



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Efeitos da posição social e do contexto reprodutivo sobre a preferência por substratos claro ou escuro, em machos de Tilápia-do-nilo

Fabio Cardoso Martins

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Universidade Estadual Paulista
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

FABIO CARDOSO MARTINS
BIÓLOGO

**EFEITOS DA POSIÇÃO SOCIAL E DO CONTEXTO
REPRODUTIVO SOBRE A PREFERÊNCIA POR SUBSTRATOS
CLARO OU ESCURO, EM MACHOS DE TILÁPIA-DO-NILO**

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Letras e Ciências
Exatas, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do título de
mestre em Biologia Animal.**

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

Martins, Fabio Cardoso.

Efeito da posição social e do contexto reprodutivo sobre a preferência por substrato claro e escuro / Fabio Cardoso Martins. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

34 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eliane Gonçalves de Freitas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia animal. 2. Comportamento social dos animais. 3. Tilápia (Peixe) – Comportamento. 4. Substratos. I. Gonçalves-de-Freitas, Eliane. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 597.5

Fabio Cardoso Martins

Efeito da posição social sobre a preferência por substrato claro ou escuro em machos de Tilápia do Nilo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração – Ecologia e Comportamento, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato
UNESP – Botucatu

Dr^a. Fabiana Garcia
APTA/SAA – Votuporanga

São José do Rio Preto
04/Março/2011

Dedico

Em primeiro lugar a Deus, por ter me permitido chegar até aqui. Dedico também a meus pais, Julio e Sônia, a meus irmãos, Daniel e Fernanda, e à minha esposa, Deborah, pela paciência e apoio durante todo o trabalho.

Amo todos vocês.

“O homem sábio é forte, e o homem de conhecimento consolida a força”

Provérbios 24:5

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram a concluir mais uma etapa da minha vida, com conhecimento e crescimento espiritual, profissional e ético. Em especial agradeço a:

Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas: Pela paciência, pelos ensinamentos, pela cordialidade, pelas oportunidades, pela ética e profissionalismo, fazendo tudo o que podia (e as vezes até o que não podia) para me auxiliar em meus estudos.

Meus Pais Julio e Sônia: Que com esforço diligente, me fizeram o homem que sou. Que me proporcionaram conhecimento e oportunidades de aprender ensinamentos religiosos e sacros. Que não mediram esforços para me manter nos caminhos corretos: da honestidade, da ética e de Deus.

Meus Irmãos Daniel e Fernanda: Por me oferecerem apoio nas horas mais difíceis, fazendo o que sabem de melhor para me ajudar.

Minha esposa Deborah: Pelo carinho e compreensão durante as noites acordado preparando relatórios, por me suportar nos momentos difíceis que nem eu mesmo me suportava, pelo carinho e amor incondicional e pelas horas de conversa e diversão.

Meus grandes amigos Akila e Evandro: Por me mostrarem as bênçãos que Deus me deu através do mestrado, apoiando a continua-lo e por me mostrarem o caminho ao qual fui verdadeiramente chamado.

Meus colegas de laboratório: André, Ângelo, Camila, Francine, Manoela, Marcela, Maristela Thais e Tatiane, pelas dicas e trocas de informações que me auxiliaram no delineamento do experimento e na dissertação.

Meus professores: Todos que me auxiliaram em minha formação.

Técnicos Msc. Roselene S. Costa Ferreira e Carlos Eduardo de Souza: pelo auxílio no laboratório todas as vezes que precisei.

À FAPESP: Pelo auxílio financeiro (proc. 2009/07110-0).

O Presente Trabalho será submetido para
publicação na revista Applied Animal
Behaviour Science (ISSN: 0168-1591) e
se encontra nas normas da revista
supracitada.

SUMÁRIO

Resumo.....	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Material Biológico e Manutenção	17
2.2. Preferência por substrato e experiência social	18
2.3. Dupla e contexto reprodutivo	19
2.4. Preferencia por substrato ao longo do tempo	20
2.5. Análise dos dados	21
2.6. Nota ética	22
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES	26
Legenda das Figuras.....	32
Figuras	33

Resumo

Testes de preferências têm sido utilizados como meio de obtenção de ambiente provedor de bem estar nos animais. Porém, a preferência pode mudar de acordo com características do indivíduo. Assim, testamos a hipótese geral de que a posição social (dominante ou submisso) afeta a preferência por substrato claro ou escuro em machos adultos de tilápia-do-nilo e de que essa preferência é afetada pelo contexto reprodutivo. O substrato escuro representa um local onde o animal pode ficar menos visível, ao contrário do claro. Foram realizados três experimentos. 1º. Testamos se peixes isolados apresentam preferência por um dos substratos. Depois, pareamos os peixes (1 hora/dia, 3 dias) para experiência de dominância e submissão e re-testamos a preferência de cada um. 2º. O mesmo procedimento foi realizado, mas a escolha de substrato ocorreu com a dupla no mesmo aquário. Após 24 horas, o teste foi feito novamente, mas com a presença de uma fêmea sexualmente madura em um aquário menor, dentro do aquário teste. 3º. Testamos se a escolha se mantém ao longo do tempo e se o isolamento social afeta a escolha. O mesmo procedimento dos outros testes foi adotado, mas o experimento durou 4 dias com a seguinte sequência de procedimentos: peixes isolados foram registrados no primeiro dia e após 24 horas; em seguida, o macho passava a ter contato visual com 4 outros machos em aquário adjacente; a escolha foi registrada 24 horas depois; em seguida, o contato visual era interrompido e, após 24 horas, o macho era testado pela última vez. Nesses experimentos, utilizamos um aquário (80 X 30 X 40) com 37,5% da área do fundo forrada externamente com plástico preto, 37,5% por plástico branco, e com a região central com plástico cinza (zona neutra – de onde os animais eram liberados). O local onde o animal estava era registrado a cada 10 s, por 20 min. Em quase todos os casos observamos que os machos escolhem o substrato escuro

sempre que estão sozinhos no aquário. Não há efeito da experiência social, do tempo de teste ou do isolamento social. No entanto, quando a dupla está no mesmo aquário, a frequência de permanência no substrato escuro é maior para o dominante, enquanto é semelhante com o branco para o submisso. Concluimos que machos de tilápia-do-nilo preferem substrato escuro, independente da experiência social e do contexto reprodutivo. No entanto, em condição de competição no mesmo espaço físico, a preferência só é constatada para o dominante, sendo mascarada para o submisso. Assim, sugerimos que substratos escuros devem ser utilizados em condições de criação e manutenção, pois melhoram o bem-estar de machos de tilápia-do-nilo.

Palavras-Chave: Testes de preferência; Bem-estar; Cichlidae; Contexto social; Isolamento social; *Oreochromis niloticus*.

1. INTRODUÇÃO

O estudo do bem-estar de animais, embora seja antigo, vem ganhando força nas duas últimas décadas (Volpato et al., 2009). Apesar do crescimento das pesquisas no assunto, um dos desafios ainda recente, é encontrar formas adequadas de avaliar e quantificar o bem estar nos animais, particularmente naqueles que diferem em muitos aspectos dos mamíferos, como por exemplo, os peixes. Isso porque, segundo Broom (1986), o estado de bem estar está em uma escala que vai de bom- bem estar a mau- bem estar.

Na maioria dos casos, as formas de acesso aos níveis de bem estar em peixes ocorrem por meio de fatores fisiológicos e comportamentais (Volpato et al., 2007). Os níveis de cortisol indicando níveis de estresse (Huntingford, et al., 2006) e consequentemente, ausência de bem-estar; a exibição de comportamentos no vácuo (Galhardo et al., 2008) e comportamentos indicadores de dor e desconforto (Sneddon, 2003) são exemplos de indicadores de bem-estar em peixes. Mas são indicadores indiretos, uma vez que quantificam estresse e não bem estar.

O tipo de indicador de bem-estar utilizado, geralmente está atrelado ao conceito de bem-estar animal, o qual ainda é um tema complexo, já que não há uma definição completa, uma vez que a questão da quantificação não está bem resolvida. Por exemplo, de acordo com Huntingford et al. (2006), bem estar significa ausência de sofrimento, o que por si já é bastante difícil de acessar em mamíferos, quanto mais em peixes. Para tentar desviar desta dificuldade, autores se usam de outras abordagens que envolvem o estudo de áreas neurais responsáveis pela sensação de dor e de emoções (ex. Sneddon, 2002; 2003), que são utilizadas nas inferências sobre conforto e sofrimento. Esses estudos podem ser parte auxiliar no entendimento e acesso ao bem-estar, mas não são completos, pois mesmo esses numerosos estudos não nos permite acessar

adequadamente o estado da consciência em peixes e o que significa sofrimento e desconforto para esse grupo de animais – sensiência- (Volpato et al., 2009).

A definição proposta por Volpato et al. (2007, p. 170) é que o bem-estar animal é “o estado interno quando o animal está em condições de livre escolha”. De forma semelhante, Dawkins (2008) define bem estar como o estado do animal quando está saudável e tem o que ele quer (Dawkins, 2008). Animais estão bem quando tem aquilo que escolhe, aquilo que prefere. De acordo com esses autores, testes de preferência são adequados porque não são baseados na sensiência ou correlatos neuro-anatômicos das emoções em mamíferos. Simplesmente, consideram que os animais estarão melhores na situação em que eles escolhem ficar.

Os testes de preferências, no entanto, devem ser realizados sob certos critérios, pois, um dos problemas com tais testes é que os resultados refletem a escolha do animal dentre as opções disponíveis, e não aquilo que ele realmente prefere (Volpato 2007, Volpato et al, 2007), sendo necessários testes variados para que se defina a real preferência do peixe. Segundo esses autores, a preferência pode ser direcionada pelo tipo de aparato, por marcadores no laboratório e pelo tipo de situação oferecida, pelo estado fisiológico do animal, entre outras características.

A escolha que o animal faz em determinada situação pode, também ser influenciada por características individuais, como por exemplo, a aprendizagem (Darmaillacq et al., 2004; Engeszser et al., 2004; Amano et al., 2005; Gómez-LaPlaza, 2009). Outro fator menos estudado e que pode afetar a preferência individual é a posição social, ou experiência de dominância e submissão. Galhardo et al. (2009), por exemplo, mostrou que machos dominantes de *Oreochromis mossambicus* preferem substratos que podem ser usado para construção de ninho, enquanto submissos não mostram preferência por presença ou ausência de substrato.

Em peixes a definição da posição social depende de alguns fatores como níveis hormonais e condição reprodutiva (Pankhurst & Barnett, 1993; Pankhurst 1995; Francis et al., 1993), tamanho do corpo (Beeching 1992; Chellappa et al., 1999), experiência prévia de dominância e submissão (Nelissen & Andries, 1988) níveis de agressividade e residência prévia (Gonçalves-de-Freitas, 2002). A dominância traz vantagens aos dominantes no momento da reprodução e da fuga de predadores (Alcock, 2001) e também provoca mudanças internas, pois os níveis de andrógenos em machos são modulados pela posição social (Oliveira, 2004; Soares et al., 2010). Assim, a posição social muda o estado interno do animal, gerando necessidades diferentes. Desta maneira é razoável supor que as diferenças decorrentes da posição social atuem sobre as escolhas dos animais. Dessa forma, testamos a hipótese geral de que a posição social (dominante ou submisso) afeta a preferência por substrato claro ou escuro em machos adultos de tilápia-do-nilo.

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é um ciclídeo africano de grande importância na aquicultura mundial e que tem sido utilizada como modelo em pesquisas sobre bem-estar em testes de preferência pois essa espécie responde à cor do ambiente com menor aumento dos níveis de cortisol (Volpato e Barreto, 2001), além de serem capazes de se lembrar de estímulos aversivos, evidenciando a sua capacidade cognitiva (Moreira & Volpato, 2004). Os machos preferem construir ninhos em substratos mais leves e menos complexos (Mendonça et al., 2010), preferem temperaturas mais altas e luminosidade reduzida (Volpato, GL; informações pessoais). Porém, testes sobre o efeito exercido pela hierarquia de dominância sobre a preferência substratos claros e escuros não foram ainda desenvolvidos para a tilápia-do-nilo. Além disso, o efeito do contexto reprodutivo (situação de corte) também é pouco explorado.

De acordo com Maximino (2007), a tilápia-do-nilo prefere ambientes pretos, indicando nesse estudo que a cor escolhida pode funcionar como testes de ansiedade em peixes. Esse é, também, um indicativo de que a escolha por locais escuros pode estar associado à refúgio. Como a Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) tem variados padrões de listras transversais negras em seu corpo, especialmente os submissos (Falter, 1983; Volpato et al., 2003), o substrato escuro ofereceria uma proteção, tornando-os menos visíveis. Num contexto reprodutivo, entretanto, principalmente durante a corte, é importante para o macho dominante se expor para a fêmea (e.g. Lowe-McConnell, 1958; Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998), podendo alterar seu padrão de escolha nesse contexto. Assim, é possível que em situações em que os animais fiquem mais vulneráveis, seja vantajoso para o peixe que ele fique menos visível. Por outro lado, em algumas situações é necessário ficar mais visível, como acontece com os dominantes na época reprodutiva (Lowe-McConnell, 1958; Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998), quando o macho precisa de destaque para que a fêmea o veja com maior facilidade.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi testar se machos de tilápia-do-nilo preferem substratos claros ou escuros e se essa preferência é alterada pela posição na hierarquia de dominância e pelo contexto reprodutivo. Predizemos que tanto dominantes como submissos isolados preferem substratos escuros. Como os animais submissos ficam mais escuros que os dominantes, a experiência prévia de submissão pode intensificar a permanência do animal no substrato escuro. Quando juntos num mesmo espaço, os dominantes poderão preferir o substrato claro, que é mais parecido com seu padrão corporal, ou preferir o substrato escuro e expulsar os submissos para o lado claro. Nesse caso, a escolha será do dominante e, o comportamento do submisso denotaria “escolha”, guiada pelo comportamento do dominante. Já em presença da

fêmea, é possível que o dominante fique mais exposto no ambiente preferindo o lado claro.

Diante do delineamento utilizado, deparamos com outro problema. O isolamento social e o estresse de manipulação também podem afetar a escolha, uma vez que os animais podem reduzir a exploração espacial em ambientes novos (Gómez-LaPlaza & Morgan, 2000; 2003). Assim, foi testado, em um segundo estudo, se essas variáveis poderiam afetar a escolha em machos de tilápia-do-nilo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico e Manutenção

Nos experimentos foram usados peixes machos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* (L.)) coletados da miniestação de piscicultura de São José do Rio Preto. Depois, permaneceram em tanques internos de 500 L por, no mínimo, 20 dias para aclimação às condições do laboratório, que eram 12 horas de fotoperíodo (iniciando às 07:00), alimentação 2 vezes ao dia (uma hora depois do início do fotoperíodo e uma hora antes do seu fim), até a completa saciação, temperatura de $\pm 27^{\circ}$ C em sistema de recirculação de água e aeração. Todos os animais foram anestesiados antes de da biometria e dos testes, exceto quando foram pareados para definição da hierarquia. A anestesia consistia em uma solução aquosa de benzocaína (0.2g/5L). Para identificação dos animais, foram feitos cortes parciais na nadadeira caudal segundo Fernandes & Volpato (1993) e Höglund et al (2005).

2.2. Experimento 1: Preferência por substrato e experiência social

Este experimento foi feito para responder se machos de tilápia-do-nilo têm ou não preferência por substratos claro ou escuro e se a experiência de dominância ou submissão pode ou não afetar essa preferência. Utilizamos 20 duplas de machos de tilápia-do-nilo, com comprimento padrão de (média $\pm$ desvio padrão) $13,93 \pm 0,43$ cm (para dominantes) e $12,55 \pm 0,32$ cm (para submissos), e peso de $81,47 \pm 7,48$ g (dominantes) e $59,80 \pm 5,22$ g (submissos), os quais foram isolados por 10 dias em aquários de 40cm X 30cm X 30cm. O tempo de isolamento foi utilizado para reduzir a experiência prévia de dominância ou de submissão, de acordo com o proposto por Figler (1983). Os aquários foram revestidos lateralmente e posteriormente por plástico azul, pois essa cor diminui o aumento do estresse na tilápia-do-nilo (Volpato & Barreto, 2001).

Os peixes foram transferidos, individualmente, para outro aquário (“aquário teste”) de 80cm X 30cm X 40cm, com 37,5% (30 cmX30cm) do fundo forrado externamente com plástico branco formando a zona clara; 30 cm forrado por plástico preto, formando a zona escura, e 20 cm, no centro, forrado por plástico cinza, formando a zona neutra (figura 1). Os peixes ficaram restritos à zona neutra nos 5 primeiros min do teste. A restrição foi feita com um cilindro plástico transparente com 13 cm de diâmetro. Depois dos 5 min, o cilindro foi removido e o peixe podia nadar livremente por todo o aquário por 20 min, sendo anotada a cada 10 s a zona em que o peixe estava, utilizando, portanto, amostragem intervalar (Martin & Bateson, 2007).

Para o estabelecimento da hierarquia de dominância, os animais foram colocados, em pares, em aquários similares ao aquário de isolamento, mas com um vidro transparente no meio separando o aquário em duas partes iguais. O vidro possuía

três furos com diâmetro de aproximadamente 5 cm cada para possibilitar comunicação visual e química entre os animais. Cada peixe da dupla foi colocado em uma parte do aquário e, imediatamente, o vidro do meio era removido por uma hora para que os animais definissem a hierarquia. O vidro era recolocado e, depois de 24 horas, era removido novamente por mais uma hora. No terceiro dia o vidro era retirado por mais uma hora e os peixes eram transferidos, separadamente, para o aquário teste, para serem testados novamente quanto à preferência. Foi considerado dominante o peixe que possuísse três características: Olhos claros (Volpato et al., 2003), Corpo bege-acinzentado (Falter, 1983) e perseguiam e atacavam mais que o outro peixe.

2.3. Experimento 2: Dupla e contexto reprodutivo

Neste experimento, verificamos se dominantes e submissos escolhem o mesmo substrato sem e com a presença da fêmea, respectivamente. Para isso, isolamos 11 duplas de machos de peixes com comprimento padrão de (média $\pm$ desvio padrão) $14,1 \pm 0,56$ cm e peso de $98,43 \pm 13,99$ g (Dominantes) e $13,03 \pm 0,35$ cm e peso de $75,98 \pm 6,76$ g (Submissos) por 10 dias, como no experimento 1. Os peixes foram transferidos, em duplas, para aquários teste. O par permaneceu no aquário por uma hora ou até que a hierarquia estivesse bem estabelecida, segundo os critérios já mencionados, depois do que o teste era conduzido, como no último experimento (5 min restrito à zona neutra e mais 20 min nadando por todo o aquário, sendo anotada a cada 10 s a posição de ambos os animais – dominante e submisso). Os peixes voltavam, então, para o aquário de isolamento por 24 horas e depois, foram recolocados no aquário teste com o mesmo peixe do dia anterior (a dupla foi mantida), mas agora, dentro do aquário teste havia, no centro da zona neutra e colado à parede do fundo do aquário, um aquário menor (15cm

X 15cm X 30cm) contendo uma fêmea fértil e madura. Novamente os peixes permaneceram lá por pelo menos 1 hora ou até que a hierarquia de dominância estivesse bem estabelecida e o teste era conduzido como antes, anotando-se a zona de dominante e submisso a cada 10 s.

2.4. Experimento 3: Preferencia por substrato ao longo do tempo

Após os primeiros experimentos, novos estudos foram realizados para testar as variáveis dos experimentos anteriores que poderiam afetar os resultados. O tempo reduzido decorrido entre a transferência dos animais do aquário de isolamento para o aquário teste poderia causar estresse de manipulação. Além disso, o animal isolado poderia reduzir a exploração do ambiente e não exibir escolha. Por isso, foi feito mais um experimento com testes após um tempo mais longo no aquário teste e, também, na presença de co-específicos.

Foram isolados 20 machos com comprimento padrão de (media $\pm$ desvio padrão) 12.6 ± 1.38 cm e peso de (media $\pm$ desvio padrão) 71.02 ± 22.23 g, por 5 dias. Os machos foram transferidos como descrito no experimento 1 para o aquário teste onde permaneceram por 72 horas. Imediatamente após serem colocados ali, os registros foram realizados. Depois de 24 horas, um segundo registro (20 min) foi realizado. Logo após o segundo teste, foram colocados 4 peixes em um aquário atrás do aquário teste que o peixe a ser testado podia ver. Depois de 24 horas, o peixe no aquário teste foi testado novamente, mas vendo os 4 peixes. Após o terceiro teste, os 4 outros peixes foram retirados e, depois de 24 horas o peixe foi testado novamente.

2.5. Análise dos dados

Em todos os experimentos, os dados foram analisados quanto à homogeneidade utilizado Teste Fmax (Ha & Ha, 2007) e quanto à normalidade utilizando-se teste de “Kurtosis” (mostra distribuição normal quando seu valor fica entre -8,0 e 8,0) e teste de “Skewness” (mostra normalidade para valores entre -4,0 e 4,0) (Ha & Ha, 2007). Não atendendo a estes requisitos (mesmo depois de transformações) os dados foram considerados não paramétricos sendo utilizados testes dessa categoria.

No primeiro experimento coletamos a frequência relativa (escolhas/120) da presença dos peixes em cada zona, antes e depois da experiência social. Sendo não paramétricos e havendo dependência entre os dados, eles foram analisados por ANOVA de Friedman comparando “antes e depois da experiência” com “permanência na zona clara ou permanência na zona escura”, isso para dominantes e depois para submissos (Ha & Ha, 2007).

No segundo experimento, comparamos a frequência de permanência na zona clara com a frequência de permanência na zona escura para dominantes e para submissos, na presença ou ausência de fêmeas. Utilizamos o teste de Wilcoxon para comparar a frequência nas zonas clara e escura (Ha & Ha, 2007).

No terceiro experimento, tínhamos a frequência imediatamente após a manipulação, 24 horas após a transferência, em contato visual com co-específicos e 24 horas após o contato visual. Como os dados pressupõem dependência (uma vez que o mesmo peixe foi testado em cada uma das situações), eles foram analisados por ANOVA de Friedman, comparando cada um dos dias, a permanência em cada uma das zonas (Ha & Ha, 2007).

2.6. Nota ética

Os procedimentos adotados neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovadas pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da UNESP de São José do Rio Preto, SP-Brasil (protocolo 014/09).

3. RESULTADOS

Em todos os experimentos, desconsideramos a zona neutra pois a frequência de permanência nesse local foi reduzida. Os peixes permaneceram apenas 9.29 ± 14.88 (média $\pm$ desvio padrão) vezes (em 120) durante todos os experimentos. Assim, analisamos apenas a frequência nas zonas clara e escura para os testes de hipótese.

Os dominantes permaneceram mais na zona de substrato escuro tanto antes quanto depois da experiência de dominância ($\chi^2 = 32,59$; $p < 0,001$). O mesmo é possível afirmar para os submissos ($\chi^2 = 28,06$; $p < 0,001$) como se vê na figura 2.

No 2º experimento, a frequência de permanência dos dominantes foi maior na zona escura ($Z = 2,00$ e $p = 0,0454$, sem a fêmea e $Z = 2,22$ e $p = 0,026$ na presença da fêmea), enquanto que para os submissos não houve diferença significativa ($Z = 0,71$ e $p = 0,47$ sem a fêmea e $Z = 0,76$ e $p = 0,44$), na ausência (figura 3) ou presença da fêmea (figura 4). Os dominantes também desferiram ataques no submisso a todo momento, expulsando-os com frequência da zona escura.

No 3º experimento, duas réplicas cujos peixes permaneceram o tempo todo em apenas uma zona, sem explorar o ambiente, foram retiradas das análises. No primeiro dia (animal isolado), a frequência de permanência foi semelhante entre as zonas clara e escura (ANOVA de Friedman- $\chi^2 = 78,68$ $p < 0,001$; dunnet - $\chi^2 = 9$, $p > 0,05$), sendo que no segundo dia de isolamento no aquário teste, a frequência foi maior na zona escura (dunnet - $\chi^2 = 84,00$; $p < 0,05$). O contato visual com co-específicos não alterou a preferência (dunnet - $\chi^2 = 73,5$; $p < 0,05$ – figura 5).

4. DISCUSSÃO

Descobrimos, com este trabalho, que os peixes preferem substratos escuros. Vimos também que nem a posição social e nem o contexto reprodutivo podem modular essa preferência, embora a presença do dominante mascare a preferência do submisso. Este trabalho nos permitiu, também, ver que essa preferência não muda ao longo dos dias e que não é causada pelo estresse de manipulação ou de isolamento social.

Devemos lembrar que a preferência está condicionada às opções que disponibilizamos a ele e pode não representar a real preferência (Volpato 2007, Volpato et al, 2007). Assim, quando falarmos em preferência, falaremos de preferência em relação ao que foi oferecido aos animais.

Vemos que os peixes, em todos os experimentos, tiveram maior frequência no substrato escuro. Assim, podemos dizer que preferem o substrato escuro. Como a escolha do substrato está fortemente ligada à reprodução (Fryer e Iles, 1972) e à sobrevivência (Hart, 1993; Atkinson et al., 2004; Reyer et al., 2008), podemos deduzir que há uma preferência natural na tilápia-do-nilo por substratos que oferecem maior

proteção, assim como ocorre em *Danio rerio* (Serra et al., 1999) e em linguados do pacífico- *Hippoglossus stenolepis* e *Lepidopsetta polyxystra*- (Reyer et al., 2008). É o caso do substrato escuro que oferece proteção na forma de camuflagem uma vez que os peixes têm faixas escuras pelo corpo (Falter, 1983) e submissos possuem os olhos escuros (Volpato et al., 2003). Além disso, Maximino et al. (2007) mostraram que *Danio rerio*, *Paracheirodon axelrodi*, *Astyanax altiparanae*, *Oreochromis niloticus* e *Poecilia reticulata* preferem, todos, um ambiente escuro, passando um tempo maior nesse local em um experimento parecido com o do trabalho aqui apresentado. Maximino et al. (2007) mostraram também que o branco não é aversivo à espécie aqui estudada. Isso nos reforça que os animais ficaram mais no substrato escuro por preferi-lo, e não porque ficaram no lado oposto ao substrato claro.

Como os machos de tilápia-do-nilo preferem o substrato escuro com e sem experiência de dominância ou submissão, a experiência social prévia não interfere na preferência. Isto é independente da experiência prévia do animal quanto à posição na hierarquia de dominância. É por isso que, tanto dominantes quanto submissos preferem o substrato escuro tanto antes quanto depois da experiência social.

Como esperado, quando dominantes e submissos estão juntos, dominantes ficam mais no substrato escuro, o lado que preferem. O submisso, entretanto, não fica no lado escuro. Isso porque ele é repellido do território pelo dominante com ataques do dominante direcionados ao submisso como era esperado (Alcook, 2001). Assim, os subordinados não tem como mostrar sua preferência quando estão na presença do dominante. A preferência pelo substrato fica mascarada pelo contexto social no subordinado. Isso indica que a presença do dominante altera a preferência do submisso. Isso pode ser visto, por exemplo, em lagostas que preferem abrigos com menos

entradas, mas dominantes ficam com estes abrigos, expulsando submissos para outros abrigos menos protegidos (Martin III & Moore, 2008).

Os machos precisam ser vistos pela fêmea para que a corte seja eficiente (e.g. Lowe-McConnell, 1958; Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Sabe-se que machos, especialmente dominantes, tem uma cor bege-acinzentada brilhante (Falter, 1983). Essa coloração se mantém durante o acasalamento (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Assim, o animal fica mais claro. Para uma melhor visualização pela fêmea, o dominante se posiciona na parte do aquário com substrato escuro, para contrastar com este substrato. Assim, embora inicialmente tenha sido suposto que o dominante ficaria mais visível se estivesse no substrato claro, ele pode também se destacar no substrato mais escuro. Isso faz com que machos dominantes, na presença da fêmea, prefiram o lado escuro. Ele, então expulsa o submisso de lá. A preferência pelo substrato escuro não muda no contexto reprodutivo, mas o motivo pelo qual o dominante o prefere é diferente.

Há animais que, quando estressados, ficam imóveis (Steckler, 2005; Galhardo & Oliveira, 2009; Vilhunen & Hirvonen, 2003). Assim, os peixes poderiam ter ficado mais frequentemente do lado escuro por estarem estressados e não por uma preferência. Para excluir o efeito do estresse de manipulação, o terceiro experimento foi delineado. Entretanto, a manipulação gerou um comportamento não visualizado no experimento “preferência por substrato e experiência social”. A tilápia não mostrou preferência imediatamente após a manipulação. Podemos notar que, 24 horas após a manipulação, quando o estresse desta manipulação já passou e os peixes aclimataram, eles ficam a maior parte do tempo no substrato escuro. Podemos então excluir o efeito do estresse. Essa permanência não é alterada pelo contato visual com outros animais da mesma espécie. Em outras palavras, contato físico pode mascarar a preferência do submisso,

mas somente contato visual não afeta essa preferência. Nem Contato visual, nem contato físico podem mudar a preferência do dominante. Assim, sabemos que os peixes preferem o substrato escuro.

Quando os peixes ficaram isolados por 10 dias, entretanto, como em “preferência por substrato e experiência”, eles escolheram o lado escuro, mesmo imediatamente após a manipulação. Quando ficaram isolados apenas 5 dias, como em “Preferência por substrato ao longo dos dias”, eles não apresentam preferência por nenhum dos substratos imediatamente após a manipulação. Esse resultado pode ser atribuído à diferença no tempo de isolamento entre os experimentos, pois, em acará bandeira, por exemplo, quanto maior o tempo de isolamento, menor a exploração do ambiente (Gómez-Laplaza & Morgan (1991). Dessa forma, o maior registro na zona clara pode ser atribuída à maior exploração do ambiente, que antecede a escolha na tilápia-do-nilo.

5. CONCLUSÕES

A tilápia-do-nilo prefere substrato escuro, o qual pode oferecer maior proteção. Essa preferência não é afetada por experiência social. Além disso, o dominante expulsa o submisso do substrato escuro quando estão juntos, modificando a preferência do submisso. No contexto reprodutivo, a preferência por substrato escuro não é alterada, mas, provavelmente, o motivo da escolha seja diferente (por que o peixe precisava ficar mais visível e não se esconder). Dessa forma, há dupla vantagem em preferir o substrato escuro para animais dominantes.

É bem conhecido que animais com melhor bem estar tem uma melhor qualidade de carne (Alvarez et al., 2009). Então, é recomendado que se façam tanques com substratos escuros, já que essa coloração independe da experiência de dominância ou submissão.

6. Referencias

- Alcock, J., 2001. Animal Behavior, seventh edition. Sinauer associates inc, Sunderland. pp. 266-271.
- Alvarez, D., Garrido, M. D., Banon, S., 2009. Influences of pre-slaughter process in pork quality: an overview. Food Reviews International. 25, 233-250.
- Amano, M., Iigo, M., Yamamori, K., 2005. Effects of feeding time on approaching behavior to food odor in goldfish. Fisheries Science. 71, 183-186.
- Atkinson, C. J. L., Bergmann, M., Kaiser, M.J., 2004. Habitat selection in whiting. Journal of Fish Biology. 64, 788-793.
- Beeching, S. C., 1992. Visual assessment of relative body size in a Cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. Ethology. 90, 177-186.
- Broom, M. D., 1986. Indicators of poor welfare. British Veterinary Journal. 142, 524-526.
- Chellappa, S., Yamamoto, M. E., Cacho, M. S. R. F., Huntingford, F. A., 1999. Prior residence, body size and the dynamics of territorial disputes between male freshwater angelfish. Journal of Fish Biology. 55, 1163-1170.
- Darmaillacq, A.S., Chechery, R., Poirier, R., 2004. Effect of early feeding experience on subsequent prey preference by cuttlefish, *Sepia officinalis*. Developmental Psychobiology. 45, n.4, 239-244.
- Dawkins, M. S., 2008. The science of animal suffering. Ethology. 114, 937-945.
- Engeszer, E., Ryan, M.J., Parichy, D.M., 2004. Learned social preference in zebrafish. Current Biology. 14, 881-884.
- Falter, U., 1983. Les comportements agonistiques de *Sarotherodon niloticus* (Pisces, Cichlidae) et la signification évolutive de l'incubation buccale. Bulletin de la Classe des Sciences. 69, 566-593.
- Fernandes, M.O., Volpato, G.L., 1993. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. Physiology and Behavior, 54, 319-323.
- Figler, M. H., 1983. The territorial prior residence effect in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum* Gunther): temporal aspects of establishment and retention, and proximate mechanisms. Behaviour. 85, 157-183.

- Francis, R. C., Soma, K., Fernald, R. D., 1993. Social regulation of the brain pituitary-gonadal axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90, 7794-7798.
- Fryer, G., Iles, T.D., 1972. Breeding habits. In: Fryer, G. & Iles, T. D. (Eds) *The cichlid fishes of the great lakes of Africa*, pp. 105-172. Neptune City. T.F.H. publications.
- Galhardo, L., Almeida, O., Oliveira, R. F., 2009. Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *Applied Animal Behaviour Science*. 120, 224-230.
- Galhardo, L., Correia, J., Oliveira, R. F. 2008. The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis niloticus*). *Animal Welfare*. 17, 239-254.
- Gómez-Laplaza, L. M., 2009. Recent social environment affects color-assortative shoaling in juvenile angelfish (*Pterophyllun scalare*). *Behavioural Processes*. 82, 39-44.
- Gómez-Laplaza, L. M., Morgan, E., 1991. Effects of short-term isolation on the locomotor activity of the angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Journal of Comparative Psychology*, 105, 366-375.
- Gómez-Laplaza, L. M., Morgan, E., 2000. Laboratory studies of the effects of short-term isolation on aggressive behaviour in fish. *Marine and Freshwater behaviour and physiology*. 33, 63-102.
- Gómez-Laplaza, L. M., Morgan, E., 2003. The influence of social rank in the angelfish, *Pterophyllum scalare*, on locomotor and feeding activities in a novel environmental. *Laboratory Animals*, 37, 108-120.
- Gonçalves-de-Freitas, E., 2002. Confrontos assimétricos e hierarquia de dominância em ciclídeos. *Anais do XX Encontro Anual de Etologia*. p. 137-141.
- Gonçalves-De-Freitas, E., Nishida, S.M., 1998. Sneaking behaviour of the Nile tilapia. *Boletim Técnico Do CEPTA*. 11, 71-79.
- HA, R. R. & HA, J. C.. 2007. *Integrative Statistics for Behavioral Sciences*. MA: Pearson Custom Publishing, Boston.
- Hart, P. J. B., 1993. Teleost foraging: facts and theories Chapter. In: Pitcher, T. J. (Ed) *Behaviour of Teleost Fishes*, pp. 253-279. New York. Chapman & Hall.
- Höglund, E., Bakke, M. J., Overli, O., Winberg, S., Nilsson, G. E., 2005. Suppression of aggressive behavior in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by 1-tryptophan supplementation. *Aquaculture*. 249, 525-531.

- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandoe, P. Turnbull, J. F., 2006. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*. 68, 332-372.
- Lowe-McConnell, R. H., 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.
- Martin, P., Baterson, P., 2007. *Measuring Behaviour: An introductory Guide*. Cambridge University press. Cambridge.
- Martin III, A. L., Moore, P., 2008. The influence of dominance on shelter preference and eviction rates in the cryfish, *Orconectes rusticus*. *Ethology*. 114, 351-360.
- Maximino, C., Brito, T. M., Moraes, F. D., Oliveira, F. V. C., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., Colmanetti, R., Lozano, R., Gazolla, R. A., Tenório, R., Lacerda, R. I. T., Rodrigues, S. T. K., Lameirão, S. V. O. C., Pontes, A. A. A., Romão, C. F., Prado, V. M., Gouveia Jr., A., 2007. A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleostes. *International Journal of Comparative Psychology*. 20, 351-367
- Mendonça, F. Z., Gonçalves-de-Freitas, E., Costa-Ferreira, R. S., Volpato, G. L., 2010. Substratum choice for nesting in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Biology*. 77, 1439-1445.
- Moreira, P. S. A., Volpato, G. L., 2004. Conditioning of stress in Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*. 64, 961-969.
- Nelissen, M. H. J., Andries, S., 1988. Does previous experience affect the ranking of cichlid fish in a dominance hierarchy. *Annales de la Societe Royale Zoologique de Belgique*. 118, 91-91
- Oliveira, R. F., 2004. Social modulation of androgens in vertebrates: mechanisms and functions. *Advances in the Study of Behavior*. 34, 165-239.
- Pankhurst, N.W., 1995. Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*. 99, 249-257.
- Pankhurst, N. W., Barnett, C. W., 1993. Relationship of population-density, territorial interaction and plasma-levels of gonadal-steroids in spawning male demoiselles chromis-dispilus (Pisces, Pomacentridae). *General and Comparative Endocrinology*. 90, 168-176.

- Ryer, C. H., Lemke, J. L., Boersma, k., Levaas, S., 2008. Adaptative coloration, behavior and predation vulnerability in three juvenile north Pacific Flatfishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 359, 62-66.
- Serra, E. L., Medalha, C. C., Mattioli, R., 1999. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32, 1551-1553.
- Sneddon, L. U., 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*. 319, 167-171.
- Sneddon, L. U., 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*. 83, 153-162.
- Soares, M. C., Bshary, R., Fusani, L., Goymann, W., Hau, M., Hirschenhauser, K., Oliveira R. F., 2010. Hormonal mechanisms of cooperative behavior. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*. 365, 2737-2750.
- Steckler T., 2005. The neuropsychology of stress. In: Steckler T., Kalin N. H., Reul J. M. H. M. (editors). *Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress*. Elsevier. Amsterdam.
- Vilhunen, S., Hirvonen, H., 2003. Innate antipredator responses of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) depend on predator species and their diet. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 55, 1-10.
- Volpato, G. L., 2007. Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36, 53-61.
- Volpato, G. L., Barreto, R. E., 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34, 1041-1045.
- Volpato, G. L., Giaquinto, P. C., de Castilho, M. F., Barreto, R. E. Gonçalves-de-Freitas, E., 2009. Animal welfare: from concepts to reality. *Oecologia Brasiliensis*. 17, 5-15.
- Volpato, G. L., Gonçalves-De-Freitas, E., Fernandes-De-Castilho, M., 2007. Insights into the concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms*. 75, 165-171.
- Volpato, G. L., Luchiari, A. C., Duarte, C. R. A., Barreto, R. E., Ramanzini, G. C., 2003. Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36, 1659-1663.

Legenda das Figuras

Figura 1: Visão frontal do aquário com capacidade de 96 litros, onde os testes eram realizados.

Figura 2: Média ($\pm$ erro padrão) da frequência de permanência dos machos dominantes (A) e submissos (B) na zona clara ou escura, antes e após a experiência social. * indica diferença significativa: A ($\chi^2 = 32,5950$; $p < 0,00001$); B ($\chi^2 = 28,0566$; $p < 0,00001$).

Figura 3: Média ($\pm$ erro padrão) da frequência de permanência em cada zona na presença do co-específico no mesmo aquário (A- T = 10,5000; $p = 0,0454$ para dominantes; T = 25,0000; $p = 0,4769$ para submissos) e no contexto reprodutivo (B- T = 8,0000; $p = 0,0262$ para dominantes; T = 20,0000; $p = 0,4445$ para submissos). * indica diferença significativa.

Figura 4: Média ($\pm$ erro padrão) de permanência em cada zona ao longo dos 4 dias. * indica uma diferença significativa ($\chi^2 = 78,6775$; $p < 0,001$).

Figura 1

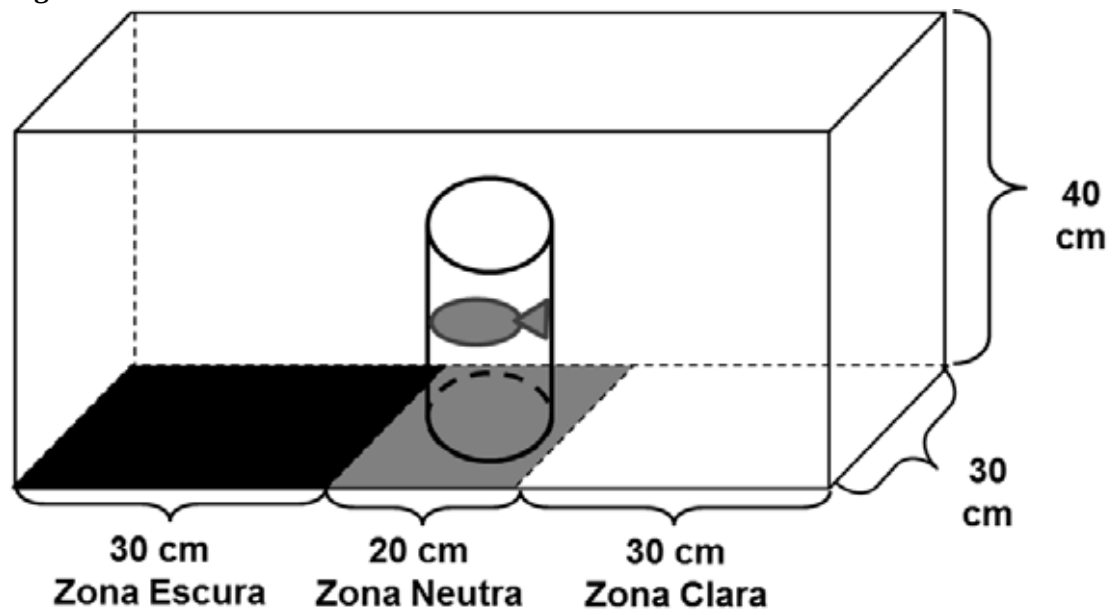


Figura 2

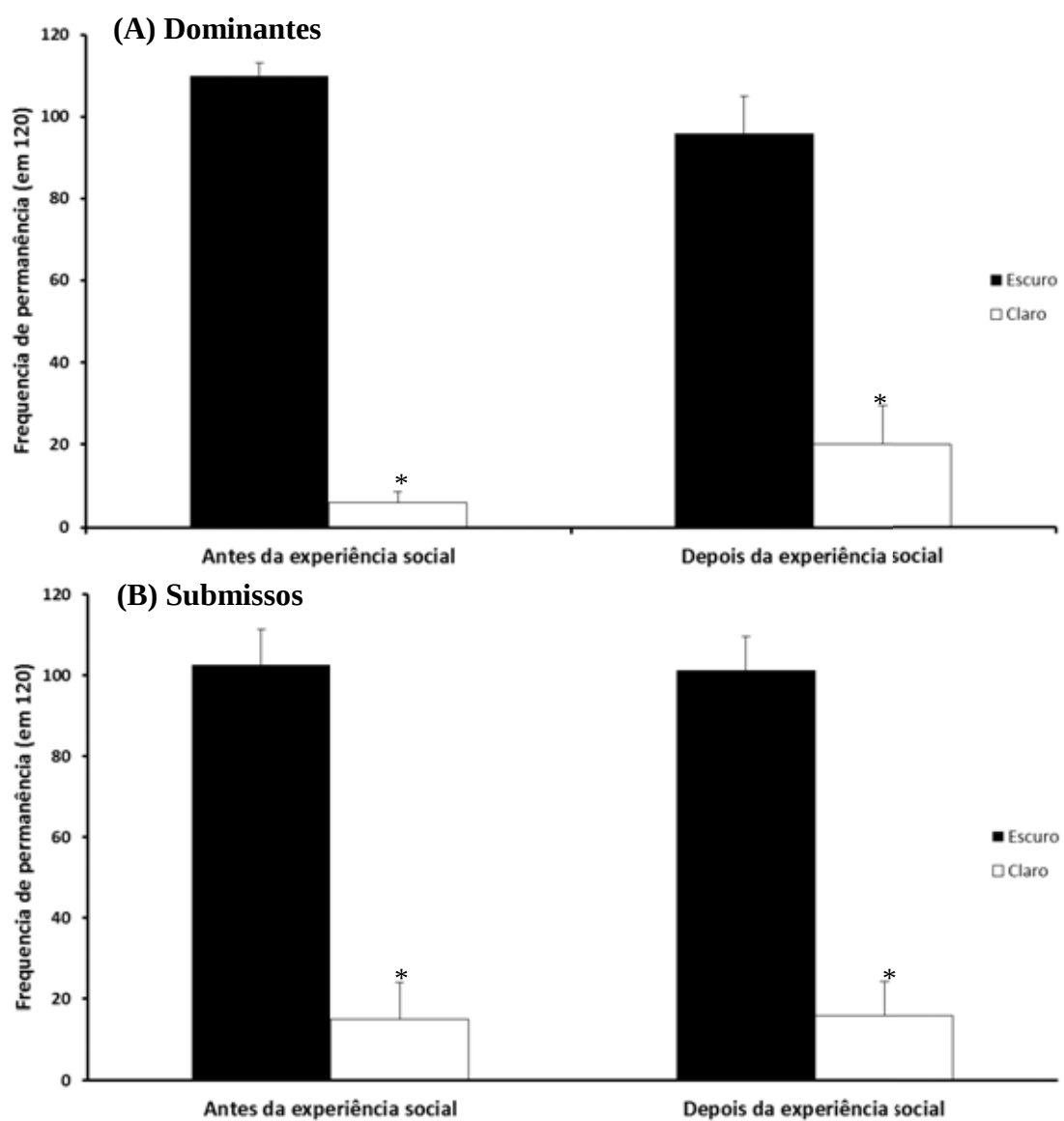


Figura 3

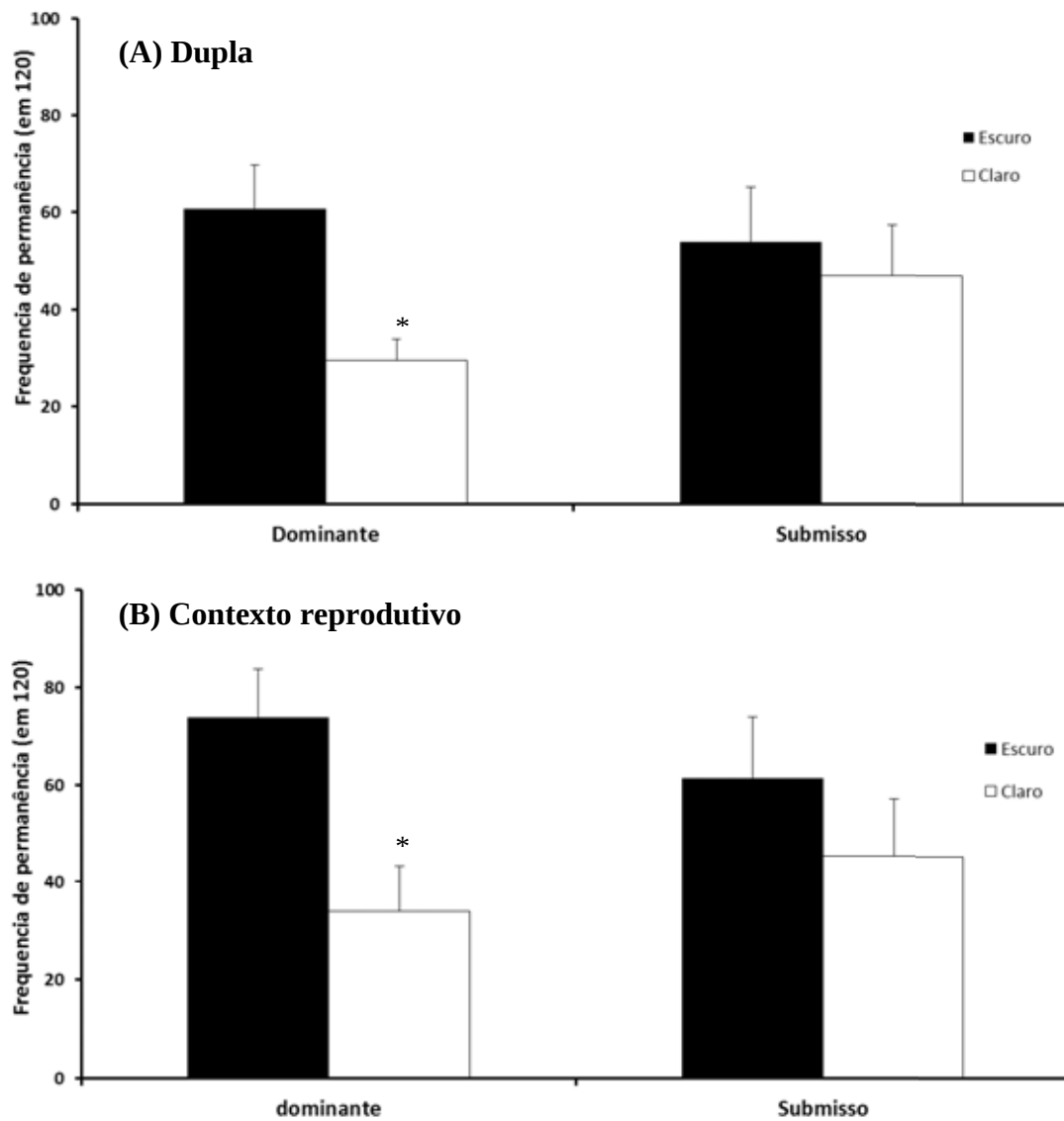


Figura 4

