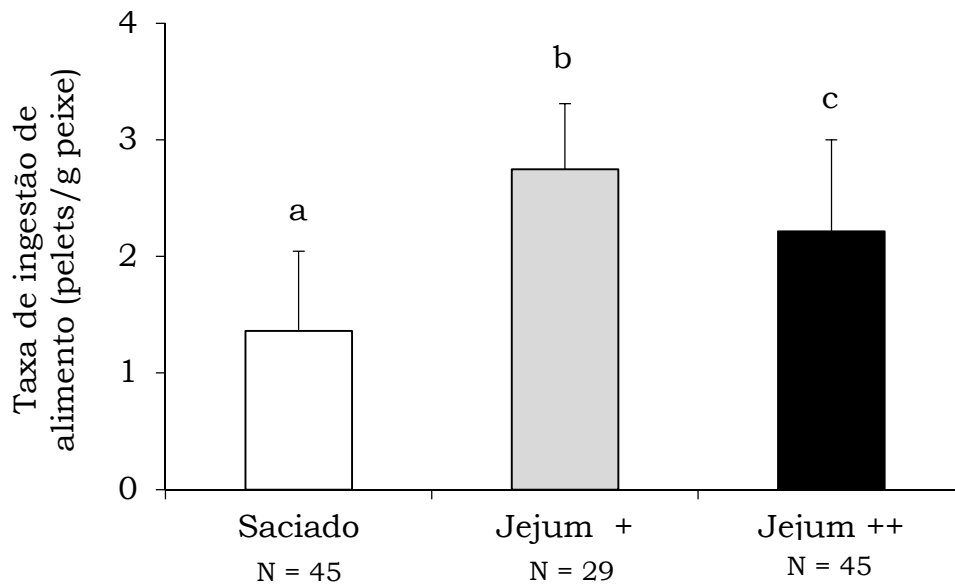
d) Análise dos dados

Dados de frequência foram comparados por teste de Goodman (1965 para comparação dentro de multinomiais e 1964 para comparação entre multinomiais). As demais variáveis foram testadas quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene) para escolha de testes paramétricos ou não paramétricos. Sempre consideramos $\alpha = 0,05$ para as decisões estatísticas. Os testes específicos de cada comparação estão descritos na seção de Resultados.

Resultados

Numa análise conjunta de todos os animais em cada tratamento, vemos que aqueles em jejum ingeriram mais alimento que os controles saciados (Figura 2). Porém, os animais em jejum++ comeram menos que os submetidos a jejum+. Nessa mesma figura vemos que essa diferença entre os animais em jejum desaparece quando consideramos a ingestão apenas dos animais que escavaram, embora continuem ingerindo mais que os saciados, o que revela que a menor ingestão dos animais em jejum++ decorreu da baixa alimentação de animais que não escavaram.

A) Ingestão final de todos os peixes



B) Ingestão final apenas dos peixes que escavaram

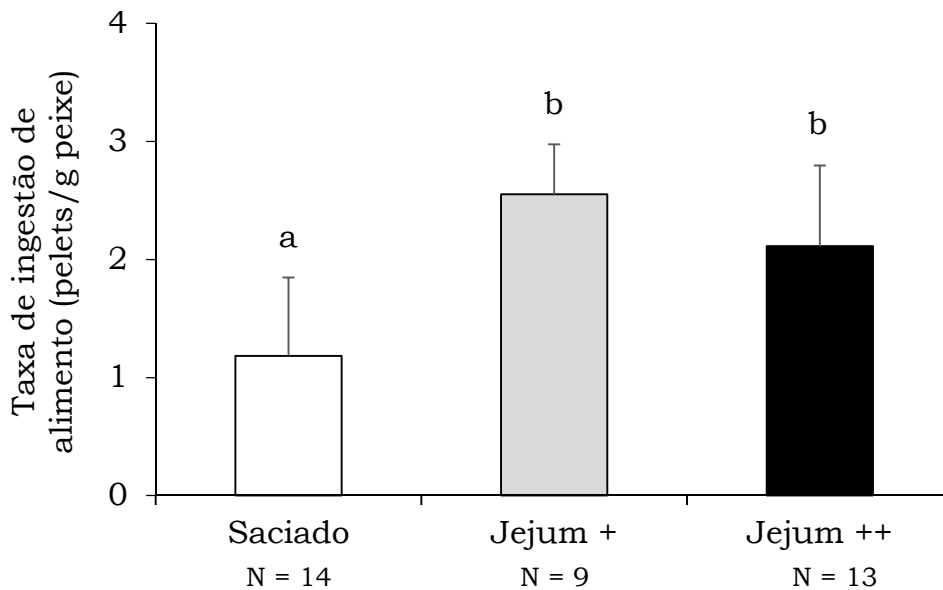


Figura 2. Caracterização da taxa de ingestão de alimento dos tratamentos. Saciado: peixes alimentados 4x todos os dias; Jejum+: 2 dias de jejum; Jejum++: 3 dias de jejum. Dados obtidos no final do último dia. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,0001$; One-way Anova, complementada com HSD para N-desigual). A: $F = 37,64$; B: $F = 4,97$.

A proporção de peixes que escavaram aumentou significativamente do 4º para o 5º dia apenas no tratamento de jejum++ (Figura 3). Ou seja, os peixes retardaram o início da escavação na condição mais severa de jejum.

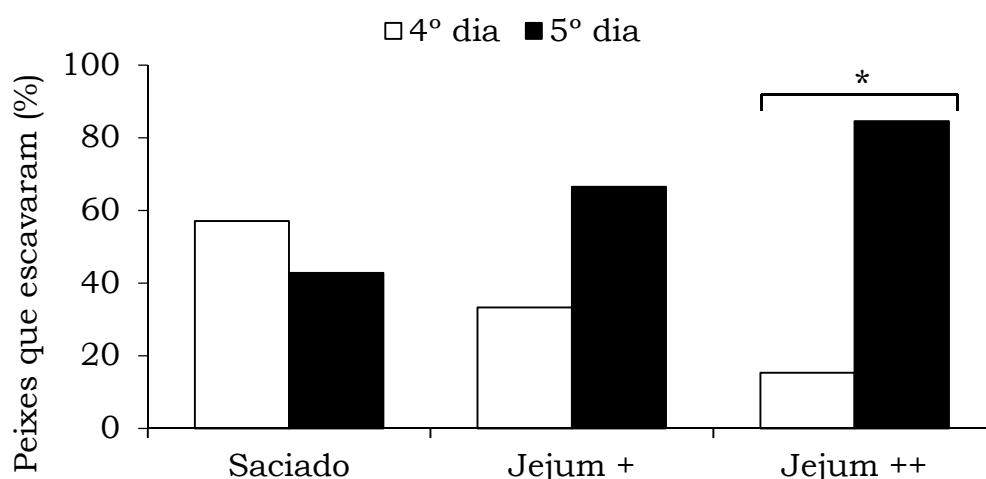


Figura 3. Efeito do jejum no surgimento da escavação. Saciado (N = 45): peixes alimentados 4x todos os dias; Jejum+ (N = 29): 2 dias de jejum; Jejum++ (N = 45): 3 dias de jejum. *Indica diferença dentro do tratamento (teste de proporção de Goodman, $p < 0,05$).

Além disso, quando examinamos a resposta de estresse por meio da taxa de escurecimento dos olhos, não encontramos efeitos de interação entre nível alimentar, sexo e escavação (Anova fatorial, $p = 0,239$, $F = 1,45$). Porém, no exame individual de cada variável, encontramos efeito apenas do comportamento de escavação no nível de estresse, com os peixes que escavaram apresentando maior nível de estresse (Figura 4).

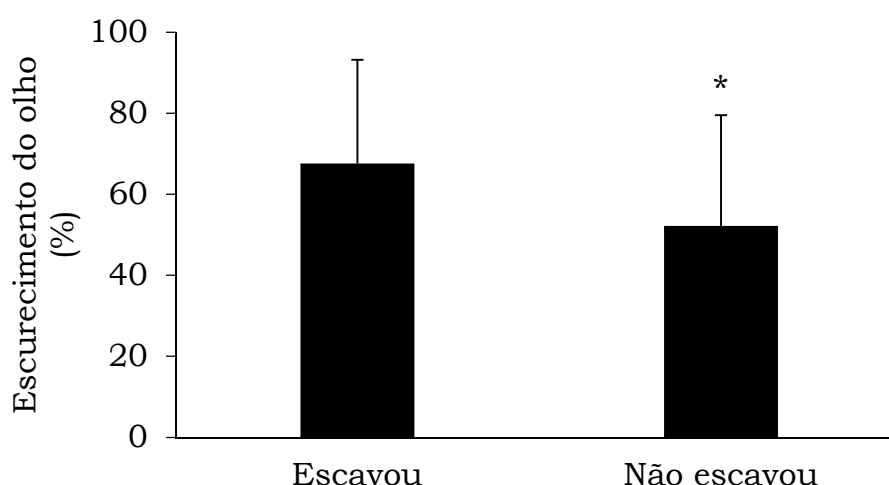


Figura 4. Cor do olho em relação à escavação. Saciado (N = 45): peixes alimentados 4x todos os dias; Jejum+ (N = 29): 2 dias de jejum; Jejum++ (N = 45): 3 dias de jejum. *Indica diferença significativa (teste t independente, $p = 0,006$, $t = 2,79$).

Em geral, não houve efeito dos tratamentos alimentares e nem do sexo do peixe nos parâmetros investigados (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização das variáveis dependentes do estudo em relação aos tratamentos alimentares e sexo do peixes.

<i>Variável</i>	<i>Saciado</i> (<i>N</i> = 45)	<i>Jejum+</i> (<i>N</i> = 29)	<i>Jejum++</i> (<i>N</i> = 45)
Ocorrências de escavação ¹	14	9	13
<i>Fêmeas</i>	8	5	7
<i>Machos</i>	6	4	6
Altura das escavações ²	3,76 ± 2,02	2,80 ± 0,98	3,76 ± 1,37
<i>Fêmeas</i>	4,28 ± 2,67	2,40 ± 0,43	4,38 ± 1,15
<i>Machos</i>	3,37 ± 1,45	3,1 ± 1,24	3,22 ± 1,39
Diâmetro das escavações ²	14,14 ± 6,67	11,77 ± 3,45	13,92 ± 6,27
<i>Fêmeas</i>	14,33 ± 8,73	10,50 ± 2,64	15,16 ± 7,41
<i>Machos</i>	14,00 ± 5,31	12,80 ± 3,96	12,85 ± 5,49
Cor do olho (estresse) ²	59,61 ± 27,07	65,62 ± 25,66	76,92 ± 22,73
<i>Fêmeas</i>	55,00 ± 28,78	45,83 ± 7,22	85,42 ± 5,10
<i>Machos</i>	62,50 ± 27,55	77,50 ± 25,62	69,64 ± 29,63

¹Teste de proporção de Goodman ($p > 0,05$ para comparações da frequência de escavações entre tratamentos e entre sexos). ²Dados médios ± desvio-padrão. Anova fatorial (tratamento: $p = 0,27$, $F = 1,30$; sexo: $p = 0,58$, $F = 0,65$; tratamento x sexo: $p = 0,39$, $F = 1,05$).

Discussão

Neste estudo mostramos que a fome não é fator primordial na determinação do comportamento de escavar na tilápia-do-Nilo. O único efeito da alimentação detectado sobre a escavação foi que os peixes submetidos ao jejum++ adiaram a escavação, pois um maior número de peixes escavou apenas no 5^a dia de observação, o que pode decorrer do balanço energético desses animais. Porém, os peixes que escavaram, independente das outras condições deste estudo, eram os mais estressados, possivelmente sendo mais susceptíveis às condições do estudo.

No final do experimento, os peixes submetidos ao jejum++ comeram menos que os submetidos ao jejum+ por influência dos peixes que não escavaram. Quando retirados da análise, a ingestão dos peixes nos dois níveis de jejum foi a mesma. Isso poderia indicar que os peixes que escavaram estavam numa mesma taxa de jejum. Porém, como a avaliação da ingestão final foi feita uma única vez, essa ingestão similar pode não refletir a diferença no estado de fome, mas da capacidade de ingerir num período curto (possivelmente limitado pelo tamanho do estômago). Porém, o fato dos peixes em jejum terem comido mais que os saciados indica claramente que a condição de jejum teve um efeito na fome desses animais.

O efeito dos dois níveis de jejum foi mais perceptível quando analisamos o número de peixes que escavaram nos dias 4 e 5 (Figura 3). Na condição jejum++ houve uma predominância de peixes que escavaram no último dia, o que indica que o maior jejum atrasou a escavação. Isso pode ser entendido como um balanço energético. A alimentação é um dos determinantes primários no controle da expressão motora do comportamento. É possível que em situação de jejum a dominância cerebral seja no sentido de priorizar economia de energia em relação a outras atividades que não se relacionam com alimentação. Se isso é verdade, então reforçamos que a escavação na tilápia não tenha função de busca de alimento. De fato, o gasto energético com escavação parece bem alto. No ciclídeo *Neolamprologus pulcher*, o comportamento de escavar aumenta 6,1 vezes a taxa metabólica basal, sendo que os comportamentos de subordinação e dominância aumentam a taxa metabólica basal 3,3 e 3,9 vezes, respectivamente (Grantner & Taborsky 1998). Portanto, o alto custo energético de escavar coaduna com o fato dos peixes em maior jejum terem adiado essa atividade para mais tarde.

Embora não tenhamos detectado clara evidência de que a alimentação possa ser uma das forças para a escavação, percebemos que animais que escavaram estavam com o olho mais escuro. Como o escurecimento do olho é um indicador confiável de estresse em peixes (Freitas *et al.* 2014), podemos concluir que os peixes que escavaram estavam em situação de maior desconforto. Isso nos suscita a possibilidade de que esse estado interno de desconforto evoque a escavação, que pode, então, ter outra função,

possivelmente a busca de um lugar seguro (refúgio). Essa hipótese foi testada no próximo estudo.

Referências

- Afonso LOB & Lebouté EM (1993) Métodos para sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: Anais do IV Encontro Rio-Grandense de Técnicos em Aquicultura. Porto Alegre, RS. p. 100-103.
- Carvalho TB & Gonçalves-de-Freitas E (2008) Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Biology* 68(4): 807-812.
- Freitas RHA, Negrão CA, Felício AKC & Volpato GL (2014) Eye darkening as a reliable, easy and inexpensive indicator of stress in fish. *Zoology* 117: 179-184.
- Galhardo L, Correia J & Oliveira RF (2008) The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*) *Animal Welfare* 2008, 17: 239-254.
- Goodman LA (1964) Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* 35: 716-725.
- Goodman LA (1965) On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7(2): 247-254.
- Grantner A & Taborsky M (1998) The metabolic rates associated with resting, and with the performance of agonistic, submissive and digging behaviours in the cichlid fish *Neolamprologus pulcher* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Comparative Physiology B* 168(6): 427-433.
- Oso JA, Ayodele IA & Fagbuaro O (2006) Food and feeding habits of *Oreochromis niloticus* (L.) and *Sarotherodon galilaeus* (L.) in a tropical reservoir. *World Journal of Zoology* 1(2): 118-121.

Estudo 3:

Ninho ou esconderijo?

Resumo

Afinal, que outra função poderia ter a escavação? Aqui mostramos que as escavações de machos e fêmeas em isolamento social apresentam características físicas que permitem que os peixes se escondam dentro delas. A presença de toca reduz acentuadamente a frequência com que os peixes escavam. As escavações são usadas pelos peixes durante o período de inatividade noturna. Portanto, temos evidências consistentes de que as escavações podem ter função de abrigo para evitar perigos potenciais ou para o repouso noturno.

Introdução

Existem diversas evidências sobre a função reprodutiva das escavações de espécies de ciclídeos poligínicos como a tilápia-do-Nilo. Na interpretação mais clássica, a presença de fêmeas estimula os machos a escavarem (Gonçalves-de-Freitas & Nishida 1998); as fêmeas visitam com maior frequência as maiores escavações (Mckaye *et al.* 1990, Mendonça & Gonçalves-de-Freitas 2008) e desovam mais frequentemente com machos que construíram ninhos maiores (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas 2008). Além disso, o investimento do macho em ninho é, para as fêmeas, pista mais importante que a agressividade, que o investimento em corte ou que o fator de condição corporal do macho (Mendonça & Gonçalves-de-Freitas 2008). Essas evidências não deixam dúvidas sobre a função reprodutiva dessas escavações.

Entretanto, as fêmeas também podem estar envolvidas na escavação de ninhos iniciada por machos, em contexto reprodutivo (Gonçalves-de-Freitas & Nishida 1998), e podem inclusive escavar sozinhas, quando isoladas socialmente (Castro *et al.* 2009). Embora esses relatos tenham ganhado pouca repercussão, eles levam a questionamentos inevitáveis: a escavação só tem função no contexto reprodutivo? A escavação pelas fêmeas é um comportamento não-natural?

No estudo 1, mostramos que o comportamento de escavar surge espontaneamente em fêmeas isoladas e no mesmo momento da ontogenia em que surge nos machos. Vimos também que esses peixes podem escavar mesmo antes da maturação gonadal. E esses achados ocorreram não apenas na tilápia-do-Nilo, espécie já domesticada, mas também na espécie selvagem *Geophagus brasiliensis*. Isso indica que o comportamento de escavar seja natural para

fêmeas das duas espécies (e, possivelmente, de outras tantas espécies). Considerando que a escavação seja, então, natural para fêmeas, o que estaria motivando-as a escavar em contextos não-reprodutivos? Aliás, o que estaria motivando os próprios machos a escavarem fora de contextos reprodutivos?

No estudo 2, mostramos que a escavação não é motivada pela fome dos peixes. Nesse terceiro estudo, investigamos se a escavação pode estar associada a mecanismos de defesa. Assim, estudamos a possibilidade das escavações terem funções similares às de tocas, pois muitas espécies de peixes usam refúgios naturais contra predadores ou competidores (Allouche 2002). Então, predizemos que a presença de uma toca no ambiente reduziria escavação pela tilápia e que as escavações teriam relação com áreas potenciais de risco do ambiente. E como muitas espécies de peixes usam refúgios para repousar em períodos de inatividade, predizemos que a tilápia repouse dentro da escavação à noite, quando está predominantemente inativa (Vera *et al.* 2009). Nossas observações revelaram que as escavações podem ter função de redução de risco de predação.

Material & Métodos

a) Peixes e condições de alojamento

Os peixes utilizados nesse estudo foram mantidos nas mesmas condições prévias descritas no estudo 2.

b) Delineamento

Em aquários supridos com pedrisco para permitir escavação, constituímos dois tratamentos (Figura 1): presença ou ausência de toca. Cada peixe foi isolado no respectivo aquário e, a partir do dia seguinte, registramos durante o dia a ocorrência de escavação. Quando detectada, o aquário era observado durante as 4 noites subsequentes (~23:00, ~01:00 e ~03:00 h) para registrarmos se os peixes ficavam dentro da escavação à noite. Esse procedimento foi realizado da mesma forma com todos os peixes que tinham toca. Após a última observação, registramos o tamanho das escavações, a posição delas no aquário, a altura do substrato na parede frontal e de fundo do aquário, além do sexo e biometria dos peixes. Utilizamos 30 animais em cada tratamento.

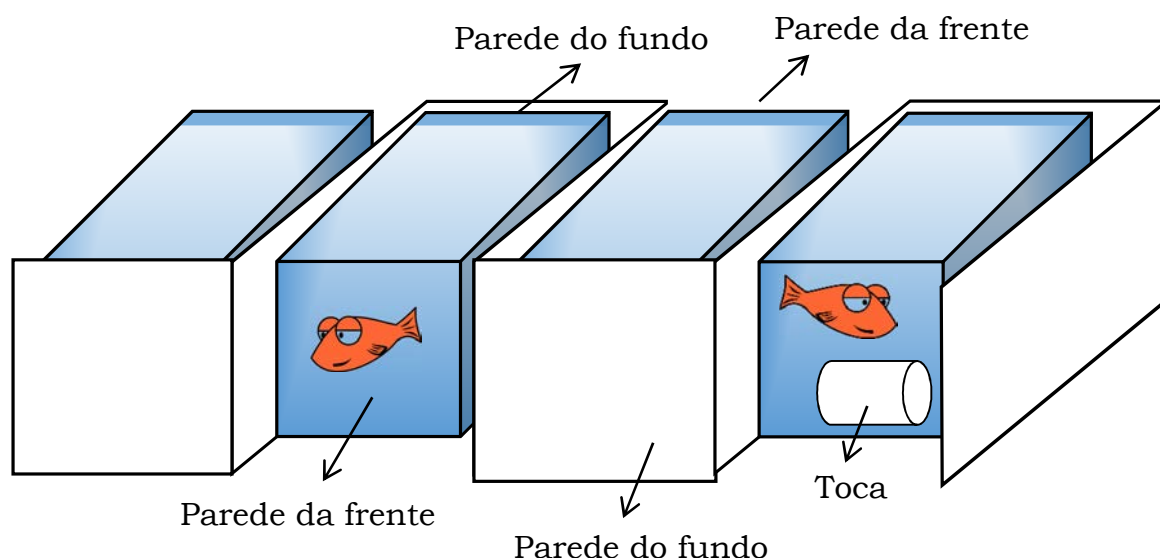


Figura 1. Conformação dos aquários experimentais. Aquários de vidro transparente (40 x 20 x 20 cm) supridos com filtro biológico e substrato (3 cm de pedrisco de ~3 mm de granulometria). Metade dos aquários tinha uma toca (tubo de PVC de 12 cm comprimento x 7,5 cm largura). Placas de isopor cobriram as paredes laterais e a parede de fundo dos aquários. As observações eram feitas a partir da parede da frente do aquário e a disposição desses aquários reduzia a interferência do observador nos aquários adjacentes.

c) Procedimentos experimentais

Escavação. Consideramos escavação as depressões circulares ou ovais presentes no substrato, de tamanho próximo ao do peixe ou maior que este.

Ocupação do ninho e da toca à noite. Silenciosamente adentrávamos no laboratório, acendíamos uma luz fraca (<50 Lux) e direcional sobre o aquário onde havia escavação e registrávamos se o peixe estava inativo no interior da escavação. Somente obtínhamos esse registro quando os peixes estavam em inatividade. Esse estado era caracterizado por ausência de deslocamento, nadadeira dorsal retraída e ausência de alguma reação perceptível quando da chegada do observador.

Medidas da escavação e da camada de substrato. Após as observações, medíamos o maior diâmetro ao nível da borda (Figura 2) e a altura dos ninhos (do ponto mais profundo à borda), a menor distância da borda do ninho até as paredes da frente e do fundo do aquário (Figura 2) e a altura máxima e mínima da camada de substrato nas paredes da frente e do fundo do aquário (Figura 3).

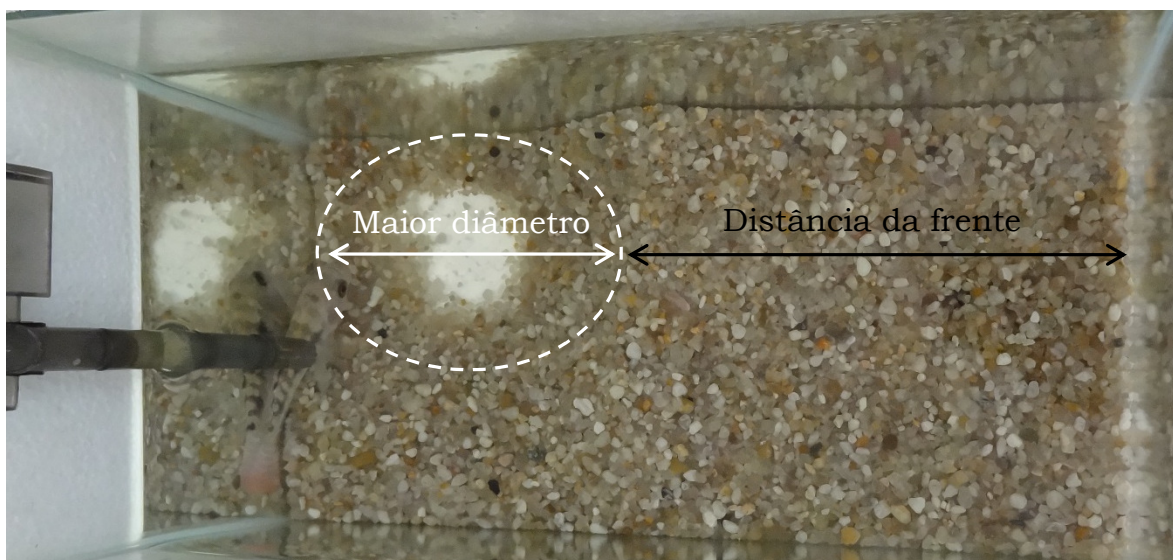


Figura 2. Indicação da distância da escavação em relação às paredes do aquário. Vista superior. A linha tracejada indica a borda da escavação. A seta branca indica o diâmetro da escavação e a seta preta indica a distância considerada. Neste caso, a distância em relação à parede do fundo foi zero.

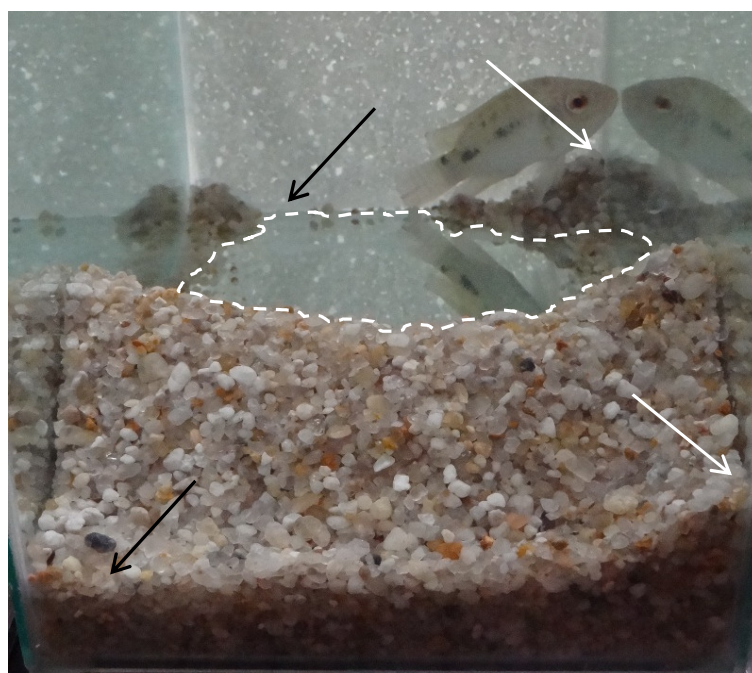


Figura 3. Indicação da altura do substrato nas paredes da frente e do fundo do aquário. Vista lateral. Ao fundo vemos o peixe na região escavada (delimitada pela linha tracejada), que ficou apenas com o vidro do aquário no fundo. Da borda da escavação até o topo da coluna de pedrisco no meio do aquário há aproximadamente 6 cm de altura. As setas pretas indicam as alturas mínimas da frente e do fundo do aquário e as setas brancas as alturas máximas.

Medidas dos peixes e qualidade da água. Medimos o comprimento-padrão, a altura (comprimento de linha imaginária traçada verticalmente da porção mais anterior da nadadeira dorsal até o ventre) e o peso dos peixes após a última observação. O sexo foi determinado como descrito no estudo 2. Esses dados não diferiram entre os tratamentos (Tabela 1). Ao final medimos também a qualidade da água, que não foi diferente entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1: Biometria e sexo dos animais do estudo

<i>Tratamento</i>	¹ Peso (g)	¹ Comprimento-padrão (cm)	² Altura (cm)	³ Sexo
Sem toca	22,86 ± 4,02	8,84 ± 0,51	2,99 ± 0,20	13 ♀ 17 ♂
Com toca	24,83 ± 6,22	8,93 ± 0,79	3,06 ± 0,26	12 ♀ 18 ♂
Valor de p	0,314	0,450	0,304	> 0,05

Dados médios ± desvio-padrão medidos no final das observações. ¹Mann-Whitney.

²Teste t independente. ³Teste de proporção de Goodman.

Tabela 2: Parâmetros da água dos aquários do estudo.

<i>Tratamento</i>	¹ Temperatura (°C)	² PH	² Amônia (ppm)	² Nitrito (ppm)
Sem toca	28,86 ± 0,49	5,5 ± 0,0	0,001 ± 0,001	0,183 ± 0,27
Com toca	27,50 ± 0,72	6,4 ± 0,1	0,001 ± 0,001	0,183 ± 0,23
Valor de p	0,30	0,09	0,99	0,99

Dados médios ± desvio-padrão medidos uma vez em cada aquário ao final das observações. ¹Mann-Whitney; ²Teste t independente. Variáveis químicas realizadas pelo LabConTest®.

d) Análise dos dados

Dados de frequência foram comparados por teste de Goodman (1965 para comparação dentro de multinomiais e 1964 para comparação entre multinomiais). As demais variáveis foram testadas quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene) para escolha de testes paramétricos ou não paramétricos. Sempre consideramos $\alpha = 0,05$ para as decisões estatísticas. Os testes específicos de cada comparação estão descritos na seção de Resultados.

Resultados

Vimos que tanto machos quanto fêmeas escavam e ambos reduzem muito a escavação quando há disponibilidade de toca no ambiente (Figura 4). Vimos também que as escavações de machos e fêmeas tinham o mesmo diâmetro (Mann-Whitney, $p = 0,561$) e a mesma altura (Mann-Whitney, $p = 0,651$). Além disso, essas escavações são de tamanho que permite que os peixes entrem em seu interior. O tamanho da escavação foi maior que o tamanho dos peixes, tanto em altura quanto em comprimento (Figura 5). Chama a atenção o fato de que a variabilidade do tamanho dos peixes em nossa amostra foi bem menor que aquela da escavação (altura = 8,6 vezes menor; comprimento = 16,6 vezes menor), sugerindo ausência de relação entre essas variáveis. De fato, não detectamos correlação significativa entre a altura da escavação e a altura do peixe (correlação de Spearman, $p = 0,373$, $R = 0,216$, $t = 0,913$) ou entre o diâmetro da escavação e o comprimento-padrão do peixe (correlação de Spearman, $p = 0,195$, $R = 0,31$, $t = 1,346$).

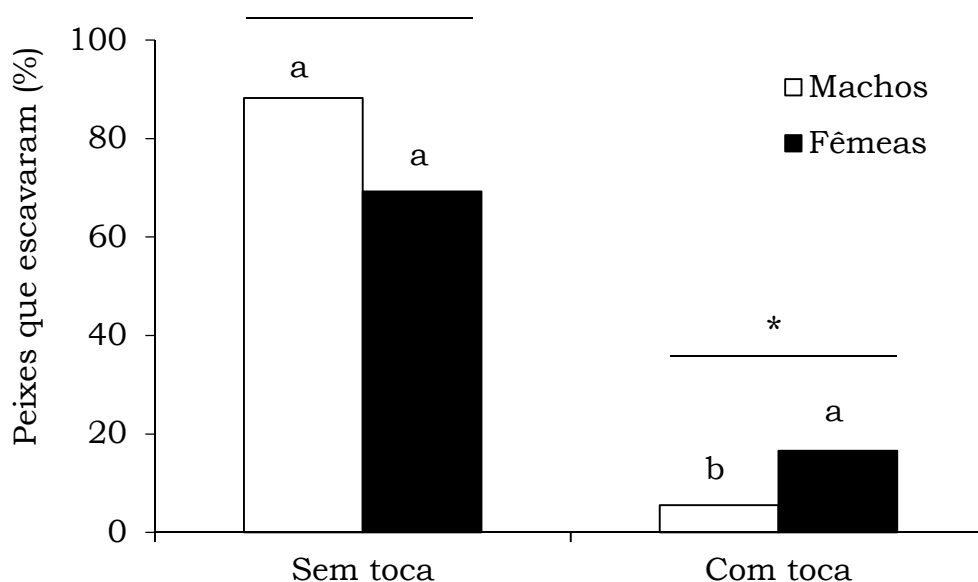


Figura 4. Efeito da presença de toca na frequência de escavação. Dados de 30 peixes em cada tratamento. As letras comparam simultaneamente o sexo dentro de cada tratamento e o tratamento dentro de um mesmo sexo. Letras diferentes indicam diferença significativa. *Indica diferença entre tratamentos, independente do sexo. (Goodman; $p < 0,05$).

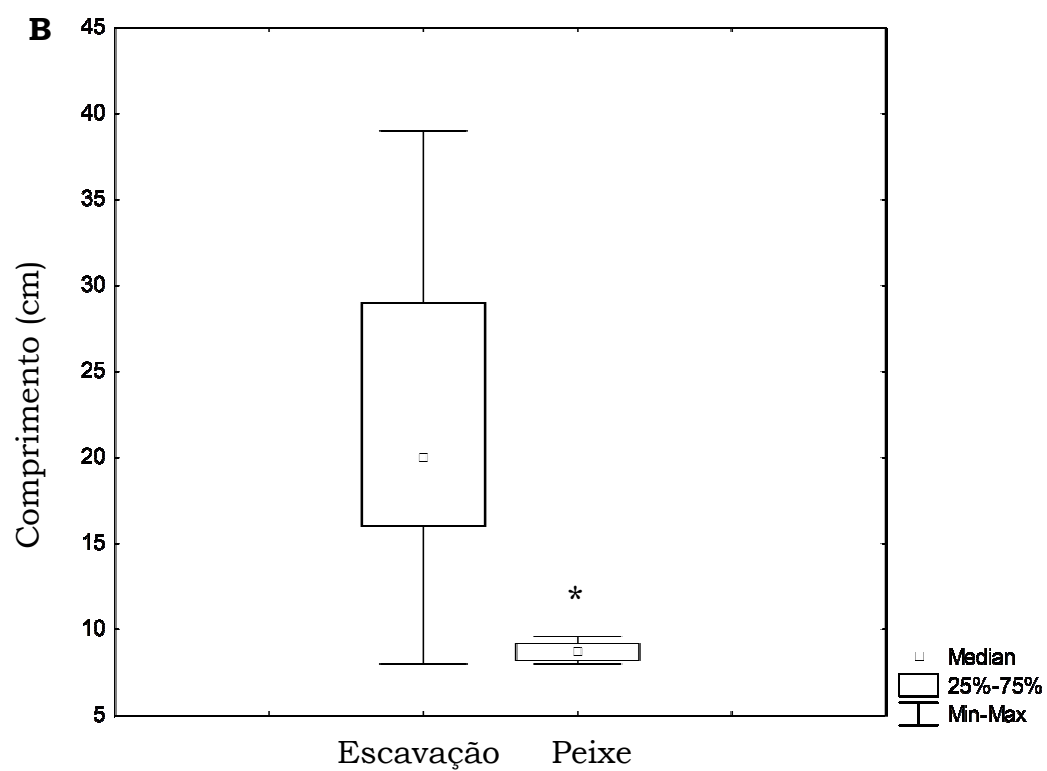
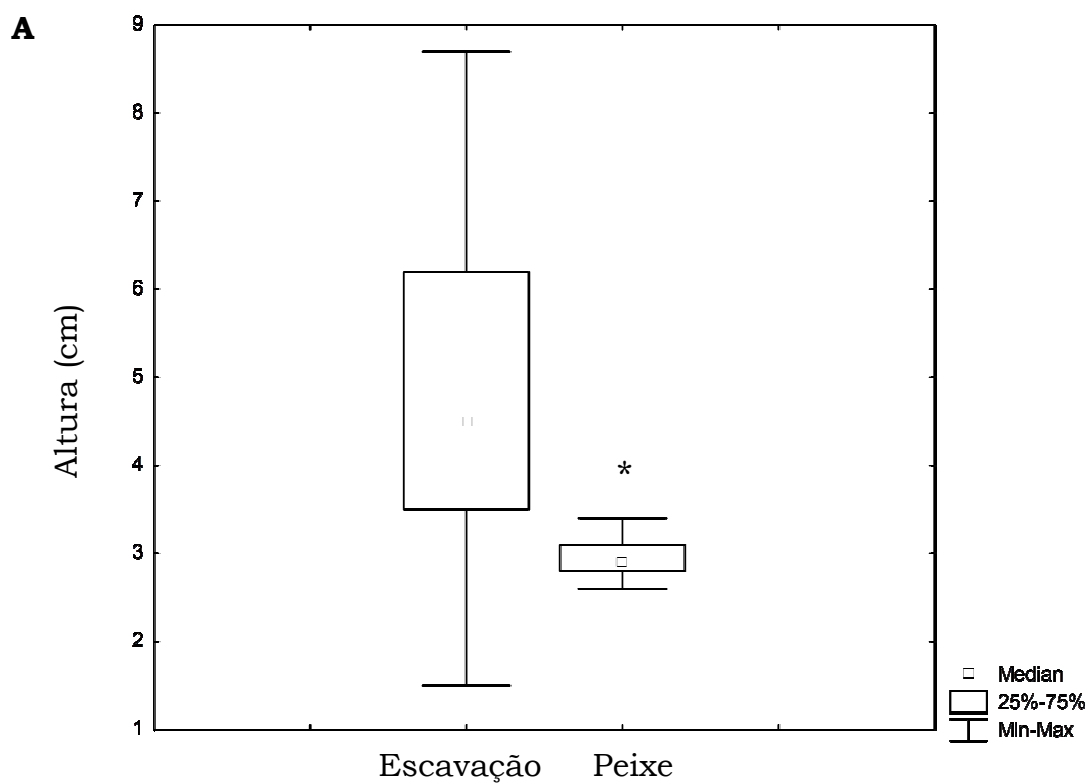


Figura 5. Comparações entre as dimensões das escavações e dos peixes. Dados de 19 peixes e suas escavações. *Indica diferença significativa (Wilcoxon). A: altura ($p = 0,001$), B: comprimento ($p = 0,0001$).

Durante a noite, período em que a tilápia mais frequentemente repousa, vimos que os peixes permaneceram predominantemente dentro da escavação ou da toca, independentemente do sexo dos animais (Figura 6).

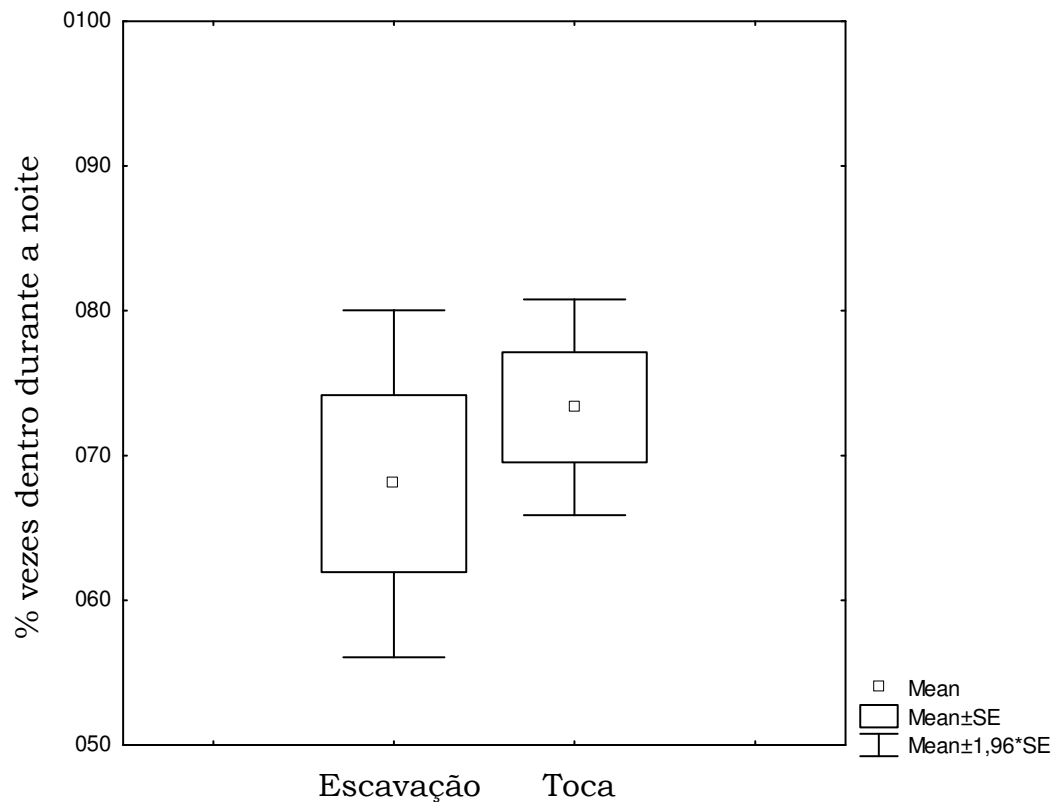


Figura 6. Percentual de vezes que os peixes repousaram dentro da escavação ou toca à noite. N = 24 peixes com escavação e 30 com toca. Mann-Whitney, $p = 0,867$).

A análise da posição da escavação no aquário também se coaduna com a ideia de que ela tenha função de proteção. As escavações foram construídas em locais menos expostos no ambiente (Figura 7). No caso, elas ficaram geralmente afastadas da parede frontal do aquário e, em 68,3 % dos casos, detectamos que o substrato estava acima do nível inicial na parede da frente. Além disso, o a altura mínima do substrato na parede da frente era maior que na do fundo (Figura 8).

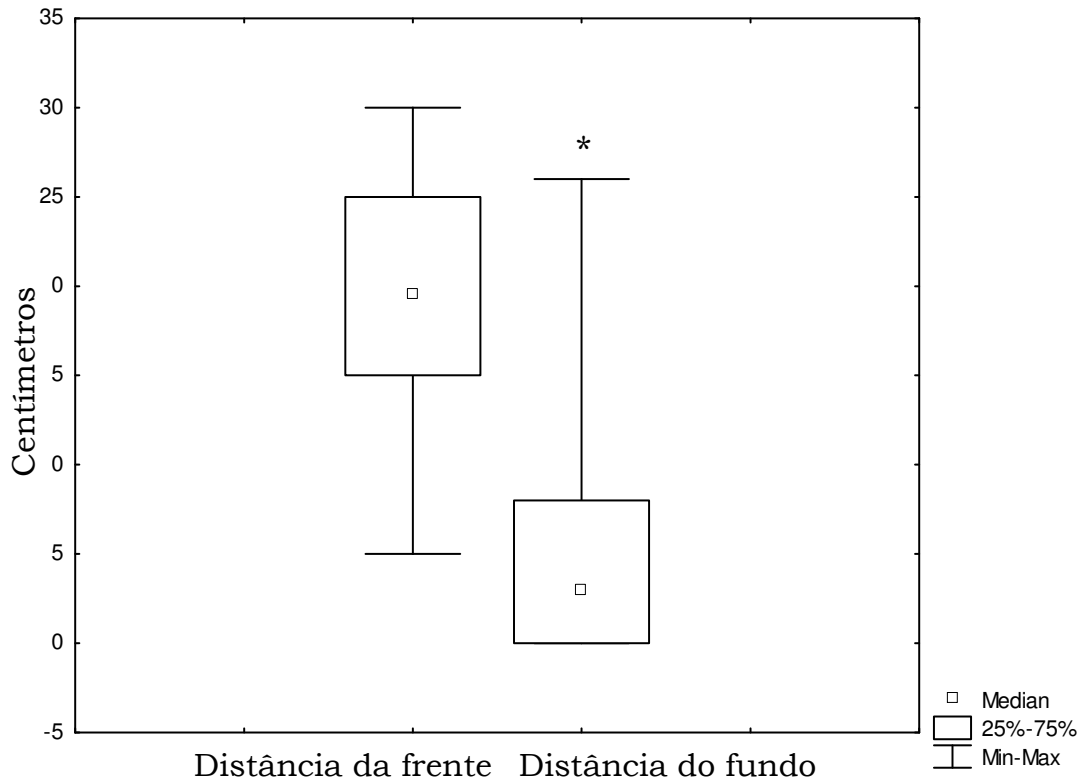


Figura 7. Distância da escavação à parede da frente e do fundo do aquário. N = 23 ninhos. *Indica diferença significativa (Wilcoxon, $p = 0,001$).

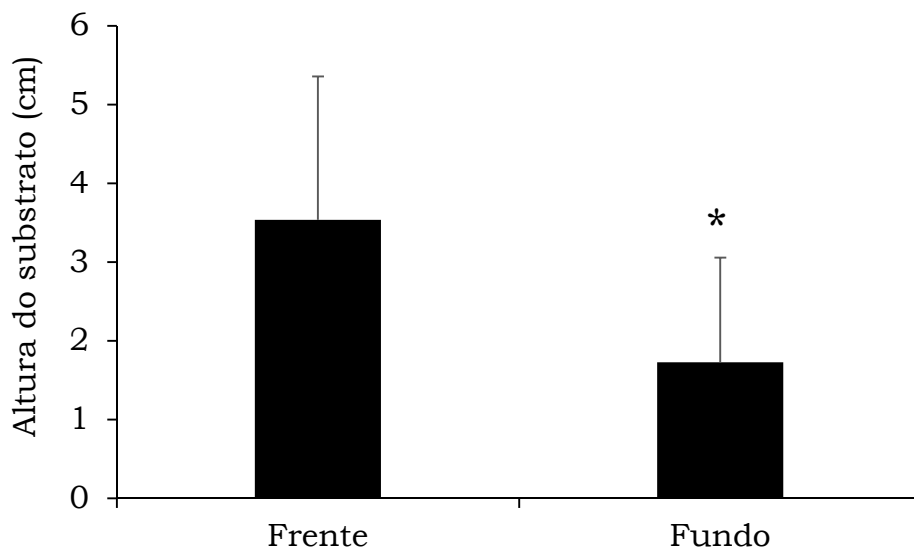


Figura 8. Altura mínima do substrato nas paredes da frente e do fundo do aquário. N = 27 aquários com escavação (24 sem toca e 3 com toca). *Indica diferença significativa (teste t pareado, $p = 0,0003$, $t = 4,200$).

Discussão

Atualmente, um dos paradigmas sobre a reprodução de espécies de tilápia é que as escavações são feitas pelos machos em contexto reprodutivo, atraem as fêmeas e servem de sítio para desova (Lowe-McConnell 1958). Com isso, as escavações são frequentemente chamadas de ninhos. Recentemente, escavações de fêmeas foram relatadas e interpretadas como decorrentes da ausência de componentes estruturais do ambiente (Castro *et al.* 2009) ou ação na limpeza de ninhos construídos pelos machos (Gonçalves-de-Freitas & Nishida 1998). No entanto, a escavação é uma atividade que tem alto custo energético (Grantner & Taborsky 1998), o que suscita que ela deva ter outro significado biológico, desvinculado da reprodução e da alimentação (como concluímos no estudo 2). Nessa problemática, nosso estudo é o primeiro a mostrar que essas escavações da tilápia-do-Nilo têm também a função de refúgio.

Embora na literatura apenas dois trabalhos relatem a escavação do substrato pelas fêmeas de tilápia-do-Nilo, aqui vimos que a escavação ocorreu predominantemente no primeiro dia após colocação do animal no aquário e que 69% das fêmeas escavaram em ambiente sem toca. Essa contradição pode ocorrer do fato de que muitos dos trabalhos sobre esses ciclídeos são direcionados à reprodução (em grupo), onde há bastante competição pelo substrato. Porém, nas condições de isolamento social, com a eliminação dessa competição, cada animal teria mais oportunidade para escavar o substrato.

O fato das escavações serem reduzidas pela presença de tocas sugere que a função das tocas também seja desempenhada pelas escavações. Basicamente, as escavações serviriam de refúgio contra perigos potenciais, local de descanso e poderiam dar ao animal maior estabilidade hidrostática em seu microambiente (Allouche 2002). Aqui vimos que para a tilápia-do-Nilo, as escavações permitem o alojamento do peixe e, durante a noite, os peixes permanecem inativos em seu interior. Como algumas espécies de peixes apresentam padrões de sono (Siegel 2008), essa inatividade dentro da escavação pode significar sítio para dormirem. Os peixes de recife de coral *Choerodon jordani* e *Novaculichthys taeniourus* ativamente constroem sítios para dormir: eles escavam a areia, depositam sobre a escavação pedaços de corais e se alojam dentro dela durante a noite (Nanami & Nishihira 1999, Takayanagi *et al.* 2003). Portanto, essa possibilidade é bem plausível para a tilápia.

Sem excluirmos essa possibilidade, outros dados nossos sugerem que a permanência no interior das escavações tenha também função de proteção contra possíveis perigos ambientais. Em nossa situação experimental, a presença do observador pode ser assumida como elemento de perigo. Pelo fato dos aquários serem revestidos com material opaco em suas laterais, exceto na face frontal, criamos um ambiente mais protegido com uma visão frontal mais aberta, o que poderia significar uma região com maior chance de risco. Isso se coaduna tanto com a posição em que as escavações foram feitas (afastadas dessa região frontal do aquário), bem como pela detecção da construção de barreiras (coluna de pedrisco) na base da face frontal do aquário, as quais reduziam a possibilidade de se detectar os peixes a partir dessa região.

Numa análise conjunta, os dados aqui apresentados são consistentes com a interpretação de que as escavações dão a esses peixes abrigo, que pode ser usado tanto para dormirem quanto para se refugiarem em situações de risco. Isso é ainda reforçado pelo fato de animais em fase não reprodutiva fazerem escavações com as características aqui relatadas, incluindo machos e fêmeas (Estudo 1 desta tese). O fato do surgimento do comportamento de escavação ter algum controle genético, também alicerça que se trate de uma atividade com função biológica determinante. Assim, da função reprodutiva classicamente aferida a esse comportamento, acrescentamos sua função como refúgio. Além disso, a alta variabilidade no tamanho do ninho reportada aqui, em contraste com a baixa variação no tamanho dos animais, além da inexistência de correlação entre essas variáveis, sugere que a motivação para construção do ninho possa ter algum componente emocional, o que também condiz com a ideia de proteção conferida pela escavação. Observações em nossos laboratórios estão em linha com essa expectativa, pois escavações são feitas predominantemente por tilápias neofóbicas (dados não publicados).

Referências

- Allouche S (2002) Nature and functions of cover for riverine fish. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture. 365: 297-324.
- Castro ALS, Gonçalves-de-Freitas E, Volpato GL & Oliveira C (2009) Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis*

- niloticus* (L.) Brazilian Journal of Medical and Biological Research 42(4): 368-374.
- Gonçalves-de-Freitas E & Nishida SM (1998) Sneaking behavior of the Nile tilapia. Boletim Técnico Cepta 11: 71-79.
- Goodman LA (1965) On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Technometrics 7(2): 247-254.
- Goodman LA (1964) Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Annals of Mathematical Statistics 35: 716-725.
- Grantner A & Taborsky M (1998) The metabolic rates associated with resting, and with the performance of agonistic, submissive and digging behaviours in the cichlid fish *Neolamprologus pulcher* (Pisces: Cichlidae). Journal of Comparative Physiology B 168(6): 427-433.
- Lowe-McConnell M (1958) Breeding behaviour patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). Proceedings of the Zoological Society of London 132: 1-31.
- McKaye KR, Louda SM & Stauffer JR (1990) Bower size and male reproductive success in a cichlid fish lek. The American Naturalist 135(5): 597-613.
- Mendonça FZ & Gonçalves-de-Freitas E (2008) Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei: Cichlidae). Revista Brasileira de Zoologia 25(3): 413-418.
- Nanami A & Nishihira M (1999) Nest construction by the labrid fish *Choerodon jordani* (Snyder 1908). Coral Reefs 18(3): 292.
- Siegel JM (2008) Do all animals sleep? Trends in Neurosciences 31(4): 208-213.
- Takayanagi S, Sakai Y, Hashimoto H & Gushima K (2003) Sleeping mound construction using coral fragments by the rockmover wrasse. Journal of Fish Biology 63(5): 1352-1356.
- Vera LM, Cairns L, Sanchez-Vazquez FJ & Migaud H (2009) Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Chronobiology International 26 (4): 666-681.