



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aquicultura da Unesp- CAUNESP



**A HOMOGENEIDADE DE TAMANHO AUMENTA AS
INTERAÇÕES AGRESSIVAS EM GRUPOS DE MACHOS
REVERTIDOS DE TILÁPIA-DO-NILO, LINHAGEM GIFT**

CAMILA NOMURA PEREIRA BOSCOLO

JABOTICABAL

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aquicultura da Unesp- CAUNESP



**A HOMOGENEIDADE DE TAMANHO AUMENTA AS
INTERAÇÕES AGRESSIVAS EM GRUPOS DE MACHOS
REVERTIDOS DE TILÁPIA-DO-NILO, LINHAGEM GIFT**

Camila Nomura Pereira Boscolo

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

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

JABOTICABAL

2011

B742a	Boscolo, Camila Nomura Pereira A homogeneidade de tamanho aumenta as interações agressivas em machos revertidos de tilápia-do-nilo, linhagem GIFT / Camila Nomura Pereira Boscolo. – – Jaboticabal, 2011 xii, 62 f. : il. ; 29 cm Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura , 2011 Orientador: Eliane Gonçalves de Freitas Banca examinadora: Marisa Fernandes de Castilho, José Eurico Possebon Cyrino Bibliografia 1. Agressividade. 2. Estresse Social. 3. Bem-estar I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura. CDU 693.3.045
-------	---

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

Dedico

Aos meus pais, Allan e Nina e minha tia, Haruê, pela confiança e pelo incondicional apoio e amor.

Ao meu querido e amado companheiro, Thiago, que sempre fez de tudo para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Eliane Gonçalves de Freitas, pela oportunidade, paciência, confiança, ensinamentos oferecidos e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e ética.

Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni e à Prof^a Dr^a Elisabeth Criscuolo Urbinati pela participação e sugestões feitas na minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros pelo auxílio nas análises estatísticas.

À minha mãe, Nina, por ser minha amiga e ser um exemplo de força e determinação e me ensinar que os percalços da vida nos tornam sempre mais fortes.

Ao meu pai, Allan, pelo exemplo de bondade infinita, justiça e por ser sempre um grande amigo.

Aos meus queridos irmãos, Flavia e Henrique, cada um com seu jeito muito especial que admiro e me espelho sempre.

À minha cunhada, Maristela, por fazer parte da minha vida.

Ao meu sobrinho, Marcelo, que ilumina nossa família.

À minha tia, Haruê, por ser essa pessoa incrivelmente iluminada e por ser um exemplo de otimismo e bondade.

Ao meu companheiro, Thiago, por toda a ajuda na coleta de dados, pela paciência, dedicação e companheirismo, mesmo nos momentos em que meu cortisol subia a níveis insuportáveis. Obrigada pelas longas conversas que sempre me incentivaram e me deram força para seguir em frente. Além de meu amado, meu grande amigo.

Aos meus amores, Fiona e Serena, por me alegrarem sempre e por me ensinarem que não precisamos de muito para ser feliz.

Ao grande amigo, Julian, pela amizade, companheirismo e pelos momentos agradáveis e muito engraçados.

Às minhas grandes amigas de graduação de república e da vida, Carmen, Gel e Mel, pela grande amizade que dura até hoje e vai durar por muitos anos.

À Thálita, pela amizade e pelo auxílio fundamental nas coletas.

Aos colegas do Laboratório de Comportamento Animal: André, Ângelo, Fábio, Francine, Maristela, Tatiana e Thais. As sugestões dadas a este trabalho foram essenciais para o seu desenvolvimento e sua conclusão.

Ao Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração nas análises de cortisol.

Aos colegas, docentes e funcionários do CAUNESP, pela boa convivência e pelos ensinamentos transmitidos durante esses anos.

A todos, que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

FINANCIAMENTO:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNPq (Projeto Universal, processo: 479600/2008-2)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES
(Bolsa Mestrado)

SUMÁRIO

Resumo – 1

1. Introdução – 1

2. Material e Métodos – 4

2.1. Manutenção dos Peixes – 4

2.2. Delineamento Experimental – 4

2.3. Condições Experimentais – 5

2.4. Interações Sociais – 5

2.5. Classificação Hierárquica e Estabilidade Social – 5

2.6. Coleta de Sangue e dosagem do cortisol – 6

2.7. Taxa de Crescimento Específico – 6

2.8. Análise dos dados – 6

2.9. Nota Ética – 6

3. Resultados – 7

3.1. Interação Agonística e Estabilidade Social – 7

3.2. Cortisol – 7

3.3. Taxa de Crescimento Específico Cortisol – 7

4. Discussão – 7

Referências – 13

Tabelas – 22 e 23

Legenda das Figuras – 24

Figuras – 25 a 28

Anexo

Resumo

Animais com a mesma habilidade de luta podem lutar por mais tempo e intensamente do que em confrontos assimétricos. Assim, a seleção de peixes pela similaridade de tamanho em manejos da piscicultura pode causar um aumento das interações agressivas e levar à instabilidade social em peixes socialmente organizados. Assim, testou-se a hipótese de que o agrupamento de animais de tamanhos semelhantes aumenta as interações agressivas entre machos de tilápia-do-nilo, linhagem GIFT. Este, por sua vez, aumenta o estresse social e desestabiliza a hierarquia social. Foram comparados dois tratamentos: um grupo homogêneo (HM), formado por cinco machos revertidos com variação de tamanho entre 9,0 e 9,4 cm; e um grupo heterogêneo (HT), formado por cinco animais de tamanhos variando entre 7,5 e 11,5 cm (n=16 para cada tratamento). Os peixes foram mantidos nesses grupos por seis dias, nos quais as interações agonísticas foram registradas a partir do segundo dia de agrupamento (10 min dia⁻¹ – 5 sessões de observação). Níveis de cortisol plasmático e taxa de crescimento específico (TCE) foram utilizados para inferir estresse social. A frequência de interações agonísticas foi maior no HM (média ± S.E: HM = 302,06 ± 20,13 x 10 min⁻¹; HT = 151,06 ± 13,35 x 10 min⁻¹). Mudanças na posição social ocorreram neste grupo, indicando instabilidade social. Entretanto, os níveis de cortisol (HM = 27,54 ± 3,02 ng mL⁻¹; HT = 24,42 ± 2,41 ng mL⁻¹) e TCE (HM = -0,53 ± 0,04%; HT = -0,64 ± 0,08%) foram similares entre os tratamentos. Dessa forma, conclui-se que o agrupamento de peixes de tamanhos semelhantes aumenta as interações agressivas e desestabiliza a hierarquia social. Assim, apesar de não terem sido encontradas diferenças nos indicadores de estresse, pode-se concluir, com base em comportamento, que o agrupamento de animais de tamanhos semelhante reduz o bem-estar de peixes sociais, devido as chances de injúrias serem maiores do que em grupos heterogêneos.

Palavras-chave: Cichlidae, Agressividade, Estresse social, Instabilidade Social, Bem-estar.

1. Introdução

As práticas de manejo utilizadas na piscicultura, como altas densidades de estocagem, transporte, biometrias e classificação de animais por similaridade de tamanho geralmente

provocam estresse nos peixes (e.g. Pickering et al., 1982; Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Conte (2004), relata que o estresse é um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência de doenças e mortalidade na aquicultura.

Entre as várias fontes de estresse, é bastante prevalente na aquicultura aquele causado por interações sociais em peixes territoriais, como ciclídeos e salmonídeos (e.g. Pottinger e Pickering, 1992, Sloman et al., 2000a; Earley et al., 2006). Em tais interações, os peixes lutam agressivamente até a definição hierárquica (e.g. Enquist e Jakobsson, 1986; Turner e Huntingford, 1986) e alguns animais (dominantes) têm prioridade sobre os outros (subordinados) ao acesso a recursos limitados, tais como: alimentos, parceiros para acasalamento, abrigo e território (Huntingford e Turner 1987; Johnsson et al., 2000). As lutas se intensificam rapidamente, mas após o estabelecimento da hierarquia de dominância as interações agonísticas são reduzidas prevalecendo exibições de baixa intensidade de agressividade e baixo custo energético (e.g. Haller e Wittemberger, 1988; Chellapa et al., 1989; Johnsson et al., 2000). Geralmente, os dominantes apresentam menor estresse social do que os subordinados (e.g. Fernandes e Volpato, 1993) e o resultado dessa diferença é a variação no tamanho do corpo, sendo o crescimento dos submissos mais lento do que os dominantes, gerando assim o crescimento heterogêneo (Volpato e Fernandes, 1994; Metcalfe et al., 2003).

Neste tipo de organização social, é importante o reconhecimento da posição entre os indivíduos. Em peixes, a posição social pode ser exibida por sinalizações, tais como diferenças na coloração do corpo (Keenleyside e Yamamoto 1962; O'Connor et al., 1999), cor dos olhos (Volpato et al., 2003), comunicação química (Giaquinto e Volpato, 1997; Almeida et al., 2005; Gonçalves-de-Freitas et al., 2008) e som (Amorim et al., 2003). Essas sinalizações são fundamentais para manter a posição social e reduzir as chances de confrontos físicos diretos. Um importante sinal visual relacionado à informação e avaliação da habilidade de luta em peixes é o tamanho do corpo. Assim, o crescimento heterogêneo derivado da hierarquia social, pode ser uma forma de reduzir os confrontos físicos diretos em algumas espécies de peixes.

Apesar destas hipóteses, em sistemas de produção, o agrupamento de peixes por similaridade de tamanho é uma prática comum entre os piscicultores, pois, como os animais são comercializados pela biomassa média, a heterogeneidade resulta em perdas econômicas. Assim, o agrupamento de peixes sociais por similaridade de tamanho pode aumentar as interações agressivas, pois animais de tamanhos semelhantes possuem a mesma habilidade de luta, tendo, portanto, demora para estabelecimento hierárquico levando a um aumento do estresse social (Beeching, 1992; Koops and Grant, 1992; Ang and Manica, 2010) e também um aumento das chances de mortalidade pelo gasto excessivo de energia e injúrias físicas decorrentes das interações agressivas (Turnbull et al., 1998).

Neste estudo, testou-se o efeito do agrupamento de animais de tamanhos semelhantes sobre o comportamento agressivo, a instabilidade social e estresse social na tilápia-do-nilo, linhagem GIFT.

A tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) é uma das principais espécies produzidas na piscicultura (Romana-Eguía et al., 2004); a linhagem GIFT é amplamente utilizada, pois tem um excelente desempenho zootécnico e crescimento de 50 a 60% maior em comparação com a tilápia-do-nilo comum (Hussain et al., 2000) e 10 a 15% em relação a outras linhagens geneticamente melhoradas (Dey, 2000). A exemplo dos demais ciclídeos, a tilápia-do-nilo é um peixe territorial (Lowe-McConnell, 1958) que apresenta hierarquia de dominância e submissão estabelecida por confrontos agonísticos (e.g. Gonçalves-de-Freitas et al., 2008; Carvalho e Gonçalves-de-Freitas, 2008). Os animais maiores geralmente são dominantes e os menores, submissos (Volpato et al., 1989). Além disso, apresenta crescimento heterogêneo relacionado com as diferenças nos custos metabólicos do estresse social (Fernandes e Volpato, 1993), sendo o crescimento dos subordinados mais lento do que os dominantes (Volpato e Fernandes, 1994). Assim, a predição deste estudo é que os grupos formados por peixes de tamanhos homogêneos apresentem maior frequência de interações agressivas, níveis mais elevados de cortisol devido ao aumento do estresse social e instabilidade social em relação aos grupos formados por peixes com tamanhos heterogêneos.

O bem-estar em peixes vem sendo considerado sob vários aspectos (*e.g.* Huntingford et al., 2006; Volpato, Gonçalves-de-Freitas e Castilho, 2007; Volpato et al., 2009) e todas as informações sobre o comportamento dos animais utilizados na piscicultura são muito importantes para propor técnicas mais adequadas de manejo (Huntingford et al., 2006). Assim, as influências das interações sociais sobre o bem-estar ainda é um fator importante a ser investigado na piscicultura.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção dos peixes

Machos adultos sexualmente revertidos de tilápia-do-nilo *O. niloticus*, (L.), linhagem GIFT, foram mantidos durante 30 dias em tanques de 500 L (ca. 1 peixe. 5L⁻¹) para aclimação, com água sem cloro, a temperatura de 27 ° C e fotoperíodo de 12L: 12D. Filtros biológicos e aeração constante garantiram a qualidade da água. A ração (ração comercial para peixes tropicais) foi fornecida duas vezes ao dia à saciedade. Os tanques foram sifonados uma vez por semana para remover as sobras.

2.2. Delineamento Experimental

Foi comparado o efeito da similaridade de tamanho sobre o comportamento agressivo, estabilidade social e estresse social em grupos de tilápia-do-nilo, linhagem GIFT, em dois tratamentos. Um tratamento com cinco machos do mesmo tamanho, denominado grupo homogêneo (HM) e outro com cinco machos de diferentes tamanhos (grupo heterogêneo ou HT) (Tabela 1). Os ensaios foram conduzidos em delineamento em blocos casualizados com 16 repetições por tratamento. Os animais foram agrupados durante seis dias nos quais os níveis de agressividade foram avaliados pela frequência de ataques entre os indivíduos. O estresse social foi inferido por meio dos níveis de cortisol e da taxa de crescimento específico.

2.3. Condições Experimentais

Os animais foram observados em aquários (60 cm X 60 cm X 40 cm, ca. 140 L) revestidos por plástico azul nas paredes laterais e posteriores para impedir a visualização dos aquários vizinhos. O azul foi utilizado, pois reduz o estresse na tilápia-do-nilo (Volpato e Barreto, 2001).

A temperatura média da água foi de $26 \pm 1,1$ ° C e fotoperíodo de 12L:12D (07:00 h as 19:00 h). Os animais foram alimentados com ração para peixes tropicais correspondente a 3% da biomassa, fornecida duas vezes ao dia (às 08:00 h e às 18:00 h). Antes do agrupamento, os animais foram anestesiados com benzocaína (9 mg L^{-1}), como recomendado por Gontijo et al. (2003), pesados, medidos e identificados por pequenos cortes na nadadeira caudal como realizado por Fernandes e Volpato (1993) e Hoglund et al. (2005) e agrupados de acordo com o tamanho.

2.4. Interações Agonísticas

Os animais foram agrupados durante seis dias, nos quais realizamos filmagens diárias (10 min dia^{-1}) para quantificar as interações agonísticas e também para acessar a posição social dos peixes. As filmagens foram iniciadas no segundo dia de agrupamento, assim cinco registros ocorreram. As filmagens foram realizadas sempre no mesmo período, 9h30 min -10:00 h. As interações agonísticas foram quantificadas baseado no etograma de Falter (1983) e Alvarenga e Volpato (1995) para a tilápia-do-nilo (Tabela 2).

2.5. Classificação Hierárquica e Estabilidade Social

A posição hierárquica foi definida por um índice de dominância ($ID = \text{número de ataques emitidos} / \text{número total de ataques no grupo}$), como utilizado por Gómez-LaPlaza e Morgan (1993), Oliveira e Almada (1996) e Gonçalves-de-Freitas et al. (2008). ID varia de 0 a 1,0; é esperado que o ID dos dominantes seja superior ao ID dos subordinados. A estabilidade social foi avaliada pela correlação da posição social entre os dias de agrupamento, de acordo com os critérios estabelecidos por Oliveira e Almada (1996) para *Oreochromis mossambicus*. Consideramos estável o grupo cujo R de Spearman é igual ou superior a 0,70 (Oliveira e Almada, 1996).

2.6. Coleta de Sangue e dosagem do cortisol

Os animais foram anestesiados com benzocaína (9 mg L^{-1}), como recomendado por Gontijo et al. (2003), para coleta de sangue. O manejo de captura e anestesia foi realizado em menos de 2 minutos para evitar interferência nos resultados (e.g. Pottinger, 2008). O sangue foi coletado

sempre entre 11:00 h ao 12:00 h por punção da veia da caudal, tendo o cuidado para não exceder 1 minuto neste procedimento. O sangue foi então centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos e o plasma separado e congelado a -20 ° C para posterior dosagem de cortisol. A dosagem hormonal foi realizada pelo método ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay validado para tilápia-do-nilo, linhagem GIFT, de acordo com o método descrito por Brown et al. (2004).

2.7. Taxa de Crescimento Específico

A taxa de crescimento específico (TCE) foi utilizada para avaliar o efeito do agrupamento sobre o crescimento dos peixes. $TCE = (\text{peso inicial} \ln - \ln \text{ peso final}) / \Delta t \cdot 100$, sendo $\Delta t = 6$ dias (Wootton, 1998).

2.8. Análise dos Dados

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Cramer-von Mises (Zar, 1999). Testes paramétricos e não-paramétricos foram utilizados quando necessário. Foi utilizado o teste de Student não pareado para comparar R Spearman e TCE entre os tratamentos e também para comparar os níveis de cortisol entre dominantes e subordinados dentro de cada tratamento. Foi comparada a frequência de comportamentos agressivos entre os tratamentos e sessões de observação por *two-way* ANOVA para medidas repetidas (Modelos Mistos), sendo o tratamento a variável categórica. O cortisol também foi analisado por *two-way* ANOVA, sendo o tratamento a variável categórica e a variável dependente, o cortisol antes e após o agrupamento. O teste de Tukey foi utilizado como análise *post hoc*. Foi utilizado $p \leq 0,05$ para inferir significância estatística.

2.9. Nota Ética

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (<http://www.cobea.org.br>) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil, protocolo (015280/10).

3. Resultados

3.1. Interação Agonística e Estabilidade Social

Não foi observada interação entre tratamento e as cinco sessões de observação (*two-way* ANOVA: $F_{(16)} = 0,37$, $p = 0,83$). No entanto, após a soma de todas as sessões de observação, a frequência de todos os tipos de comportamentos agressivos foi maior para o HM do que para o grupo HT (*Two-way* ANOVA: $F_{(16)} = 47,01$, $p < 0,0001$; Tukey $p < 0,03$; Fig. 1). Foi observada diferenças na estabilidade social no grupo HT que apresentou um maior R Spearman do que o grupo HM (teste t não pareado: $t_{(16)} = -4,72$, $p < 0,0001$; Fig. 2).

3.2. Cortisol

Não foi observada interação entre tratamento e período de coleta para os níveis de cortisol plasmático (*two-way* ANOVA: $F_{(14)} = 0,3$, $p = 0,59$) e também não houve diferença entre os tratamentos ($F_{(14)} = 0,09$, $p = 0,76$). No entanto, os níveis de cortisol antes do agrupamento foram maiores do que os níveis após o agrupamento (*two-way* ANOVA: $F_{(14)} = 21,78$, $p < 0,0001$; Fig. 3).

Comparando-se os animais nos extremos da hierarquia (dominante com maior ID e subordinado com menor ID), observou-se que os peixes subordinados tinham níveis mais baixos de cortisol que os dominantes do grupo HT (teste t não pareado: $t_{(14)} = 2,37$, $p = 0,02$; Fig. 4A). O grupo HM não foi significativamente diferente nos níveis de cortisol plasmático entre dominantes e subordinados ($t_{(14)} = -0,42$, $p = 0,67$; Fig. 4B).

3.3. Taxa de Crescimento Específico

Observou-se uma redução no peso dos animais em ambos os grupos, resultando em uma TCE negativa. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (média $\pm$ S.E: TCE: HM = $-0,53 \pm 0,04$, HT = $-0,64 \pm 0,08\%$, teste t não pareado $t_{(16)} = -1,35$; $p = 0,17$).

4. Discussão

Neste estudo observou-se que o agrupamento de animais de tamanhos similares aumenta a frequência das interações agonísticas e causa instabilidade social, corroborando, dessa forma, parte da hipótese proposta. Diferenças no estresse social, no entanto, não foram muito claras.

Primeiramente, é necessário considerar o procedimento em relação ao corte das nadadeiras de tilápia-do-nilo, a fim de reconhecer o peixe individualmente. De acordo com o recente trabalho de Roques et al. (2010), o corte da nadadeira é um procedimento doloroso, que compromete o bem-estar dos peixes. Não era conhecido esse fato no início deste estudo, em 2009, e esta é a razão pela qual foi utilizada essa técnica. No entanto, o corte foi realizado sob anestesia e o comportamento não parece ter sido modificado por esse procedimento. Como as diferenças esperadas para o comportamento foram encontradas entre os tratamentos, é plausível supor que o comportamento não foi afetado pela corte da nadadeira caudal e as diferenças surgiram a partir do ambiente social.

A maior frequência de interações agonísticas para todos os tipos de confrontos observada no tratamento HM indica que essa condição social aumenta interações agressivas no grupo. De fato, isso também foi observado para outras espécies de peixes sociais. Beeching (1992), por exemplo, mostrou que o ciclídeo *Astronotus ocellatus* pode avaliar visualmente o tamanho do corpo em relação a um “manequim” e que os ataques se iniciaram rapidamente e foram mais intensos quando o “manequim” era de tamanho semelhante. Além disso, quando os peixes são de tamanhos semelhantes, os confrontos tem uma longa duração como observado para o ciclídeo *Nannacara anomala* (Enquist e Jakobsson, 1986).

O aumento na duração e na intensidade das lutas causa um retardo no estabelecimento da hierarquia de dominância. Como os animais do grupo HM apresentam semelhante habilidade de luta, todos são potenciais dominantes, o que leva à instabilidade social. Segundo Huntingford e Turner (1987), a interação agressiva é mais intensa em condições onde a estrutura social ainda não está definida. Assim, essa regra também é aplicável para a tilápia-do-nilo, linhagem GIFT, pois foi observado no grupo HM uma maior frequência de interações agonísticas e menor estabilidade.

Todos os confrontos diádicos são seguidos por um certo grau de assimetria entre os indivíduos os quais possuem uma habilidade relativa de luta, definida como habilidade relativa para confrontar-se com o adversário (Enquist et al., 1987). Diversos fatores devem ser

ponderados para definir habilidade de luta, como andrógenos (Oliveira et al., 2001), estágio de desenvolvimento gonadal (Neat et al., 1998), residência prévia no território (Chellapa et al., 1999), experiência prévia (Nelissen e Andries, 1994), peso e tamanho corporal (Wazlavek and Figler, 1989; Turner, 1994). De acordo com Enquist e Leimar (1984), quanto mais semelhante a habilidade de luta, mais simétrico serão os confrontos e, portanto, mais agressivos e duradouros. Embora a habilidade de luta não seja definida por apenas uma característica (e.g. Leimar e Enquist, 1984), a assimetria de tamanho parece ser um fator crucial para essa suposição em tilápia-do-nilo.

Outra questão que temos que considerar, é que a assimetria parece ser mais acentuada após o estabelecimento hierárquico. De fato, níveis de andrógenos são mais acentuados em peixes dominantes, o que pode auxiliar na manutenção da posição social (Oliveira e Gonçalves, 2008). Residência prévia e experiência prévia são mais evidentes ao longo do tempo (Metcalf e al., 2003; Beacham, 2003). Finalmente, as diferenças de tamanho podem surgir (e.g. Volpato e Fernandes, 1994; Tiira et al., 2009). Assim, esse fato tem lógica, pois ao mostrar suas diferenças na habilidade de luta ocorre uma redução das chances de confrontos físicos diretos, e o tamanho pode ser a informação mais visível antes das lutas se intensificarem. Dessa forma, a evolução selecionou o crescimento heterogêneo como um sinal para evitar injúrias e outras consequências de luta intensas e prolongadas. Esta é o motivo pelo qual não se pode controlar o crescimento heterogêneo em tilápia-do-nilo.

De acordo com Huntingford e Turner (1986), mesmo após a definição hierárquica o dominante é constantemente desafiado por seus co-específicos, alterando sua posição dentro do grupo, o que leva a instabilidade social. Por outro lado, no agrupamento de animais de diferentes tamanhos, isto não ocorre, pois a diferença de tamanho reforça a posição social de cada indivíduo, o que torna a hierarquia de dominância mais estável (Abbot et al., 1985). De acordo com os autores, diferenças no tamanho dos peixes são importantes, pois as disputas para a definição hierárquica são resolvidas rapidamente sem altos níveis de agressão.

A instabilidade social, neste estudo, foi considerada através de reversões na posição social ao longo do tempo, tal como utilizado por Oliveira e Almada (1996) para *Oreochromis mossambicus*, uma espécie próxima a tilápia-do-nilo. Para acessar as mudanças na posição social, foi utilizado um R de Correlação de Spearman, e com base em estudos de Oliveira e Almada (1996), também foi utilizado um $R \geq 0,70$ para inferir estabilidade social. A estabilidade associada com formação de hierarquia de dominância beneficia tanto os animais dominantes e subordinados através da redução nos combates quando comparado com os sistemas sociais instáveis (Beacham, 1987). Por outro lado, os confrontos mais intensos e prolongados causam um forte impacto sobre o gasto energético e o risco de injúrias (Neat et al., 1998; Sloman et al., 2000; Castro et al., 2006; Johnsson et al., 2006). Assim, concluímos que o agrupamento de animais de tamanhos similares prejudica as interações entre os indivíduos. O aumento da frequência de comportamentos agonísticos e mudanças na posição social geram instabilidade social, aumentando o risco de mortalidade e de injúrias decorrentes das interações agressivas prolongadas na tilápia-do-nilo, linhagem GIFT.

Apesar das diferenças encontradas no comportamento agressivo e estabilidade social para os tratamentos HT e HM, os níveis de cortisol foram semelhantes entre eles, contrariando às nossas expectativas. Assim, há algumas considerações a fazer sobre o cortisol. Primeiro, o cortisol foi analisado por ELISA, um método bem estabelecido que é aplicável aos peixes (e.g. Kagawa e Mujiya, 2000). As amostras de sangue foram cuidadosamente obtidas no mesmo intervalo de tempo, para evitar variações devido ao ritmo circadiano. Com base nesses fatos, conclui-se não haver nenhum problema quanto à análise de cortisol. Assim, explicações biológicas podem originar a partir desses resultados.

As médias dos valores obtidos neste estudo, ao final do período de agrupamento, estão próximas dos considerados basais para a tilápia-do-nilo comum que podem variar de 5 a 15 ng mL⁻¹ (Barcellos *et al.*, 1999), 16 a 39 ng mL⁻¹ (Volpato e Barreto, 2001) e 5 a 50 ng mL⁻¹ (Auperin *et al.*, 1997). Entretanto, não há informações na literatura sobre o valor basal de cortisol plasmático para a tilápia-do-nilo, linhagem GIFT. Essa linhagem foi selecionada com o

objetivo de melhorar seu desempenho em relação ao crescimento, maturação sexual tardia e sobrevivência (Gupta e Acosta, 2004). Tais cruzamentos podem selecionar indivíduos menos reativos ao estresse (e.g. Pottinger, 1994). Portanto, é possível que esses animais respondam ao estresse com níveis mais baixos de cortisol quando comparados a tilápia-do-nilo comum.

Esperava-se encontrar níveis mais altos de cortisol no grupo HM, onde houve elevada frequência de confrontos, pois, segundo Barcellos et al. (1999) e Øverli et al. (1999), as interações agonísticas estão associados a altas concentrações de cortisol em tilápia-do-nilo e *Salvelinus alpinus*. Entretanto, em uma análise dos extremos do *rank* mostrou que, apesar da ausência de significância no grupo todo, existem diferenças quanto à posição social. O maior nível de cortisol para o peixe dominante no grupo HT pode ocorrer devido a esse animal ter que manter a posição social diante dos outros membros do grupo. Por outro lado, os animais subordinados neste grupo mantêm um baixo número de ataques emitidos e recebidos, o que torna a situação menos estressante. De acordo com Sapolsky (1992), babuíños dominantes possuem altos níveis de cortisol, que são atribuídos ao aumento dos custos de manutenção da posição social.

Embora seja bem estabelecido que o peixe subordinado apresente níveis de cortisol mais altos do que os dominantes, Sloman et al. (2008) encontraram níveis mais altos de cortisol para os animais dominantes no ambiente natural, concluindo que a fisiologia correlacionada com a posição social no ambiente natural é diferente das quais encontramos no laboratório. Por outro lado, a maioria dos relatos fisiológicos é estudada em pares, onde subordinado é o único peixe atacado. É possível que, em grupos formados por mais indivíduos, o último no *ranking* pode ser o último a ser atacado e o peixe menos estressado. Assim, estudos com grupos mais numerosos são necessários para completar entender as mudanças fisiológicas em situações sociais.

Quando se compara dentro do grupo HM, não foi observadas diferenças entre dominantes e subordinados. Neste caso, as lutas são simétricas e a hierarquia demora mais tempo a ser definida, o que provoca estresse similar para dominantes e subordinados. Para outras espécies de ciclídeos, *Haplochromis burtoni*, o agrupamento de animais de tamanho semelhante é

estressante para dominantes e subordinados (Fox et al., 1997) e Corrêa et al. (2003) mostraram que os níveis de cortisol são semelhantes para dominantes e subordinados durante o estabelecimento da hierarquia para a tilápia-do-nylo, concluindo, portanto, que este período é estressante para ambas as posições sociais.

Quando se compara o cortisol antes e após o agrupamento não houve diferenças significativas nos dois tratamentos, porém os níveis de cortisol foram maiores na amostragem inicial. Além do fato desse hormônio reduzir ao longo do tempo (Øverli et al., 1999; Sloman et al., 2000a), os resultados observados neste estudo também pode ser explicado pela densidade de estocagem. Antes do agrupamento (período de aclimação) os animais foram mantidos em uma densidade de 1 peixe. 5L⁻¹, mas nos aquários a densidade diminuiu para 1 peixe. 28L⁻¹. Dessa forma, os níveis mais elevados de cortisol plasmático inicial podem refletir a condição de estocagem no laboratório, como observado para outras espécies de peixes em elevadas densidades de estocagem (Mazur e Iwama, 1993; Fox et al., 1997; Conte, 2004).

A perda de peso em ambos os grupos indica uma possível redução da ingestão de alimentos dos animais ou gasto de energia ocasionados pelo estresse do manejo e pelo ajuste fisiológico dos animais ao novo ambiente. A linhagem GIFT foi selecionada para atingir rápido crescimento (Gupta e Acosta, 2004) necessitando de maior quantidade de energia do que outras linhagens, dessa forma, ela é mais sensível ao déficit calórico (Circa et al., 1995). Além disso, pode ter ocorrido um redirecionamento do uso de energia implicando na supressão de outros processos (e.g. crescimento) (Moberg, 2000). De acordo com Cruz e Brow (2007), o agrupamento de *O. niloticus* durante 10 dias provoca redução da taxa de crescimento dos animais, sendo mais acentuada nos submissos. Talvez o período de agrupamento utilizado neste trabalho não tenha sido suficiente para evidenciar as diferenças de gasto energético entre os tratamentos. O que se pode concluir com esse delineamento é que não há diferença no gasto de energia, apesar do aumento de interações agonísticas no grupo HM.

O estresse social e as relações de peixes sociais podem ser consideradas de acordo com a espécie utilizada na aquicultura. Em *Clarias gariepinus*, por exemplo, a agressão é mais

acentuada em grupos formados por tamanho heterogêneo do que em homogêneos (Martins et al., 2006). Além disso, algumas espécies podem reduzir a agressividade como um ajuste ao ambiente, mas se não há oportunidades para a fuga, efeitos deletérios como altos níveis de cortisol podem surgir (Brännäs e Johsson, 2008).

Em resumo, conclui-se que o agrupamento de animais de tamanhos similares aumenta as interações agressivas e promove instabilidade social em machos revertidos de tilápia-do-nilo, linhagem GIFT. Essa situação não é desejável em condições de aquicultura, pois pode aumentar as injúrias físicas e a mortalidade decorrente das interações agressivas prolongadas. Assim, apesar de não encontrarmos diferenças nos indicadores de estresse, podemos concluir, com base no comportamento, que agrupamentos de animais de tamanho semelhante reduzem o bem-estar de peixes sociais.

Referências

- Abbott, J.C., Dunbrack R.L., Orr C.D., 1985. The interaction of size and experience in dominance relationships of juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). Behaviour 92, 241–253.
- Adams, C.E., Turnbull, J.F., Bell, A., Bron, J.E., Huntingford, F.A., 2007. Multiple determinants of welfare in farmed fish: stocking density, disturbance, and aggression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish Aquat. Sci. 64, 336-344.
- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2005. Urine as a Social Signal in the Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Chem. Senses 30, 309-310.
- Alvarenga, C.M.D., Volpato, G.L., 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. Physiol. Behav. 57, 75-80.
- Amorim, M.C.P., Fonseca, P.J., Almada, V.C., 2003. Sound production during courtship and spawning of *Oreochromis mossambicus*: male–female and male–male interactions. J. Fish Biol. 62, 658-672.

- Ang, T.Z., Manica, A., 2010. Unavoidable limits on group size in a body size-based linear hierarchy. *Behav. Ecol.* 21, 819-825.
- Auperin, B., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Fostier, A., Prunet, P., 1997. Effect of confinement stress on circulation levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 35–44.
- Barcellos, L.J.G. Nocolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999. The effect of stocking density and social interactions on acute stress response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aqua. Res.* 30, 887-892.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *An. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- Beacham, J.L., 2003. Models of dominance hierarchy formation: Effects of prior experience and intrinsic traits. *Behaviour* 140, 1275-1303
- Beacham, J.L., 1987. The relative importance of body size and aggressive experience as determinants of dominance in Pumpkinseed sunfish *Lepomis gibbosus*. *Anim. Behav.* 36, 621-623.
- Beeching, S.C., 1992. Visual assessment of body size in a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Ethology* 90, 177-186.
- Brännäs, E., Johnsson. J.I., 2008. Behaviour and welfare in farmed fish, in: Braithwayte, V.A., Forsgren, E., Kapoor E.D. (Eds.), *Fish Behaviour*. Science Publishers Inc., USA, pp. 593-627
- Brown, J., Walker, S.E., Steinmain, K., 2004. *Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species*. Virginia, EUA.
- Carvalho, T.B., Gonçalves-de-Freitas, E., 2008. Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. *Braz. J. Biol.* 68, 807-812.
- Castro, N., Ros, A.F.H., Becker, K., Oliveira, R.F., 2006. Metabolic costs of aggressive behaviour in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aggress. Behav.* 32, 474-480.

- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1989. Annual variation in energy reserves in male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatm* L. (Pisces, Gasterosteidae). *J. Fish Biol.* 35, 275-286.
- Chellappa, S., Yamamoto, M.E., Cacho, M.S.R.F., Huntingford, E.A., 1999. Prior residence, body size and the dynamics of territorial disputes between male freshwater angelfish. *J. Fish Biol.* 55, 1163-1170.
- Circa, A.V., Eknath, A.E., Taduan, A.G., 1995. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of the gift strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in rice-fish environments. *Aquaculture* 137, 329-330.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205-223.
- Corrêa, S.A., Fernandes, M.O., Iseki, K.K., Negrão, J.A., 2003. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1725-1731.
- Cruz, V.E.M., Brown, C.L., 2007. The influence of social status on the rate of growth, eye color pattern and insulin-like growth factor-I gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Horm. Behav.* 51, 611-619.
- Dey, M.M., 2000. The impact of genetically improved farmed Nile tilapia in Asia. *Aquacult. Econ. and Manage* 4, 109-123.
- Earley, R.L., Edwards, J.T., Aseem, O., Felton, K., Blumer, L.S., Karom, M., Grober, M.S., 2006. Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*). *Physiol. Behav.* 88, 353-363.
- Enquist, M., Jakobsson, S., 1986. Decision making and assessment in the fighting behaviour of *Nannacara anomala* (Cichlidae, Pisces). *Ethology* 72, 143-153
- Enquist, M., Leimar, O., 1983. Evolution of fighting behaviour: decision rules and assessment of relative strength. *J. Theor. Biol.* 102, 387.

- Enquist, M., Leimar, O., Ljungberg, T., Mallner, Y., Segerdahl, N., 1990. A test of the sequential assessment game fighting in the cichlid fish. *Nannacara anomala*. Anim. Behav. 40, 1–14.
- Enquist, M., Ljungberg, T., Zandor, A., 1987. Visual assessment of fighting ability in the cichlid fish *Nannacara anomala*. Anim. Behav. 35, 1262-1264.
- Falter, U., 1983. Les comportements agonistiques de *Sarotherodon niloticus* (Pisces, Cichlidae) et la signification évolutive de l'incubation buccale. Bull. Cl. Sci. 69, 566-593.
- Fernandes, M.O, Volpato, G.L., 1993. Heterogeneous growth in Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. Physiol. Behav. 54, 319-323.
- Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., Fernald, R.D., 1997. Stress and dominance in a social fish. J. Neurosci. 17, 6463-6469.
- Giaquinto, P.C., Volpato, G.L., 1997. Chemical communication, aggression and conspecific recognition in the fish Nile Tilapia. Physiol. Behav. 62, 1333-1338.
- Gómez-Laplaza, L.M., Morgan, E., 1993. Social isolation, aggression, and dominance in attacks in juvenile angelfish, *Pterophyllum scalare*. Aggress. Behav. 19, 213-222.
- Gonçalves-de-Freitas, E., Teresa, F.B., Gomes, F.S., Giaquinto, P.C., 2008. Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. Appl. Anim. Behav. Sci. 112, 187-195.
- Gontijo, A.M., Barreto, R.E., Speit, G., Reyes, V.A.V., Volpato, G.L., Salvadori, D.M.F., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. Mutat. Res. 534, 165-172.
- Gupta, M.V., Acosta, B.O., 2004. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project. Naga World Fish Center Q. 27, 4-14.
- Haller, J., Wittenberger, C., 1988. Biochemical energetics of hierarchy formation in *Betta splendens*. Physiol. Behav. 43, 447–450.

- Höglund, E., Bakke, M.J., Øverli, O., Winberg, S., Nilsson, G.E., 2005. Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation. *Aquaculture* 249, 525-531.
- Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandoe, P., Turnbull, J.F., 2006. Current issues in fish welfare. *J. Fish Biol.* 68, 332-372.
- Huntingford, F.A., Turner A.K., 1987. *Animal Conflict*. Chapman and Hall, London.
- Hussain, M.G., Kohinoor, A.H.M., Islam, M.A., Hossain, Dey, M.M., Mazid, M.A., 2000. Growth and production performances of GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in ponds and cages under different farming conditions in Bangladesh. *J. Aquacult. Trop.* 15, 273-280.
- Johnsson, J.I., Winberg, S., Sloman, K.A., 2006. Social interactions. in: Sloman, K.A., Wilson, R.W., Balshine, S. (Eds.), *Behaviour and Physiology of Fish (Fish Physiology)*, Elsevier, San Diego, pp. 151-196.
- Kagawa, N., Mugiya, Y., 2000. Exposure of goldfish (*Carassius auratus*) to bluegills (*Lepomis macrochirus*) enhances expression of stress protein 70 mRNA in the brains and increases plasma cortisol levels. *Zool. Sci.* 17, 1061-1066.
- Keenleyside, M.H.A., Yamamoto, F.T., 1962. Territorial behaviour of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Behaviour* 19, 138-169.
- Koops, M., Grant, J.W.A., 1992. Weight asymmetry and sequential assessment in convict cichlid contests. *Can. J. Zool.* 71, 475-479.
- Leimar, O., Enquist, M., 1984. Effects of asymmetries in owner-intruder interactions. *J. Theor. Biol.* 111, 475-491.
- Lowe-McConnell, R.H., 1958. Observations on the biology of *Tilapia nilotica* Linné in East African waters. *Revue de Zoologie et de Botanique Africaine* 67, 129-170.
- Martins, C.I.M., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2006. The effect of group composition on the welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97, 323-334.

- Mazur, C.F., Iwama, G.K., 1993. Handling and crowding stress reduced number of plaque-forming cells in Atlantic salmon. *J. Aquat. Anim. Health* 5, 98-101.
- Metcalfe, N.B., Valdimarsson, S.K., Morgan, I.J., 2003. The relative roles of domestication, rearing environment, prior residence and body size in deciding territorial contests between hatchery and wild juvenile salmon. *Ecology* 40, 535-544.
- Moberg, G.P., 2000. Biological response to stress: Implications for animal welfare. in: Moberg, G.P, Mench, J.A. (Eds.), *The Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CAB International, British Library, London, pp. 1-21.
- Neat, F.C., Huntingford, F.A., Beveridge, M.M.C., 1998. Fighting and assessment in male cichlid fish: the effects of asymmetries in gonadal state and body size. *Anim. Behav.* 55, 883-891.
- 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, 41-50.
- Nelissen, M.H.J., 1992. Does body size affect the ranking of a cichlid fish in a dominance hierarchy? *J. Ethol.* 10, 153-156.
- O'Connor, K.I., Metcalfe, N.B., Taylor, A.C., 1999. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Anim. Behav.* 58, 1269-1276.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., Gonçalves, E.J., Forsgren, E., Canario, A.V.M., 2001. Androgen levels and social interactions in breeding males of the peacock blenny. *J. Fish Biol.* 58, 897- 908.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1996. On the (in)stability of dominance hierarchies in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Aggress. Behav.* 22, 37-45.
- Oliveira, R.F., Gonçalves, D.M., 2008. Hormones and social behaviour of teleost fish. In: Magnhagen, C., Braithwaite, V.A., Forsgren, E., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Behaviour*, Science Publishers Inc., Enfield, N.H, pp. 61-150

- Øverli, Ø., Olsen R.E., Løvik F., Ringø E., 1999. Dominance hierarchies in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: differential cortisol profiles of dominant and subordinate individuals after handling stress. *Aqua. Res.* 30, 259–64.
- Pickering, A.D., Pottinger T.G., Christie P.J., 1982. Recovery of the brown trout *Salmo trutta* L. from acute handling stress: A time course study. *J. Fish Biol.* 20, 229–244.
- Pottinger, T.G., Moran, T., Morgan, J., 1994. Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress. *J. Fish Biol.* 44, 149–163.
- Pottinger, T.G., Pickering, A.D., 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress, *J. Fish Biol.* 41, 435–447.
- Pottinger, T.G., 2008. The Stress Response in Fish – Mechanisms, Effects and Measurement. in: Branson, E.J (Ed.), *Fish Welfare*. Blackwell Publishing Ltd, UK, pp. 32–48.
- Romana-Eguia, M.R.R., Ikeda, M., Basiao, Z.U., Taniguchi, N., 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236, 131–150.
- Roques, J.A.C., Abbink, W., Geurds, F., Van de Vis, H., Flik, G., 2010. Tailfin clipping, a painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp. *Physiol. Behav.* 101, 533–540.
- Sapolsky, R.M., 1992. Cortisol concentrations and the social significance of rank instability among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology* 17, 701–709.
- Sloman, K.A., Motherwell, G., O'Connor, K.I., Taylor, A.C., 2000. The effect of social stress on the standard metabolic rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. *Fish Physiol. Bioch.* 23, 49–53.
- Sloman, K.A., Metcalfe, N.B., Taylor, A.C., Gilmour, K.M., 2001. Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 383–389.

- Sloman, K.A., Baker, D., Winberg, S., Wilson, R.W., 2008. Are there physiological correlates of dominance in natural trout populations? *Anim. Behav.* 76, 1279-1287.
- Tiira, K., Laurila, A., Enberg, K., Piironen, J., 2009. Short-term dominance: stability and consequences for subsequent growth. *J. Fish Biol.* 74, 2374-2385.
- Turnbull, J.F., Adams, C.E., Richards, R.H., Robertson, D.A., 1998. Attack site and resultant damage during aggressive encounters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Aquaculture* 159, 345-353.
- Turner, G.F., Huntingford, F.A., 1986. A problem for game theory analyses: assessment and intention in male mouth brooder contests. *Anim. Behav.* 34, 961-970.
- Turner, G.F., 1994. The fighting of male mouthbrooding cichlids- The effects of size and residency. *Anim. Behav.* 47, 655-662.
- Volpato, G.L., Barreto, R.E., 2001. Environmental blue light prevents stress in Nile tilapia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 104-1045.
- Volpato, G.L., Fernandes, M.O., 1994. Social control of growth in fish. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 797-810.
- Volpato, G.L., Frioli, P.M.A., Carrieri, M.P., 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a general view about the causal mechanism. *Boletim de Fisiologia Animal* 13, 7-22.
- Volpato, G.L., Giaquinto, P.C., Castilho, M.F., Barreto, R.E., Gonçalves-de-Freitas, E., 2009. *Animal Welfare: from concepts to reality.* *Oecol. Bras.* 13, 05-15.
- Volpato, G.L., Gonçalves-de-Freitas, E., Castilho, M.F., 2007. Insights into the concept of fish welfare. *Dis. Aquat. Org.* 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. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1659-1663.

- Wazlavek, B.E., Figler, M.H., 1989. Territorial prior residence, size asymmetry, and scalation of aggression in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Aggress. Behav.* 15, 235-244.
- Wendeelar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wootton, R.J., 1998. *Ecology of Teleost Fishes*. Chapman and Hall, London, p. 386.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical Analyses*. Printice Hall, New Jersey.

Tabela 1. Comprimento padrão e peso dos peixes referentes aos tratamentos Heterogêneos e Homogêneos (n = 16 para cada tratamento).

	Tratamento Homogêneo			Tratamento Heterogêneo		
	Média($\pm$ S.E)	CV (%)	Variação	Média($\pm$ S.E)	CV (%)	Variação
Comprimento padrão (cm)	9,19 $\pm$ 0,47	5,15	9,0 a 9,4	9,77 $\pm$ 1,61	16,54	7,5 a 11,5
Peso (g)	33,38 $\pm$ 6,48	19,42	27,0 a 40,0	42,83 $\pm$ 20,56	48,01	22,0 a 62,0

Tabela 2. Breve descrição dos padrões comportamentais de interação agonística.

Comportamento agonístico	Descrição
Ameaça	O animal se aproxima do oponente com a boca aberta, preparando-se para uma mordida lateral, mas seu oponente foge antes de ser atacado.
Confronto Frontal	Dois animais se aproximam frontalmente e, com a boca aberta, justapõem as mandíbulas e se “empurram”, ondulando vigorosamente a região caudal do corpo.
Confronto Lateral	Um animal se aproxima do outro e ataca o oponente com mordidas ou golpes com a boca aberta.
Confronto Paralelo	Dois animais posicionam-se lado a lado, voltados para o mesmo sentido ou em sentidos opostos. Ondulam simultaneamente o corpo, sem que ocorra contato físico direto.
Ondulação	Um animal ondula vigorosamente o corpo no sentido antero-posterior. Este padrão é semelhante ao confronto paralelo, mas é emitido por apenas um indivíduo.
Perserguição	Um animal nada em direção ao outro, acompanhando sua trajetória. Pode culminar em ataques ao perseguidor ou numa natação mais rápida do animal perseguido, distanciando-se do oponente.
Total de confrontos	Soma de todas as unidades agonísticas.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Média ($\pm$ erro padrão) da frequência da interação agonística entre os tratamentos HM e HT (n=16 para cada tratamento). *Médias diferem significativamente.

Fig. 2. Média ($\pm$ erro padrão) do R de Spearman entre os tratamentos HM e HT (n= 16 para cada tratamento). *Médias diferem significativamente.

Fig. 3. Média ($\pm$ erro padrão) do cortisol plasmático entre a coleta inicial e final para os dois tratamentos (n=14 para cada tratamento). *Médias diferem significativamente.

Fig.4. Média ($\pm$ erro padrão) do cortisol plasmático entre dominantes e submissos para os tratamentos homogêneo (A) e heterogêneo (B) (n=14 para cada tratamento). *Médias diferem significativamente.

Fig.1

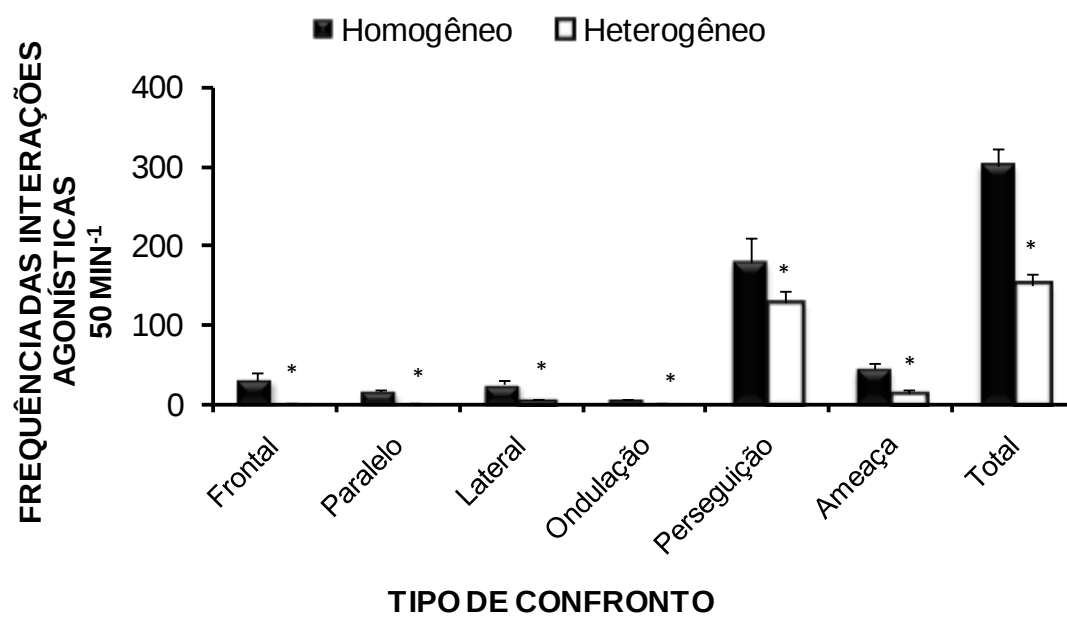


Fig. 2

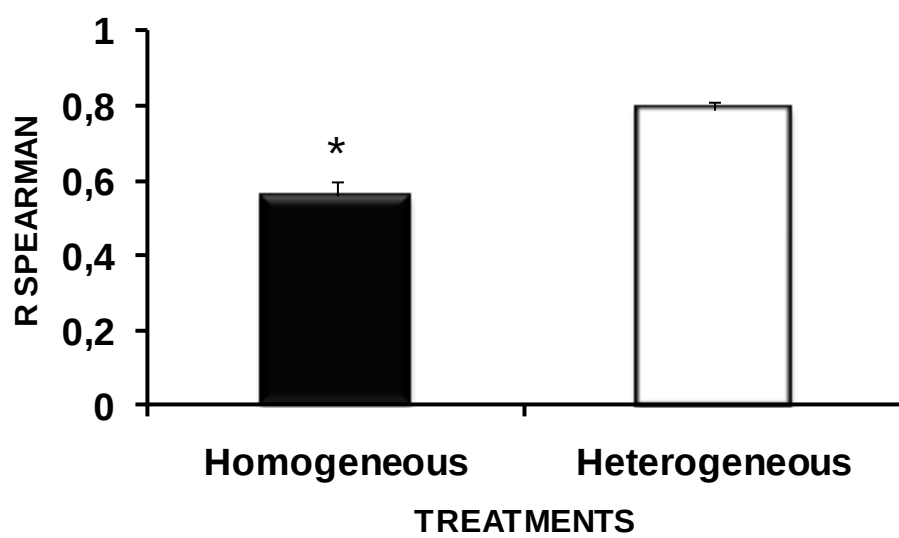


Fig.3

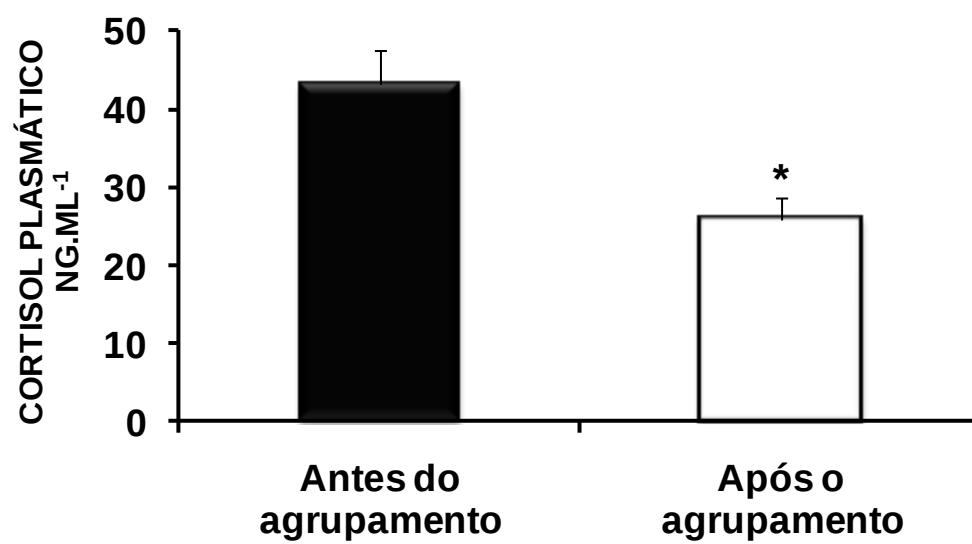
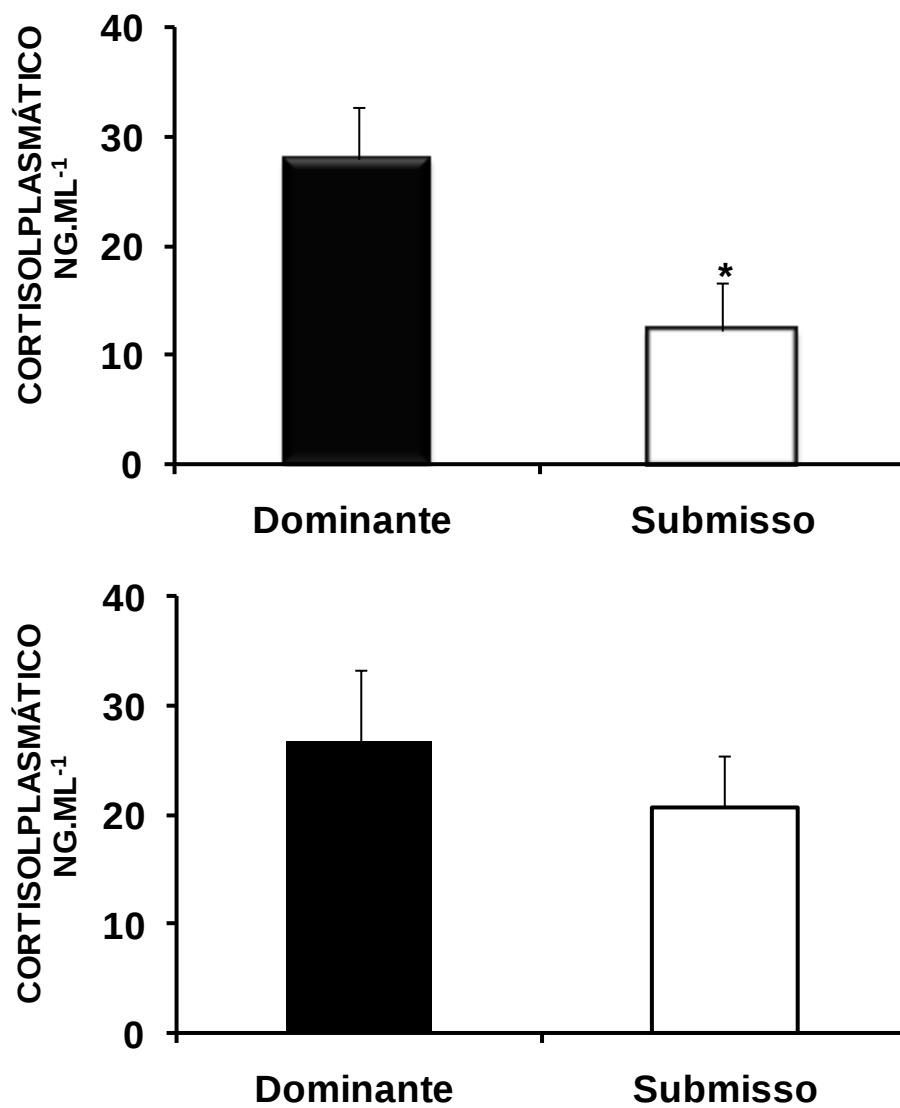


Fig. 4



ANEXO

Artigo Submetido como *full paper* a revista **Applied Animal Behaviour Science**. O artigo passará por modificações conforme as sugestões dos revisores.

**Size homogeneity increases aggressive interaction of sex-reversed males in groups of Nile
tilapia GIFT strain.**

Camila Nomura Pereira Boscolo^a, Rosana Nogueira Morais^b, and Eliane Gonçalves-de-Freitas^{*c}

^a Graduate program in Aquaculture, Aquaculture Center of UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brazil.

E-mail address: nomuracamila@yahoo.com.br

^b Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Cep 81530-990- Caixa Postal 19031, Curitiba, PR, Brazil.

Tel.: +55 41 33611719; Fax: +55 41 33611714

E-mail address: moraisrn@ufpr.br

^{a,c} Laboratorio de Comportamento Animal, Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth, Cep 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Tel.: +55 17 3221 2375; fax: +55 17 3221 2374

E-mail address: elianeg@ibilce.unesp.br

^{a,c} Research Center on Animal Welfare (RECAW, CNPq)

^{*} Corresponding Author

This study is in agreement with the precepts of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) (www.cobea.org.br) and was approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP (protocol 015280/10).

Abstract

Animals with similar fighting ability can fight intensely and longer than animals in asymmetric contests. Thus, the selection of fish by size similarity in husbandry might increase aggressive interactions, and lead to social instability in socially organized fish. We tested the hypothesis that grouping similar size animals increases aggressive interactions between males of Genetic Improved Farmed Tilapia (GIFT). This, in turn, enhances social stress and destabilizes social hierarchy. We compared two treatments: a homogeneous group (HM) formed by five males ranging in size from 9.0 to 9.4 cm, and a heterogeneous group (HT) formed by five males sizing from 7.5 to 11.5 cm ($n = 16$ each treatment). The fish were kept in these groups for six days, in which agonistic interactions were video-recorded daily from the second day of grouping (10 min/ day – five observation sessions). Plasma cortisol levels and specific growth rate (SGR) were used to infer stress level. The frequency of agonistic interactions was higher in the HM (mean $\pm$ S.E.: HM = $302.06 \pm 20.13 \times 50 \text{ min}^{-1}$; HT = $151.06 \pm 13.35 \times 50 \text{ min}^{-1}$). Changes in social position occurred over time in this group, indicating social instability. However, cortisol levels (HM = $27.54 \pm 3.02 \text{ ng.mL}^{-1}$; HT = $24.42 \pm 2.41 \text{ ng.mL}^{-1}$) and SGR (HM = $-0.53 \pm 0.04 \%$; HT = $-0.64 \pm 0.08 \%$) were similar between treatments. Thus, we conclude that the grouping of similar size fish increases aggressive interactions and destabilizes social hierarchy. Although no significant differences were found on indicators of stress we can conclude, based on behavior, that groups of similar sized animals reduces the welfare in social fish, because chances of injuries are higher than in heterogeneous groups.

Keywords: Cichlidae, Aggressiveness, Social stress, Social instability, Welfare.

1. Introduction

Management practices used in aquaculture, such as high stock density, transportation, biometry and selection by size similarity, usually cause stress in fish (e.g. Barton and Iwama, 1991). According to Conte (2004), stress is the principal factor responsible for the emergence of disease and mortality in aquaculture systems.

Among the several sources of stress, one still persistent in aquaculture is the stress caused by social interactions in territorial fish, such as cichlids and salmonids (e.g. Pottinger and Pickering, 1992; Sloman et al., 2000). In such interactions, fishes fight aggressively until establishing a hierarchical rank (e.g. Enquist and **Jakobsson**, 1986) and some animals (dominants) have priority over others (subordinates) concerning access to limited resources such as food, mates, shelter and territory (Huntingford and Turner 1987; Johnsson et al., 2006). Fights escalate rapidly in fishes but, after settling dominance, overt fights are reduced, prevailing displays of low intense aggressiveness and of low energetic cost (e.g. Johnsson et al., 2006). Generally, dominants show less social stress than subordinates (e.g. Fernandes and Volpato, 1993) and the result of such a difference in stress level is the difference of body size, being the subordinates growing slower than dominants, thus generating what is known as stunting or heterogeneous growth (Metcalf et al., 2003; Volpato and Fernandes, 1994).

In this type of social system, the importance of social rank should be recognized by all individuals. In fish, social rank can be displayed by signs such as differences in body color (Falter, 1987), chemicals (Gonçalves-de-Freitas et al., 2008) and sound (Amorim et al., 2003). Such informations are crucial to maintain social rank and, consequently, to reduce the chances of overt fights. An important visual cue related to social information and assessment of fighting ability in fish is body size (Nelissen, 1992). Thus, a heterogeneous growth derived from social hierarchy can be a way of reducing overt fights in some fish species.

Despite these assumptions, in production systems, grouping fish by size similarity is a common practice among farmers as the animals are marketed by the mean biomass, but heterogeneity results in economic losses. Accordingly, grouping social fish by size similarity can increase aggressive interactions by putting together animals with similar fighting ability, therefore taking the hierarchy longer to be established and leading to an increase in social stress (Ang and Manica, 2010; Beeching, 1992) and also to higher chances of mortality by energy expenditure or physical injuries (Turnbull et al., 1998).

In this study, we tested the effect of grouping similar sized animals on aggressive behavior, social instability and social stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) GIFT strain. This is one of the main species reared for aquaculture in the world, and the GIFT strain is widely used in fish farming because it has great zootechnic performance and a growth rate of 50 to 60% higher than the common Nile tilapia (Hussain et al., 2000) and 10 to 15% higher than other improved genetically strains (Dey, 2000). As all cichlids, Nile tilapia is a territorial fish (Lowe-McConnell, 1958) that shows social dominance hierarchy and submission established by agonistic interaction (e.g. Gonçalves-de-Freitas et al., 2008). The larger animals are usually the dominant ones and the minor subordinates (Volpato et al., 1989). Additionally, it shows a heterogeneous growth related to differences in metabolic costs of social stress (Fernandes and Volpato, 1993), with the subordinates growing slower than dominant fish (Volpato and Fernandes, 1994). Thus we predicted that the groups formed by homogeneous sized fish would show higher frequency of aggressive interactions than groups formed by fish with heterogeneous size, and would also show social instability and higher levels of cortisol because of enhanced social stress.

Fish welfare has been considered in several ways (e.g. Huntingford et al., 2006; Volpato, et al., 2007) and all information about animal behavior in cultured fish is important when planning techniques for husbandry (Huntingford et al., 2006). Accordingly, the influences of social interactions on welfare are still important factors to be explored for rearing and welfare purposes (Brännäs and Johnsson, 2008).

2. Methods

2.1. Rearing Conditions

We used adult sex-reversed males of Nile tilapia *O. niloticus* (L.), GIFT strain, which larvae were treated with 17-alpha-methyltestosterone to produce all-male fish. This procedure is common in aquaculture, and by using sex-reversed fish, we tried to follow the same management. The fish were maintained during 30 days in 500 L indoor tanks (ca. 1 fish. 5L⁻¹) for acclimatization in dechlorinated water, temperature at 27 °C and a 12L:12D photoperiod.

Biological filters and constant aeration ensured water quality. Food (commercial pellets for tropical fish) was provided twice a day to satiation. Tanks were siphoned once a week to remove leftovers.

2.2. Experimental Design

We compared the effect of size similarity on the aggressive behavior, social stability and social stress in groups of Nile tilapia, GIFT strain in two treatments. One treatment with five males of the same size, named Homogeneous group (HM) and another with five males of different sizes (Heterogeneous group or HT) (Table 1). We used a randomized block design with 16 replicates per treatment. The animals were grouped for six days during which the levels of aggression were assessed by the frequency of attacks between individuals. Social stress was measured by means of cortisol levels and specific growth rate.

2.3. Aquaria, housing conditions

Fish were observed in a glass aquaria of 60 x 60 x 40 cm (140 L), having three walls covered with an opaque blue plastic to prevent visual contact between neighboring fish. The blue color was chosen because it has been shown to prevent stress in the Nile tilapia (Volpato and Barreto, 2001). Water mean temperature was 26 ± 1.1 °C and photoperiod was 12L:12D (7:00 h to 19:00 h). Fish feed for tropical fish corresponding to 3% of biomass was given twice a day (at 8:00 h and 18:00 h). Before grouping, the animals were anesthetized with benzocaine (9 mg L^{-1}), sized, weighed and identified by small cuts in the caudal fin as performed by Fernandes and Volpato (1993) and Hoglund et al. (2005), and grouped according to the size treatment.

2.4. Agonistic interaction

We grouped the animals for six days and performed daily video-recordings (10 min / day) to quantify the agonistic interactions and also to access the social rank of the fish. Video-records started on the second day of grouping, thus providing five sessions of observations. We carried out the video-recordings always from 09:30 h to 10:00 h. For this, we used Sony Handy cam Hi8 camcorders, which were placed on tripods in front of the experimental aquaria.

Agonistic interaction was quantified in terms of frequency of each agonistic type based on an ethogram described by Alvarenga and Volpato (1995) for Nile tilapia (Table 2).

2.5. Rank Order and Social Stability

Rank order was defined by a dominance index ($DI = \text{number of attacks emitted} / \text{total number of attacks in the group}$) as used by Oliveira and Almada (1996), and Gonçalves-de-Freitas et al. (2008). DI varies from 0 to 1.0; dominant DI is expected to be higher than subordinate DI. In this study social instability was assumed to be rank reversals over time, as done by Oliveira and Almada (1996) for *Oreochromis mossambicus*, a species close to Nile tilapia. To access the rank reversals in the group, we used Spearman R Correlation and, based on Oliveira and Almada (1996) criteria, we used 0.70 or a higher R value among dominance index on subsequent days of grouping to infer social stability.

2.6. Blood Sample and Cortisol Assay

The animals were anesthetized (9 mg L^{-1}) for blood sampling. Fish were captured and managed with anesthesia in less than 2 min to avoid interference on the results (e.g. Pottinger, 2008). Blood was always collected between 11:00 h to 12:00 h by puncturing the tail vein, taking care not to exceed 1 min with this procedure. The blood was then centrifuged at 3.000 rpm for 10 min, and the plasma was separated and frozen at -20°C for later cortisol assay. Plasma cortisol level was measured by ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay validated for Nile tilapia GIFT strain, according to the methods described by Brown et al. (2004).

2.7. Specific Growth Rate (SGR)

Specific Growth Rate was used to evaluate the effect of grouping on fish growth. $SGR = (\ln \text{initial weight} - \ln \text{final weight}) / \Delta t \cdot 100$, being $\Delta t = 6$ days (Wootton, 1998).

2.8. Data analysis

Statistics were based on Zar (1999). First, data normality was checked with the Cramer-von Mises test and homocedasticity with the Fmax test. Parametric tests were used accordingly. We

used unpaired Student's t test to compare Spearman's R and SGR between treatments. We compared the frequency of aggressive behavior between treatments with two-way ANOVA, with the treatment being the categorical variable. Cortisol was also analyzed with two-way ANOVA, with the treatment being the categorical factor, and the dependent factor the cortisol before and after grouping. We also analyzed the cortisol after grouping only for the higher dominant and for the most subordinate fish in the treatment by unpaired t test. Tukey's test was used as a post hoc analysis. Values of $P \leq 0.05$ were set to infer statistical differences.

2.9. Ethical note

This study was conducted in agreement with the precepts of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) (<http://www.cobea.org.br>) and was approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation of the São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil (015280/10).

3. Results

3.1. Agonistic Interaction and social stability

The frequency of all types of aggressive behavior was higher for the HM than for the HT group (two-way ANOVA: $F_{(16)} = 47.01$, $P < 0.0001$; Tukey, $P < 0.03$; Fig. 1). We observed differences in social stability in the HT group, which had a higher R Spearman than the HM group (unpaired t test: $t_{(16)} = -4.72$, $P < 0.0001$; Fig. 2).

3.2. Cortisol levels

There was no significant statistic interaction between treatment and sampling periods for plasma cortisol levels (two-way ANOVA: $F_{(14)} = 0.3$, $P = 0.59$) and neither for cortisol levels between treatments ($F_{(14)} = 0.09$, $P = 0.76$). However, cortisol levels before grouping were higher than the levels after grouping (two-way ANOVA: $F_{(14)} = 21.78$, $P < 0.0001$; Fig. 3).

After grouping, by comparing cortisol of animals at the extremes of the hierarchy (dominant with higher DI and subordinate with smaller DI), we observed that the subordinate fish had lower cortisol levels than dominant ones in the HT group (unpaired t test: $t_{(14)} = 2.37$, $P = 0.02$;

Fig. 4A). There were no significant differences in plasma cortisol levels between dominant and subordinate in HM treatment ($t_{(14)} = -0.42$ $P = 0.67$; Fig. 4B).

3.3. Specific growth rate

We observed a reduction in weight of animals in both groups resulting in a negative SGR. We did not observe significant differences between the treatments (Mean $\pm$ S.E.: SGR: HM = -0.53 ± 0.04 , HT = $-0.64 \pm 0.08\%$, unpaired t test: $t_{(16)} = -1.35$, $P = 0.17$).

4. Discussion

In this study it was shown that grouping similar sized fish increases the frequency of agonistic interactions and causes social instability, corroborating part of the proposed hypothesis. However, differences in social stress were not so clear.

First, we have to consider the procedure regarding individual marks in the Nile tilapia. According to Roques et al. (2010), clipping tail fin is a painful procedure that reduces the welfare in fish. Nevertheless, in our study clipping was done under anesthesia and the aggressive behavior did not modify. As expected differences in behavior were found between treatments, we assumed that the results reflected differences in the social environment.

The highest frequency of agonistic interactions observed in the HM treatment indicates this social condition increases aggressive interactions in the group. Similar results were observed by Beeching (1992) for the cichlid *Astronotus ocellatus* that can visually assess the relative body size of a dummy, and attacks quickly and more intensely when the dummy's size is similar to the fish's size. Moreover, similar size cause longer fights in the cichlid *Nannacara anomala* (Enquist and Jakobsson, 1986).

The increased duration of fights delays the establishment of a dominance hierarchy, which leads to social instability. According to Huntingford and Turner (1987), the aggressive interaction is more intense in conditions where the social structure is not defined. Thus, such a rule is also applicable to the GIFT Nile tilapia, because the HM treatment showed a higher aggressive interaction frequency and lower stability.

All dyadic fighting is followed by some degree of asymmetry between the contestants because they have different fighting abilities, defined as the opponent's relative ability to injure the other (Enquist et al., 1987). Several factors can be weighed relative to fighting ability, as for instance, androgens (Oliveira et al., 2001), gonad development (Neat et al., 1998), previous residence in the territory (Chellappa et al., 1999), previous experience (Nelissen and Andries, 1988), and weight and size (Turner, 1994). According to Enquist and Leimar (1983), the more similar is the ability to fight, the more symmetrical are the contestants. Therefore, more aggressive and long lasting should be the contest. Although relative fighting ability is not defined by only one factor (e.g. Leimar and Enquist, 1984), size asymmetry seems to be a crucial factor for Nile tilapia.

Asymmetry, however, becomes more pronounced after a hierarchy settlement. In fact, androgen levels are higher in dominant fish (and other vertebrates), which can help to keep the dominance (Oliveira and Gonçalves, 2008). Previous residence and experience are more pronounced as time goes by (Metcalf et al., 2003). Finally, differences in size such as heterogeneous growth can emerge (e.g. Tiira et al., 2009; Volpato and Fernandes, 1994). Thus, by showing their differences in fighting ability, fish reduce the chances of overt fighting, and size could be the more visible information before fighting escalation. Accordingly, heterogeneous growth was evolutionarily selected as a signal to avoid injuries and other consequences of intense and prolonged fighting among animals. This is the reason why we cannot control the heterogeneous growth in Nile tilapia.

According to Huntingford and Turner (1987), even after hierarchical definition the dominant is constantly challenged by their conspecifics that can change its position in the group, which leads to social instability. However, in a group formed by heterogeneous sized fish, the size difference reinforces the social position, making rank order more stable and hierarchy defined quickly without high levels of aggression (Abbott et al., 1985).

The stability of social hierarchy benefits both dominant and subordinate animals through a reduction in combat compared to unstable social conditions (Beacham, 1987). On the other

hand, more intense and prolonged contests cause a well documented impact on energy cost and risk of injuries to the contestants (e.g. Johnsson et al., 2006; Sloman et al., 2000). Thus, we conclude that grouping similar sizes can jeopardize the fitness of individuals, increasing the risk of death and injuries from intense aggressive interactions in GIFT Nile tilapia.

Despite the differences in aggressive behavior and social stability, cortisol levels were similar between the treatments. Cortisol was analyzed by ELISA, a well established method applicable to fish (e.g. Kagawa and Mujiya, 2000). Blood samples were carefully obtained at the same time interval to avoid variations from circadian rhythm. Thus, we assumed there was no problem regarding cortisol measurements so therefore biological explanations can originate from the results.

The mean cortisol levels after grouping obtained in this study are considered baseline for the common Nile tilapia, which range from 5 to 15 ng.mL⁻¹ (Barcellos et al., 1999) 16 to 39 ng.mL⁻¹ (Volpato and Barreto, 2001) and 5-50 ng.mL⁻¹ (Auperin et al., 1997). However, there is no information in literature regarding basal plasma cortisol for the GIFT strain. This strain was selected to improve the growth performance and survival (Gupta and Acosta, 2004). This crossbreeding may select individuals less reactive to stress, therefore responding with lower cortisol levels than common Nile tilapia (e.g. Pottinger, 1994).

We expected to find higher cortisol in HM treatment because, according to Barcellos et al. (1999), agonistic interactions are associated to high concentrations of cortisol in Nile tilapia. However, an analysis of the extremes ranks in the treatment showed that, despite the absence of significance in the whole group, there are differences according to rank. The higher cortisol level for the dominant fish in HT treatment can occur because this animal has to keep its social position in front of other group members, as stated by Sapolsky (1992) for baboons.

Although it is well established that subordinate fish show higher cortisol than dominants, Sloman et al. (2008) found higher cortisol level for dominant brown trout in a natural environment, concluding that physiological correlates to social position in natural conditions may differ from those found in the laboratory. Furthermore, most of those physiological

correlates are from pairs, where the subordinate is the only attacked fish. Thus, it is possible that in groups formed by more individuals, the last in the rank could be the less attacked and less stressed fish, as observed for the subordinate in HT treatment.

No differences in cortisol level were found between extreme ranks in HM treatment. In this case, the fights were symmetrical and the hierarchy unstable, which causes a similar level of stress for dominant and subordinate fish. With another cichlid, *Haplochromis burtoni*, groups formed by similar sized animals is stressful for both dominant and subordinate (Fox et al., 1997). Corrêa et al. (2003) show that cortisol levels are similar for dominants and subordinates Nile tilapia during hierarchy establishment, therefore concluding this period is stressful for both social ranks.

Cortisol levels before and after grouping were similar between the treatments, but were higher in the first sampling. Besides the fact that the hormone level can reduce over time (Sloman et al., 2001), results can be explained by stocking density. Before grouping (acclimation period) the animals were kept at 1 fish. 5L⁻¹, but in experimental aquaria the density decreased to 1 fish. 28L⁻¹. Thus, higher cortisol levels may reflect the initial condition of storage in the laboratory, as observed for other fish species (Conte, 2004; Fox et al., 1997).

Weight loss in both treatments indicates a possible reduction of food intake or energy expenditure caused by the stress of husbandry and by physiological adjustment to the new environment. The GIFT strain was selected to achieve rapid growth (Gupta and Acosta, 2004) requiring greater amounts of energy than other strains, thus it is more sensitive to caloric deficit (Circa et al., 1995). In addition, a redirection of energy to fighting can suppress growth (Moberg, 2000). According to Cruz and Brown (2007), *O. niloticus* grouped for 10 days show a reduction in SGR, being more pronounced in the subordinate animals. Perhaps the period of grouping used in our study was not enough to demonstrate the differences in energy expenditure between treatments and ranks. Thus, the energy expenditure in this experimental design could not be translated to SGR differences, despite the higher agonistic interactions in HM treatment.

The social stress and social relationships of fish can be considered according to the species for aquaculture purposes. In *Clarias gariepinus*, for example, aggression is more pronounced in groups formed by heterogeneous sized fish than homogeneous ones (Martins et al., 2006). Moreover, some species can reduce aggressiveness as an adjustment to the environment, but if there is not much opportunity to escape from fights, deleterious effect from high cortisol levels can emerge (Brännäs and Johsson, 2008).

Conclusions

We conclude that groups formed by similar sized fish increase aggressive interactions and cause social instability in sex-reversed males of GIFT Nile tilapia. This condition is not desirable in the aquaculture because it may increase the risk of physical injuries and death resulting from prolonged aggressive interactions. Thus, although no significant differences were found in the indicators of stress, we conclude that grouping similar sized animals reduces the welfare in social fish.

Acknowledgments

The authors thank Msc. Thiago S.B Pereira (CAUNESP, Jaboticabal, Brazil) for technical support and critical suggestions of this manuscript. Also thank Dr. Euclides Braga Malheiros (UNESP, Jaboticabal, Brazil) for statistical support. The research was supported by CNPq proc. 479600/2008-2 (Gonçalves-de-Freitas E) and CAPES (Boscolo C.N.P).

References

- Abbott, J.C, Dunbrack R.L, Orr C.D., 1985. The interaction of size and experience in dominance relationships of juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). Behaviour 92, 241–253.
- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2005. Urine as a Social Signal in the Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Chem. Senses 30, 309-310.
- Alvarenga, C.M.D., Volpato, G.L., 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. Physiol. Behav. 57, 75-80.

316 Amorim, M.C.P., Fonseca, P.J., Almada, V.C., 2003. Sound production during courtship and
 317 spawning of *Oreochromis mossambicus*: male–female and male–male interactions. J. Fish
 318 Biol. 62, 658-672.

319 Ang, T.Z., Manica, A., 2010. Unavoidable limits on group size in a body size-based linear
 320 hierarchy. Behav. Ecol. 21, 819-825.

321 Auperin, B., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Fostier, A., Prunet, P., 1997. Effect of confinement
 322 stress on circulation levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted
 323 tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). Gen. Comp. Endocrinol. 108, 35–44.

324 Barcellos, L.J.G. Nocolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999. The effect of stocking
 325 density and social interactions on acute stress response in Nile tilapia (*Oreochromis*
 326 *niloticus*) fingerlings. Aqua. Res. 30, 887-892.

327 Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with
 328 emphasis on the response and effects of corticosteroids. An. Rev. Fish Dis. 1, 3–26.

329 Beacham, J.L., 1987. The relative importance of body size and aggressive experience as
 330 determinants of dominance in Pumpkinseed sunfish *Lepomis gibbosus*. Anim. Behav. 36, 621-
 331 623.

332 Beeching, S.C., 1992. Visual assessment of body size in a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus*
 333 *ocellatus*. Ethology 90, 177-186.

334 Brännäs, E., Johnsson. J.I., 2008. Behaviour and welfare in farmed fish, in: Braithwayte, V.A.,
 335 Forsgren, E., Kapoor E.D. (Eds.), Fish Behaviour. Science Publishers Inc., USA, pp. 593-
 336 627

337 Brown, J., Walker, S.E., Steinmain, K., 2004. Endocrine manual for the reproductive
 338 assessment of domestic and non-domestics species. Virginia, EUA.

339 Chellappa, S., Yamamoto, M.E., Cacho, M.S.R.F., Huntingford, E.A., 1999. Prior residence,
 340 body size and the dynamics of territorial disputes between male freshwater angelfish. J.
 341 Fish Biol. 55, 1163-1170.

342 Circa, A.V., Eknath, A.E., Taduan, A.G., 1995. Genetic improvement of farmed tilapias: the
 343 growth performance of the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in rice-fish
 344 environments. *Aquaculture* 137, 329-330.

345 Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205-223.

346 Corrêa, S.A., Fernandes, M.O., Iseki, K.K., Negrão, J.A., 2003. Effect of the establishment of
 347 dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia
 348 (*Oreochromis niloticus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1725-1731.

349 Cruz, V.E.M., Brown, C.L., 2007. The influence of social status on the rate of growth, eye color
 350 pattern and insulin-like growth factor-I gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis*
 351 *niloticus*. *Horm. Behav.* 51, 611–619.

352 Dey, M.M., 2000. The impact of genetically improved farmed Nile tilapia in Asia. *Aquacult.*
 353 *Econ. and Manage* 4, 109-123.

354 Enquist, M., Jakobsson, S., 1986. Decision making and assessment in the fighting behaviour of
 355 *Nannacara anomala* (Cichlidae, Pisces). *Ethology* 72, 143-153

356 Enquist, M., Leimar, O., 1983. Evolution of fighting behaviour: decision rules and assessment
 357 of relative strength. *J. Theor. Biol.* 102, 387.

358 Enquist, M., Ljungberg, T., Zandor, A., 1987. Visual assessment of fighting ability in the
 359 cichlid fish *Nannacara anomala*. *Anim. Behav.* 35, 1262-1264.

360 Falter, U. 1987. Description of the color patterns in *Oreochromis niloticus* (Teleostei,
 361 Cichlidae). *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.* 117, 201-219.

362 Fernandes, M.O, Volpato, G.L., 1993. Heterogeneous growth in Nile tilapia: social stress and
 363 carbohydrate metabolism. *Physiol. Behav.* 54, 319-323.

364 Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., Fernald, R.D., 1997. Stress and dominance in a social
 365 fish. *J. Neurosci.* 17, 6463-6469.

366 Gonçalves-de-Freitas, E., Teresa, F.B., Gomes, F.S., Giaquinto, P.C., 2008. Effect of water
 367 renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 112,
 368 187-195.

369 Gupta, M.V., Acosta, B.O., 2004. From drawing board to dining table: the success story of the
 370 GIFT project. Naga World Fish Center Q. 27, 4-14.

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

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

376 Huntingford, F.A., Turner A.K., 1987. Animal Conflict. Chapman and Hall, London.

377 Hussain, M.G., Kohinoor, A.H.M., Islam, M.A, Hossain, Dey, M.M., Mazid, M.A., 2000.
 378 Growth and production performances of GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis*
 379 *niloticus* L., in ponds and cages under different farming conditions in Bangladesh. J.
 380 Aquacult. Trop. 15, 273–280.

381 Johnsson, J.I., Winberg, S., Sloman, K.A., 2006. Social interactions. in: Sloman, K.A., Wilson,
 382 R.W., Balshine, S. (Eds.), Behaviour and Physiology of Fish (Fish Physiology), Elsevier,
 383 San Diego, pp. 151–196.

384 Kagawa, N., Mugiya, Y., 2000. Exposure of goldfish (*Carassius auratus*) to bluegills (*Lepomis*
 385 *macrochirus*) enhances expression of stress protein 70 mRNA in the brains and increases
 386 plasma cortisol levels. Zool. Sci. 17, 1061-1066.

387 Leimar, O., Enquist, M., 1984. Effects of asymmetries in owner-intruder interactions. J. Theor.
 388 Biol. 111, 475-491

389 Lowe-McConnell, R.H., 1958. Observations on the biology of **Tilapia nilotica** Linné in East
 390 African waters. *Revue de Zoologie et de Botanique Africaine* 67, 129–170.

391 Martins, C.I.M., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2006. The effect of group composition on the
 392 welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*). Appl. Anim. Behav. Sci. 97, 323-334.

393 Metcalfe, N.B., Valdimarsson, S.K., Morgan, I.J., 2003. The relative roles of domestication,
 394 rearing environment, prior residence and body size in deciding territorial contests
 395 between hatchery and wild juvenile salmon. Ecology 40, 535-544.

396 Moberg, G.P., 2000. Biological response to stress: Implications for animal welfare. in: Moberg,
397 G.P, Mench, J.A. (Eds.), The Biology of animal stress: basic principles and implications
398 for animal welfare. CAB International, British Library, London, pp. 1-21.

399 Neat, F.C., Huntingford, F.A., Beveridge, M.M.C., 1998. Fighting and assessment in male
400 cichlid fish: the effects of asymmetries in gonadal state and body size. *Anim. Behav.* 55,
401 883-891.

402 Nelissen, M.H.J., Andries, S., 1988. Does previous experience affect the ranking of cichlid fish
403 in a dominance hierarchy. *Annales de la Societe Royale Zoologique de Belgique* 118, 41-
404 50.

405 Nelissen, M.H.J., 1992. Does body size affect the ranking of a cichlid fish in a dominance
406 hierarchy? *J. Ethol.* 10, 153-156.

407 Oliveira, R.F., Almada, V.C., Gonçalves, E.J., Forsgren, E., Canario, A.V.M., 2001.
408 Androgen levels and social interactions in breeding males of the peacock blenny. *J.*
409 *Fish Biol.* 58, 897- 908.

410 Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1996. On the (in)stability of dominance hierarchies in the cichlid
411 fish *Oreochromis mossambicus*. *Aggress. Behav.* 22, 37-45.

412 Oliveira, R.F., Gonçalves, D.M., 2008. Hormones and social behaviour of teleost fish. In:
413 Magnhagen, C., Braithwaite, V.A., Forsgren, E., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Behaviour*,
414 Pottinger, T.G., Moran, T., Morgan, J., 1994. Primary and secondary indices of stress in the
415 progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low
416 responsiveness to stress. *J. Fish Biol.* 44, 149-163.

417 Pottinger, T.G., Pickering, A.D., 1992. The influence of social interaction on the acclimation of
418 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress, *J. Fish Biol.* **41**, 435–
419 447.

420 Pottinger, T.G., 2008. The Stress Response in Fish – Mechanisms, Effects and Measurement. in:
421 Branson, E.J (Ed.), *Fish Welfare*. Blackwell Publishing Ltd, UK, pp. 32–48.

422 Roques, J.A.C., Abbink, W., Geurds, F., Van de Vis, H., Flik, G., 2010. Tailfin clipping, a
 423 painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp. *Physiol. Behav.* 101, 533-
 424 540.

425 Sapolsky, R.M., 1992. Cortisol concentrations and the social significance of rank instability
 426 among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology* 17, 701–709.

427 Sloman, K.A., Motherwell, G., O'Connor, K.I., Taylor, A.C., 2000. The effect of social stress
 428 on the standard metabolic rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. *Fish Physiol. Bioch.*
 429 23, 49–53.

430 Sloman, K.A., Metcalfe, N.B., Taylor, A.C., Gilmour, K.M., 2001. Plasma cortisol
 431 concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiol.*
 432 *Biochem. Zool.* 74, 383–389.

433 Sloman, K.A., Baker, D., Winberg, S., Wilson, R.W., 2008. Are there physiological correlates
 434 of dominance in natural trout populations? *Anim. Behav.* 76, 1279-1287.

435 Tiira, K., Laurila, A., Enberg, K., Piironen, J., 2009. Short-term dominance: stability and
 436 consequences for subsequent growth. *J. Fish Biol.* 74, 2374-2385.

437 Turnbull, J.F., Adams, C.E., Richards, R.H., Robertson, D.A., 1998. Attack site and resultant
 438 damage during aggressive encounters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr.
 439 *Aquaculture* 159, 345-353.

440 Turner, G.F., 1994. The fighting of male mouthbrooding cichlids- The effects of size and
 441 residency. *Anim. Behav.* 47, 655-662.

442 Volpato, G.L., Barreto, R.E., 2001. Environmental blue light prevents stress in Nile tilapia.
 443 *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 104-1045.

444 Volpato, G.L., Fernandes, M.O., 1994. Social control of growth in fish. *Braz. J. Med. Biol. Res.*
 445 27, 797-810.

446 Volpato, G.L., Frioli, P.M.A., Carrieri, M.P., 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new
 447 data in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a general view about the causal
 448 mechanism. *Bol. Fisiol. Animal* 13, 7–22.

449 Volpato, G.L., Gonçalves-de-Freitas, E., Castilho, M.F., 2007. Insights into the concept of fish
450 welfare. *Dis. Aquat. Org.* 75, 165-171.
451 Wootton, R.J., 1998. *Ecology of Teleost Fishes*. Chapman and Hall, London, p. 386.
452 Zar, J., 1999. *Biostatistical Analyses*. Printice Hall, New Jersey.
453

454 Table titles

455

456 Table 1. Standard length and weight of fish addressed to the Heterogeneous and Homogeneous
457 treatment (n = 16 each one).

458

459 Table 2. Brief description of the aggressive behavior patterns.

460

461 Figure Caption

462 Fig.1. Mean ($\pm$ S.E.) frequency of the aggressive behavior between Homogeneous and
463 Heterogeneous treatments (n = 16 each one). * Means significant difference.

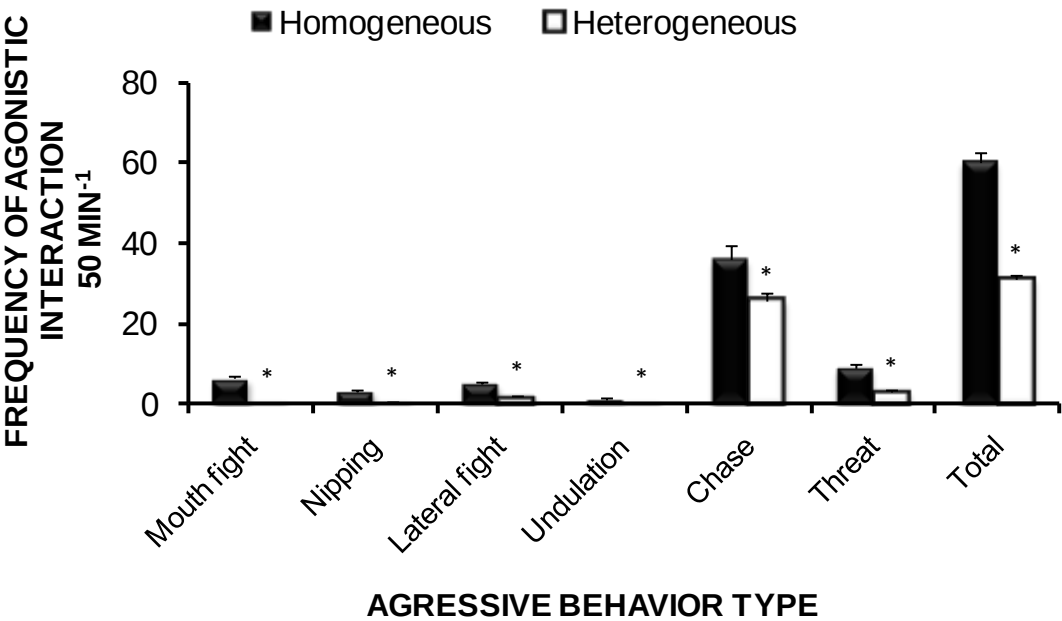
464 Fig. 2. Mean ($\pm$ S.E.) Spearman's R for the HM and HT treatments (n = 16 each one). * Means
465 significant difference.

466 Fig.3. Mean ($\pm$ S.E.) plasma cortisol levels between the initial and final sampling for both
467 treatments (n = 14 each one). * Means significant difference.

468 Fig. 4. Mean ($\pm$ S.E.) plasma cortisol levels between dominants e subordinates for
469 heterogeneous (a) and homogeneous (b) treatments (n = 14 each one). * Means significant
470 difference.

471

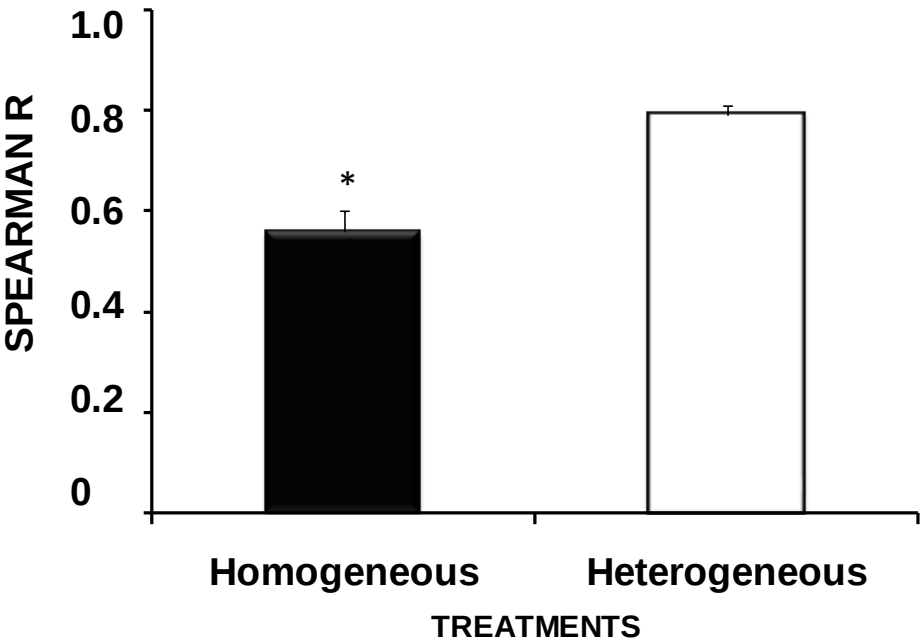
472 Fig. 1



473

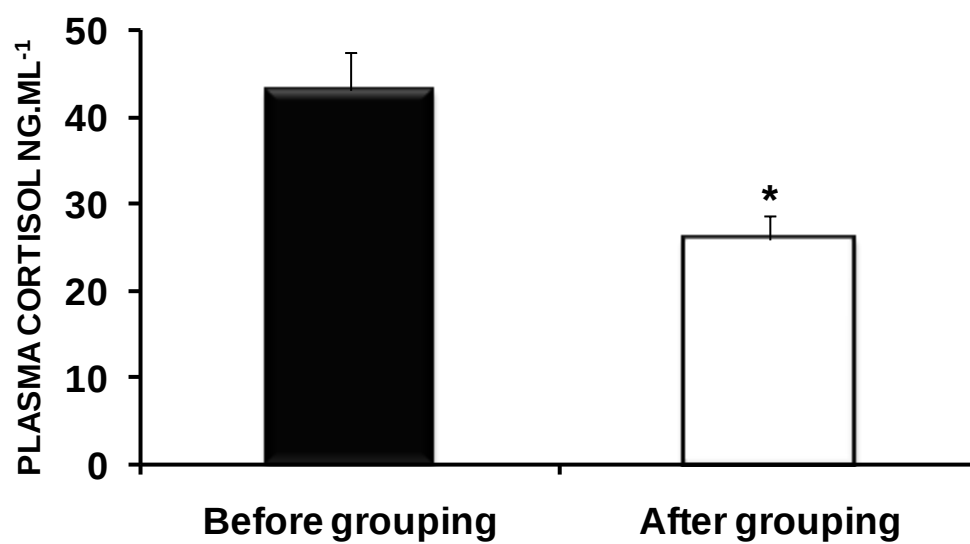
474

475 Fig. 2

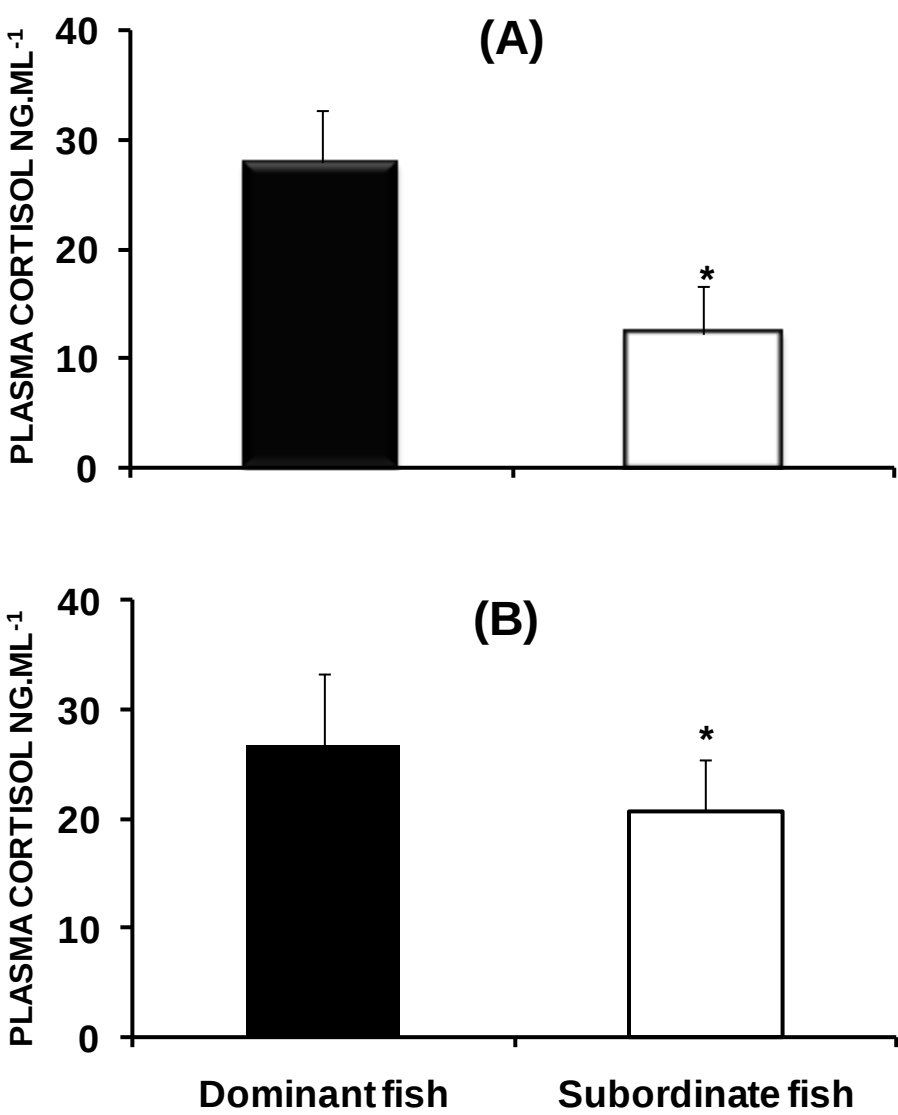


476

477 Fig. 3



478



481 Table 1

	Homogeneous Treatment			Heterogeneous Treatment		
	Mean($\pm$ S.E)	CV (%)	Range	Mean($\pm$ SE)	CV (%)	Range
Standard length (mm)	91.9 $\pm$ 4.7	5.15	90.0-94.0	97.7 $\pm$ 16.1	16.54	75.0-115.0
Weight (g)	33.38 $\pm$ 6.48	19.42	27.0-40.0	42.83 $\pm$ 20.56	48.01	22.0-62.0

482 CV: Coefficient of variation

Agonistic behavior type	Description
Threat	Animal approaches the opponent with its mouth open, preparing to bite one side, but his opponent flight before being attacked.
Mouth Fight	Both fish approach frontally each other with their mouths opened and bite the opponent's mouth. Their mouths are kept tightly together while one fish displaces the opponent backward.
Nipping	The aggressor swims towards the opponent and bites its body.
Lateral Fight	The fish remain alongside each other facing the same or opposite direction and beat their tails sideways.
Undulation	Only one fish beats its tail sideways (undulating the body), without spreading their fins. The opponent may fly or give another attack.
Chase	One fish follows the opponent that swims to an opposite direction
"Total Fight"	Mean of all agonistic behavior types