



CLAYTON KUNIO FUKAKUSA

Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de Glandulocaudini: Comunicação Química? Atração Sexual, Agressão e Reconhecimento coespecífico?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia e Comportamento Animal  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PORTO ALEGRE  
2014

Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de  
Gandulocaudini: Comunicação Química? Atração Sexual, Agressão e  
Reconhecimento coespecífico?

CLAYTON KUNIO FUKAKUSA

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Dr.

---

Dr<sup>a</sup>.

---

Dr.

---

Dr<sup>a</sup>.



## **Agradecimentos**

## Sumário

Resumo.....	6
Introdução.....	7
Capítulo 1 – Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de Glandulocaudini: Comunicação Química? Atração Sexual?.....	21
Capítulo 2 – Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de Glandulocaudini: Comunicação Química? Agressão? Reconhecimento coespecífico?.....	43
Considerações finais.....	71
Anexos.....	72

## Resumo

Todas as espécies da tribo Glandulocaudini possuem tecido hipertrofiado de células “club” na nadadeira caudal (órgão caudal). Pelo fato desta estrutura estar presente somente em machos maduros, formulou-se a hipótese que estas células secretam um tipo de feromônio relacionado à reprodução. Em *Mimagoniates inequalis*, testamos as hipóteses de: (i) órgão caudal tem função secretora; (ii) os peixes percebem as substâncias químicas do órgão caudal; (iii) as células “club” da pele e do órgão caudal produzem/contêm substâncias diferentes; (iv) as fêmeas são atraídas por substâncias químicas do órgão caudal; (v) as fêmeas tem preferência por substâncias químicas secretadas na água pelo órgão caudal; (vi) as fêmeas tem preferência pelo estímulo químico-visual de machos com órgão caudal; (vii) as substâncias químicas do órgão caudal aumentam a afinidade/receptividade da fêmea à corte; (viii) as substâncias químicas do órgão caudal aumentam a agressividade dos machos nas disputas; (ix) o macho pode discriminar/reconhecer o estímulo químico do órgão caudal de machos familiares e não familiares. As fêmeas *Mimagoniates inequalis* foram atraídas pelo extrato das células “club” do órgão caudal e possuem preferência pela água em que machos foram aclimatados individualmente (água condicionada) somente quando não há o estímulo visual de machos. Entretanto, os estímulos químicos do órgão caudal reduziram o número de corte de casais e aumentaram o número de comportamento agonístico. Na disputa entre machos, por outro lado, as substâncias químicas do órgão caudal de machos familiares não aumentaram a agressividade, mas os machos submissos tiveram menor tempo de atividade com estímulo químico de machos familiares do que com estímulo químico de machos não familiares. O comportamento de casais não diferiu entre o extrato de órgão caudal e da água condicionada, e diferiu entre o extrato das células “club” da pele e do órgão caudal. Esses dados suportam a hipótese de machos e fêmeas perceberem o estímulo químico do órgão caudal, desta estrutura ser secretora e especializada na comunicação química e de diferença nas substâncias químicas das células “club” da pele e do órgão caudal.

## Introdução

A capacidade dos animais de obter informações sobre seu ambiente físico e social é essencial para sua sobrevivência e seu sucesso reprodutivo (Ward *et al.*, 2007). Desde mamíferos a insetos sociais, os sinais químicos permitem tanto reconhecimentos gerais quanto específicos (Wyatt, 2003).

Dentre os sinais químicos, os feromônios são descritos como uma substância química ou mistura de substâncias químicas liberadas pelo organismo e que provocam reações específicas comportamentais ou fisiológicas em um ou mais coespecíficos (Karlson and Luscher, 1959) e são importantes mediadores da comunicação para as bactérias, plantas e animais em seus ambientes (Tillman *et al.*, 1999).

Desde os primeiros feromônios isolados e identificados (*Bombyx mori*, Lepidoptera; Butenandt *et al.*, 1961a; 1961b), inúmeros estudos vêm reportando a presença de feromônios em espécies de diversos táxons animais (Suter and Renkes, 1982; Tillman *et al.*, 1999; Stebbing *et al.*, 2003; Pfander and Zettel, 2004; Johansson *et al.*, 2005; Herborg *et al.*, 2006; Ruther *et al.*, 2011), especialmente entre os vertebrados (McIntosh and Drickamer, 1977; Alberts, 1989; Cooper *et al.*, 1994; Rodriguez, 2004; Grammer *et al.*, 2005; Burger *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2008; Caro and Balthazart, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Mardon *et al.*, 2011). Ambientes aquáticos não são exceção e têm sido uma área fértil para o estudo da comunicação química, principalmente em anfíbios (Yamamoto *et al.*, 2000; Kikuyama *et al.*, 2005; Fraker *et al.*, 2009; Vaccaro *et al.*, 2010; Woodley, 2010) e peixes (Colombo *et al.*, 1980; Resink *et al.*, 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991; Sorensen and Stacey, 1999; 2004; Murphy *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002; Stacey and Sorensen, 2002; 2006; Stacey, 2003; Sloman *et al.*, 2006; Barata *et al.*, 2008b; 2008a; Serrano *et al.*, 2008a; 2008b; Barbosa Junior *et al.*, 2010).

Sinais químicos são de particular relevância para os animais aquáticos devido às propriedades da água como solvente e meio de dispersão e devido às limitações na visão em profundidade, em ambientes complexos e em águas turvas (Ward *et al.*, 2007). Em peixes de água doce, o reconhecimento social é alcançado usando uma combinação de estímulos visuais e químicos (Brown and Smith, 1994). A visão é de primordial importância para peixes na detecção

de curto alcance (Douglas and Hawryshyn, 1990). No entanto, em distâncias maiores, os peixes podem reunir informações usando seus sentidos olfativo e gustativo (Ward *et al.*, 2007). O olfato é altamente desenvolvido em muitas espécies ícticas, sendo reconhecida a sua importância na detecção de informações químicas para as interações sociais entre os peixes (Hara, 1986; Resink *et al.*, 1989; Sveinsson and Hara, 2000; Murphy *et al.*, 2001; Frade *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Belanger *et al.*, 2004; Sloman *et al.*, 2006; Laframboise and Zielinski, 2011).

Devido à grande diversidade de estratégias de histórias de vida dos peixes e talvez por viverem em um meio muitas vezes desprovido de luz, os feromônios têm se mostrado importantes para uma grande variedade de funções nesse grupo (Sorensen and Stacey, 2004), como por exemplo: alarme (anti-predação) (Wisenden *et al.*, 2004; Duboc, 2007; Barbosa Junior *et al.*, 2010; 2012), reconhecimento populacional (Courtenay *et al.*, 1997), reconhecimento sexual (Hutter *et al.*, 2011), reconhecimento social (Ward *et al.*, 2005; 2007), reconhecimento de coespecíficos (McLennan and Ryan, 1997), reconhecimento parental (Moore *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2002), migração (Baker and Montgomery, 2001; Wagner *et al.*, 2009; Vrieze *et al.*, 2010; Neeson *et al.*, 2011), comportamento agressivo e competição entre machos (Giaquinto and Volpato, 1997; Poling *et al.*, 2001; Stacey *et al.*, 2001; Fraser and Stacey, 2002; Locatello *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2007), formação de cardume (Hemmings, 1966), inibição sexual (Aday *et al.*, 2003) e reprodução (Sorensen *et al.*, 1998; Sorensen and Stacey, 1999; 2004; Kobayashi *et al.*, 2002; Stacey and Sorensen, 2002; Stacey, 2003; Stacey and Sorensen, 2006). A atração sexual de parceiros por meio de feromônios reprodutivos foi descrita em diversas espécies, como em *Gobius niger* (Colombo *et al.*, 1980) e *Neogobius melanostomus* (Belanger *et al.*, 2004; Arbuckle *et al.*, 2005; Gammon *et al.*, 2005b) (Gobiidae); no bagre africano *Clarias gariepinus* (Clariidae) (Resink *et al.*, 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991); em *Salaria pavo* (Blenniidae) (Barata *et al.*, 2008b; Serrano *et al.*, 2008a); em *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) (Frade *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2008a); e no peixe dourado *Carassius auratus* (Cyprinidae) (Appelt and Sorensen, 2007; Kobayashi *et al.*, 2002).

Os feromônios de insetos e mamíferos funcionam normalmente na



comunicação, sendo que a coevolução de sinalizador e receptor produziu estruturas especializadas que liberam e captam sinais especializados (Stacey, 2003). Muitos animais terrestres expelem feromônios de glândulas exócrinas e executam comportamentos característicos associados com a deposição ou lançamento de odor (Bradbury and Vehrencamp, 1998). Glândulas exócrinas e glândulas odoríferas especializadas não são amplamente relatadas em peixes, nem comportamentos claramente associados à liberação de feromônio (Rosenthal and Lobel, 2006). Relativamente pouco é conhecido sobre o comportamento de sinalização química e glândulas de feromônio especializadas (Serrano *et al.*, 2008a).

A aparente ausência de tais estruturas especializadas no peixe-dourado, *Carassius auratus* (Cypriniformes), levou à proposição (Sorensen and Stacey, 1999; Stacey and Sorensen, 2002) da hipótese da primeira fase na evolução da comunicação química, a espionagem química, em que os receptores desenvolvem a capacidade de detectar e responder à liberação de químicos de coespecíficos (pistas feromonais), mas os doadores não precisam beneficiar-se da resposta do receptor, e permanecem não-especializados no que diz respeito à produção e liberação de pista (Stacey, 2003). A espionagem progride para a comunicação se a resposta do receptor pode selecionar a especialização na produção e/ou liberação de uma pista detectada, agora chamado de sinal e liberado por um sinalizador (Stacey, 2003).

Hormônios e outros metabólitos (esteroides, prostaglandinas e ácido biliático) liberados pelos peixes através da urina, fezes, brânquias e fluido das gônadas, atuam em algumas espécies como feromônios (Stacey and Sorensen, 2006). O peixe-dourado *C. auratus* é um exemplo de mecanismo não-especializado de liberação, onde as fêmeas liberam esteroides gonadais e prostaglandinas através da urina e brânquias, e os machos próximos os detectam (Stacey, 2003; Sorensen and Stacey, 2004; Stacey and Sorensen, 2006). A comunicação química especializada parece estar presente em machos do bagre africano *Clarias gariepinus* (Siluriformes), que possuem vesículas seminais produtoras de esteroides glucuronídeos que atraem fêmeas (Resink *et al.*, 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991); gobídeos machos, *Gobius niger* e *Neogobius melanostomus* (Perciformes), possuem porções não espermatogênicas no testículo chamadas de glândula mesorchial, produtoras

principalmente de andrógenos que parecem atrair fêmeas (Colombo et al., 1980; Murphy et al., 2001; Belanger et al., 2004; Arbuckle et al., 2005; Gammon et al., 2005b); as lampreias da espécie *Petromyzon marinus* (Petromyzontiformes) produzem ácido biliático no fígado que é liberado pelas brânquias, sendo que em machos maduros (mas não em fêmeas) há o desenvolvimento de células glandulares que parecem especializadas para a liberação de feromônio que atrai fêmeas para o sítio de desova (Li et al., 2002; Sorensen and Stacey, 2004); e em várias espécies de Blenniidae (Perciformes), os machos possuem um par de glândulas na nadadeira anal (Barata et al., 2008b), como é o caso de *Salaria pavo*, na qual foi demonstrado que a glândula anal libera feromônios que atraem fêmeas (Barata et al., 2008b; Serrano et al., 2008a; 2008c) e que estas preferem desovar em ninhos de machos que possuem glândulas anais (Barata et al., 2008b).

As células “club” são glândulas holócrinas geralmente encontradas em camadas mais profundas da epiderme da superfície do corpo de Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e outros peixes otofíseos (Weitzman et al., 2005). Estas produzem uma substância de alarme que é liberada no meio pelo rompimento da epiderme, provocando uma reação de susto em outros indivíduos (Pfeiffer, 1963; 1967; 1977).

Os machos maduros de diversas espécies de Characidae possuem tecidos hipertrofiados na superfície da pele, junto às nadadeiras anal, caudal ou pélvicas, muitas vezes associados a ganchos ósseos presentes nos raios das nadadeiras. Entre as espécies da subfamília Stevardiinae (*sensu* Mirande, 2010), foram identificadas células “club” nos órgãos na nadadeira caudal dos membros de tribo Glandulocaudini (Menezes and Weitzman, 1990; 2009), no órgão da região anterior da nadadeira anal de *Bryconadenos tanaothoros* (Weitzman et al., 2005) e na superfície da epiderme das nadadeiras pélvicas de *Planaltina myersi* (Menezes et al., 2003). *Hyphessobrycon diancistrus* (*incertae sedis*) possui células “club” na superfície da epiderme da nadadeira anal (Weitzman et al., 2005). Diferente dos glandulocaudini, *Corynopoma riisei* (Stervardiinae, Corynopomini) possui células mucosas especializadas no órgão caudal (Atkins and Fink, 1979). Na subfamília Cheirodontinae, todas as espécies da tribo Compsurini também possuem órgãos caudais (Malabarba,

1998). Outra estrutura incomum encontrada somente em machos maduros de determinadas espécies de Characidae é a glândula branquial (Burns and Weitzman, 1996). Glândulas branquiais desenvolvem-se a partir de filamentos branquiais do primeiro arco branquial e consistem em câmaras revestidas por um epitélio que varia de cúbico a colunar (Burns and Weitzman, 1996; Bushmann *et al.*, 2002).

Pelo fato destes órgãos e glândulas estarem presentes somente em machos maduros, formulou-se a hipótese que estas células liberariam, via secreção holócrina, um tipo de feromônio relacionado à corte ou a outro comportamento reprodutivo. Entretanto, nenhum estudo dedicou-se ao conhecimento das funções destas estruturas na família Characidae e de suas vantagens adaptativas (Rosenthal and Lobel, 2006).

Além da comunicação química, um dos aspectos mais importantes e interessantes da plasticidade alcançada pelos peixes é o número diverso de estratégias reprodutivas utilizadas por diferentes grupos (Azevedo, 2010). A superordem de teleósteos Ostariophysi, a qual reúne os Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cypriniformes e Gonorrhynchiformes, constitui em torno de 30% do total de espécies de peixes do planeta, com mais de 10.083 espécies (Eschmeyer and Fong, 2014), e 74,26% do total de espécies de água doce da América Central e do Sul, com 4.475 espécies (Reis *et al.*, 2003). Dentro desta superordem, nenhum caso de fecundação interna é conhecido até o momento, embora em algumas espécies de Siluriformes e Characiformes tenha sido verificada a presença de espermatozoides nos ovários das fêmeas. Entretanto, o exato momento da fecundação dos oócitos ainda é desconhecido, uma vez que não foram encontrados oócitos fertilizados no interior dos ovários, em qualquer estágio de desenvolvimento (Burns *et al.*, 1995; 1997; Azevedo, 2000; Burns and Weitzman, 2005). Diante disto, tem se utilizado o termo inseminação para caracterizar a estratégia adotada por estes peixes.

Peixes teleósteos resolveram o desafio da sincronização da maturação dos gametas com o comportamento entre os sexos usando hormônios reprodutivos tanto como sinais endógenos para sincronizar o comportamento sexual com a maturação dos gametas, quanto como sinais exógenos (feromônios) para sincronizar as interações de desova entre os peixes

(Kobayashi *et al.*, 2002). Entretanto, os inseminadores resolveram parte desse problema através de uma inseminação que pode ocorrer meses antes da maturação folicular (inseminação pré-ovulatória), ou seja, as fêmeas podem carregar espermatozoides por meses (Kutaygil, 1959), não sendo necessária uma sincronização temporal na maturação dos gametas entre o casal.

Em duas famílias neotropicais de Siluriformes, Auchenipteridae e Scoloplacidae, foi verificada a presença de inseminadores (von Ihering, 1937; Loir *et al.*, 1989; Burns *et al.*, 2000). Entre os Characiformes, um número crescente de espécies da família Characidae tem sido caracterizadas como inseminadora. Nesta família encontramos oito espécies inseminadoras em Cheirodontinae, 57 em Stevardiinae, e cinco em gêneros *incertae sedis* na família (Weitzman *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2009; Menezes and Weitzman, 2009; Mirande, 2010).

Characiformes inseminadores são de grande importância para compreensão da evolução da comunicação química e do comportamento reprodutivo em peixes, pois supõe-se que o surgimento de uma nova estratégia reprodutiva e a inseminação pré-ovulatória altere drasticamente os hormônios ancestrais e os mecanismos feromonais que regulam o comportamento reprodutivo (Stacey, 2003), além de trazer implicações na seleção sexual, especialmente na competição entre machos.

As espécies de Glandulocaudini são distribuídas em partes do leste e sul do Brasil, Paraguai e nordeste do Uruguai. São todos atrativamente coloridos, relativamente pequenos, geralmente com cerca de 28-60 mm de comprimento padrão quando adultos (Menezes and Weitzman, 2009). A tribo Glandulocaudini de Menezes e Weitzman (1990) consiste em três gêneros, *Lophiobrycon* Castro *et al.* (2003) com uma espécie, *Glandulocauda* Eigenmann (1911) com duas espécies e *Mimagoniates* Regan (1907) com sete espécies. Algumas das espécies da tribo estão aparentemente adaptadas a habitats restritos e limitadas na distribuição geográfica em função de sua ecologia (Menezes and Weitzman, 2009).

Todos os Glandulocaudini são inseminadores e têm um órgão na base da nadadeira caudal dos machos que varia de acordo com a espécie e que acredita-se que secreta um ou mais feromônios durante a corte. Provavelmente esse órgão, em associação com o bater da nadadeira caudal, impulsiona

feromônios em direção à cabeça da fêmea durante a corte (Menezes and Weitzman, 2009). Segundo Nelson (1964b), esta suposta glândula de feromônio aumentaria a resposta da fêmea ao cortejo do macho.

Nelson (1964b) analisou os comportamentos não sociais de locomoção, orientação, alimentação e desova, e sociais realizados pelos machos, pelas fêmeas e por ambos os sexos em três espécies de *Mimagoniates*: *M. microlepis* (Steindachner, 1876), *M. lateralis* (Nichols, 1913) e *M. inequalis* (Eigenmann, 1911). Dentre as interações sociais, Nelson (1964) descreve um elaborado comportamento de corte.

*Mimagoniates inequalis* é conhecido de pequenos riachos e rios tributários do rio Jacuí e lago Guaíba, de pequenos córregos que fluem para laguna dos Patos, de lagoas costeiras pequenas e isoladas e córregos que deságuam no Oceano Atlântico, ao sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Também foi coletado em tributários do alto rio Negro, Rivera, Uruguai (Menezes and Weitzman, 2009).

## **OBJETIVO**

Objetivo geral - Este estudo tem como objetivo testar se as substâncias químicas das células "club" do órgão da nadadeira caudal de *Glandulocaudini* liberam substâncias químicas que provocam reações comportamentais específicas em coespecíficos.

Diante da escassez de informações, esse estudo utilizará a espécie *Mimagoniates inequalis* como modelo experimental com o objetivo de testar as seguintes hipóteses:

- (i) O órgão caudal secreta substâncias químicas na água.
- (ii) Machos e fêmeas discriminam/percebem as substâncias químicas dos órgãos da nadadeira caudal.
- (iii) As células "club" da pele e do órgão caudal produzem/contêm substâncias diferentes.
- (iv) As fêmeas são atraídas por substâncias químicas do órgão caudal.
- (v) As fêmeas tem preferência por substâncias químicas secretadas

na água pelo órgão caudal.

- (vi) As fêmeas tem preferência pelo estímulo químico-visual de machos com órgão caudal.
- (vii) As substâncias químicas do órgão caudal aumentam a afinidade/receptividade da fêmea à corte.
- (viii) As substâncias químicas do órgão caudal aumentam a agressividade dos machos nas disputas.
- (ix) O macho pode discriminar/reconhecer o estímulo químico do órgão caudal de machos familiares e não familiares.

## Referências Bibliográficas

- ADAY, D. D., D. H. WAHL, and D. P. PHILIPP. 2003. A mechanism for social inhibition of sexual maturation in bluegill. *Journal of Fish Biology*. 62:486-490.
- ALBERTS, A. C. 1989. Ultraviolet visual sensitivity in desert iguanas: implications for pheromone detection. *Animal Behaviour*. 38:129-137.
- APPELT, C. W., and P. W. SORENSEN. 2007. Female goldfish signal spawning readiness by altering when and where they release a urinary pheromone. *Animal Behaviour*. 74:1329-1338.
- ARBUCKLE, W. J., A. J. BÉLANGER, L. D. CORKUM, B. S. ZIELINSKI, W. LI, S. YUN, S. BACHYNSKI, and A. P. SCOTT. 2005. In vitro biosynthesis of novel 5 $\beta$ -reduced steroids by the testis of the round goby, *Neogobius melanostomus*. *General and Comparative Endocrinology*. 140:1-13.
- ATKINS, D. L., and W. L. FINK. 1979. Morphology and histochemistry of the caudal gland of *Corynopoma riisei* Gill. *Journal of Fish Biology*. 14:465-469.
- AZEVEDO, M. A. 2000. Biologia reprodutiva de dois glandulocaudíneos com inseminação, *Mimagoniates microlepis* e *Mimagoniates rheocharis* (Teleostei: Characidae), e características de seus ambientes, p. 84. In: Departamento de Zoologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- . 2010. Reproductive characteristics of characid fish species (Teleostei, Characiformes) and their relationship with body size and phylogeny. *Iheringia Serie Zoologia*. 100:469-482.
- BAKER, C. F., and J. C. MONTGOMERY. 2001. Species-specific attraction of migratory banded kokopu juveniles to adult pheromones. *Journal of Fish Biology*. 58:1221-1229.
- BARATA, E. N., J. M. FINE, P. C. HUBBARD, O. G. ALMEIDA, P. FRADE, P. W. SORENSEN, and A. V. CANÁRIO. 2008a. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *Journal of Chemical Ecology*. 34:438-449.
- BARATA, E. N., P. C. HUBBARD, O. G. ALMEIDA, A. MIRANDA, and A. V. M. CANÁRIO. 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BioMed Central Biology*. 5:1-11.
- BARATA, E. N., R. M. SERRANO, A. MIRANDA, R. NOGUEIRA, P. C. HUBBARD, and A. V. M. CANÁRIO. 2008b. Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour*. 75:379-389.
- BARBOSA JUNIOR, A., F. L. ALVES, S. PEREIRA ADE, L. M. IDE, and A. HOFFMANN. 2012. Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piaucu fish. *Physiology & Behavior*. 105:784-90.
- BARBOSA JUNIOR, A., E. J. MAGALHAES, A. HOFFMANN, and L. M. IDE. 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Ethologica*. 13:119-126.
- BELANGER, A. J., W. J. ARBUCKLE, L. D. CORKUM, D. B. GAMMON, W. LI, A. P. SCOTT, and B. S. ZIELINSKI. 2004. Behavioural and electrophysiological responses by reproductive female *Neogobius melanostomus* to odours released by conspecific males. *Journal of Fish Biology*. 65:933-946.
- BRADBURY, J. W., and S. L. VEHRENCAMP. 1998. Principles of animal communication. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- BROWN, G. E., and R. J. F. SMITH. 1994. Fathead minnows use chemical cues to discriminate natural shoalmates from unfamiliar conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*. 20:3051-3061.
- BURGER, B. V., M. Z. VIVIERS, J. P. BEKKER, M. LE ROUX, N. FISH, W. B. FOURIE, and G. WEIBCHEN. 2008. Chemical characterization of territorial marking fluid of male Bengal tiger, *Panthera tigris*. *Journal of Chemical Ecology*. 34:659-671.
- BURNS, J. R., and S. H. WEITZMAN. 1996. Novel gill-derived gland in the male swordtail characin, *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Copeia*:627-633.

- . 2005. Insemination in ostariophysan fishes, p. 107-134. *In: Viviparous Fishes*. H. J. Grier and M. C. Uribe (eds.). New Life Publications, Homestead Florida.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, H. J. GRIER, and N. A. MENEZES.** 1995. Internal fertilization, testis and sperm morphology in Glandulocaudine fishes (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 224:131-145.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, and L. R. MALABARBA.** 1997. Insemination in eight species of Cheirodontine fishes (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae). *Copeia*:433-438.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, L. R. MALABARBA, and A. DOWNING-MEISNER.** 2000. Sperm modifications in inseminating Ostariophysan fishes, with new documentation of inseminating species. *In: Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson, and S. O. Stefansson (eds.). Institute of Marine Research and University of Bergen.
- BUSHMANN, P. J., J. R. BURNS, and S. H. WEITZMAN.** 2002. Gill-derived glands in glandulocaudine fishes (Teleostei : Characidae : Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 253:187-195.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, and E. HECKER.** 1961a. On the sexattractant of silk-moths. I. The biological test and the isolation of the pure sex-attractant bombykol. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 324:71-83.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, and D. STAMM.** 1961b. On the sexattractant of silk-moths. II. Constitution and configuration of bombykol. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 324:84-87.
- CARO, S. P., and J. BALTHAZART.** 2010. Pheromones in birds: myth or reality? *Journal of Comparative Physiology A*. 196:751-66.
- CASTRO, R. M. C., A. C. RIBEIRO, R. C. BENINE, and A. L. A. MELO.** 2003. *Lophiobrycon weitzmani*, a new genus and species of glandulocaudine fish (Characiformes: Characidae) from the rio Grande drainage, upper rio Paraná system, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 1:11-19.
- COLOMBO, L., A. MARCONATO, P. C. BELVEDERE, and C. FRISO.** 1980. Endocrinology of teleost reproduction: A testicular steroid pheromone in the black goby, *Gobius joko* L. *Bolletino di zoologia*. 47:355-364.
- COOPER, W. E., P. LÓPEZ, and A. SALVADOR.** 1994. Pheromone detection by an amphibiaenian. *Animal Behaviour*. 47:1401-1411.
- COURTENAY, S. C., T. P. QUINN, H. M. C. DUPUIS, C. GROOT, and P. A. LARKIN.** 1997. Factors affecting the recognition of population-specific odours by juvenile coho salmon. *Journal of Fish Biology*. 50:1042-1060.
- DOUGLAS, R. H., and C. W. HAWRYSHYN.** 1990. Behavioural studies of fish vision: an analysis of their capabilities. *In: The visual system of fish*. Vol. 373-418. R. H. Douglas and M. B. A. Djamgoz (eds.). Chapman and Hall, London, UK.
- DUBOC, L. F.** 2007. Análise comparativa e aspectos ecológicos da reação de alarme em duas espécies de *Mimagoniates* (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae). *Revista Brasileira de Zoologia*. 24:1163-1185.
- EIGENMANN, C. H.** 1911. New characins in the collections of the Carnegie Museum. *Annals of the Carnegie Museum*. 8:164-181.
- ESCHMEYER, W. N., and J. D. FONG.** 2014. Species by Family/Subfamily, <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Versão eletrônica acessada em 21/04/2014.
- FRADE, P., P. C. HUBBARD, E. N. BARATA, and A. V. M. CANÁRIO.** 2002. Olfactory sensitivity of the Mozambique tilapia to conspecific odours. *Journal of Fish Biology*. 61:1239-1254.
- FRAKER, M. E., F. HU, V. CUDDAPAH, S. A. MCCOLLUM, R. A. RELYEA, J. HEMPEL, and R. J. DENVER.** 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior*. 55:520-529.



- FRASER, E. J., and N. STACEY. 2002. Isolation increases milt production in goldfish. *Journal of Experimental Zoology*. 293:511-524.
- GAMMON, D. B., W. LI, A. P. SCOTT, B. S. ZIELINSKI, and L. D. CORKUM. 2005. Behavioural responses of female *Neogobius melanostomus* to odours of conspecifics. *Journal of Fish Biology*. 67:615-626.
- GIAQUINTO, P. C., and G. L. VOLPATO. 1997. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiology & Behavior*. 62:1333-1338.
- GRAMMER, K., B. FINK, and N. NEAVE. 2005. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 118:135-142.
- HARA, T. J. 1986. Role of olfaction in fish behaviour, p. 152–176. *In: The Behaviour of Teleost Fishes*. T. J. Pitcher (ed.). Johns Hopkins Press, Baltimore.
- HEMMINGS, C. C. 1966. Olfaction and Vision in Fish Schooling. *Journal of Experimental Biology*. 45:449-464.
- HERBORG, L., M. G. BENTLEY, A. S. CLARE, and K. S. LAST. 2006. Mating behaviour and chemical communication in the invasive Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 329:1-10.
- HUTTER, S., S. M. ZALA, and D. J. PENN. 2011. Sex recognition in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Ethology*. 29:55-61.
- JAVONILLO, R., J. R. BURNS, and S. H. WEITZMAN. 2009. Sperm modifications related to insemination, with examples from the Ostariophysi. *In: Reproductive Biology and Phylogeny in Fishes*. B. G. M. Jamieson (ed.). Science Publishers, Enfield.
- JOHANSSON, B. G., T. M. JONES, and F. WIDEMO. 2005. Cost of pheromone production in a lekking *Drosophila*. *Animal Behaviour*. 69:851-858.
- KARLSON, P., and M. LUSCHER. 1959. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 183:55-6.
- KIKUYAMA, S., T. NAKADA, F. TOYODA, T. IWATA, K. YAMAMOTO, and J. M. CONLON. 2005. Amphibian Pheromones and Endocrine Control of Their Secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1040:123-130.
- KOBAYASHI, M., P. W. SORENSEN, and N. E. STACEY. 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 26:71-84.
- KUTAYGIL, D. L. 1959. Insemination, sexual differentiation and secondary sex characters in *Stevardia albipinnis* gill. *Hydrobiology University Istanbul Fen Fakültesi Mecmuası*. 24:93–128.
- LAFRAMBOISE, A. J., and B. S. ZIELINSKI. 2011. Responses of round goby (*Neogobius melanostomus*) olfactory epithelium to steroids released by reproductive males. *Journal of Comparative Physiology A*. 197:999-1008.
- LAMBERT, J. G., and J. W. RESINK. 1991. Steroid glucuronides as male pheromones in the reproduction of the African catfish *Clarias gariepinus*--a brief review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 40:549-556.
- LI, W., A. P. SCOTT, M. J. SIEFKES, H. YAN, Q. LIU, S. S. YUN, and D. A. GAGE. 2002. Bile Acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. *Science*. 296:138-141.
- LOCATELLO, L., C. MAZZOLDI, and M. B. RASOTTO. 2002. Ejaculate of sneaker males is pheromonally inconspicuous in the black goby, *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Journal of Experimental Zoology*. 293:601-605.
- LOIR, M., C. CAUTY, P. PLANQUETTE, and P. Y. LeBAIL. 1989. Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquatic Living Resour.* 2:45-56.
- MALABARBA, L. R. 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae), p. 193-233. *In: Phylogeny and classification of neotropical fishes*. L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena, and C. A. Lucena (eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

- MARDON, J., S. M. SAUNDERS, and F. BONADONNA.** 2011. Comments on recent work by Zhang and colleagues: "Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in budgerigars". *Chemical Senses*. 36:3-4; author reply 5-7.
- MCINTOSH, T. K., and L. C. DRICKAMER.** 1977. Excreted urine, bladder urine, and the delay of sexual maturation in female house mice. *Animal Behaviour*. 25:999-1004.
- MCLENNAN, D. A., and M. J. RYAN.** 1997. Responses to conspecific and heterospecific olfactory cues in the swordtail *Xiphophorus cortezi*. *Animal Behaviour*. 54:1077-1088.
- MENEZES, N. A., and S. H. WEITZMAN.** 1990. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 103:380-426.
- . 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 7:295-370.
- MENEZES, N. A., S. H. WEITZMAN, and J. R. BURNS.** 2003. A systematic review of *Planaltina* (Teleostei: Characiformes: Characidae: Glandulocaudinae: Diapomini) with a description of two new species from the upper rio Paraná, Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 116:557-600.
- MEYER, J. M., T. E. GOODWIN, and B. A. SCHULTE.** 2008. Intrasexual chemical communication and social responses of captive female African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour*. 76:163-174.
- MIRANDE, J. M.** 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*. 8:385-568.
- MOORE, A., M. J. IVES, and L. T. KELL.** 1994. The Role of Urine in Sibling Recognition in Atlantic Salmon *Salmo Salar* (L) Parr. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 255:173-180.
- MURPHY, C. A., N. E. STACEY, and L. D. CORKUM.** 2001. Putative steroidal pheromones in the round goby, *Neogobius melanostomus*: olfactory and behavioral responses. *Journal of Chemical Ecology*. 27:443-470.
- NEESON, T. M., M. J. WILEY, S. A. ADLERSTEIN, and R. L. RIOLO.** 2011. River network structure shapes interannual feedbacks between adult sea lamprey migration and larval habitation. *Ecological Modelling*. 222:3181-3192.
- NELSON, K.** 1964. Behavior and morphology in the glandulocaudine fishes (Ostariophysi, Characidae). University of California Publisher Zoology. 75:59-152.
- OLSEN, K. H., M. GRAHN, and J. LOHM.** 2002. Influence of MHC on sibling discrimination in Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Chemical Ecology*. 28:783-795.
- PFANDER, I., and J. ZETTEL.** 2004. Chemical communication in *Ceratophysella sigillata* (Collembola: Hypogastruridae): intraspecific reaction to alarm substances. *Pedobiologia*. 48:575-580.
- PFEIFFER, W.** 1963. Alarm substances. *Experientia*. 19:113-23.
- . 1967. Alarm reaction and alarm substance cells in Kneriidae and Phractolaemidae (Isospondyli, Pisces). *Naturwissenschaften*. 54:177.
- . 1977. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia* 1977:653-665.
- POLING, K. R., E. J. FRASER, and P. W. SORENSEN.** 2001. The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 129:645-651.
- REGAN, C. T.** 1907. Description of two new characinid fishes from South America. *Annals and Magazine of Natural History*. 20:402-403.
- REIS, R. E., S. O. KULLANDER, and C. J. FERRARIS-JR.** 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre.

- RESINK, J. W., R. VAN DEN HURK, R. F. O. GROENINX VAN ZOELEN, and E. A. HUISMAN.** 1987. The Seminal Vesicle as Source of Sex Attracting Substances in the African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 63:115-127.
- RESINK, J. W., P. K. VOORTHUIS, R. VAN DEN HURK, R. C. PETERS, and P. G. VAN OORDT.** 1989. Steroid Glucuronides of the Seminal Vesicle as Olfactory Stimuli in African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 83:153-166.
- RODRIGUEZ, I.** 2004. Pheromone receptors in mammals. *Hormones and Behavior*. 46:219-30.
- ROSENTHAL, G. G., and P. S. LOBEL.** 2006. Communication, p. 39-78. *In: Behaviour and physiology of fish*. Vol. 24. K. A. Sloman, R. W. Wilson, and S. Balshine (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- RUTHER, J., K. THAL, and S. STEINER.** 2011. Pheromone communication in *Nasonia vitripennis*: abdominal sex attractant mediates site fidelity of releasing males. *Journal of Chemical Ecology*. 37:161-165.
- SERRANO, R. M., E. N. BARATA, M. A. BIRKETT, P. C. HUBBARD, P. S. GUERREIRO, and A. V. CANARIO.** 2008a. Behavioral and olfactory responses of female *Salaria pavo* (Pisces: Blenniidae) to a putative multi-component male pheromone. *Journal of Chemical Ecology*. 34:647-658.
- SERRANO, R. M., O. LOPES, P. C. HUBBARD, J. ARAUJO, A. V. CANARIO, and E. N. BARATA.** 2008b. 11-ketotestosterone stimulates putative sex pheromone production in the male peacock blenny, *Salaria pavo* (Risso 1810). *Biology of Reproduction*. 79:861-868.
- SERRANO, R. M., O. LOPES, P. C. HUBBARD, J. ARAÚJO, A. V. M. CANÁRIO, and E. N. BARATA.** 2008c. Seasonal cell differentiation and olfactory potency of secretions by the anal glands of male peacock blenny *Salaria Pavo*. *Journal of Fish Biology*. 73:1790–1798.
- SLOMAN, K. A., R. W. WILSON, and S. BALSHINE.** 2006. *Behaviour and physiology of fish*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- SORENSEN, P. W., T. A. CHRISTENSEN, and N. E. STACEY.** 1998. Discrimination of pheromonal cues in fish: emerging parallels with insects. *Current Opinion in Neurobiology*. 8:458-467.
- SORENSEN, P. W., M. PINILLOS, and A. P. SCOTT.** 2005. Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology*. 140:164-175.
- SORENSEN, P. W., and N. E. STACEY.** 1999. Evolution and specialization of fish hormonal pheromones, p. 15–47. *In: Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. R. E. Johnston, D. Muller-Schwarze, and P. W. Sorensen (eds.). Kluwer Academic/Plenum, New York.
- SORENSEN, P. W., and N. E. STACEY.** 2004. Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 38:399–417.
- STACEY, N.** 2003. Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28:229–235.
- STACEY, N., E. J. FRASER, P. SORENSEN, and G. VAN DER KRAAK.** 2001. Milt production in goldfish: regulation by multiple social stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 130:467-476.
- STACEY, N., and P. SORENSEN.** 2006. Reproductive Pheromones, p. 359-412. *In: Behaviour and physiology of fish*. Vol. 24. K. A. Sloman, R. W. Wilson, and S. Balshine (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- STACEY, N. E., and P. W. SORENSEN.** 2002. Hormonal pheromones in fish, p. 375–434. *In: Hormones, Brain and Behavior*. Vol. 2. D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, and R. T. Rubin (eds.). Academic Press, New York.
- STEBBING, P. D., M. G. BENTLEY, and G. J. WATSON.** 2003. Mating behaviour and evidence for a female released courtship pheromone in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Chemical Ecology*. 29:465-475.
- SUTER, R. B., and G. RENKES.** 1982. Linyphiid Spider Courtship: Releaser and Attractant Functions of a Contact Sex Pheromone. *Animal Behaviour*. 30:714-718.

- SVEINSSON, T., and T. J. HARA.** 2000. Olfactory sensitivity and specificity of Arctic char, *Salvelinus alpinus*, to a putative male pheromone, prostaglandin f(2)alpha. *Physiology & Behavior*. 69:301-7.
- TILLMAN, J. A., S. J. SEYBOLD, R. A. JURENKA, and G. J. BLUMQUIST.** 1999. Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29:481-514.
- VACCARO, E. A., P. W. FELDHOFF, R. C. FELDHOFF, and L. D. HOUCK.** 2010. A pheromone mechanism for swaying female mate choice: enhanced affinity for a sexual stimulus in a woodland salamander. *Animal Behaviour*. 80:983-989.
- VON IHERING, R.** 1937. Oviductal fertilization in the South American catfish, *Trachycorystes*. *Copeia*. 1937:201-205.
- VRIEZE, L. A., R. BJERSELIUS, and P. W. SORENSEN.** 2010. Importance of the olfactory sense to migratory sea lampreys *Petromyzon marinus* seeking riverine spawning habitat. *Journal of Fish Biology*. 76:949-964.
- WAGNER, C. M., M. B. TWOHEY, and J. M. FINE.** 2009. Conspecific cueing in the sea lamprey: do reproductive migrations consistently follow the most intense larval odour? *Animal Behaviour*. 78:593-599.
- WARD, A. J. W., R. I. HOLBROOK, J. KRAUSE, and P. J. B. HART.** 2005. Social recognition in sticklebacks: the role of direct experience and habitat cues. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 57:575-583.
- WARD, A. J. W., M. M. WEBSTER, and P. J. B. HART.** 2007. Social recognition in wild fish populations. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 274:1071-1077.
- WEITZMAN, S. H., N. A. MENEZES, H.-G. EVERS, and J. R. BURNS.** 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 3:329-360.
- WISENDEN, B. D., K. A. VOLLBRECHT, and J. L. BROWN.** 2004. Is there a fish alarm cue? Affirming evidence from a wild study. *Animal Behaviour*. 67:59-67.
- WOODLEY, S. K.** 2010. Pheromonal communication in amphibians. *Journal of Comparative Physiology A*. 196:713-727.
- WYATT, T. D.** 2003. Pheromones and animal behaviour : communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York.
- YAMAMOTO, K., Y. KAWAI, T. HAYASHI, Y. OHE, H. HAYASHI, F. TOYODA, G. KAWAHARA, T. IWATA, and S. KIKUYAMA.** 2000. Silefrin, a sodefrin-like pheromone in the abdominal gland of the sword-tailed newt, *Cynops ensicauda*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 472:267-270.
- ZHANG, J. X., W. WEI, J. H. ZHANG, and W. H. YANG.** 2010. Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in budgerigars. *Chemical Senses*. 35:375-382.

## **Capítulo 1**

Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de  
Glandulocaudini: Comunicação Química? Atração Sexual?

(Manuscrito a ser submetido ao periódico Animal Behavior)

## Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de Glandulocaudini: Comunicação Química? Atração Sexual?

Clayton Kunio Fukakusa<sup>12</sup> e Luiz Roberto Malabarba<sup>13</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970. Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>2</sup>[claytonfukakusa@gmail.com](mailto:claytonfukakusa@gmail.com);

<sup>3</sup>[malabarba@ufrgs.br](mailto:malabarba@ufrgs.br)

Todas as espécies da tribo Glandulocaudini possuem tecido hipertrofiado de células “club” na nadadeira caudal (órgão caudal). Pelo fato desta estrutura estar presente somente em machos maduros, formulou-se a hipótese que estas células secretem um tipo de feromônio relacionado à reprodução. Em *Mimagoniates inequalis*, foi testada a atratividade das fêmeas pelo estímulo químico do órgão caudal em um tanque em forma de Y e a preferência das fêmeas pela água condicionada por machos com órgão caudal (água em que machos foram aclimatados individualmente) em um aquário com três compartimentos (um central, flanquado por dois). As fêmeas permaneceram mais tempo e optaram mais vezes em entrar primeiro no braço do tanque Y com estímulo químico do órgão caudal do que no braço sem estímulo (controle). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o estímulo de extrato de raios da nadadeira caudal sem o órgão caudal e o controle. No aquário com três compartimentos, as fêmeas permaneceram mais tempo na área com água condicionada de machos com órgão caudal do que na área com água condicionada por machos sem órgão caudal. Não houve preferência das fêmeas quando os estímulos das águas condicionadas foram apresentados junto ao estímulo visual dos machos. Estes dados corroboram as hipóteses de função secretora do órgão caudal, especialização desta estrutura na comunicação química intersexual e atração de fêmeas pelo estímulo do órgão caudal do macho.

Palavra-chave: Peixe; Characidae; Reprodução; Inseminação; *Mimagoniates inequalis*; Comunicação química; Feromônio, Sinal químico.

A capacidade dos animais de obter informações sobre seu ambiente físico e social é essencial para sua sobrevivência e seu sucesso reprodutivo (Ward et al., 2007). A comunicação intersexual envolve sinais visuais, táteis, auditivos e químicos que podem ser utilizados para atrair, localizar ou avaliar a qualidade do potencial parceiro reprodutivo (Gaskett, 2007).

Desde os primeiros feromônios isolados e identificados (*Bombyx mori*, Lepidoptera; Butenandt et al., 1961a; 1961b), inúmeros estudos vêm reportando a presença de feromônios em espécies de diversos táxons animais (Suter and Renkes, 1982; Tillman et al., 1999; Stebbing et al., 2003; Pfander and Zettel, 2004; Johansson et al., 2005; Herborg et al., 2006; Ruther et al., 2011), especialmente entre os vertebrados (McIntosh and Drickamer, 1977; Alberts, 1989; Cooper et al., 1994; Rodriguez, 2004; Grammer et al., 2005; Burger et al., 2008; Meyer et al., 2008; Caro and Balthazart, 2010; Zhang et al., 2010; Mardon et al., 2011). Ambientes aquáticos não são exceção e têm sido uma área fértil para estudo de comunicação química, principalmente em anfíbios (Yamamoto et al., 2000; Kikuyama et al., 2005; Fraker et al., 2009; Vaccaro et al., 2010; Woodley, 2010) e peixes (Colombo et al., 1980; Resink et al., 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991; Sorensen and Stacey, 1999; 2004; Murphy et al., 2001; Li et al., 2002; Kobayashi et al., 2002; Stacey and Sorensen, 2002; 2006; Stacey, 2003; Sloman et al., 2006; Barata et al., 2008a; Barata et al., 2008b; Serrano et al., 2008a; Serrano et al., 2008b; Barbosa Junior et al., 2010).

Além da comunicação química, um dos aspectos mais importantes e interessantes da plasticidade alcançada pelos peixes é o número diverso de estratégias reprodutivas utilizadas por diferentes grupos (Azevedo et al., 2010). Na superordem Ostariophysi nenhum caso de fecundação interna é conhecido até o momento, embora em algumas espécies de Siluriformes e Characiformes tenha sido verificada a presença de espermatozoides nos ovários das fêmeas. Entretanto, o exato momento da fecundação dos oócitos ainda é desconhecido, uma vez que não foram encontrados oócitos fertilizados no interior dos ovários em qualquer estágio de desenvolvimento (Burns et al., 1995; 1997; Burns and Weitzman, 2005). Diante disto, tem se utilizado o termo inseminação para caracterizar a estratégia adotada por estes peixes.

Caracídeos inseminadores são de grande importância para compreensão da evolução da comunicação química e do comportamento reprodutivo em peixes, pois supõe-se que o surgimento de uma nova estratégia reprodutiva e a inseminação pré-ovulatória alterem drasticamente os hormônios ancestrais e os mecanismos feromonais que regulam o comportamento reprodutivo (Stacey, 2003), além de trazer implicações na seleção sexual, especialmente na competição entre machos.

Os machos maduros de diversas espécies de Characidae possuem tecidos hipertrofiados na superfície da pele junto às nadadeiras anal, caudal ou pélvicas, muitas vezes associados a ganchos ósseos presentes nos raios das nadadeiras. Entre as espécies da subfamília Stevardiinae (*sensu* Mirande, 2010), foram identificadas células “club” nos órgãos na nadadeira caudal dos membros de tribo Glandulocaudini (Menezes and Weitzman, 1990; 2009), no órgão da região anterior da nadadeira anal de *Bryconadenos tanaothoros* (Weitzman et al., 2005) e na superfície da epiderme das nadadeiras pélvicas de *Planaltina myersi* (Menezes et al., 2003). *Hyphessobrycon diancistrus* (*incertae sedis*) possui células “club” na superfície da epiderme da nadadeira anal (Weitzman et al., 2005). Diferente dos glandulocaudini, *Corynopoma riisei* (Stevardiinae, Corynopomini) possui células mucosas no órgão caudal (Atkins and Fink, 1979). Na subfamília Cheirodontinae, todas as espécies da tribo Compsurini também possuem órgãos caudais (Malabarba, 1998). Outra estrutura incomum encontrada somente em machos maduros de determinadas espécies de Characidae é a glândula branquial (Burns and Weitzman, 1996). Glândulas branquiais desenvolvem-se a partir de filamentos branquiais do primeiro arco branquial e consistem em câmaras revestidas por um epitélio que varia de cúbico a colunar (Burns and Weitzman, 1996; Bushmann et al., 2002).

Pelo fato destes órgãos e glândulas estarem presentes somente em machos maduros, formulou-se a hipótese que estas células liberariam, via secreção holócrina, um tipo de feromônio relacionado à corte ou a outro comportamento reprodutivo. Entretanto, nenhum estudo dedicou-se ao conhecimento das funções destas estruturas na família Characidae e de suas vantagens adaptativas (Rosenthal and Lobel, 2006).

*Mimagoniates inequalis* (Eigenmann, 1911) é um glandulocaudini inseminador que possui células “club” no órgão caudal, e ocorre em pequenos riachos e rios do sul do Brasil e nordeste do Uruguai (Menezes and Weitzman, 2009).

Diante da escassez de informação sobre a função do órgão caudal, esse estudo utilizou a espécie *Mimagoniates inequalis* como modelo experimental com o objetivo de testar as hipóteses: (1) o órgão caudal secreta substâncias químicas na água; (2) as fêmeas discriminam/percebem as substâncias químicas do órgão caudal; (3) as fêmeas são atraídas por substâncias químicas do órgão caudal; (4) as fêmeas tem preferência por substâncias químicas secretadas na água por machos com órgão caudal e (5) as fêmeas tem preferência pelo estímulo químico-visual de machos com órgão caudal.

## MATERIAL E MÉTODOS



### *Cuidado e Uso de Animais*

Este estudo seguiu os princípios de cuidado e uso de animais em pesquisa aprovados pela Sociedade para o Estudo da Reprodução, de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (1996) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto nº 23447). As metodologias descritas neste estudo são adaptadas de McRobert e Bradner (1998), Plenderleith et al. (2005), Barata *et al.* (2008b), e Sathya e Couldridge (2013), e foram julgadas pelas comissões de ética dos países de origem.

### *Origem dos organismos teste*

Os espécimes de *Mimagoniates inequalis* foram coletados com puçá de tela plástica (malha 1 mm) em janeiro de 2013 no arroio Calombos, sistema da laguna dos Patos (30° 6'49.10"S, 51°41'0.01"O), em Eldorado do Sul, RS, Brasil (Licença Nº 34933-2, ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). Os exemplares foram acondicionados em sacos plásticos contendo água do local e estes em caixas plásticas, sendo transportados até o Laboratório de Ictiologia, Departamento de Zoologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após o término do estudo parte dos exemplares utilizados foi enviada para a Coleção de peixes do Departamento de Zoologia da UFRGS, como material testemunho (UFRGS19190).

### *Manutenção dos peixes em laboratório*

A introdução dos exemplares coletados nos aquários foi precedida de um processo de aclimação, no qual estes permaneceram nos sacos plásticos parcialmente submersos nos aquários até que as temperaturas da água dos sacos e dos aquários fossem naturalmente igualadas. Posteriormente, a água dos sacos foi gradualmente misturada à água dos aquários. Os exemplares foram distribuídos em aquários de aproximadamente 60 l com no máximo dois machos e cinco fêmeas por aquário. Os aquários continham água tratada desclorada e estavam equipados com filtro biológico de fundo, coberto por aproximadamente 5 cm de cascalho com granulação em torno de 5 mm e plantados com *Hygrophila difformis* (Linnaeus) e *Microsorium pteropus* (Blume). A iluminação consistiu de lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W com um timer regulado para fornecer um fotoperíodo de 12 h:12 h luz-escuro. A aeração foi mantida constante através de bombas submersas (280 l/h). A temperatura foi mantida em aproximadamente 25°C com auxílio de termostatos e aquecedores e a sala de aquários climatizada através de um condicionador de ar. A dieta oferecida aos peixes foi à base de ração comercial em flocos disponibilizada uma vez ao dia em *ad libitum*.

### *Ensaio I: atração química*

### *Tanque teste*

A avaliação da atração de fêmeas de *M. inequalis* para estímulos químicos foi realizada em um labirinto (tanque) em forma de “Y” com 30 cm de altura, 55 cm de comprimento e 25 cm de largura na haste (base do “Y”), 60° entre os dois braços do tanque “Y” e cada braço medindo 40 cm de comprimento e 12,5 cm de largura. Uma placa removível e perfurada foi colocada a 20 cm da base da haste para restringir a natação do peixe e ao mesmo tempo possibilitar a entrada dos estímulos químicos (Fig. 1). Um fluxo de água foi gerado pela entrada independente de 3 l/min de água em cada braço, sendo o excesso drenado para fora do tanque por dois tubos de PVC (2 cm de diâmetro) localizados no final da haste. Estes tubos mantiveram a altura da coluna d’água constante. As paredes externas do tanque, com exceção do fundo, foram cobertas por cartolina azul e a área em torno do tanque “Y” cercada por cortinas para reduzir estímulos visuais durante o experimento. As filmagens em vista superior ao tanque “Y” foram registradas com uma câmera Sony DCR-SR220.

### *Estímulos químicos*

Os estímulos químicos testados foram extrato de células “club” do órgão da nadadeira caudal (OC) e de raios da nadadeira caudal (RA) de machos. As soluções teste de OC e RA foram produzidas separadamente e respectivamente pela extração dos órgãos caudais e dos raios da nadadeira caudal de 24 machos ( $SL+DP = 37,09 \pm 2,98$  mm) eutanasiados com uma overdose de Eugenol. Os tecidos foram macerados em água destilada e as soluções resultantes filtradas e armazenadas em alíquotas de 75 ml a -20° C até a utilização. As soluções descongeladas foram utilizadas nos experimentos em concentrações de 0,04 mg/ml de OC e 0,14 mg/ml de RA.

### *Procedimento experimental*

Ativação do fluxo de água no tanque “Y”. Aclimação de uma fêmea na haste do tanque “Y” (região a jusante) durante 1 h. Introdução do estímulo químico em um dos braços do tanque “Y” com auxílio de uma bomba peristáltica (5 ml/min). Remoção da placa perfurada 5 min após a introdução do estímulo, assegurando que o estímulo químico atinja a região a jusante do tanque “Y” (haste) antes que o peixe possa nadar em direção a montante (braços do “Y”). Início da gravação com duração de 10 min.

Os experimentos em que os peixes não nadaram para um dos braços após a remoção da placa perfurada não foram considerados na análise. Nenhum peixe foi testado mais de uma vez, independente da sua resposta. A água do tanque foi substituída entre cada réplica e os estímulos químicos foram introduzidos no braço oposto do “Y” em relação à réplica anterior.

### *Dados e análise estatística*

O comportamento das fêmeas (RA:  $N = 20$ ,  $SL+DP = 33,28 \pm 2,15$  mm; OC:  $N = 28$ ,  $SL+DP = 32,69 \pm 1,92$  mm) foi quantificado como: (1) braço que a fêmea entrou primeiro; (2) o tempo decorrido antes da entrada neste braço (tempo de latência); (3) número de vezes que a fêmea entra em cada braço e (4) o tempo de permanência em cada braço. O efeito de cada estímulo químico sobre a primeira escolha do peixe no tanque “Y” (variável 1 - braço com ou sem um estímulo) foi avaliado pelo teste qui-quadrado para determinar se a frequência observada difere da esperada (50%-50%). A variável 2 foi analisada utilizando o Teste T de Student para comparar os estímulos químicos (OC e RA). As variáveis 3 e 4 foram analisadas utilizando o teste T pareado quando comparados os braços com ou sem estímulo de cada um dos estímulos químicos. A Regressão linear e o teste F foram utilizados para testar as relações entre o comprimento padrão e as variáveis comportamentais. Os testes foram realizados no software R 3.0.2.

### *Ensaio II: preferência de fêmeas por estímulos químico e químico-visual*

#### *Aquário teste*

A avaliação da preferência de fêmeas de *M. inequalis* por estímulos químicos ou químico-visuais foi realizada em dois testes em sequência em um aquário (80x20x30 cm) dividido em três compartimentos por divisórias de vidro fixas e transparentes. Dois compartimentos nas extremidades (20x20x30 cm) do aquário flanqueando um compartimento central (40x20x30 cm). Placas removíveis opacas de acrílico foram colocadas junto às divisórias de vidro. Marcações fixas na face externa do vidro da frente do aquário dividiram o compartimento central em quatro partes iguais. Duas placas removíveis de acrílico transparente e perfurado sobre as marcações periféricas (próximas às divisórias de vidro) criaram três subcompartimentos com 25%, 50% e 25% (respectivamente) do volume do compartimento central. Bombas peristálticas introduziram os estímulos químicos de beckers e dos compartimentos adjacentes para o compartimento central. Essa configuração permitiu que fosse controlada a percepção da fêmea aos estímulos químicos e visuais dos machos e que a natação da fêmea fosse limitada ao subcompartimento central. As laterais do aquário, com exceção da frente do compartimento central, foram cobertas por cartolina azul e a frente isolada por cortinas para reduzir estímulos visuais durante o experimento. As filmagens foram registradas em vista frontal ao aquário teste.

#### *Estímulos químicos*

Os estímulos testados foram: 1 - água condicionada por machos ( $N = 23$ ,  $SL+DP = 41,32 \pm 1,89$  mm) com órgãos da nadadeira caudal. 2 - água condicionada por machos ( $N = 23$ ,  $SL+DP = 41,24 \pm 1,80$  mm) sem órgãos da nadadeira caudal. A água condicionada foi produzida pela exposição do macho a estímulos visuais, e não químicos, de outros peixes. O macho foi mantido por 23 h em um aquário (20x40x30 cm) com 16 l de água entre dois aquários adjacentes. Em um dos aquários adjacentes havia duas fêmeas e no outro um macho.

#### *Estímulos visuais*

Exposição a machos com e sem órgão caudal. A extração dos órgãos da nadadeira caudal de machos anestesiados com Eugenol (0,2 ml/l) teve a finalidade de produzir solução para um ensaio não mencionado nesse estudo e testar o estímulo químico (água condicionada) nesse ensaio. Os machos foram mantidos isolados e tratados com antifúngico e antibacterino (Api<sup>tm</sup>) até a recuperação.

#### *Procedimento experimental*

Primeiro teste (estímulo químico). Aclimação de uma fêmea no subcompartimento central do aquário teste durante 17 h. Introdução de estímulos químicos (33 ml/min) nas extremidades do compartimento central (500 ml de água condicionada em cada uma das duas extremidades próximas às divisórias de vidro). Remoção das placas perfuradas 5 min após a introdução dos estímulos, assegurando que os estímulos químicos atinjam o subcompartimento central e a fêmea tenha contato com os dois estímulos. Início da gravação com duração de 10 min.

Início do segundo teste (estímulo químico-visual). Substituição d'água do compartimento central. Introdução de machos junto a suas águas condicionadas nos compartimentos adjacentes ao central. Os machos com e sem órgão caudal foram introduzidos no lado oposto do aquário teste em que seus estímulos químicos foram anteriormente apresentados no primeiro teste. Aclimação da fêmea e dos dois machos durante 4 h. Introdução dos estímulos químicos (40 ml/min) nas extremidades do compartimento central (próximo às divisórias de vidro). Remoção das placas perfuradas e das placas opacas 5 min após a introdução dos estímulos químicos. Início da gravação com duração de 10 min. Sacrifício dos peixes através de overdose de Eugenol. Fixação em formol 10% durante uma semana e preservação em álcool 70%. Mensuração do comprimento padrão e peso e cálculo do índice gonadosomático.

#### *Dados e análise estatística*

O comportamento de 24 fêmeas ( $SL+DP = 34,18 \pm 1,87$  mm) foi quantificado como: tempo de permanência nas áreas do compartimento central dividido em (1) duas áreas (50%-50%) adjacentes respectivamente a cada uma das áreas com estímulos químicos de água condicionada de machos com órgão caudal (ÁCO) e sem órgão caudal (ÁSO) e (2) em três áreas (25%-50%-25%), sendo neste último a área central (50%) neutra e as duas áreas de 25% adjacentes a cada uma das áreas com estímulos químicos de água condicionada de machos com órgão caudal (ÁCO) e sem órgão caudal (ÁSO). As variáveis comportamentais foram analisadas utilizando o teste T pareado. A Regressão linear e o teste F foram utilizados para testar as relações entre o comprimento padrão, peso e o IGS com as variáveis comportamentais.

## RESULTADOS

### *Ensaio I*

As fêmeas optaram mais vezes em entrar primeiro no braço do tanque "Y" com estímulo de células "club" do órgão caudal do que no braço sem estímulo (controle). Não houve diferença estatisticamente significativa para o estímulo de raios da nadadeira caudal (Tab. 1). O tempo decorrido antes do deslocamento para um dos braços não diferiu entre os dois estímulos. 50% e 35% das fêmeas entraram somente no braço com estímulo de OC e RA (respectivamente). Após a escolha do primeiro braço, 60% nadaram de volta à haste (região a jusante do tanque "Y") para ambos os estímulos, destas fêmeas, 59% e 67% exploraram os dois braços quando testadas com OC e RA (respectivamente). O número de vezes que a fêmea entra em cada braço não diferiu para RA e OC. Entretanto, as fêmeas permaneceram mais tempo no braço com estímulo de OC do que no braço controle (Fig. 2). Não houve diferença entre o tempo de permanência em cada braço para o estímulo RA. As variáveis comportamentais não apresentaram relação com o comprimento padrão das fêmeas (Tab. 2). Entretanto, observa-se uma tendência das fêmeas menores nadarem primeiro (menos tempo de latência) para um dos braços quando testadas com OC que as fêmeas maiores ( $R^2 = 0,14$ ;  $N = 28$ ;  $F_{26} = 4,22$ ;  $P = 0,05$ ).

### *Ensaio II*

As fêmeas permaneceram mais tempo nas áreas com água condicionada por machos com órgão caudal (ÁCO) do que na água condicionada por machos sem órgão caudal (ÁSO) na análise de duas áreas (50%-50%, Fig. 3) no teste sem estímulo visual. Entretanto, na análise de três áreas (25%-50%-25%) não houve diferença entre as águas condicionadas por machos com e sem órgão caudal (Tab. 3). Não houve preferência da fêmea por um dos estímulos químico-visuais para ambas análises

(duas áreas e de três áreas). Quanto menor a fêmea mais tempo ela permanece em ÁCO na análise de três áreas (Tab. 4) no teste sem estímulo visual. As demais variáveis comportamentais das fêmeas não apresentaram relação com o comprimento padrão, peso e IGS das fêmeas e dos machos.

## DISCUSSÃO

*Mimagoniates inequalis* possui um complexo sistema de comunicação visual (Nelson, 1964a) e acústico (Nelson, 1964c) e nenhuma evidência de comunicação química além da glândula de alarme, embora todas as espécies da tribo Glandulocaudini possuam tecidos hipertrofiados de células “club” na nadadeira caudal de machos maduros (Menezes and Weitzman, 1990; 2009). O maior tempo de permanência das fêmeas no braço do tanque “Y” com estímulo de células “club” do órgão caudal (Fig. 2) e na área do aquário de três compartimentos com água condicionada por macho com órgão caudal (Fig. 3), e o fato das fêmeas optarem mais vezes em entrar primeiro no braço com OC (Tab. 1), suportam as hipóteses das fêmeas perceberem o estímulo do órgão caudal e de comunicação química intersexual onde o órgão caudal sinaliza a localização do macho a uma distância e atraia fêmea. A semelhança entre OC e ÁCO na atração de fêmeas e nas interações macho-fêmea (cap. 2) corrobora a hipótese de que o órgão caudal seja uma estrutura secretora especializada na comunicação química.

O comportamento da fêmea de *M. inequalis* na presença dos estímulos químicos do órgão caudal de machos (ÁCO e OC) é semelhante ao observado em fêmeas e machos de outras espécies (Resink et al., 1987; 1989; Colombo et al., 1980; Belanger et al., 2004; Gammon et al., 2005a; Barata et al., 2008b; Serrano et al., 2008a) que tiveram seus comportamentos classificados como atração reprodutiva/sexual, relacionados a hormônios e outros metabólitos (esteroides, prostaglandinas e ácido biliático) liberados através da urina, fezes, brânquias e fluído das gônadas (Stacey and Sorensen, 2006). Fêmeas do peixe-dourado *Carassius auratus* (Cypriniformes) liberam esteroides gonadais e prostaglandinas através da urina e brânquias, e os machos próximos os detectam e são atraídos (Stacey, 2003; Sorensen and Stacey, 2004; Stacey and Sorensen, 2006); machos do bagre africano *Clarias gariepinus* (Siluriformes) possuem vesículas seminais produtoras de esteroides glucuronídeos que atraem fêmeas (Resink et al., 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991); gobídeos machos, *Gobius niger* e *Neogobius melanostomus* (Perciformes), possuem porções não espermatogênicas no testículo chamadas de glândula mesorchial, produtoras principalmente de andrógenos que atraem fêmeas (Colombo et al., 1980; Murphy et al., 2001; Belanger et al., 2004; Arbuckle et al., 2005; Gammon et al., 2005a);

lampreias da espécie *Petromyzon marinus* (Petromyzontiformes) produzem ácido biliático no fígado que é liberado pelas brânquias, sendo que em machos maduros (mas não em fêmeas) há o desenvolvimento de células glandulares especializadas para a liberação de feromônio que atrai fêmeas para o sítio de desova (Li et al., 2002; Sorensen and Stacey, 2004); e em várias espécies de Blenniidae (Perciformes), os machos possuem um par de glândulas na nadadeira anal (Barata et al., 2008b), como é o caso de *Salaria pavo*, na qual foi demonstrado que a glândula anal libera feromônios que atraem fêmeas (Barata et al., 2008b; Serrano et al., 2008a; 2008c) e que estas preferem desovar em ninhos de machos que possuem glândulas anais (Barata et al., 2008b). Em nenhuma destas espécies, no entanto, observa-se a presença do órgão caudal associado a células club como em Glandulocaudini.

Nossos resultados e o fato de somente machos maduros terem órgão caudal suportam a hipótese de função reprodutiva do órgão caudal (atração sexual). O IGS das fêmeas de *M. inequalis* não apresentou relação com o comportamento (Tab. 4). O status reprodutivo das fêmeas, no entanto, tem sido considerado importante em espécies que exibem atração reprodutiva/sexual (Colombo et al., 1980; Resink et al., 1987; Resink et al., 1989; Li et al., 2002; Belanger et al., 2004; Gammon et al., 2005a; Barata et al., 2008b; Serrano et al., 2008a). *Mimagoniates inequalis* é uma espécie inseminadora, apresentando uma separação temporal entre a inseminação e a desova onde os espermatozoides podem ser armazenados por meses (Kutaygil, 1959; Nelson, 1964a; Javonillo et al., 2009) e as fêmeas podem ser inseminadas em diferentes fases da maturação gonadal, exceto fêmeas imaturas (Azevedo et al., 2000; 2010; Gonçalves et al., 2005). O mesmo padrão também ocorre em *Mimagoniates rheocharis* Menezes e Weitzman 1990 (Azevedo, informação pessoal). Logo, não é necessária uma sincronização de maturação dos gametas entre o casal. Com isso, a receptividade da fêmea pela secreção do órgão caudal pode não estar relacionada com o status reprodutivo da fêmea nas espécies inseminadoras, nas quais a “cópula” e a fertilização ocorrem em momentos distintos.

O fato das fêmeas menores de *M. inequalis* permanecerem mais tempo junto ao estímulo ÁCO (Tab. 4) e a tendência das fêmeas menores terem menor tempo de latência com OC que as fêmeas maiores (Tab. 2) pode estar relacionado com a probabilidade de fêmeas maiores já terem sido inseminadas e a consequente diminuição da atratividade sexual. A maior receptividade das fêmeas menores pelo extrato do órgão caudal pode estar relacionada com o fato de não terem sido inseminadas ou terem sido inseminadas menos vezes. A maior probabilidade de fêmeas maiores terem sido inseminadas antes das fêmeas menores pode estar

relacionada à preferência reprodutiva dos machos por fêmeas maiores, quando a fecundidade é aumentada com o tamanho do corpo (Herdman et al., 2004; Andersson and Iwasa, 1996; Bonduriansky, 2001; Olsson, 1993). Outro fator que pode estar relacionado à receptividade da fêmea é o tempo decorrido após a inseminação. Embora nesse estudo as fêmeas tenham sido isoladas dos machos antes do experimento por seis meses, não realizamos testes com fêmeas que conviviam com machos (não isoladas). Diante disso, mais estudos são necessários para compreender as variáveis reprodutivas que regulam a receptividade da fêmea à secreção do órgão caudal.

O reconhecimento social é alcançado usando uma combinação de estímulos visuais e químicos (Brown and Smith, 1994), sendo a visão primordial na detecção em curto alcance (Douglas and Hawryshyn, 1990) e o sentido olfativo e gustativo em maiores distâncias (Li et al., 2002; Ward et al., 2007). As fêmeas não tiveram preferência por um estímulo químico quando tinham a percepção visual dos machos, embora elas permanecessem mais tempo em ÁCO quando oferecido somente o estímulo químico (Tab. 3). Possivelmente, em ambiente natural, o órgão caudal seja fundamental na sinalização em distâncias maiores que o alcance da visão e secundário na presença de estímulos visuais. Em *Corynopoma riisei* Gill 1858 (órgão caudal com células mucosas), o macho posiciona a parte posterior do seu corpo perto da cabeça da fêmea e movimentam a nadadeira anal em direção a fêmea (possível movimento de liberação de sinais químicos) e geralmente após esse movimento ocorre a cópula (Atkins and Fink, 1979), indicando que o sinal químico pode estimular sexualmente a fêmea junto com os estímulos visuais. As glândulas mucosas hipertrofiadas do órgão caudal de *C. riisei* são encontradas somente em machos sexualmente ativos, examinados durante a corte, e machos isolados possuem glândulas com tamanho reduzido (Atkins and Fink, 1979). Nelson (1964a) também relata um comportamento semelhante ao observado por Atkins e Fink (1979) em *Mimagoniates lateralis* (Nichols, 1913) e os *Mimagoniates* podem gerar um fluxo de água pelo interior do órgão caudal através do movimento da nadadeira caudal (Fin-Ray Pump, Weitzman and Fink, 1985) e com isso bombear sinais químicos de forma ativa. Embora a secreção do órgão caudal possa estimular sexualmente a fêmea na corte em outras espécies, as fêmeas de *M. inequalis* tem preferência pela água condicionada por machos com órgão caudal (ÁCO) somente quando não há o estímulo visual de outros machos, indicando um predomínio do estímulo visual sobre o químico.

Embora a presença do órgão caudal seja frequentemente associada a maturidade sexual dos machos em Stevardiinae, não encontramos dados que associem



claramente o grau de maturação dos testículos com desenvolvimento ou atividade glandular do órgão caudal. No caracídeo *Aphyocharax anisitsi* Eigenmann & Kennedy 1903, no entanto, a presença da glândula branquial desenvolvida está associada com testículos maduros e em maturação (Gonçalves et al., 2005). Além disso, há uma proteína presente na glândula branquial de machos maduros nesta espécie que está ausente na área correspondente de machos imaturos e fêmeas (Shrestha et al., 2013). Os esteroides sexuais das gônadas geram uma grande variedade de sinais de dimorfismo sexual que alteram o fenótipo morfológico e comportamental de uma maneira que transmita a informação visual, elétrica, acústica ou química (Stacey and Sorensen, 2002). Possivelmente o órgão caudal varie em seu desenvolvimento e composição química junto com o desenvolvimento gonadal e de outros caracteres sexuais secundários do macho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, A. C.** 1989. Ultraviolet visual sensitivity in desert iguanas: implications for pheromone detection. *Animal Behaviour*. 38:129-137.
- ANDERSSON, M., and Y. IWASA.** 1996. Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*. 11:53-8.
- ARBUCKLE, W. J., A. J. BÉLANGER, L. D. CORKUM, B. S. ZIELINSKI, W. LI, S. YUN, S. BACHYNSKI, and A. P. SCOTT.** 2005. In vitro biosynthesis of novel 5 $\beta$ -reduced steroids by the testis of the round goby, *Neogobius melanostomus*. *General and Comparative Endocrinology*. 140:1-13.
- ATKINS, D. L., and W. L. FINK.** 1979. Morphology and histochemistry of the caudal gland of *Corynopoma riisei* Gill. *Journal of Fish Biology*. 14:465-469.
- AZEVEDO, M. A., L. R. MALABARBA, and J. R. BURNS.** 2010. Reproductive biology and development of gill glands in the inseminating characid, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann, 1915 (Cheirodontinae: Compsurini). *Neotropical Ichthyology*. 8:87-96.
- AZEVEDO, M. A., L. R. MALABARBA, and C. B. FIALHO.** 2000. Reproductive biology of the inseminating glandulocaudine *Diapoma speculiferum* cope (Teleostei : Characidae). *Copeia*:983-989.
- BARATA, E. N., J. M. FINE, P. C. HUBBARD, O. G. ALMEIDA, P. FRADE, P. W. SORENSEN, and A. V. CANÁRIO.** 2008a. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *Journal of Chemical Ecology*. 34:438-449.
- BARATA, E. N., R. M. SERRANO, A. MIRANDA, R. NOGUEIRA, P. C. HUBBARD, and A. V. M. CANÁRIO.** 2008b. Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour*. 75:379-389.
- BARBOSA JUNIOR, A., E. J. MAGALHAES, A. HOFFMANN, and L. M. IDE.** 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Ethologica*. 13:119-126.
- BELANGER, A. J., W. J. ARBUCKLE, L. D. CORKUM, D. B. GAMMON, W. LI, A. P. SCOTT, and B. S. ZIELINSKI.** 2004. Behavioural and electrophysiological responses by reproductive female *Neogobius melanostomus* to odours released by conspecific males. *Journal of Fish Biology*. 65:933-946.
- BONDURIANSKY, R.** 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 76:305-39.

- BROWN, G. E., and R. J. F. SMITH.** 1994. Fathead minnows use chemical cues to discriminate natural shoalmates from unfamiliar conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*. 20:3051-3061.
- BURGER, B. V., M. Z. VIVIERS, J. P. BEKKER, M. LE ROUX, N. FISH, W. B. FOURIE, and G. WEIBCHEN.** 2008. Chemical characterization of territorial marking fluid of male Bengal tiger, *Panthera tigris*. *Journal of Chemical Ecology*. 34:659-671.
- BURNS, J. R., and S. H. WEITZMAN.** 1996. Novel gill-derived gland in the male swordtail characin, *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Copeia*:627-633.
- . 2005. Insemination in ostariophysan fishes, p. 107-134. *In: Viviparous Fishes*. H. J. Grier and M. C. Uribe (eds.). New Life Publications, Homestead Florida.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, H. J. GRIER, and N. A. MENEZES.** 1995. Internal fertilization, testis and sperm morphology in Glandulocaudine fishes (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 224:131-145.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, and L. R. MALABARBA.** 1997. Insemination in eight species of Cheirodontine fishes (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae). *Copeia*:433-438.
- BUSHMANN, P. J., J. R. BURNS, and S. H. WEITZMAN.** 2002. Gill-derived glands in glandulocaudine fishes (Teleostei : Characidae : Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 253:187-195.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, and E. HECKER.** 1961a. On the sexattractant of silk-moths. I. The biological test and the isolation of the pure sex-attractant bombykol. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 324:71-83.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, and D. STAMM.** 1961b. On the sexattractant of silk-months. II. Constitution and configuration of bombvkol. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 324:84-87.
- CARO, S. P., and J. BALTHAZART.** 2010. Pheromones in birds: myth or reality? *Journal of Comparative Physiology A*. 196:751-66.
- COLOMBO, L., A. MARCONATO, P. C. BELVEDERE, and C. FRISO.** 1980. Endocrinology of teleost reproduction: A testicular steroid pheromone in the black goby, *Gobius jozo* L. *Bolletino di zoologia*. 47:355-364.
- COOPER, W. E., P. LÓPEZ, and A. SALVADOR.** 1994. Pheromone detection by an amphibiaenian. *Animal Behaviour*. 47:1401-1411.
- COUNCIL, N. R.** 1996. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy Press, Washington, D.C.
- DOUGLAS, R. H., and C. W. HAWRYSHYN.** 1990. Behavioural studies of fish vision: an analysis of their capabilities. *In: The visual system of fish*. Vol. 373-418. R. H. Douglas and M. B. A. Djamgoz (eds.). Chapman and Hall, London, UK.
- EIGENMANN, C. H.** 1911. New characins in the collections of the Carnegie Museum. *Annals of the Carnegie Museum*. 8:164-181.
- FRAKER, M. E., F. HU, V. CUDDAPAH, S. A. MCCOLLUM, R. A. RELYEA, J. HEMPEL, and R. J. DENVER.** 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior*. 55:520-529.
- GAMMON, D. B., W. LI, A. P. SCOTT, B. S. ZIELINSKI, and L. D. CORKUM.** 2005. Behavioural responses of female *Neogobius melanostomus* to odours of conspecifics. *Journal of Fish Biology*. 67:615-626.
- GASKETT, A. C.** 2007. Spider sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. *Biological Reviews*. 82:26-48.
- GONÇALVES, T. K., M. A. AZEVEDO, L. R. MALABARBA, and C. B. FIALHO.** 2005. Reproductive biology and development of sexually dimorphic structures in *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 3:5.
- GRAMMER, K., B. FINK, and N. NEAVE.** 2005. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 118:135-142.

- HERBORG, L., M. G. BENTLEY, A. S. CLARE, and K. S. LAST.** 2006. Mating behaviour and chemical communication in the invasive Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 329:1-10.
- HERDMAN, E. J. E., C. D. KELLY, and J. G. J. GODIN.** 2004. Male mate choice in the guppy (*Poecilia reticulata*): Do males prefer larger females as mates? *Ethology*. 110:97-111.
- JAVONILLO, R., J. R. BURNS, and S. H. WEITZMAN.** 2009. Sperm modifications related to insemination, with examples from the Ostariophysi. *In: Reproductive Biology and Phylogeny in Fishes*. B. G. M. Jamieson (ed.). Science Publishers, Enfield.
- JOHANSSON, B. G., T. M. JONES, and F. WIDEMO.** 2005. Cost of pheromone production in a lekking *Drosophila*. *Animal Behaviour*. 69:851-858.
- KIKUYAMA, S., T. NAKADA, F. TOYODA, T. IWATA, K. YAMAMOTO, and J. M. CONLON.** 2005. Amphibian Pheromones and Endocrine Control of Their Secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1040:123-130.
- KOBAYASHI, M., P. W. SORENSEN, and N. E. STACEY.** 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 26:71-84.
- KUTAYGIL, D. L.** 1959. Insemination, sexual differentiation and secondary sex characters in *Stevardia albipinnis* gill. *Hydrobiology University Istanbul Fen Fakültesi Mecmuasi*. 24:93-128.
- LAMBERT, J. G., and J. W. RESINK.** 1991. Steroid glucuronides as male pheromones in the reproduction of the African catfish *Clarias gariepinus*--a brief review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 40:549-556.
- LI, W., A. P. SCOTT, M. J. SIEFKES, H. YAN, Q. LIU, S. S. YUN, and D. A. GAGE.** 2002. Bile Acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. *Science*. 296:138-141.
- MALABARBA, L. R.** 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae), p. 193-233. *In: Phylogeny and classification of neotropical fishes*. L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena, and C. A. Lucena (eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- MARDON, J., S. M. SAUNDERS, and F. BONADONNA.** 2011. Comments on recent work by Zhang and colleagues: "Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in budgerigars". *Chemical Senses*. 36:3-4; author reply 5-7.
- MCINTOSH, T. K., and L. C. DRICKAMER.** 1977. Excreted urine, bladder urine, and the delay of sexual maturation in female house mice. *Animal Behaviour*. 25:999-1004.
- MCRBERT, S. P., and J. BRADNER.** 1998. The influence of body coloration on shoaling preferences in fish. *Animal Behaviour*. 56:611-615.
- MENEZES, N. A., and S. H. WEITZMAN.** 1990. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 103:380-426.
- . 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 7:295-370.
- MENEZES, N. A., S. H. WEITZMAN, and J. R. BURNS.** 2003. A systematic review of *Planaltina* (Teleostei: Characiformes: Characidae: Glandulocaudinae: Diapomini) with a description of two new species from the upper rio Paraná, Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 116:557-600.
- MEYER, J. M., T. E. GOODWIN, and B. A. SCHULTE.** 2008. Intrasexual chemical communication and social responses of captive female African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour*. 76:163-174.
- MIRANDE, J. M.** 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*. 8:385-568.
- MURPHY, C. A., N. E. STACEY, and L. D. CORKUM.** 2001. Putative steroidal pheromones in the round goby, *Neogobius melanostomus*: olfactory and behavioral responses. *Journal of Chemical Ecology*. 27:443-470.

- NELSON, K.** 1964a. Behavior and morphology in the Glanduloaudine fishes (Ostariophysi, Characidae). University of California Publications in Zoology. 75:93.
- . 1964b. The evolution of a pattern of sound production associated with courtship in the characid fish, *Glandulo cauda inequalis*. Evolution. 18:14.
- OLSSON, M.** 1993. Male preference for large females and assortative mating for body size in the sand lizard (*Lacerta agilis*). Behavioral Ecology and Sociobiology. 32:337-341.
- PFANDER, I., and J. ZETTEL.** 2004. Chemical communication in *Ceratophysella sigillata* (Collembola: Hypogastruridae): intraspecific reaction to alarm substances. Pedobiologia. 48:575-580.
- PLENDERLEITH, M., C. VAN OOSTERHOUT, R. L. ROBINSON, and G. F. TURNER.** 2005. Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish. Biology Letters. 1:411-414.
- RESINK, J. W., R. VAN DEN HURK, R. F. O. GROENINX VAN ZOELLEN, and E. A. HUISMAN.** 1987. The Seminal Vesicle as Source of Sex Attracting Substances in the African Catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 63:115-127.
- RESINK, J. W., P. K. VOORTHUIS, R. VAN DEN HURK, R. C. PETERS, and P. G. VAN OORDT.** 1989. Steroid Glucuronides of the Seminal Vesicle as Olfactory Stimuli in African Catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 83:153-166.
- RODRIGUEZ, I.** 2004. Pheromone receptors in mammals. Hormones and Behavior. 46:219-30.
- ROSENTHAL, G. G., and P. S. LOBEL.** 2006. Communication, p. 39-78. *In: Behaviour and physiology of fish*. Vol. 24. K. A. Sloman, R. W. Wilson, and S. Balshine (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- RUTHER, J., K. THAL, and S. STEINER.** 2011. Pheromone communication in *Nasonia vitripennis*: abdominal sex attractant mediates site fidelity of releasing males. Journal of Chemical Ecology. 37:161-165.
- SATHYAN, R., and V. C. K. COULDRIDGE.** 2013. Female preference for blue in Japan blue guppies (*Poecilia reticulata*). Environmental Biology of Fishes. 96:953-959.
- SERRANO, R. M., E. N. BARATA, M. A. BIRKETT, P. C. HUBBARD, P. S. GUERREIRO, and A. V. CANARIO.** 2008a. Behavioral and olfactory responses of female *Salaria pavo* (Pisces: Blenniidae) to a putative multi-component male pheromone. Journal of Chemical Ecology. 34:647-658.
- SERRANO, R. M., O. LOPES, P. C. HUBBARD, J. ARAUJO, A. V. CANARIO, and E. N. BARATA.** 2008b. 11-ketotestosterone stimulates putative sex pheromone production in the male peacock blenny, *Salaria pavo* (Risso 1810). Biology of Reproduction. 79:861-868.
- SERRANO, R. M., O. LOPES, P. C. HUBBARD, J. ARAÚJO, A. V. M. CANÁRIO, and E. N. BARATA.** 2008c. Seasonal cell differentiation and olfactory potency of secretions by the anal glands of male peacock blenny *Salaria Pavo*. Journal of Fish Biology. 73:1790-1798.
- SHRESTHA, B., R. JAVONILLO, J. R. BURNS, Z. PIRGER, and A. VERTES.** 2013. Comparative local analysis of metabolites, lipids and proteins in intact fish tissues by LAESI mass spectrometry. Analyst. 138:3444-9.
- SLOMAN, K. A., R. W. WILSON, and S. BALSHINE.** 2006. Behaviour and physiology of fish. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- SORENSEN, P. W., and N. E. STACEY.** 1999. Evolution and specialization of fish hormonal pheromones, p. 15-47. *In: Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. R. E. Johnston, D. Muller-Schwarze, and P. W. Sorensen (eds.). Kluwer Academic/Plenum, New York.
- SORENSEN, P. W., and N. E. STACEY.** 2004. Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 38:399-417.
- STACEY, N.** 2003. Hormones, pheromones and reproductive behavior. Fish Physiology and Biochemistry. 28:229-235.

- STACEY, N., and P. SORENSEN.** 2006. Reproductive Pheromones, p. 359-412. *In: Behaviour and physiology of fish.* Vol. 24. K. A. Sloman, R. W. Wilson, and S. Balshine (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- STACEY, N. E., and P. W. SORENSEN.** 2002. Hormonal pheromones in fish, p. 375-434. *In: Hormones, Brain and Behavior.* Vol. 2. D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, and R. T. Rubin (eds.). Academic Press, New York.
- STEBBING, P. D., M. G. BENTLEY, and G. J. WATSON.** 2003. Mating behaviour and evidence for a female released courtship pheromone in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Chemical Ecology.* 29:465-475.
- SUTER, R. B., and G. RENKES.** 1982. Linyphiid Spider Courtship: Releaser and Attractant Functions of a Contact Sex Pheromone. *Animal Behaviour.* 30:714-718.
- TILLMAN, J. A., S. J. SEYBOLD, R. A. JURENKA, and G. J. BLUMQUIST.** 1999. Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 29:481-514.
- VACCARO, E. A., P. W. FELDHOFF, R. C. FELDHOFF, and L. D. HOUCK.** 2010. A pheromone mechanism for swaying female mate choice: enhanced affinity for a sexual stimulus in a woodland salamander. *Animal Behaviour.* 80:983-989.
- WARD, A. J. W., M. M. WEBSTER, and P. J. B. HART.** 2007. Social recognition in wild fish populations. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences.* 274:1071-1077.
- WEITZMAN, S. H., and S. V. FINK.** 1985. Xenobryconin phylogeny and putative pheromone pumps in glandulo-caudine fishes (Teleostei: Characidae). Smithsonian Institution Press, City of Washington.
- WEITZMAN, S. H., N. A. MENEZES, H.-G. EVERS, and J. R. BURNS.** 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology.* 3:329-360.
- WOODLEY, S. K.** 2010. Pheromonal communication in amphibians. *Journal of Comparative Physiology A.* 196:713-727.
- YAMAMOTO, K., Y. KAWAI, T. HAYASHI, Y. OHE, H. HAYASHI, F. TOYODA, G. KAWAHARA, T. IWATA, and S. KIKUYAMA.** 2000. Silefrin, a sodefrin-like pheromone in the abdominal gland of the sword-tailed newt, *Cynops ensicauda*. *Federation of European Biochemical Societies Letters.* 472:267-270.
- ZHANG, J. X., W. WEI, J. H. ZHANG, and W. H. YANG.** 2010. Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in budgerigars. *Chemical Senses.* 35:375-382.

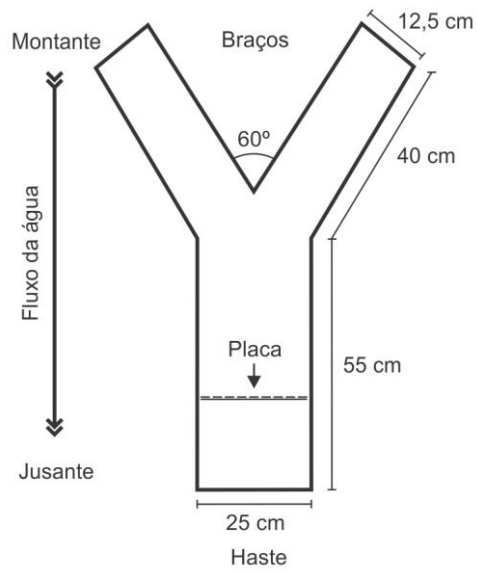


Figura1. Modelo do tanque “Y” com medidas e sentido do fluxo da água utilizado no ensaio de atração química. Placa = placa removível e perfurada.

Tabela 1. Comportamento das fêmeas de *Mimagoniates inequalis* com estímulos químicos dos raios da nadadeira caudal (RA,  $N = 20$ ,  $SL+DP = 33,28 \pm 2,15$  mm) e das células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC,  $N = 28$ ,  $SL+DP = 32,69 \pm 1,92$  mm) introduzidos nos braços do tanque “Y” (Ensaio I). O comportamento 1ª escolha (braço que a fêmea entrou primeiro) é comparado entre os braços com e sem estímulo para cada estímulo químico pelo teste qui-quadrado ( $X$ ). O comportamento tempo da primeira escolha (tempo decorrido antes da entrada em qualquer um dos braços) é comparado entre os dois estímulos químicos pelo teste T de Student. Os comportamentos N. de entrada (número de vezes que a fêmea entra em cada braço) e tempo de permanência (tempo de permanência (s) em cada braço) são comparados entre os braços com e sem estímulos pelo teste T pareado. Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito.

Comportamento	Teste	RA	OC
<b>1ª escolha</b>			
Braço com Estímulo		11	21
Braço sem estímulo		9	7
	$X$	0,2	<b>7</b>
	Df	1	<b>1</b>
	$P$	0,655	<b>0,008</b>
<b>Tempo da 1ª escolha (s)</b>			
	$X \pm DP$	217,6 $\pm$ 164,11	191,21 $\pm$ 175,01
	$T$		0,53
	Df		42,62
	$P$		0,596
<b>N. de entradas</b>			
Braço com Estímulo	$X \pm DP$	1,4 $\pm$ 1,27	1,89 $\pm$ 2,17
Braço sem estímulo	$X \pm DP$	1,65 $\pm$ 2,39	1,17 $\pm$ 1,96
	$T$	-0,413	1,129
	Df	28,98	49,2
	$P$	0,683	0,264
<b>Tempo de permanência (s)</b>			
Braço com Estímulo	$X \pm DP$	170,1 $\pm$ 193	219,9 $\pm$ 204,1
Braço sem estímulo	$X \pm DP$	108,4 $\pm$ 161,5	107 $\pm$ 157,4
	$T$	1,095	<b>2,317</b>
	Df	36,86	<b>50,72</b>
	$P$	0,28	<b>0,025</b>

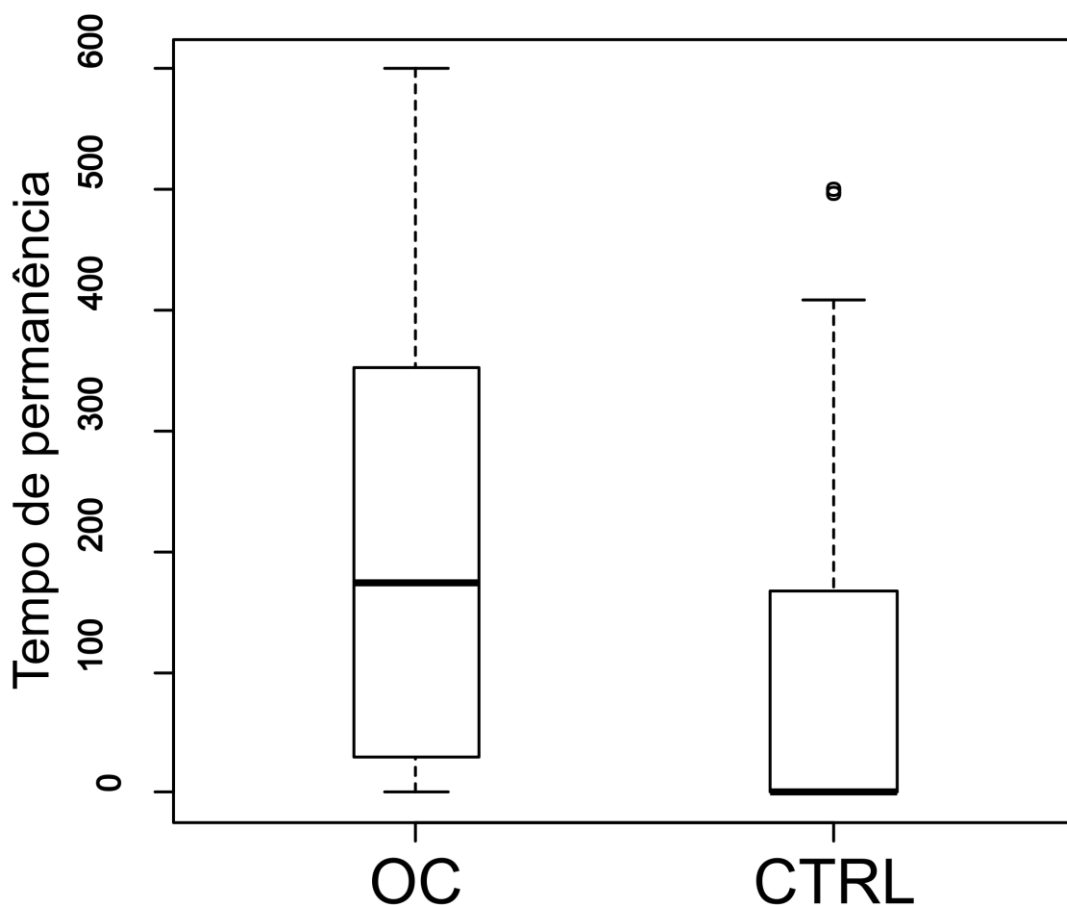


Figura 2. Boxplot do tempo de permanência (s) das fêmeas ( $N = 28$ ,  $SL+DP = 32,69 \pm 1,92$  mm) no braço com estímulo das células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e no braço controle (Ctrl, sem estímulo) do tanque “Y”.  $T_{50,72} = 2.32$ ,  $P < 0.05$ . Os pontos são outliers e as barras são o desvio interquartil vezes 1,5.

Tabela 2. Relação entre tamanho (mm) das fêmeas com as variáveis comportamentais no tanque “Y” com estímulo de células “club” dos órgãos (OC) e raios (RA) da nadadeira caudal. Coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e teste  $F$  com seus correspondentes valores e valor de  $P$ . Tempo da 1ª escolha: o tempo decorrido antes da entrada em um dos braços; N. de entrada: número de vezes que a fêmea entra em cada braço; Tempo de permanência: o tempo de permanência (s) em cada braço.

Tamanho das fêmeas	$N = 28$ , $SL+DP = 32,69 \pm 1,92$ mm			$N = 20$ , $SL+DP = 33,28 \pm 2,15$ mm		
Estímulos	OC			Raios		
Variáveis comportamentais	$R^2$	$F$	$P$	$R^2$	$F$	$P$
Tempo da 1ª escolha	0,14	4,22	0,050	0,01	0,02	0,883
N. de entrada	0,05	1,26	0,273	0,01	0,01	0,911
Tempo de permanência	0,01	0,01	0,959	0,07	1,30	0,268



Tabela 3. Tempo de permanência (s) de fêmeas ( $N = 24$ ,  $SL+DP = 34,18 \pm 1,87$  mm) nas áreas do compartimento central do aquário teste com estímulos químicos da água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal adjacentes às áreas.  $T$  = Teste T pareado.  $DF$  = graus de liberdade. Valor de  $P$ . Compartimento central dividido ao meio por duas áreas (50%-50%) e em três áreas (25%-50%-25%), sendo neste último a área central (50%) neutra. Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito. Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito.

Químico	Estímulos químicos		Teste		
	ÁCO	ÁSO	$T$	$DF$	$P$
Três áreas – 25%	187 ± 202	157 ± 202	1,52	42,9	0,126
Duas áreas – 50%	340 ± 252	259 ± 252	<b>2,1</b>	<b>44</b>	<b>0,041</b>
Químico-Visual	ÁCO	ÁSO	$T$	$DF$	$P$
Três áreas – 25%	230 ± 210	215 ± 203	0,33	43,88	0,741
Duas áreas – 50%	318 ± 217	282 ± 217	0,24	44	0,809

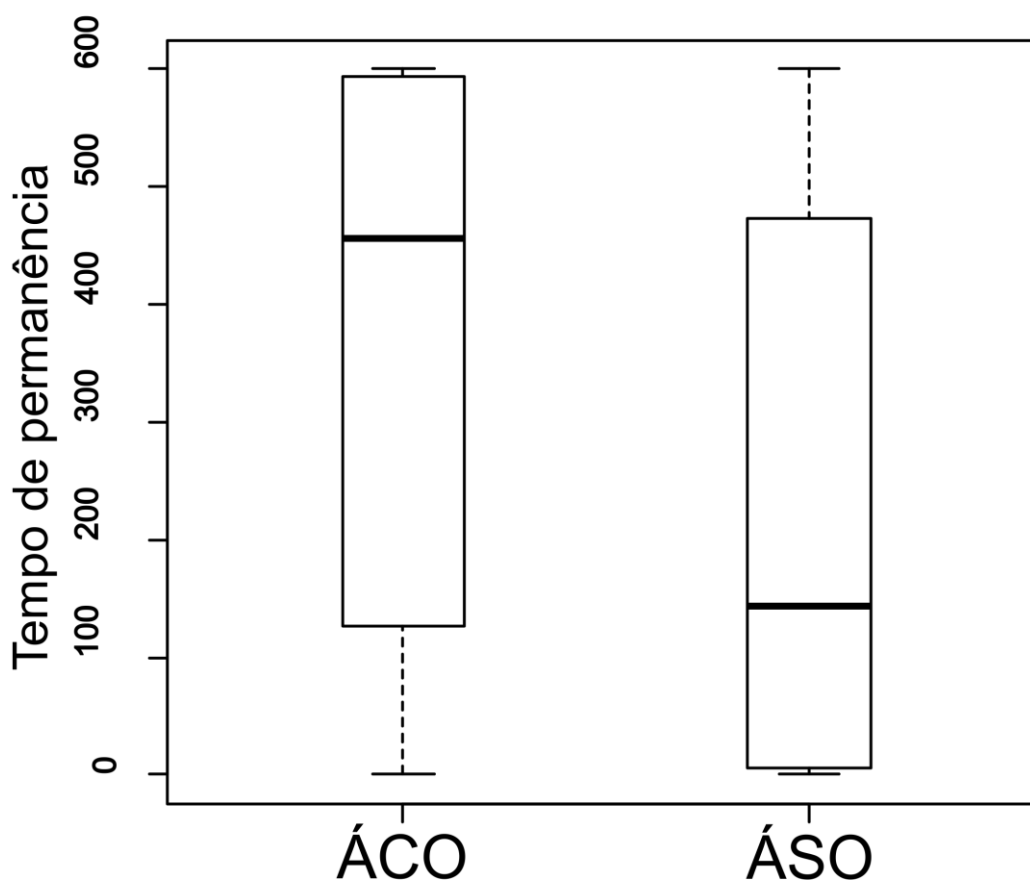


Figura 3. Boxplot do tempo de permanência (s) de fêmeas ( $N = 24$ ,  $SL+DP = 34,18 \pm 1,87$  mm) nas áreas do aquário teste com estímulos químicos da água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal na análise de duas áreas (50%-50%).  $T_{44} = 2,1$ ,  $P < 0,05$ . Os pontos são outliers e as barras são o desvio interquartil vezes 1,5.

Tabela 4. Relação entre tamanho (mm), peso (g) e IGS (g) de fêmeas e de machos com órgão caudal com o tempo de permanência (s) destas fêmeas ( $N = 24$ ,  $SL+DP = 34,18 \pm 1,87$  mm) nas áreas do compartimento central do aquário teste com estímulos químicos da água condicionada por machos com órgão caudal (ÁCO). Coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e teste  $F$  com seus correspondentes valores de  $P$ . Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito.

	Estímulos											
	ÁCO						ÁCO-Visual					
	2 áreas			3 áreas			2 áreas		3 áreas			
Tamanho	$R^2$	$F$	$P$	$R^2$	$F$	$P$	$R^2$	$F$	$P$	$R^2$	$F$	$P$
Fêmea	0,03	0,56	0,462	<b>0,2</b>	<b>5,3</b>	<b>0,032</b>	0,01	0,22	0,644	<0,01	0,08	0,776
Macho	0,04	0,91	0,349	<0,01	0,15	0,703	<0,01	0,05	0,82	<0,01	0,01	0,936
Peso												
Fêmea	<0,01	0,17	0,68	0,06	1,32	0,264	<0,01	4e-04	0,985	<0,01	0,03	0,861
Macho	<0,01	0,03	0,871	<0,01	0,145	0,707	0,05	1,07	0,311	0,03	0,68	0,42
IGS												
Fêmea	<0,01	0,02	0,893	<0,01	0,04	0,839	0,07	15,35	0,229	0,05	10,94	0,307
Macho	<0,01	0,01	0,939	<0,01	0,26	0,617	0,06	14,66	0,239	0,08	17,83	0,196

## **Capítulo 2**

Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de Glandulocaudini: Comunicação Química? Agressão? Reconhecimento coespecífico?

(Manuscrito a ser submetido para o periódico Freshwater Biology)

Suposto Feromônio dos Órgãos da Nadadeira Caudal de Machos de Glandulocaudini: Comunicação Química? Agressão? Reconhecimento coespecífico?

Clayton Kunio Fukakusa<sup>12</sup> e Luiz Roberto Malabarba<sup>13</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970. Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>2</sup>claytonfukakusa@gmail.com; <sup>3</sup>malabarba@ufrgs.br

Todas as espécies da tribo Glandulocaudini possuem tecido hipertrofiado de células “club” na nadadeira caudal (órgão caudal). Pelo fato desta estrutura estar presente somente em machos maduros, formulou-se a hipótese que estas células secretem um tipo de feromônio relacionado à reprodução. Em *Mimagoniates inequalis*, foi avaliada a interação comportamental de casais em aquário de 86 l e as interações entre machos em aquário de 20,8 l dividido em dois compartimentos de igual volume por uma divisória de vidro, ambos na presença de extrato de órgão caudal ou de água condicionada por machos com órgão caudal (água em que machos foram aclimatados individualmente). Na interação de casais, os machos cortejam menos, possuem mais interações agonísticas e menos tempo de atividade com extrato de órgão caudal de outros machos quando comparados ao controle. Extrato de órgão caudal e água condicionada por machos com órgão caudal não diferem entre si e diferem (respectivamente) do extrato de raios da nadadeira caudal sem órgão caudal e da água condicionada por machos sem órgão caudal, por terem menos corte e mais interações agonísticas, e diferem do extrato da pele por terem mais interações agonísticas e tempo de atividade. Na disputa entre machos, o tempo de atividade dos submissos é menor com estímulo químico da água condicionada por machos familiares (macho dominante) do que com estímulo de órgão caudal de machos não familiares. Estes dados corroboram as hipóteses de que secreções de células “club” da pele e do órgão caudal possuem substâncias diferentes, e que machos percebem os estímulos químicos do órgão caudal, reconhecem estes estímulos de familiares e

aumentam a agressividade em contato com estímulos químicos de não familiares.

Palavra-chave: Comportamento agonístico; peixe; Characidae; inseminação; *Mimagoniates inequalis*.

## Introdução

A capacidade dos animais de obter informações sobre seu ambiente físico e social é essencial para sua sobrevivência e seu sucesso reprodutivo (Ward *et al.*, 2007). De mamíferos a insetos sociais, os sinais químicos permitem tanto reconhecimentos gerais quanto específicos (Wyatt, 2003), como a discriminação entre coespecíficos familiares e não familiares. Este reconhecimento é fundamental para animais territoriais, pois pode reduzir a frequência e intensidade dos encontros agressivos, estabilizar os sistemas sociais e reduzir o custo de manutenção territorial (Hanley *et al.*, 1999; Trigo-Venário *et al.*, 2002; Aragon *et al.*, 2006; Zenuto, 2010).

Desde os primeiros feromônios isolados e identificados (*Bombyx mori*, Lepidoptera; Butenandt *et al.*, 1961a; 1961b), inúmeros estudos vêm reportando a presença de feromônios em espécies de diversos táxons animais (Suter and Renkes, 1982; Tillman *et al.*, 1999; Stebbing *et al.*, 2003; Pfander and Zettel, 2004; Johansson *et al.*, 2005; Herborg *et al.*, 2006; Ruther *et al.*, 2011), especialmente entre os vertebrados (McIntosh and Drickamer, 1977; Alberts, 1989; Cooper *et al.*, 1994; Rodriguez, 2004; Grammer *et al.*, 2005; Burger *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2008; Caro and Balthazart, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Mardon *et al.*, 2011). Ambientes aquáticos não são exceção e têm sido uma área fértil para estudo de comunicação química, principalmente em anfíbios (Yamamoto *et al.*, 2000; Kikuyama *et al.*, 2005; Fraker *et al.*, 2009; Vaccaro *et al.*, 2010; Woodley, 2010) e peixes (Colombo *et al.*, 1980; Resink *et al.*, 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991; Sorensen and Stacey, 1999; 2004; Murphy *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002; Stacey and Sorensen, 2002; 2006; Stacey, 2003; Sloman *et al.*, 2006; Barata *et al.*, 2008b; 2008a; Serrano *et al.*, 2008a; 2008b; Barbosa Junior *et al.*, 2010).

Além da comunicação química, um dos aspectos mais importantes e interessantes da plasticidade alcançada pelos peixes é o número diverso de estratégias reprodutivas utilizadas por diferentes grupos (Azevedo *et al.*, 2010). Na superordem Ostariophysi nenhum caso de fecundação interna é conhecido até o momento, embora em algumas espécies de Siluriformes e Characiformes tenha sido verificada a presença de espermatozoides nos ovários das fêmeas.

Entretanto, o exato momento da fecundação dos oócitos ainda é desconhecido, uma vez que não foram encontrados oócitos fertilizados no interior dos ovários em qualquer estágio de desenvolvimento (Burns *et al.*, 1995; 1997; Burns and Weitzman, 2005). Diante disto, tem se utilizado o termo inseminação para caracterizar a estratégia adotada por estes peixes. Caracídeos inseminadores são de grande importância para compreensão da evolução da comunicação química e do comportamento reprodutivo em peixes, pois supõe-se que o surgimento de uma nova estratégia reprodutiva e a inseminação pré-ovulatória alterem drasticamente os hormônios ancestrais e os mecanismos feromonais que regulam o comportamento reprodutivo (Stacey, 2003), além de trazer implicações na seleção sexual, especialmente na competição entre machos.

Os machos maduros de diversas espécies de Characidae possuem tecidos hipertrofiados na superfície da pele junto às nadadeiras anal, caudal ou pélvicas, muitas vezes associados a ganchos ósseos presentes nos raios das nadadeiras. Entre as espécies da subfamília Stevardiinae (*sensu* Mirande, 2010), foram identificadas células “club” nos órgãos na nadadeira caudal dos membros de tribo Glandulocaudini (Menezes and Weitzman, 1990; 2009), no órgão da região anterior da nadadeira anal de *Bryconadenos tanaothoros* (Weitzman *et al.*, 2005) e na superfície da epiderme das nadadeiras pélvicas de *Planaltina myersi* (Menezes *et al.*, 2003). *Hyphessobrycon diancistrus* (*incertae sedis*) possui células “club” na superfície da epiderme da nadadeira anal (Weitzman *et al.*, 2005). Diferente dos glandulocaudini, *Corynopoma riisei* (Stervardiinae, Corynopomini) possui células mucosas no órgão caudal (Atkins and Fink, 1979). Na subfamília Cheirodontinae, todas as espécies da tribo Compsurini também possuem órgão caudal (Malabarba, 1998). Outra estrutura incomum encontrada somente em machos maduros de determinadas espécies de Characidae é a glândula branquial (Burns and Weitzman, 1996). Glândulas branquiais desenvolvem-se a partir de filamentos branquiais do primeiro arco branquial e consistem em câmaras revestidas por um epitélio que varia de cúbico a colunar (Burns and Weitzman, 1996; Bushmann *et al.*, 2002).

Pelo fato destes órgãos e glândulas estarem presentes somente em machos maduros, formulou-se a hipótese que estas células liberariam, via secreção holócrina, um tipo de feromônio relacionado à corte ou a outro comportamento

reprodutivo. Entretanto, nenhum estudo dedicou-se ao conhecimento das funções destas estruturas na família Characidae e de suas vantagens adaptativas (Rosenthal and Lobel, 2006).

*Mimagoniates inequalis* (Eigenmann, 1911) é um glandulocaudini inseminador que possui células “club” no órgão caudal, e ocorre em pequenos riachos e rios do sul do Brasil e nordeste do Uruguai (Menezes and Weitzman, 2009).

Diante da escassez de informação sobre a função do órgão caudal, esse estudo utilizou a espécie *Mimagoniates inequalis* como modelo experimental com o objetivo de testar as hipóteses: (1) o órgão caudal secreta substâncias químicas na água; (2) os machos discriminam/percebem as substâncias químicas do órgão caudal; (3) as células “club” da pele e do órgão caudal produzem/contêm substâncias diferentes; (4) as substâncias químicas do órgão caudal aumentam a afinidade/receptividade da fêmea à corte; (5) as substâncias químicas do órgão caudal aumentam a agressividade dos machos nas disputas; (6) o macho pode discriminar/reconhecer o estímulo químico do órgão caudal de machos familiares e não familiares.

#### *Material e Métodos*

##### *Cuidado e Uso de Animais*

Este estudo seguiu os princípios de cuidado e uso de animais em pesquisa aprovados pela Sociedade para o Estudo da Reprodução, de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (1996) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto nº 23447). As metodologias descritas neste estudo são adaptações de Giaquinto e Volpato (1997), Duboc (2007) e Barbosa *et al.* (2010) e foram julgadas pelas comissões de ética de suas universidades.

##### *Origem dos exemplares de Mimagoniates inequalis*

Os espécimes de *Mimagoniates inequalis* foram coletados com puçá de tela plástica (malha 1 mm) em outubro de 2012 no arroio Calombos, sistema da laguna dos Patos (30°6'49.10"S, 51°41'0.01"O), em Eldorado do Sul, RS, Brasil (licença de coleta Nº 34933-2, ICMBio - Instituto Chico Mendes de



Conservação da Biodiversidade). Os exemplares foram transportados até o Laboratório de Ictiologia, Departamento de Zoologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### *Manutenção dos peixes em laboratório*

Os exemplares foram distribuídos em aquários de aproximadamente 60 l com no máximo dois machos e cinco fêmeas por aquário. Os aquários continham água tratada desclorada e estavam equipados com filtro biológico de fundo, coberto por aproximadamente 5 cm de cascalho com granulação em torno de 5 mm e plantados com *Hygrophila difformis* (Linnaeus) e *Microsorium pteropus* (Blume). A iluminação consistiu de lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W com um timer regulado para fornecer um fotoperíodo de 12 h:12 h luz-escuro. A aeração foi mantida constante através de bombas submersas (280 l/h). A temperatura foi mantida em aproximadamente 25°C com auxílio de termostatos e aquecedores e a sala de aquários climatizada através de um condicionador de ar. A dieta oferecida aos peixes foi à base de ração comercial em flocos disponibilizada uma vez ao dia em *ad libitum*.

#### *Ensaio I: Interação macho-fêmea*

##### *Aquário teste*

A avaliação da interação comportamental dos casais na presença de estímulos químicos foi realizada em aquários de 86 l (70X35x35 cm) equipados com a mesma configuração do aquários utilizados na manutenção dos peixes em laboratório (descrito acima). A troca parcial d'água foi gerada pela entrada de 80 l (1,4 l/min) de água tratada desclorada em uma extremidade do aquário, sendo o excesso drenado para fora do aquário por um tubo de PVC (2 cm de diâmetro) localizado na extremidade oposta à entrada de água. Esse tubo manteve a altura da coluna d'água constante. Esse sistema permitiu diluir a concentração dos estímulos químicos testados sem estressar os peixes. As laterais dos aquários, com exceção da frente, foram cobertas por cartolina azul e a frente isolada por cortinas para reduzir estímulos visuais durante o experimento. As filmagens foram registradas em vista frontal ao aquário teste.

##### *Estímulos químicos*

Os estímulos químicos testados foram: extrato de células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e da pele do corpo (PE), água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal e extrato de raios da nadadeira caudal (RA). As soluções teste de OC e RA foram produzidas separadamente e respectivamente pela extração dos órgãos caudais e de pedaços dos raios da nadadeira caudal de 30 machos (SL =  $40,23 \pm 3,22$  mm) anestesiados com Eugenol (0,2 ml/l). E a solução teste de PE foi produzida pela remoção da pele do corpo de 5 machos (SL =  $39,88 \pm 3,77$  mm) eutanasiados com uma overdose anestésica. Os tecidos foram macerados em água destilada e as soluções resultantes filtradas e armazenadas em alíquotas de 150 ml a  $-20^{\circ}$  C até a utilização. As soluções descongeladas foram utilizadas nos experimentos em concentrações de 0,04 mg/ml de OC, 0,14 mg/ml de RA e 0,15 mg/ml de PE. As soluções teste de ÁCO e ÁSO foram produzidas separadamente e respectivamente pelo tratamento de machos com (N = 14, sl =  $40,82 \pm 1,64$  mm) e sem (N = 14, sl =  $41,38 \pm 3,32$  mm) órgãos caudais com estímulos visuais, e não químicos, de outros peixes. Estes machos permaneceram individualmente durante 23 h em um aquário (20x40x30 cm) com 16 l de água e dois aquários adjacentes. Em um dos aquários adjacentes havia duas fêmeas e no outro um macho. A água condicionada de cada grupo de machos foi reunida, filtrada e armazenada em alíquotas de 500 ml a  $-20^{\circ}$  C até a utilização.

#### *Procedimento experimental*

Aclimação de um macho e uma fêmea no aquário teste durante três dias. Início da gravação com duração de 10 min (controle). Os demais passos são repetidos para cada estímulo. Introdução do estímulo químico. Início da gravação com duração de 10 min. Troca parcial de água (80 l). Aclimação do casal durante uma hora. Introdução do próximo estímulo químico.

A solução de PE foi a última a ser introduzida no aquário teste para evitar a interferência deste estímulo nos demais, pois constatamos nos experimentos piloto uma diminuição drástica nas interações por um longo período após a introdução de extratos da pele, mesmo depois de sua diluição. A ordem dos demais estímulos foi aleatorizada.

### *Dados e análise estatística*

O comportamento dos machos ( $N = 24$ ,  $sl = 40,21 \pm 2,79$  mm) com as fêmeas ( $N = 24$ ,  $sl = 34,18 \pm 1,87$  mm) foi quantificado como: (1) tempo de atividade do macho, (2) número de interações agonísticas e (3) número de interações de corte, conforme descritos em Nelson (1964a) e Fukakusa (2011). As variáveis comportamentais foram comparadas entre os estímulos e o controle (sem estímulo químico) e entre os estímulos utilizando o Teste T pareado no software R 3.0.2.

### *Ensaio II: Interação entre machos*

#### *Aquário teste*

A avaliação da interação comportamental entre machos na presença de estímulos químicos foi realizada em aquários de 20,8 l (40X20x30 cm) divididos em dois compartimentos de igual volume por uma divisória fixa e transparente de vidro. Uma placa removível opaca de acrílico foi colocada junto à divisória. A transferência de água entre os compartimentos foi realizada por uma bomba peristáltica (40 ml/min) e uma pequena abertura na extremidade superior da divisória de vidro. Esse sistema permitiu que fosse controlada a percepção dos machos aos estímulos químicos e visuais. As cortinas, a cartolina e a câmera foram utilizadas de maneira semelhante ao ensaio I.

#### *Estímulos químicos*

Os estímulos testados foram: água condicionada por machos (1) com ( $\acute{A}CO_2$ :  $N = 24$ ,  $sl = 39,79 \pm 1,43$  mm) e (2) sem ( $\acute{A}SO_2$ :  $N = 24$ ,  $sl = 42,70 \pm 2,79$  mm) órgãos caudais e tratados sem comunicação visual de coespecíficos; água condicionada por machos com órgãos caudais e tratados (3) com comunicação visual de coespecíficos ( $\acute{A}CO$ :  $N = 38$ ,  $sl = 39,85 \pm 3,83$  mm); e (4) extrato de células “club” do órgão da nadadeira caudal (OC). As soluções teste de  $\acute{A}CO_2$  e  $\acute{A}SO_2$  foram produzidas através de machos aclimatados individualmente no compartimento do aquário teste com 10 l de água e sem comunicação visual com coespecíficos durante 23 h. A produção do estímulo  $\acute{A}CO$  seguiu o protocolo do ensaio I, porém mantendo as amostras de água condicionada por machos com órgãos caudais individualizadas, sem mistura com a água de

outros machos. As águas condicionadas (ÁCO<sub>2</sub>, ÁSO<sub>2</sub> ou ÁCO) foram utilizadas junto com o estímulo visual do doador do estímulo químico. O estímulo OC e os machos sem órgãos caudais utilizados neste ensaio são proveniente do ensaio I. A introdução dos estímulos químicos foi através de troca de águas condicionadas entre os compartimentos ou introdução de 75 ml de OC por compartimento. Réplicas sem estímulos químicos (sem troca de água entre os compartimentos) foram utilizadas como controle. A ordem dos estímulos foi aleatorizada.

### *Procedimento experimental*

Pareamento dos machos por tamanho. Repetição dos próximos passos para todos os estímulos. Aclimação do par em aquário (40X20X30 cm) com 18 l de água durante uma semana. Identificação do macho dominante e do submisso. Aclimação individual dos machos junto com sua água condicionada nos compartimentos do aquário teste durante 4 h. Introdução de estímulo químico. Remoção da placa opaca 5 min após a introdução dos estímulos químicos, assegurando que os machos tenham contato com o estímulo químico antes de terem o estímulo visual. Início da gravação com duração de 20 min.

### *Etograma*

A análise comportamental foi adaptada do etograma de Fukakusa (2011). ↑↓: deslocamento no sentido vertical superior à altura do peixe. ←→ : deslocamento no sentido horizontal superior ao comprimento padrão do peixe. ↑ -vidro: deslocamento no sentido vertical superior à altura do peixe e com a boca encostada na divisória. ↔-vidro: deslocamento no sentido horizontal superior ao comprimento padrão do peixe e com a boca encostada na divisória. Bater: o agressor nada em direção ao adversário e bate com a boca na divisória de vidro. Display lateral: o agressor eriça as nadadeiras expondo a porção lateral do corpo ao adversário. Bolhas: o peixe investe contra a superfície d'água e abocanha ar. Volta à região mediana da coluna d'água e lá libera bolhas de ar pela boca e fenda branquial. Parear: os machos posicionam-se um ao lado do outro, deixando seus corpos próximos e emparelhados. Subir: Os machos pareiam e deslocam-se em direção a superfície d'água.

### *Dados e análise estatística*

O comportamento dos machos foi quantificado como: (1) tempo de atividade, (2) tempo de latência (tempo decorrido antes do início das interações), (3) deslocamento e (4) número de interações agonísticas. Consideramos como deslocamento os atos  $\uparrow\downarrow$  e  $\leftarrow\rightarrow$ , e interações agonísticas os atos Bater,  $\uparrow$  - vidro,  $\leftrightarrow$ -vidro, Display lateral, Bolhas, Parear e Subir. As variáveis comportamentais foram analisadas utilizando o teste T pareado quando comparado os machos pela sua hierarquia, os estímulos químicos com o controle e o estímulo OC com  $\dot{A}CO$  (mesmo grupo de machos) e o teste T de Student quando comparado os estímulos  $\dot{A}CO_2 \times \dot{A}SO_2$  e  $\dot{A}CO \times \dot{A}CO_2$  (grupo de machos diferentes). Os testes foram executados no software R 3.0.2.

### *Resultados*

#### *Ensaio I*

O comportamento dos casais na presença dos estímulos RA e  $\dot{A}SO$  não diferem do controle (sem estímulo químico) para as três variáveis analisadas (Tab. 1). Entretanto, os machos cortejam menos com OC, PE e  $\dot{A}CO$ , possuem mais interações agonísticas com OC e  $\dot{A}CO$  e menos tempo de atividade com OC e PE, quando comparados ao controle. Não há diferença entre OC e  $\dot{A}CO$  (Tab. 2), no entanto, ambos diferem da mesma forma aos seus estímulos controle (RA e  $\dot{A}SO$ , respectivamente) por terem menos corte e mais interações agonísticas e diferem de PE por terem mais interações agonístico e tempo de atividade (Fig. 1, 2 e 3).

#### *Ensaio II*

O comportamento de pares de machos com e sem órgãos caudais na presença dos estímulos  $\dot{A}CO_2$ ,  $\dot{A}SO_2$ ,  $\dot{A}CO$  e OC não diferiu do controle (sem estímulo químico) e não houve diferença entre o comportamento do dominante e o submisso (Tab. 3 e 4). Entretanto, o tempo de atividade do macho submisso é menor em  $\dot{A}CO$  do que em OC (Fig. 4). Os demais estímulos não diferiram entre si (Tab. 5).

### *Discussão*

Embora a morfologia do órgão caudal de caracídeos inseminadores seja amplamente descrita e empregada na diferenciação de espécies e na compreensão de suas relações filogenéticas (Menezes and Weitzman, 1990; 2009), a sua função é desconhecida. A semelhança dos efeitos dos estímulos OC e ÁCO na atração das fêmeas (cap. 1) e no comportamento de casais de *M. inequalis* (Tab. 2), e o fato de ambos diferirem da mesma forma aos seus estímulos controle (RA e ÁSO, respectivamente) e de PE (Fig. 1, 2 e 3) corroboram a hipótese de que o órgão caudal seja uma estrutura secretora especializada na comunicação química. A comunicação química especializada está presente em outras espécies de peixes, porém relacionadas a órgãos distintos e não homólogos àqueles de Glandulocaudini. Machos do bagre africano *Clarias gariepinus* (Siluriformes) possuem vesículas seminais produtoras de esteroides glucuronídeos que atraem fêmeas (Resink *et al.*, 1987; 1989; Lambert and Resink, 1991); gobídeos machos, *Gobius niger* e *Neogobius melanostomus* (Perciformes), possuem porções não espermatogênicas no testículo chamadas de glândula mesorchial, produtoras principalmente de andrógenos que atraem fêmeas (Colombo *et al.*, 1980; Murphy *et al.*, 2001; Belanger *et al.*, 2004; Arbuckle *et al.*, 2005; Gammon *et al.*, 2005a); lampreias da espécie *Petromyzon marinus* (Petromyzontiformes) produzem ácido biliático no fígado que é liberado pelas brânquias, sendo que em machos maduros (mas não em fêmeas) há o desenvolvimento de células glandulares especializadas para a liberação de feromônio que atrai fêmeas para o sítio de desova (Li *et al.*, 2002; Sorensen and Stacey, 2004); e em várias espécies de Blenniidae (Perciformes), os machos possuem um par de glândulas na nadadeira anal (Barata *et al.*, 2008b), como é o caso de *Salaria pavo*, na qual foi demonstrado que a glândula anal libera feromônios que atraem fêmeas (Barata *et al.*, 2008b; Serrano *et al.*, 2008a; 2008c) e que estas preferem desovar em ninhos de machos que possuem glândulas anais (Barata *et al.*, 2008b).

Apesar das fêmeas terem preferência e serem atraídas por estímulos químicos do órgão caudal (ÁCO e OC, cap1), a presença destes estímulos na ausência do estímulo visual de outro macho resultou numa inesperada agressividade do macho sobre a fêmea no teste de interação de casais, impossibilitando a análise da afinidade da fêmea à corte do macho. Por outro lado, os estímulos

químicos do órgão caudal (ÁCO e OC) de machos não familiares são aparentemente percebidos pelos machos e incrementam a sua agressividade. Em mais de 180 h de observação do comportamento de casais de *M. inequalis* (Fukakusa, 2011) nenhum ato agonístico foi realizado pelo macho à fêmea. Aparentemente, na presença de estímulos químicos do órgão caudal (ÁCO e OC) de machos não familiares e ausência de estímulo visual de outro macho, o comportamento agressivo foi direcionado à fêmea, o único indivíduo encontrado pelo macho no recinto. A maior agressividade provocada por estímulos químicos tem sido observada em machos de goby preto *Gobius niger*, que possuem porções não espermatogênicas no testículo chamadas de glândula mesorchial que produz andrógenos que estimulam exibições agressivas entre machos (Locatello *et al.*, 2002); em machos do peixe-dourado *Carassius auratus* que aumentam sua agressividade na presença de androstenediona, um estímulo químico liberado por fêmeas no início do ciclo ovulatório e por machos maduros (Poling *et al.*, 2001); e em machos de tilápia *Oreochromis mossambicus* que anunciam ativamente o seu status dominante através de odores na urina (Barata *et al.*, 2008a).

No teste de interação entre machos, não houve diferença na agressividade observada entre o controle (somente estímulo visual) e os estímulos químico-visuais de machos obtidos a partir de machos familiares (ÁCO, ÁCO2 e ÁSO2), e nem entre os três estímulos químicos (Tab. 3 e 5). Somente houve diferença quando comparado o estímulo químico de machos familiares (ÁCO) com o estímulo químico de machos não-familiares (OC) (tempo de atividade, Fig. 4). Diversas espécies de vertebrados reconhecem coespecíficos familiares e não familiares através de estímulos visuais (Utne-Palm and Hart, 2000; Trigoso-Venario *et al.*, 2002; Van Dyk and Evans, 2007; Liebgold and Dibble, 2011; Osborne *et al.*, 2012; Tierney *et al.*, 2013), acústicos (O'Connell-Rodwell *et al.*, 2007; Masco, 2013) e químicos (Brown and Smith, 1994; Giaquinto and Volpato, 1997; Hanley *et al.*, 1999; Aragon *et al.*, 2006; Zenuto, 2010; Ibanez *et al.*, 2013) que podem reduzir as interações agonísticas e colaborar na manutenção da hierarquia (Ward and Hart, 2003). A diferença entre o comportamento dos machos de *M. inequalis* com estímulos de familiares e não-familiares (ÁCO do dominante X OC de desconhecido - Fig. 4, e ÁCO não

familiar e familiar - Tab. 1 e 3-5) suportam a hipótese de reconhecimento de machos familiares através dos estímulos químicos do órgão caudal. É possivelmente o estímulo do órgão caudal também possa ser empregado na manutenção da hierarquia. Em contrapartida à diferença entre os estímulos familiares e não familiares, não houve diferença entre o estímulo visual (controle) e os estímulos químico-visuais (ÁCO familiar e OC não familiar, Tab. 3) indicando a importância deste sinal químico para o reconhecimento de coespecíficos.

Os machos podem responder de formas diferentes aos estímulos químicos familiares e não-familiares conforme a sua hierarquia (Rawleigh *et al.*, 1993; Garbe and Kemble, 1994; Giaquinto and Volpato, 1997; Tierney *et al.*, 2013). Neste estudo não houve diferença no comportamento do dominante entre os estímulos testados. O macho submisso, entretanto, apresentou menor tempo de atividade na presença do estímulo químico do macho dominante (estímulo familiar, ÁCO) em comparação com estímulo químico de machos desconhecidos (estímulo não-familiar, OC, Fig. 4). Possivelmente o macho despenda menor energia (tempo de atividade) com estímulo do macho dominante (ÁCO), pois já realizou disputa com este macho, e tenha maior atividade com estímulo de machos desconhecidos (OC) por identifica-lo como sendo uma ameaça a sua posição hierárquica (rank) ou seu território. Com isso o reconhecimento possibilitaria o peixe ajustar a sua resposta agressiva em função do grau de ameaça, utilizar a energia de maneira mais eficiente (menor custo energético nas disputas) e diminuir o risco de lesões, além de manter a estabilidade hierárquica/territorial (Kaufmann, 1983; Utne-Palm and Hart, 2000; Trigo-Venário *et al.*, 2002; Zenuto, 2010; Osborne *et al.*, 2012).

Sinais químicos com dupla funcionalidade (reprodutiva e agressiva) e diferenças relacionadas à hierarquia dos machos foram evidenciadas na tilápia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852), onde o macho pode influenciar através de sinais químicos na urina a desova da fêmea e sinalizar dominância, que pode modular a agressividade do rival e contribuir para a estabilidade social (Oliveira and Almada, 1996; Barata *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2008a). Machos dominantes de tilápia produzem mais urina, possuem uma urina mais concentrada (aminoesterol sulfatado) e possuem uma frequência de micção na



presença de fêmeas reprodutivas superior ao submisso (Barata *et al.*, 2008a). Os machos de gobídeos pretos, *Gobius niger* Linnaeus 1758, produzem um feromônio sexual que atrai fêmeas e estimula exibições agressivas entre os machos. Entretanto, os machos submissos (sneaker) produzem um sinal químico, diferente dos dominantes (parental), que é imperceptível aos outros machos (Locatello *et al.*, 2002). Possivelmente, o órgão caudal de *M. inequalis* também tenha função reprodutiva e agressiva: atração de fêmeas (cap. 1), modulação da agressividade nas disputas entre machos e manutenção da hierarquia. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender as funções, vantagens adaptativas e diferenças hierárquicas na comunicação química de *M. inequalis*.

As células “club” da pele produzem uma substância de alarme que é liberada no meio pelo rompimento da epiderme, provocando uma reação de susto em outros indivíduos (Pfeiffer, 1963; 1967; 1977). A diminuição da corte e do tempo de atividade (Fig. 1 e 3) e a manutenção do pequeno número de interações agonísticas (Fig. 2) em casais de *M. inequalis* na presença de PE está de acordo com as reações de alarme presentes em outras espécies de Characiformes (Ide *et al.*, 2003; Duboc, 2007; Barbosa Junior *et al.*, 2012). Entretanto, os estímulos de células “club” do órgão caudal (OC e ÁCO) diferem das reações de alarme descritas na literatura e de PE (Tab. 2), suportando a hipótese de diferença entre as substâncias produzidas nas células “club” do órgão caudal e da pele. Estudos recentes tem sugerido que as células “club” de Ostariophysi são parte do sistema imune e são mantidas por seleção natural devido às vantagens que elas conferem contra agentes patógenos, parasitas e injúrias na epiderme, indicando que a função de alarme destas células evoluiu secundariamente (Chivers *et al.*, 2007; Halbgewachs *et al.*, 2009; James *et al.*, 2009). Nossos dados suportam a hipótese de uma nova especialização das células “club” na comunicação química, diferente da função de alarme.

### *Referências Bibliográficas*

**ALBERTS, A. C.** 1989. Ultraviolet visual sensitivity in desert iguanas: implications for pheromone detection. *Animal Behaviour*. 38:129-137.

- ANDERSSON, M., and Y. IWASA.** 1996. Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*. 11:53-8.
- ARAGON, P., M. MASSOT, J. GASPARINI, and J. CLOBERT.** 2006. Socially acquired information from chemical cues in the common lizard, *Lacerta vivipara*. *Animal Behaviour*. 72:965-974.
- ARBUCKLE, W. J., A. J. BÉLANGER, L. D. CORKUM, B. S. ZIELINSKI, W. LI, S. YUN, S. BACHYNSKI, and A. P. SCOTT.** 2005. In vitro biosynthesis of novel 5 $\beta$ -reduced steroids by the testis of the round goby, *Neogobius melanostomus*. *General and Comparative Endocrinology*. 140:1-13.
- ATKINS, D. L., and W. L. FINK.** 1979. Morphology and histochemistry of the caudal gland of *Corynopoma riisei* Gill. *Journal of Fish Biology*. 14:465-469.
- AZEVEDO, M. A., L. R. MALABARBA, and J. R. BURNS.** 2010. Reproductive biology and development of gill glands in the inseminating characid, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann, 1915 (Cheirodontinae: Compsurini). *Neotropical Ichthyology*. 8:87-96.
- AZEVEDO, M. A., L. R. MALABARBA, and C. B. FIALHO.** 2000. Reproductive biology of the inseminating glandulocaudine *Diapoma speculiferum* cope (Teleostei : Characidae). *Copeia*:983-989.
- BARATA, E. N., J. M. FINE, P. C. HUBBARD, O. G. ALMEIDA, P. FRADE, P. W. SORENSEN, and A. V. CANÁRIO.** 2008a. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *Journal of Chemical Ecology*. 34:438-449.
- BARATA, E. N., P. C. HUBBARD, O. G. ALMEIDA, A. MIRANDA, and A. V. M. CANÁRIO.** 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BioMed Central Biology*. 5:1-11.
- BARATA, E. N., R. M. SERRANO, A. MIRANDA, R. NOGUEIRA, P. C. HUBBARD, and A. V. M. CANÁRIO.** 2008b. Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour*. 75:379-389.
- BARBOSA JUNIOR, A., F. L. ALVES, S. PEREIRA ADE, L. M. IDE, and A. HOFFMANN.** 2012. Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piaucu fish. *Physiology & Behavior*. 105:784-90.
- BARBOSA JUNIOR, A., E. J. MAGALHAES, A. HOFFMANN, and L. M. IDE.** 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Ethologica*. 13:119-126.
- BELANGER, A. J., W. J. ARBUCKLE, L. D. CORKUM, D. B. GAMMON, W. LI, A. P. SCOTT, and B. S. ZIELINSKI.** 2004. Behavioural and electrophysiological responses by reproductive female *Neogobius melanostomus* to odours released by conspecific males. *Journal of Fish Biology*. 65:933-946.
- BONDURIANSKY, R.** 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 76:305-39.
- BROWN, G. E., and R. J. F. SMITH.** 1994. Fathead minnows use chemical cues to discriminate natural shoalmates from unfamiliar conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*. 20:3051-3061.
- BURGER, B. V., M. Z. VIVIERS, J. P. BEKKER, M. LE ROUX, N. FISH, W. B. FOURIE, and G. WEIBCHEN.** 2008. Chemical characterization of territorial marking fluid of male Bengal tiger, *Panthera tigris*. *Journal of Chemical Ecology*. 34:659-671.
- BURNS, J. R., and S. H. WEITZMAN.** 1996. Novel gill-derived gland in the male swordtail characin, *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Copeia*:627-633.
- . 2005. Insemination in ostariophysan fishes, p. 107-134. *In: Viviparous Fishes*. H. J. Grier and M. C. Uribe (eds.). New Life Publications, Homestead Florida.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, H. J. GRIER, and N. A. MENEZES.** 1995. Internal fertilization, testis and sperm morphology in Glandulocaudine fishes (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 224:131-145.
- BURNS, J. R., S. H. WEITZMAN, and L. R. MALABARBA.** 1997. Insemination in eight species of Cheirodontine fishes (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae). *Copeia*:433-438.

- BUSHMANN, P. J., J. R. BURNS, and S. H. WEITZMAN.** 2002. Gill-derived glands in glandulocaudine fishes (Teleostei : Characidae : Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 253:187-195.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, and E. HECKER.** 1961a. On the sexattractant of silk-moths. I. The biological test and the isolation of the pure sex-attractant bombykol. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 324:71-83.
- BUTENANDT, A., R. BECKMANN, and D. STAMM.** 1961b. On the sexattractant of silk-moths. II. Constitution and configuration of bombykol. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 324:84-87.
- CARO, S. P., and J. BALTHAZART.** 2010. Pheromones in birds: myth or reality? *Journal of Comparative Physiology A*. 196:751-66.
- CHIVERS, D. P., B. D. WISENDEN, C. J. HINDMAN, T. A. MICHALAK, R. C. KUSCH, S. G. KAMINSKYJ, K. L. JACK, M. C. FERRARI, R. J. POLLOCK, C. F. HALBGEWACHS, M. S. POLLOCK, S. ALEMADI, C. T. JAMES, R. K. SAVALOJA, C. P. GOATER, A. CORWIN, R. S. MIRZA, J. M. KIESECKER, G. E. BROWN, J. C. ADRIAN, JR., P. H. KRONE, A. R. BLAUSTEIN, and A. MATHIS.** 2007. Epidermal 'alarm substance' cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. *Proc Biol Sci*. 274:2611-9.
- COLOMBO, L., A. MARCONATO, P. C. BELVEDERE, and C. FRISO.** 1980. Endocrinology of teleost reproduction: A testicular steroid pheromone in the black goby, *Gobius jozo* L. *Bolletino di zoologia*. 47:355-364.
- COOPER, W. E., P. LÓPEZ, and A. SALVADOR.** 1994. Pheromone detection by an amphibiaenian. *Animal Behaviour*. 47:1401-1411.
- COUNCIL, N. R.** 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C.
- DOUGLAS, R. H., and C. W. HAWRYSHYN.** 1990. Behavioural studies of fish vision: an analysis of their capabilities. *In: The visual system of fish*. Vol. 373-418. R. H. Douglas and M. B. A. Djamgoz (eds.). Chapman and Hall, London, UK.
- DUBOC, L. F.** 2007. Análise comparativa e aspectos ecológicos da reação de alarme em duas espécies de *Mimagoniates* (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae). *Revista Brasileira de Zoologia*. 24:1163-1185.
- EIGENMANN, C. H.** 1911. New characins in the collections of the Carnegie Museum. *Annals of the Carnegie Museum*. 8:164-181.
- FRAKER, M. E., F. HU, V. CUDDAPAH, S. A. MCCOLLUM, R. A. RELYEA, J. HEMPEL, and R. J. DENVER.** 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior*. 55:520-529.
- FUKAKUSA, C. K.** 2011. Comportamentos reprodutivos em *Mimagoniates inaequalis* (Eigenmann, 1911) (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini), p. 25. *In: Departamento de Zoologia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- GAMMON, D. B., W. LI, A. P. SCOTT, B. S. ZIELINSKI, and L. D. CORKUM.** 2005. Behavioural responses of female *Neogobius melanostomus* to odours of conspecifics. *Journal of Fish Biology*. 67:615-626.
- GARBE, C. M., and E. D. KEMBLE.** 1994. Effects of Prior Agonistic Experience on Risk Assessment and Approach Behavior Evoked by Familiar or Unfamiliar Conspecific Odors. *Aggressive Behavior*. 20:143-149.
- GASKETT, A. C.** 2007. Spider sex pheromones: emission, reception, structures, and functions. *Biological Reviews*. 82:26-48.
- GIAQUINTO, P. C., and G. L. VOLPATO.** 1997. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiology & Behavior*. 62:1333-1338.
- GONÇALVES, T. K., M. A. AZEVEDO, L. R. MALABARBA, and C. B. FIALHO.** 2005. Reproductive biology and development of sexually dimorphic structures in *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 3:5.

- GRAMMER, K., B. FINK, and N. NEAVE.** 2005. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 118:135-142.
- HALBGEWACHS, C. F., T. A. MARCHANT, R. C. KUSCH, and D. P. CHIVERS.** 2009. Epidermal club cells and the innate immune system of minnows. *Biological Journal of the Linnean Society.* 98:891-897.
- HANLEY, K. A., M. L. ELLIOTT, and J. A. STAMPS.** 1999. Chemical recognition of familiar vs. unfamiliar conspecifics by juvenile iguanid lizards, *Ctenosaura similis*. *Ethology.* 105:641-650.
- HERBORG, L., M. G. BENTLEY, A. S. CLARE, and K. S. LAST.** 2006. Mating behaviour and chemical communication in the invasive Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 329:1-10.
- HERDMAN, E. J. E., C. D. KELLY, and J. G. J. GODIN.** 2004. Male mate choice in the guppy (*Poecilia reticulata*): Do males prefer larger females as mates? *Ethology.* 110:97-111.
- IBANEZ, A., A. MARZAL, P. LOPEZ, and J. MARTIN.** 2013. Boldness and body size of male Spanish terrapins affect their responses to chemical cues of familiar and unfamiliar males. *Behavioral Ecology and Sociobiology.* 67:541-548.
- IDE, L. M., E. C. URBINATI, and A. HOFFMANN.** 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *Journal of Fish Biology.* 63:332-343.
- JAMES, C. T., B. D. WISENDEN, and C. P. GOATER.** 2009. Epidermal club cells do not protect fathead minnows against trematode cercariae: a test of the anti-parasite hypothesis. *Biological Journal of the Linnean Society.* 98:884-890.
- JAVONILLO, R., J. R. BURNS, and S. H. WEITZMAN.** 2009. Sperm modifications related to insemination, with examples from the Ostariophysi. *In: Reproductive Biology and Phylogeny in Fishes.* B. G. M. Jamieson (ed.). Science Publishers, Enfield.
- JOHANSSON, B. G., T. M. JONES, and F. WIDEMO.** 2005. Cost of pheromone production in a lekking *Drosophila*. *Animal Behaviour.* 69:851-858.
- KAUFMANN, J. H.** 1983. ON THE DEFINITIONS AND FUNCTIONS OF DOMINANCE AND TERRITORIALITY. *Biological Reviews.* 58:1-20.
- KIKUYAMA, S., T. NAKADA, F. TOYODA, T. IWATA, K. YAMAMOTO, and J. M. CONLON.** 2005. Amphibian Pheromones and Endocrine Control of Their Secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1040:123-130.
- KOBAYASHI, M., P. W. SORENSEN, and N. E. STACEY.** 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry.* 26:71-84.
- KUTAYGIL, D. L.** 1959. Insemination, sexual differentiation and secondary sex characters in *Stewardia albipinnis* gill. *Hydrobiology University Istanbul Fen Fakültesi Mecmuası.* 24:93-128.
- LAMBERT, J. G., and J. W. RESINK.** 1991. Steroid glucuronides as male pheromones in the reproduction of the African catfish *Clarias gariepinus*--a brief review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 40:549-556.
- LI, W., A. P. SCOTT, M. J. SIEFKES, H. YAN, Q. LIU, S. S. YUN, and D. A. GAGE.** 2002. Bile Acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. *Science.* 296:138-141.
- LIEBGOLD, E. B., and C. J. DIBBLE.** 2011. Better the devil you know: familiarity affects foraging activity of red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Animal Behaviour.* 82:1059-1066.
- LOCATELLO, L., C. MAZZOLDI, and M. B. RASOTTO.** 2002. Ejaculate of sneaker males is pheromonally inconspicuous in the black goby, *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Journal of Experimental Zoology.* 293:601-605.
- MALABARBA, L. R.** 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae), p. 193-233. *In: Phylogeny and classification of neotropical fishes.* L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena, and C. A. Lucena (eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

- MARDON, J., S. M. SAUNDERS, and F. BONADONNA.** 2011. Comments on recent work by Zhang and colleagues: "Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in budgerigars". *Chemical Senses*. 36:3-4; author reply 5-7.
- MASCO, C.** 2013. Neighbor-Stranger Discrimination on the Basis of a Threat Vocalization in the Great Black-Backed Gull. *Wilson Journal of Ornithology*. 125:342-347.
- MCINTOSH, T. K., and L. C. DRICKAMER.** 1977. Excreted urine, bladder urine, and the delay of sexual maturation in female house mice. *Animal Behaviour*. 25:999-1004.
- MCRROBERT, S. P., and J. BRADNER.** 1998. The influence of body coloration on shoaling preferences in fish. *Animal Behaviour*. 56:611-615.
- MENEZES, N. A., and S. H. WEITZMAN.** 1990. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glanduloaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glanduloaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 103:380-426.
- . 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glanduloaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 7:295-370.
- MENEZES, N. A., S. H. WEITZMAN, and J. R. BURNS.** 2003. A systematic review of *Planaltina* (Teleostei: Characiformes: Characidae: Glanduloaudinae: Diapomini) with a description of two new species from the upper rio Paraná, Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 116:557-600.
- MEYER, J. M., T. E. GOODWIN, and B. A. SCHULTE.** 2008. Intrasexual chemical communication and social responses of captive female African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour*. 76:163-174.
- MIRANDE, J. M.** 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*. 8:385-568.
- MURPHY, C. A., N. E. STACEY, and L. D. CORKUM.** 2001. Putative steroidal pheromones in the round goby, *Neogobius melanostomus*: olfactory and behavioral responses. *Journal of Chemical Ecology*. 27:443-470.
- NELSON, K.** 1964a. Behavior and morphology in the Glanduloaudine fishes (Ostariophysi, Characidae). *University of California Publications in Zoology*. 75:93.
- . 1964b. The evolution of a pattern of sound production associated with courtship in the characid fish, *Glanduloauda inequalis*. *Evolution*. 18:14.
- O'CONNELL-RODWELL, C. E., J. D. WOOD, C. KINZLEY, T. C. RODWELL, J. H. POOLE, and S. PURIA.** 2007. Wild African elephants (*Loxodonta africana*) discriminate between familiar and unfamiliar conspecific seismic alarm calls. *Journal of the Acoustical Society of America*. 122:823-830.
- OLIVEIRA, R. F., and V. C. ALMADA.** 1996. Dominance hierarchies and social structure in captive groups of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei Cichlidae). *Ethology Ecology & Evolution*. 8:39-55.
- OLSSON, M.** 1993. Male preference for large females and assortative mating for body size in the sand lizard (*Lacerta agilis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 32:337-341.
- OSBORNE, L., K. D. L. UMBERS, P. R. Y. BACKWELL, and J. S. KEOGH.** 2012. Male tawny dragons use throat patterns to recognize rivals. *Naturwissenschaften*. 99:869-872.
- PFANDER, I., and J. ZETTEL.** 2004. Chemical communication in *Ceratophysella sigillata* (Collembola: Hypogastruridae): intraspecific reaction to alarm substances. *Pedobiologia*. 48:575-580.
- PFEIFFER, W.** 1963. Alarm substances. *Experientia*. 19:113-23.
- . 1967. Alarm reaction and alarm substance cells in Kneriidae and Phractolaemidae (Isospondyli, Pisces). *Naturwissenschaften*. 54:177.
- . 1977. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia* 1977:653-665.

- PLENDERLEITH, M., C. VAN OOSTERHOUT, R. L. ROBINSON, and G. F. TURNER.** 2005. Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish. *Biology Letters*. 1:411-414.
- POLING, K. R., E. J. FRASER, and P. W. SORENSEN.** 2001. The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 129:645-651.
- RAWLEIGH, J. M., E. D. KEMBLE, and J. OSTREM.** 1993. Differential-Effects of Prior Dominance or Subordination Experience on Conspecific Odor Preferences in Mice. *Physiology & Behavior*. 54:35-39.
- RESINK, J. W., R. VAN DEN HURK, R. F. O. GROENINX VAN ZOELLEN, and E. A. HUISMAN.** 1987. The Seminal Vesicle as Source of Sex Attracting Substances in the African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 63:115-127.
- RESINK, J. W., P. K. VOORTHUIS, R. VAN DEN HURK, R. C. PETERS, and P. G. VAN OORDT.** 1989. Steroid Glucuronides of the Seminal Vesicle as Olfactory Stimuli in African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 83:153-166.
- RODRIGUEZ, I.** 2004. Pheromone receptors in mammals. *Hormones and Behavior*. 46:219-30.
- ROSENTHAL, G. G., and P. S. LOBEL.** 2006. Communication, p. 39-78. *In: Behaviour and physiology of fish*. Vol. 24. K. A. Sloman, R. W. Wilson, and S. Balshine (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- RUTHER, J., K. THAL, and S. STEINER.** 2011. Pheromone communication in *Nasonia vitripennis*: abdominal sex attractant mediates site fidelity of releasing males. *Journal of Chemical Ecology*. 37:161-165.
- SATHYAN, R., and V. C. K. COULDRIDGE.** 2013. Female preference for blue in Japan blue guppies (*Poecilia reticulata*). *Environmental Biology of Fishes*. 96:953-959.
- SERRANO, R. M., E. N. BARATA, M. A. BIRKETT, P. C. HUBBARD, P. S. GUERREIRO, and A. V. CANARIO.** 2008a. Behavioral and olfactory responses of female *Salaria pavo* (Pisces: Blenniidae) to a putative multi-component male pheromone. *Journal of Chemical Ecology*. 34:647-658.
- SERRANO, R. M., O. LOPES, P. C. HUBBARD, J. ARAUJO, A. V. CANARIO, and E. N. BARATA.** 2008b. 11-ketotestosterone stimulates putative sex pheromone production in the male peacock blenny, *Salaria pavo* (Risso 1810). *Biology of Reproduction*. 79:861-868.
- SERRANO, R. M., O. LOPES, P. C. HUBBARD, J. ARAÚJO, A. V. M. CANÁRIO, and E. N. BARATA.** 2008c. Seasonal cell differentiation and olfactory potency of secretions by the anal glands of male peacock blenny *Salaria Pavo*. *Journal of Fish Biology*. 73:1790–1798.
- SHRESTHA, B., R. JAVONILLO, J. R. BURNS, Z. PIRGER, and A. VERTES.** 2013. Comparative local analysis of metabolites, lipids and proteins in intact fish tissues by LAESI mass spectrometry. *Analyst*. 138:3444-9.
- SLOMAN, K. A., R. W. WILSON, and S. BALSHINE.** 2006. *Behaviour and physiology of fish*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- SOERENSEN, P. W., and N. E. STACEY.** 1999. Evolution and specialization of fish hormonal pheromones, p. 15–47. *In: Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. R. E. Johnston, D. Muller-Schwarze, and P. W. Sorensen (eds.). Kluwer Academic/Plenum, New York.
- SOERENSEN, P. W., and N. E. STACEY.** 2004. Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 38:399–417.
- STACEY, N.** 2003. Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28:229–235.
- STACEY, N., and P. SOERENSEN.** 2006. Reproductive Pheromones, p. 359-412. *In: Behaviour and physiology of fish*. Vol. 24. K. A. Sloman, R. W. Wilson, and S. Balshine (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam.

- STACEY, N. E., and P. W. SORENSEN.** 2002. Hormonal pheromones in fish, p. 375–434. *In:* Hormones, Brain and Behavior. Vol. 2. D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, and R. T. Rubin (eds.). Academic Press, New York.
- STEBBING, P. D., M. G. BENTLEY, and G. J. WATSON.** 2003. Mating behaviour and evidence for a female released courtship pheromone in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Chemical Ecology*. 29:465-475.
- SUTER, R. B., and G. RENKES.** 1982. Linyphiid Spider Courtship: Releaser and Attractant Functions of a Contact Sex Pheromone. *Animal Behaviour*. 30:714-718.
- TIERNEY, A. J., K. ANDREWS, K. R. HAPPER, and M. K. M. WHITE.** 2013. Dear enemies and nasty neighbors in crayfish: Effects of social status and sex on responses to familiar and unfamiliar conspecifics. *Behavioural Processes*. 99:47-51.
- TILLMAN, J. A., S. J. SEYBOLD, R. A. JURENKA, and G. J. BLUMQUIST.** 1999. Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29:481-514.
- TRIGOSSO-VENARIO, R., A. LABRA, and H. M. NIEMEYER.** 2002. Interactions between males of the lizard *Liolaemus tenuis*: Roles of familiarity and memory. *Ethology*. 108:1057-1064.
- UTNE-PALM, A. C., and P. J. B. HART.** 2000. The effects of familiarity on competitive interactions between threespined sticklebacks. *Oikos*. 91:225-232.
- VACCARO, E. A., P. W. FELDHOFF, R. C. FELDHOFF, and L. D. HOUCK.** 2010. A pheromone mechanism for swaying female mate choice: enhanced affinity for a sexual stimulus in a woodland salamander. *Animal Behaviour*. 80:983-989.
- VAN DYK, D. A., and C. S. EVANS.** 2007. Familiar-unfamiliar discrimination based on visual cues in the Jacky dragon, *Amphibolurus muricatus*. *Animal Behaviour*. 74:33-44.
- WARD, A. J. W., and P. J. B. HART.** 2003. The effects of kin and familiarity on interactions between fish. *Fish and Fisheries*. 4:348-358.
- WARD, A. J. W., M. M. WEBSTER, and P. J. B. HART.** 2007. Social recognition in wild fish populations. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 274:1071-1077.
- WEITZMAN, S. H., and S. V. FINK.** 1985. Xenobryconin phylogeny and putative pheromone pumps in glandulo-caudine fishes (Teleostei: Characidae). Smithsonian Institution Press, City of Washington.
- WEITZMAN, S. H., N. A. MENEZES, H.-G. EVERS, and J. R. BURNS.** 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 3:329-360.
- WOODLEY, S. K.** 2010. Pheromonal communication in amphibians. *Journal of Comparative Physiology A*. 196:713-727.
- WYATT, T. D.** 2003. Pheromones and animal behaviour : communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York.
- YAMAMOTO, K., Y. KAWAI, T. HAYASHI, Y. OHE, H. HAYASHI, F. TOYODA, G. KAWAHARA, T. IWATA, and S. KIKUYAMA.** 2000. Silefrin, a sodefrin-like pheromone in the abdominal gland of the sword-tailed newt, *Cynops ensicauda*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 472:267-270.
- ZENUTO, R. R.** 2010. Dear enemy relationships in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: the role of memory of familiar odours. *Animal Behaviour*. 79:1247-1255.
- ZHANG, J. X., W. WEI, J. H. ZHANG, and W. H. YANG.** 2010. Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in budgerigars. *Chemical Senses*. 35:375-382.

Tabela 1. Comportamento de casais de *Mimagoniates inequalis* com estímulos químicos de células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e da pele do corpo (PE), água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal e secreção de raios da nadadeira caudal (RA), comparados através do Teste T pareado com o controle (aquário sem estímulo químico). Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito.

Estímulo Químico	N de interações de Corte				Comportamento N de interações Agonísticas				Tempo de atividade (s)			
	X±DP	T	Df	P	X±DP	T	Df	P	X±DP	T	Df	P
OC	<b>1,47 ± 4,14</b>	-	<b>22,53</b>	<b>9,8e<sup>-5</sup></b>	<b>16,09 ± 15,88</b>	<b>3,74</b>	<b>23,45</b>	<b>0,001</b>	<b>356 ± 227</b>	-	<b>28,25</b>	<b>0,01</b>
RA	14,14 ± 18,24	-0,9	39,58	0,375	2,67 ± 5,31	0,06	39,38	0,951	449 ± 159	-	34,74	0,178
ÁCO	<b>2,9 ± 4,3</b>	-	<b>22,72</b>	<b>2,5e<sup>-4</sup></b>	<b>15,09 ± 14,69</b>	<b>3,72</b>	<b>24,03</b>	<b>0,001</b>	448 ± 155	-	35,22	0,158
ÁSO	13,05 ± 14,03	-	39,03	0,218	5,05 ± 6,92	1,36	35,14	0,183	448 ± 171	-	33,26	0,19
PE	<b>1,09 ± 2,28</b>	-	<b>20,77</b>	<b>7,3e<sup>-5</sup></b>	6,57 ± 9,98	1,66	28,4	0,107	<b>211 ± 198</b>	-	<b>30,47</b>	<b>1,2e<sup>-6</sup></b>

Tabela 2. Comportamento de casais de *Mimagoniates inequalis* com estímulos químicos de células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e da pele do corpo (PE), água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal e secreção de raios da nadadeira caudal (RA), comparados entre os estímulos através do Teste T pareado. Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito.

Estímulo Químico	N de interações de Corte			Comportamento N de interações Agonísticas			Tempo de atividade (s)		
	T	Df	P	T	Df	P	T	Df	P
OC x RA	<b>-3,10</b>	<b>22,06</b>	<b>0,005</b>	<b>3,67</b>	<b>24,42</b>	<b>0,001</b>	-1,54	35,82	0,133
OC x PE	0,37	31,08	0,714	<b>2,33</b>	<b>33,67</b>	<b>0,026</b>	<b>2,21</b>	<b>39,29</b>	<b>0,033</b>
OC x ÁCO	-1,1	39,94	0,279	0,21	39,76	0,833	-1,52	35,35	0,137
ÁCO x ÁSO	<b>-3,17</b>	<b>23,73</b>	<b>0,004</b>	<b>2,83</b>	<b>28,47</b>	<b>0,008</b>	-0,01	39,62	0,995
ÁCO x PE	1,7	30,41	0,098	<b>2,2</b>	<b>35,22</b>	<b>0,034</b>	<b>4,31</b>	<b>37,81</b>	<b>1,1e<sup>-4</sup></b>



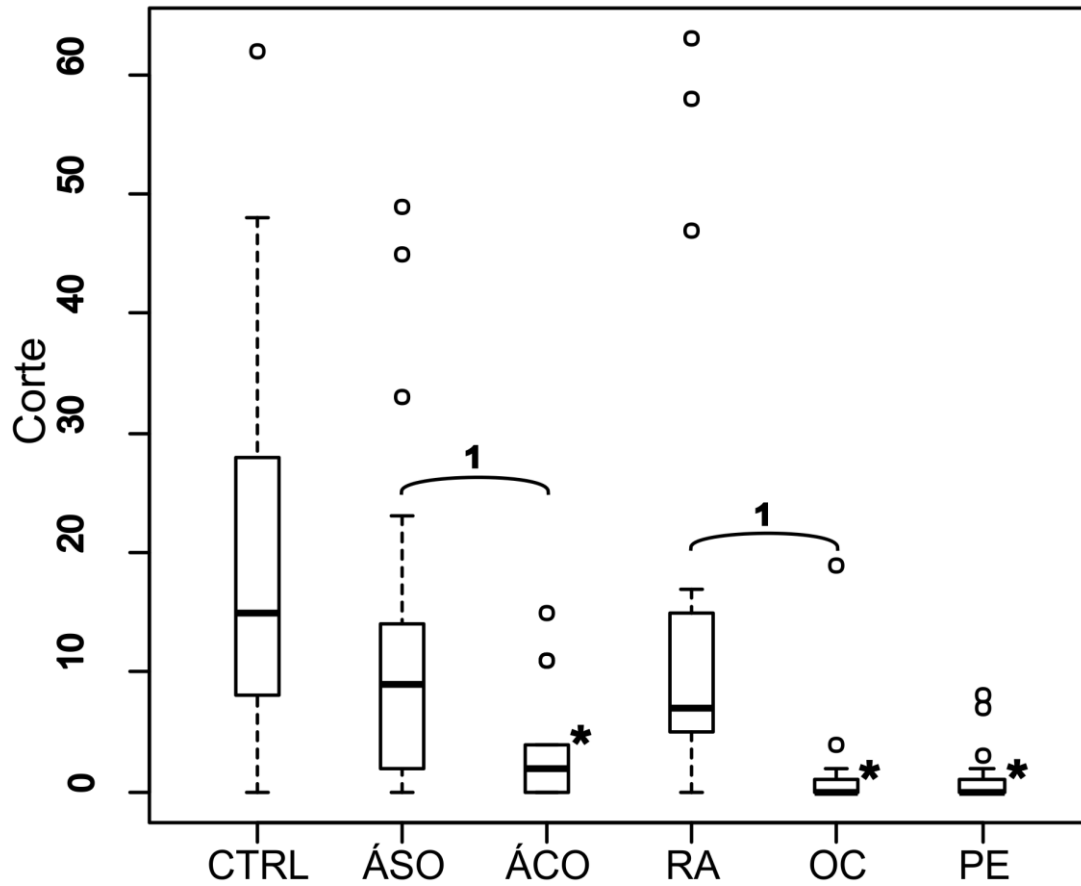


Figura 1. Boxplot do número de interações de corte de casais com estímulos químicos de células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e da pele do corpo (PE), água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal e secreção de raios da nadadeira caudal (RA), comparados ao controle (sem estímulo químico) e entre os estímulos através do Teste T pareado. Valores estatisticamente significantes \*comparados ao controle e <sup>1</sup>comparações entre estímulos (tab. 1 e 2). Os pontos são outliers e as barras são o desvio interquartil vezes 1,5.

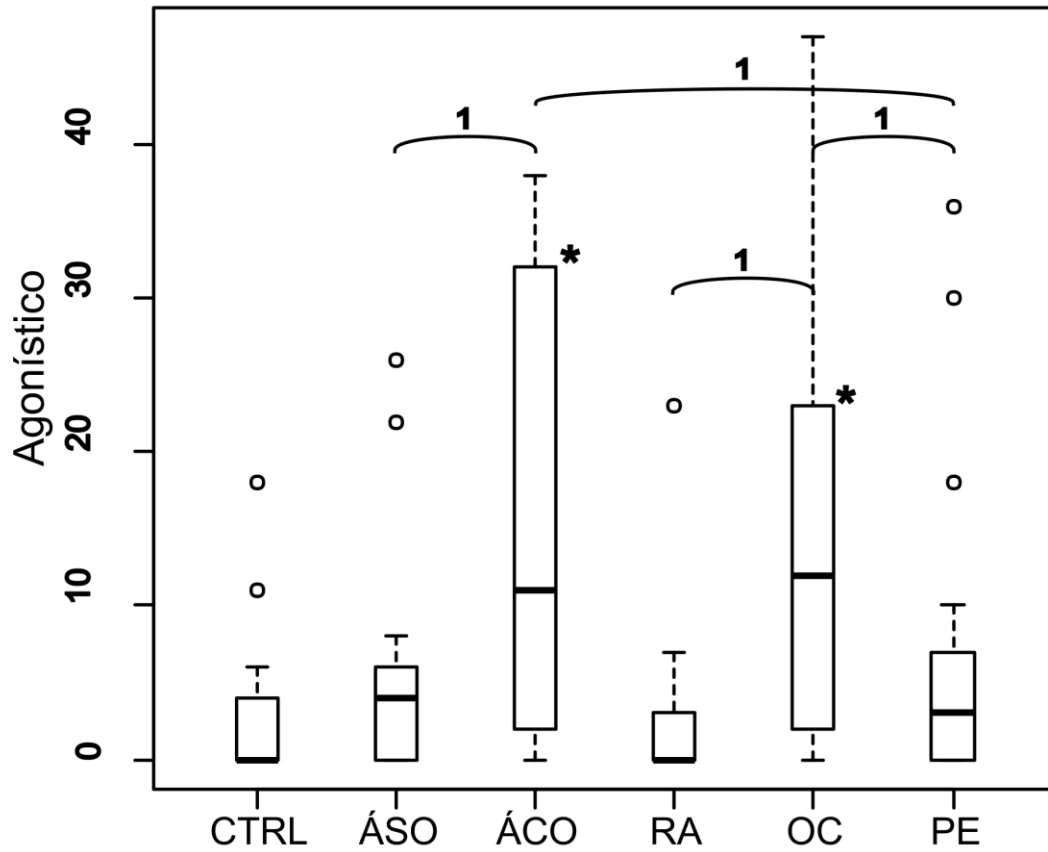


Figura 2. Boxplot do número de interações agonísticas de casais com estímulos químicos de células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e da pele do corpo (PE), água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal e secreção de raios da nadadeira caudal (RA), comparados ao controle (sem estímulo químico) e entre os estímulos através do Teste T pareado. Valores estatisticamente significantes \*comparados ao controle e <sup>1</sup>comparações entre estímulos (tab. 1 e 2). Os pontos são outliers e as barras são o desvio interquartil vezes 1,5.

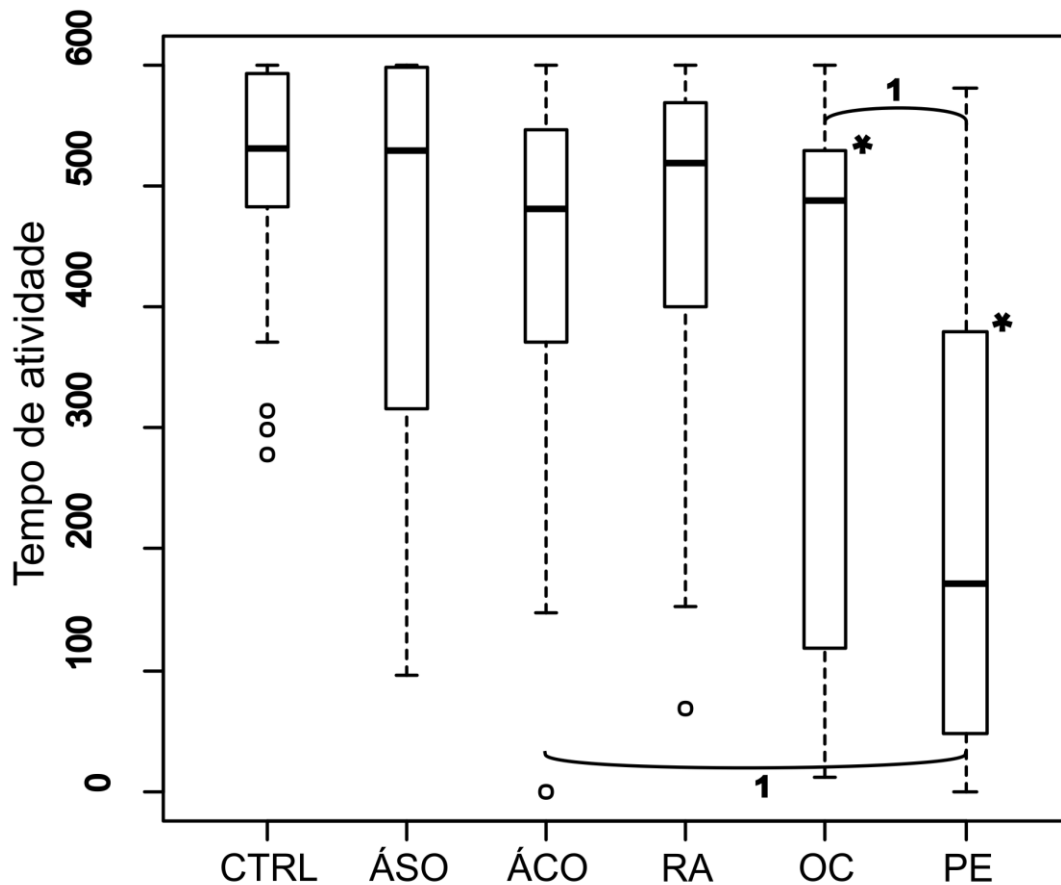


Figura 3. Boxplot do tempo de atividade (s) de casais com estímulos químicos de células “club” dos órgãos da nadadeira caudal (OC) e da pele do corpo (PE), água condicionada por machos com (ÁCO) e sem (ÁSO) órgãos da nadadeira caudal e secreção de raios da nadadeira caudal (RA), comparados ao controle (sem estímulo químico) e entre os estímulos através do Teste T pareado. Valores estatisticamente significantes \*comparados ao controle e 1comparações entre estímulos (tab. 1 e 2). Os pontos são outliers e as barras são o desvio interquartil vezes 1,5.

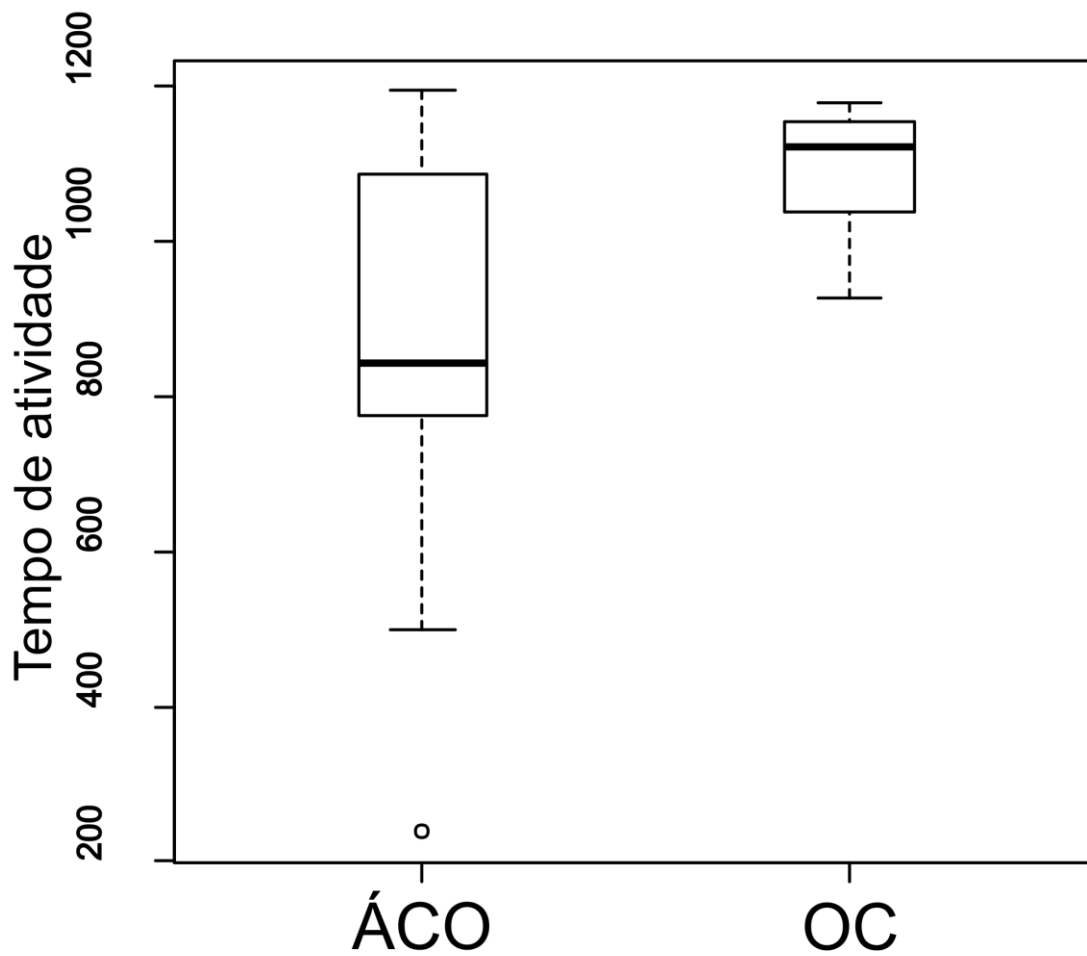


Figura 4. Boxplot do tempo de atividade (s) de pares de machos com órgãos caudais ( $N = 38$ ,  $sl = 39,85 \pm 3,83$  mm) com estímulos químicos de água condicionada por machos com comunicação visual de coespecíficos (ÁCO – estímulo familiar) e de células “club” do órgão da nadadeira caudal (OC – estímulo não familiar).  $T = -2,50$ ,  $df = 11,73$ ,  $p < 0,05$ . Os pontos são outliers e as barras são o desvio interquartil vezes 1,5.

Tabela 3. Comportamentos de machos dominantes e submissos com estímulos de água condicionada por machos com (ÁCO2: N = 24, sl = 39,79 ± 1,43 mm) e sem (ÁSO2: N = 24, sl = 42,70 ± 2,79 mm) órgãos caudais e tratados sem comunicação visual de coespecíficos e água condicionada por machos com órgãos caudais e tratados com comunicação visual de coespecíficos (ÁCO: N = 38, sl = 39,85 ± 3,83 mm), comparados com o controle (sem estímulo químico) através do Teste T pareado.

	Estímulo Químico															
	ÁCO2				ÁSO2				ÁCO				OC			
	X±DP	T	Df	P	X±DP	T	Df	P	X±DP	T	Df	P	X±DP	T	Df	P
Int. Agonísticas																
Dominante	124 ± 104	0,32	17,93	0,753	160 ± 115	0,06	19,3	0,951	92 ± 63	-	29,53	0,147	125 ± 97	0,426	16,87	0,676
Submisso	105 ± 64	-	22	0,944	160 ± 116	-	21,98	0,511	116 ± 110	0,75	20,69	0,46	115 ± 41	0,163	16,24	0,873
Deslocamento																
Dominante	94 ± 85	0,8	17,09	0,435	147 ± 116	-	21,97	0,601	83 ± 94	-	29,87	0,299	120 ± 94	0,54	19,98	0,595
Submisso	100 ± 94	1,02	19,65	0,32	160 ± 123	0,27	21,87	0,791	82 ± 85	0,68	19,8	0,506	92 ± 54	0,477	20,76	0,638
T. atividade (s)																
Dominante	782 ± 300	-	16,78	0,79	886 ± 310	-	18,82	0,751	850 ± 332	1,61	24,93	0,121	930 ± 294	-	15,5	0,444
Submisso	770 ± 315	0,36	19,72	0,72	859 ± 376	-	19,22	0,595	900 ± 296	0,37	29,25	0,712	1084 ± 83	1,478	13,22	0,163
T. latência (s)																
Dominante	-	-	-	-	-	-	-	-	59 ± 64	0,31	29,02	0,755	40 ± 51,47	-	21,99	0,269
Submisso	-	-	-	-	-	-	-	-	64 ± 88	1,52	28,49	0,14	95 ± 189	-	14,74	0,962

Tabela 4. Comportamentos de pares de machos com estímulos de água condicionada por machos com (ÁCO2: N = 24, sl = 39,79 ± 1,43 mm) e sem (ÁSO2: N = 24, sl = 42,70 ± 2,79 mm) órgãos caudais e tratados sem comunicação visual de coespecíficos e água condicionada por machos com órgãos caudais e tratados com comunicação visual de coespecíficos (ÁCO: N = 38, sl = 39,85 ± 3,83 mm), comparados entre machos dominantes e submissos através do Teste T pareado.

	Estímulo químico											
	ÁCO2			ÁSO2			ÁCO			OC		
	T	Df	P	T	Df	P	T	Df	P	T	Df	P
Int. Agonísticas	0,54	18,24	0,596	0,01	22	0,993	-0,76	24,06	0,455	0,33	14,91	0,747
Deslocamento	-0,18	21,77	0,859	-0,26	22	0,796	-0,06	28,86	0,953	0,88	17,51	0,391
T. atividade (s)	0,09	22	0,929	0,19	21	0,849	-0,45	29,62	0,655	-1,75	12,75	0,104
T. latência (s)	-	-	-	-	-	-	-0,18	27,33	0,861	-0,97	12,62	0,352

Tabela 5. Comportamentos de machos dominantes e submissos com estímulos de água condicionada por machos com ( $\dot{A}CO_2$ : N = 24, sl =  $39,79 \pm 1,43$  mm) e sem ( $\dot{A}SO_2$ : N = 24, sl =  $42,70 \pm 2,79$  mm) órgãos caudais e tratados sem comunicação visual de coespecíficos, água condicionada por machos com órgãos caudais e tratados com comunicação visual de coespecíficos ( $\dot{A}CO$ : N = 38, sl =  $39,85 \pm 3,83$  mm), e secreção de células “club” do órgão da nadadeira caudal (OC), comparados entre os estímulos químicos através do Teste T pareado ( $\dot{A}COxOC$ ) e Teste T de Student ( $\dot{A}CO_2x\dot{A}SO_2$  e  $\dot{A}COx\dot{A}CO_2$ ). Valores estatisticamente significantes estão marcados em negrito.

		Estímulos químicos								
		$\dot{A}CO_2x\dot{A}SO_2$			$\dot{A}COxOC$			$\dot{A}COx\dot{A}CO_2$		
		T	Df	P	T	Df	P	T	Df	P
Int. Agonísticas	Dominante	-0,81	21,77	0,426	-1,27	18,23	0,221	-0,94	17,03	0,361
	Submisso	-1,44	17,11	0,168	-0,61	12,83	0,549	0,34	24,73	0,738
Deslocamento	Dominante	-1,28	20,12	0,214	-0,99	19,93	0,329	-0,34	23,94	0,734
	Submisso	-1,33	20,58	0,197	-0,25	12,26	0,809	0,42	25,06	0,679
T. atividade (s)	Dominante	-0,84	21,98	0,411	-0,85	19,3	0,406	0,57	24,98	0,57
	Submisso	-0,62	21,35	0,528	<b>-2,5</b>	<b>11,73</b>	<b>0,028</b>	1,1	22,97	0,28
T. latência (s)	Dominante	-	-	-	0,66	17,91	0,517	-	-	-
	Submisso	-	-	-	0,79	13,88	0,44	-	-	-

## **Considerações finais**

Os experimentos deste estudo revelaram que: machos e fêmeas percebem o estímulo químico do órgão caudal; o órgão caudal possui função secretora especializada na comunicação química; as substâncias químicas do órgão caudal atraem fêmeas, aumentam a agressividade dos machos e podem ser utilizadas no reconhecimento de machos familiares; e as células “club” da pele e do órgão caudal possuem substâncias diferentes.

## **Anexos**



## **Anexo 1**

### Normas para publicação no periódico Animal Behavior

#### INTRODUCTION

##### Types of article

##### Research papers

Animal Behaviour publishes original papers relating to all aspects of the behaviour of animals, including humans. Papers may be field, laboratory or theoretical studies. Preference is given to studies that are likely to be of interest to the broad readership of the Journal and that test explicit hypotheses rather than being purely descriptive.

##### Reviews

These should address fundamental issues relating to behaviour and provide new insights into the subject(s) they cover. Original interdisciplinary syntheses are especially welcome. Reviews should be no longer than 6000 words (excluding references) and should include an abstract of up to 300 words. In the first instance, a preliminary outline of up to 600 words should be submitted online (see Contact details for submission below). The decision as to whether to proceed to a full review then rests with the Executive Editors or invited advisers. Contributions submitted on this basis will be subjected to the same refereeing process as normal manuscripts.

##### Essays

These should address fundamental issues relating to behaviour and provide new insights into the subject(s) they cover. In contrast to Reviews, Essays provide an opportunity for authors to express opinions, consider the subject area in a historical context and speculate on its future development. Essays should be no longer than 6000 words (excluding references) and should include an abstract of up to 300 words. In the first instance, a preliminary outline of up to 600 words should be submitted online (see Contact details for submission below). The decision as to whether to proceed to a full essay then rests with the Executive Editors or invited advisers. Contributions submitted on this basis will be subjected to the same refereeing process as normal manuscripts.

##### Commentaries

The Commentaries section of the Journal provides an opportunity to raise issues of general importance to the study of behaviour, including statistical analysis, theory, methodology and ethics. Unless there are clearly broader implications for the study of behaviour as a whole, critiques of particular papers or issues of more local interest should be reserved for the Forum section (see below). Decisions as to whether borderline submissions are more appropriate to the Commentaries or Forum section rest with the Executive Editors. Contributions should be brief, normally not more than six printed pages, and should not contain an abstract. Methodological contributions may be longer, and may contain an abstract, subject to the discretion of the Executive Editors. The

initial decision as to prima facie merit rests with the Executive Editors or invited advisers. Contributions with prima facie merit are subjected to the same refereeing process as normal manuscripts, but responses or complementary articles may be solicited by the Executive Editors at their discretion. Other contributions are returned unrefereed to the author(s).

#### Forum

The Forum section is published on ScienceDirect with contributions listed in the contents of the relevant hardcopy issue and cited as indicated in References below. The section accepts critiques of published papers relevant to the areas of interest of the Journal, and provides an opportunity for constructive exchanges on issues surrounding particular fields of study. Submission, review and acceptance procedures are as for Commentaries (see above), but there is no word limit. In the case of Forum critiques of published papers, the author(s) of the target article must be contacted and trivial points of difference or misunderstanding resolved; this correspondence must be submitted in a cover letter accompanying the Forum article.

More general correspondence on matters relating to behavioural research is published, unrefereed, in the newsletters of ASAB and ABS. Such correspondence should be sent to the newsletter editors: Dr. Lisa M. Collins, Queen's University Belfast, Department of Biological Sciences, Medical Biology Centre, 97 Lisburn Road, Belfast, UK, email: [asabnewslettereditor@gmail.com](mailto:asabnewslettereditor@gmail.com)) for ASAB; Regina H. F. Macedo, Departamento de Zoologia, Universidade de Brasilia, Brasilia DF 70910-900, Brazil (fax: +55 61 3274 1141; email: [rhfmacedo@unb.br](mailto:rhfmacedo@unb.br)) for ABS.

#### Single and double blind peer review

Animal Behaviour has instituted a double-blind peer review process (i.e., where neither the authors' nor the reviewers' identities are known to each other). Reciprocal anonymity is suggested to provide a more objective and potentially less biased assessment of manuscripts, and help ensure that the process is fair to both junior and well-established scientists. The switch to double-blind review requires some changes to editorial procedures, and we ask potential authors to pay close attention to our revised submission guidelines. Our policy with respect to reviewers is to allow them to waive anonymity if they wish, and in accord with this, authors may also choose to submit their papers without being blinded, giving both authors and reviewers maximum flexibility in how they wish their work and comments to be assessed. Animal Behaviour is one of the foremost journals in its field, and the implementation of double-blind review aims at ensuring our reputation for integrity, fairness and openness to new ideas.

#### Contact details for submission

Authors should submit manuscripts online to <http://ees.elsevier.com/anbeh>. When submitting online, authors are requested to select the article type (Research paper, Review, Essay, Review/Essay Proposal, Commentary, Forum). Each category of article is further divided into US and UK articles (e.g. US Research paper, UK Research paper, etc.) depending on whether the US or

UK Editorial Office is responsible for processing the manuscript. Authors whose current address is in the Americas, or neighbouring islands, or who are members of the Animal Behavior Society should select the US article types and authors in other geographical areas or who are members of the Association for the Study of Animal Behaviour should select the UK article types. Hard copies are not required in addition to copies submitted online. Authors who are submitting a manuscript online for the first time should read the Author Tutorial on the submission site. For enquiries relating to submissions via EES, please contact the Journal Manager at Elsevier via email ([yanbe@elsevier.com](mailto:yanbe@elsevier.com)).

For other general correspondence:

The address of the UK office is: Dr A.K. Turner, Managing Editor, Animal Behaviour Editorial Office, School of Life Sciences, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD, U.K. (fax: (0) 115 9 513 249, email: [angela.turner@nottingham.ac.uk](mailto:angela.turner@nottingham.ac.uk)).

The address of the US office is: Kris Bruner, Managing Editor, Animal Behavior Society Central Office, Indiana University, 402 N. Park Avenue, Bloomington, IN 47408-3828, U.S.A. (fax: 812 856 5542; email: [krbruner@indiana.edu](mailto:krbruner@indiana.edu)).

Correspondence about book reviews handled through the North American office should be sent to: Dr P. Loesche, Department of Psychology, Box 351525, University of Washington, Seattle, WA 98195, U.S.A. (email: [loes@uw.edu](mailto:loes@uw.edu)).

Resubmitted manuscripts should also include a detailed explanation of how the author has dealt with each of the reviewers' and Editor's comments. These comments should be uploaded as 'Revision Comments' on EES.

## BEFORE YOU BEGIN

### Ethics in publishing

Animal Behaviour publishes papers by scientists conducting research at locations around the globe. Publication is, therefore, based upon mutual trust between publisher and authors. Professional integrity in the conduct and reporting of research is an absolute requirement of publication in the journal, as is a willingness to share information with other members of the scientific community. Consequently, as a condition of publication in Animal Behaviour, authors must agree both to honour any reasonable request for materials or methods needed to verify or replicate experiments reported in the journal and to make available, upon request, any data sets upon which published studies are based. Anyone who encounters a persistent refusal to comply with these guidelines, or has reason to suspect some other departure from acceptable standards of scientific conduct, should contact the appropriate Executive Editor (European or American) of the journal. The Executive Editor will act in accordance with the guidelines of the U.K. Committee on Publication Ethics (<http://www.publicationethics.org.uk>) (European Editor) or the Animal Behavior Society Code of Ethics (North American Editor) and may inform an author's institution of a purported infraction. Statements on scientific integrity by the Association for the Study of Animal Behaviour and Animal Behavior Society can

be found at, respectively, <http://www.asab.org> and <http://.animalbehaviorsociety.org>.

#### Originality and plagiarism

As noted in Elsevier's publishing and ethical guidelines, authors should ensure that they have written entirely original works. If authors have used the work and/or words of others, please ensure that this has been appropriately cited or quoted.

Plagiarism takes many forms, from 'passing off' another's paper as the author's own paper, to copying or paraphrasing substantial parts of another's paper (without attribution), to claiming results from research conducted by others. Plagiarism in all its forms constitutes unethical publishing behavior and is unacceptable. All manuscripts are automatically put through a plagiarism check program and flagged results are evaluated individually.

For further information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication, see also <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### Animal welfare

The research should adhere to the ASAB/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research (updated in each January issue of the Journal and on the Journal [Web site:](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/ASAB2006.pdf)

[http://www.elsevier.com/framework\\_products/promis\\_misc/ASAB2006.pdf](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/ASAB2006.pdf)), the legal requirements of the country in which the work was carried out, and all institutional guidelines. The Guide to Ethical Information Required for Animal Behaviour [Papers](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/ethyanbe.doc) ([http://www.elsevier.com/framework\\_products/promis\\_misc/ethyanbe.doc](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/ethyanbe.doc))

should be consulted and its requirements met. ASAB and ABS endorse the ARRIVE guidelines for reporting experiments using live animals (<http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=1206&page=1357&skin=0>).

Animal Behaviour has exceptionally high standards for animal care for both vertebrates and invertebrates. In addition to the usual requests for permit and agency approval numbers, we would frequently like more information to address concerns that the animals were treated as well as possible given the constraints of the experimental design.

#### Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

#### Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or

academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Animal Behaviour will not consider submissions that have been published elsewhere, nor will it republish data found in other publications, unless the data are re-evaluated to provide new information not found in the original. Abstracts that both appear in published conference proceedings with ISBNs or ISSNs, such as special editions of journals, and provide explicit quantitative summaries of the key results, are considered as prior publication. Overlap between submitted manuscripts and published abstracts containing qualitative descriptions of the manuscript will be allowed, provided that such abstracts are not verbatim reproductions of the abstract contained within the submitted manuscript. Include all abstracts and other published materials in a cover letter accompanying the submitted manuscript on EES.

#### Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

#### Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

#### For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

#### Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article in the Acknowledgments section of the manuscript. Funding body agreements and policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
  - An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder
- Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for Open Access in this journal is \$2,200, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language and language services

Manuscripts should be written in British English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Papers that are accepted but incorrectly prepared or whose English is poor, may also be subject to delays in the press. After acceptance, the Editorial Offices will edit papers in accordance with the house style and will help authors to communicate effectively. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission please visit

<http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

#### Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Before submitting online, make sure you have the following details: all authors' names and addresses and their permission to proceed with submission, the details of any licences/permits/institutional approval you had for the study, suggestions for referees and any opposed referees. You will need to upload a cover letter, title page, acknowledgments and manuscript.

#### Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anbeh>.

#### Referees

Please submit, with the manuscript, the names and e-mail addresses of 4 potential referees.

In case of double blind peer review, please make sure that all text that may reveal your identity is excluded from the source files.

#### PREPARATION

##### Language

Please write your text in good English (British usage only is accepted). Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

##### Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. Microsoft Word is preferred; pdfs are not acceptable. See <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/howtosubmitpaperfor> a guide to formatting documents, including LaTeX.

The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible.

Type all manuscripts with double line spacing and aligned left, including the abstract, references, figure legends and tables.

Use a font size of 11 or larger.



Manuscripts should have continuous line numbers, page numbers and wide margins throughout (including the abstract, references, figure legends and tables).

Indent each new paragraph.

Use consistent punctuation; insert only a single space between words and after punctuation.

Type text without end-of-line hyphenation, except for compound words. Use initial capitals only for proper names (e.g. names of people, places or proprietary products), not for animals or for words such as 'experiment' or 'group'. Initial capitals may be used to label categories of behaviour or specifically defined measures. Do not use italics for these, for emphasis or for foreign words.

Use two returns to end headings and paragraphs.

Do not use lower-case 'l' (el) for '1' (one) or 'O'(oh) for '0' (zero); they have different typesetting values. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text". The usual main headings for Research papers are: Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References (no heading is used for the Abstract or Introduction). Papers should not be forced to fit into this pattern of headings, however, if they do not naturally do so. Type main headings in capitals on a separate line on the left of the page. Type subheadings in italics at the left of the page on a separate line, and begin the main words with a capital letter. Type sub-subheadings in italics on a new line, aligned full left. Start the text on a new line after subheadings and sub-subheadings. When presenting multiple experiments, authors may use main headings for the titles of each experiment,

with the Methods and Results of each experiment listed as subheadings. Try to keep subheadings short enough to fit within a single column.

#### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The Introduction should be brief, not normally exceeding two manuscript pages. Keep references to a minimum by citing reviews rather than primary research papers where appropriate.

#### Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Give the names and addresses of companies providing trademarked products. Always state sample sizes (the number of animals used in the study) and the age, sex, breed/strain and source of animals. Full details of testing or observational regimes should be given. If captive animals were used, include details of housing conditions relevant to the study (e.g. cage size and type, bedding, group size and composition, lighting, temperature, ambient noise conditions, maintenance diets) both during the study and during any period before the study that might bear on the results. The Methods section may also contain a description of the kinds of statistics used and the activities that were recorded. Ethical note. Where ethical considerations arise from the study, these should be addressed in the Methods, either in the main Methods section itself (where the additional discussion is relatively minor), or in a separate subsection of the Methods headed Ethical note. Any ethical implications of the experimental design and procedures should be identified, and any licences acquired to carry out the work specified. Procedures that were taken to minimize the welfare impact on subjects, including choice of sample sizes, use of pilot tests and predetermined rules for intervention, should be described. Any steps taken to enhance the welfare of subjects (e.g. through 'environmental enrichment') should also be indicated. If the study involved keeping wild animals in captivity, state for how long the animals were captive and whether, where and how they were returned to the wild at the end of the study.

#### Results

Results should be clear and concise. This section should include only results that are relevant to the hypotheses outlined in the Introduction and considered in the Discussion. The text should complement material given in Tables or Figures but should not directly repeat it. Give full details of statistical analysis either in the text or in Tables or Figure legends. Include the type of test, the precise data to which it was applied, the value of the relevant statistic, the sample size and/or degrees of freedom, and the probability level. Number Tables and Figures in the order to which they are referred in the text. Means and standard errors/standard deviations (and medians and interquartile

ranges/confidence limits), with their associated sample sizes, are given in the format  $X \pm SE = 10.20 \pm 1.01$  g,  $N = 15$ , not  $X = 10.20$ ,  $SE = 1.01$ ,  $N = 15$ .

For significance tests, give the name of the test followed by a colon, the test statistic and its value, the degrees of freedom or sample size (whichever is the convention for the test) and the P value (note that F values have two degrees of freedom). The different parts of the statistical quotation are separated by a comma. Note use of italics for F, P, N and other variables.

If the test statistic is conventionally quoted with degrees of freedom, these are presented as a subscript to the test statistic. For example:

ANOVA:  $F_{1,11} = 7.89$ ,  $P = 0.017$

Kruskal-Wallis test:  $H_{11} = 287.8$ ,  $P = 0.001$

Chi-square test:  $\chi^2_{22} = 0.19$ ,  $P = 0.91$

Paired t test:  $t_{12} = 1.99$ ,  $P = 0.07$

If the test is conventionally quoted with the sample size, this should follow the test statistic value.

For example:

Spearman rank correlation:  $r_s = 0.80$ ,  $N = 11$ ,  $P < 0.01$

Wilcoxon signed-ranks test:  $T = 6$ ,  $N = 14$ ,  $P < 0.01$

Mann-Whitney U test:  $U = 74$ ,  $N_1 = N_2 = 17$ ,  $P < 0.02$

P values for significant outcomes can be quoted as below a threshold significance value (e.g.  $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ), but wherever possible should be quoted as an exact probability value. Departure from a significance threshold of  $0.05$  should be stated and justified in the Methods. Marginally nonsignificant outcomes can be indicated as exact probability values or as  $P < 0.1$ . Nonsignificant outcomes should be indicated with an exact probability value whenever possible, or as NS or  $P > 0.05$ , as appropriate for the test.

State whether a test is one tailed or two tailed (or specific or nonspecific in the case of Meddis' nonparametric ANOVAs). One-tailed (or specific) tests should be used with caution. Their use is justified only when there are strong a priori reasons for predicting the direction of a difference or trend and results in the opposite direction can reasonably be regarded as equivalent to no difference or trend at all. Authors are referred to Kimmel (1957, *Psychological Bulletin*, 54, 315-353).

Do not quote decimals with naked points, for example quote  $0.01$ , not  $.01$ , or normally to more than three decimal places (the exception being P values for significance tests, which may be quoted to four decimal places where appropriate, e.g.  $0.0001$ ).

Regressions and analyses of variance. The significance of regressions should be tested with F or t but not the correlation coefficient r.  $R^2$  should be quoted with both regressions and parametric analyses of variance.

Multiple range tests. Unplanned multiple range tests following ANOVA should be avoided unless their appropriateness for the comparisons in question is verified explicitly. Authors are referred to the review by Day and Quinn (1989, *Ecological Monographs*, 59, 433-463).

Power tests. Where a significance test based on a small sample size yields a nonsignificant result, explicit consideration should be given to the power of the data for accepting the null hypothesis. Authors are referred to Thomas and Juanes (1996, *Animal Behaviour*, 52, 856-859) and Colegrave and Ruxton (2003, *Behavioral Ecology*, 14, 446-447) for guidance on the appropriate use of power tests. Providing a value for power based on a priori tests is preferred. Values of observed power are not appropriate. Authors should consider effect sizes and their confidence intervals in drawing conclusions regarding the null hypothesis.

Transformations. Where data have been transformed for parametric significance tests, the nature of the transformation and the reason for its selection (e.g. log x, x<sup>2</sup>, arcsine) should be stated.

#### Discussion

It is often helpful to begin the Discussion with a summary of the main results. The main purpose of the Discussion, however, is to comment on the significance of the results and set them in the context of previous work. The Discussion should be concise and not excessively speculative, and references should be kept to a minimum by citing review articles as much as possible.

#### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, as a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as 1, 2, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: equation (A1), equation (A2), etc.

#### Essential title page information

Title. This should be brief and informative, and should not exceed 120 characters. Avoid abbreviations, as well as part numbers unless the papers are to be published consecutively in the same issue of the Journal.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g. a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Affiliations should not include street, box number, postal (zip) code, country (when that is obvious) or city, state, province, etc., when that is redundant with the University name.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Correspondence. At the bottom of the page, give the full postal address and e-mail address (if desired) of the corresponding author and the present addresses of any co-authors if different from their affiliations; e-mail addresses of co-authors may also be given.

Word count. Include a word count for the text.

Reviews. These should address fundamental issues relating to behaviour and provide new insights into the subject(s) they cover. Original interdisciplinary syntheses are especially welcome. Reviews should be no longer than 6000 words (excluding references) and should include an abstract of up to 300 words. In the first instance, a preliminary outline of up to 600 words should be submitted online (as a Review proposal). The decision as to whether to proceed to a full review then rests with the Executive Editors of invited advisers. Contributions submitted on this basis will be subjected to the same refereeing process as normal manuscripts.

Essays. These should address fundamental issues relating to behaviour and provide new insights into the subject(s) they cover. In contrast to Reviews, Essays provide an opportunity for authors to express opinions, consider the subject area in a historical context and speculate on its future development. Essays should be no longer than 6000 words (excluding references) and should include an abstract of up to 300 words. In the first instance, a preliminary outline of up to 600 words should be submitted online (as an Essay proposal). The decision as to whether to proceed to a full essay then rests with the Executive Editor or invited advisers. Contributions submitted on this basis will be subjected to the same refereeing process as normal manuscripts.

Title document

The title document should contain the title of the article, all affiliations of the corresponding author and co-authors and the corresponding author's address. In case of double blind peer review, this information should not appear in any other file, in order not to yield the authors identity to the reviewer.

Abstract

The Abstract should describe the purpose of the study, outline the major findings and state the main conclusions. It should be concise, informative, explicit and intelligible without reference to the text. Abstracts should usually be limited to 300 words. Use both common and scientific names of animals at first mention in the Abstract unless they are given in the title. Avoid using references; if used, give the journal name, volume and page numbers, or the book title and publisher.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal for research articles, essays, reviews, commentaries and forum articles. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters including spaces and each bullet point should be on a separate line). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide up to 10 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for

example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field at their first mention in the abstract and the main text. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

#### Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

#### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. Single-letter variables should be italics. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text.

#### Footnotes

Use footnotes only to add information below the body of a Table.

#### Artwork

##### Image manipulation

While it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or colour balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

##### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications

please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); otherwise, the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Colour artwork

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting colour figures to "greyscale" (for the printed version should you not opt for

colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### Tables

Number tables consecutively, with Arabic numerals, in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript symbols. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Do not divide tables into two or more parts. Tables should not contain vertical rules, and the main body of the table should not contain horizontal rules. Large tables should be narrow (across the page) and long (down the page) rather than wide and short, so that they can be fitted into the column width of the Journal.

#### References

##### Citations in the text

Check that all references in the text are in the reference list and vice versa, that their dates and spellings match, and that complete bibliographical details are given, including page numbers, names of editors, name of publisher and full place of publication if the article is published in a book. References cited in the Abstract must be given in full. Unpublished results are not recommended in the reference list. If these references are included in the reference list, they should follow the standard reference style of the journal. Check foreign language references particularly carefully for accuracy of diacritical marks such as accents and umlauts. For papers in the course of publication, use 'in press' to replace the date and give the journal name in the references.

##### Web references

Because of the ephemeral nature of many Web sites, other Web citations will be reviewed by the Editors to ensure they are appropriate to an archival journal. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

##### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal



template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

#### Reference style

Text citations: Follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Fifth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, U.S.A. or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, U.K.

For text citations with:

- (a) One or two authors: give each author's surname and the year of publication.
- (b) Three to five authors: give each author's surname and the year of publication at first mention; at subsequent mention, give the first author's surname followed by "*et al.*" and the year of publication. (exception: when two or more sources shorten to the same form (i.e. they have the same primary author but different multiple coauthors), list as many of the coauthors' surnames as needed to distinguish between the sources, followed by a comma and '*et al.*': Zuur, Ieno, *et al.*, 2009; Zuur, Walker, *et al.*, 2009).
- (c) Six or more authors: give the first author's surname followed by "*et al.*" and the year of publication (but see exception above).

Note that '*et al.*' is not in italics. Use a comma to separate the author from the date. Use lower-case letters to distinguish between two papers by the same authors in the same year (e.g. Packer, 1979a, 1979b). When two or more primary authors have the same surname, include the primary author's initials in all text citations (A. T. Smith & Ivins 1987; F. V. Smith & Bird 1964). List multiple citations in alphabetical, then chronological, order (e.g. Arnold, 1981a, 1981b; Halliday, 1978; Nussey *et al.*, 2011; Sih, in press-a, in press-b; Zuur, Ieno, Walker, Saveliev, & Smith, 2009), using a semicolon to separate each reference. In running text, use 'and' instead of '&' before the final name in a multiple author citation: 'as described in Smith and Jones (2013)'.

#### Reference List:

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. For sources with more than six authors, include the surnames and initials of the first six authors, followed by '*et al.*'. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication "(2012a)". In press sources by the same author(s) must be identified as "(in press-a)", "(in press-b)", etc.

#### Examples:

Reference to a periodical:

Buttelmann, D., Carpenter, M., Call, J., & Tomasello, M. (in press). Chimpanzees, Pan troglodytes, recognize successful actions, but fail to imitate them. *Animal Behaviour*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.07.015>

Robinson, M. H., & Robinson, B. (1970). The stabilimentum of the orb web spider, *Argiope argentata*: An improbable defense against predators. *Canadian Entomologist*, 102, 641-645.

Reference to a book:

Bailey, N. J. (1981). *Statistical methods in biology*(2nd ed.). London, UK: Unibooks.

Reference to an article in an edited book:

Emlen, S. T. (1978). The evolution of cooperative behaviour in birds. In J. R. Krebs, & N. B. Davies (Eds.), *Behavioural ecology*(pp. 245-281). Oxford, UK: Blackwell Scientific.

Ketterson, E. D., Nolan, V., Jr., Casto, J. M., Buerkle, C. A., Clotfelter, E. D., Grindstaff, J. L., 'et al.' (2001). Testosterone, phenotype, and fitness: A research program in evolutionary behavioral endocrinology. In A. Dawson & C. M. Chaturvedi (Eds.), *Avian endocrinology*(pp.19 – 40). New Delhi: Narosa.

Reference to a thesis:

Bower, J. L. (2000). *Acoustic interactions during naturally occurring territorial conflict in a song sparrow neighborhood*(Doctoral dissertation, Cornell University, Ithaca, NY, USA).

Brewis, J. M. (1981). *The population dynamics and growth of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* in an aqueduct in Northumbria* (Doctoral thesis, Durham University, Durham, UK). Retrieved from <http://etheses.dur.ac.uk/7546/>

Note that journal titles in the reference list should be written in full.

For publications in any Latin script language other than English, give the original title and, in brackets, the English translation. Titles of publications in non-Latin scripts should be transliterated. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

Cite "personal communications" in the text only. Provide the initials and surname(s) for personal communications and give the date of the personal communication (as exact as possible), separated by a comma (A. Smith, personal communication, 9 September 2013).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can

choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see <http://www.elsevier.com/googlemaps>.

#### Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-andwhite in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

#### AFTER ACCEPTANCE

##### Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

##### Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader© version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and

return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

#### Author's discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

#### AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

## Anexo 2

### Normas para publicação no periódico Freshwater Biology

#### Author Guidelines

#### **ELECTRONIC SUBMISSION**

All manuscripts should be submitted through the *Freshwater Biology* – ScholarOne Manuscripts (S1M) web site: <http://mc.manuscriptcentral.com/fwb>.

The corresponding author will need to create an account (top left hand corner) the first time he/she accesses the site, and will be asked to provide full contact details. *Freshwater Biology* – S1M will then create a user name and password which should be retained for future access to the site. Once the author is logged into the system, the Main Menu will be displayed. Clicking on the Author Centre will bring up instructions for uploading the manuscript and associated files. However, all diagrams, tables and figures must be uploaded as separate files. As part of the submission process, any uploaded files will then be converted into journal specific PDF and HTML versions (with covering page) which you will be required to open and check before submitting. After submission, you will receive an acknowledgment within a few minutes. All subsequent correspondence regarding the manuscript will be handled by e-mail.

If the author is absolutely unable to submit the manuscript through *Freshwater Biology* – S1M, he/she should contact Professor Alan Hildrew ([a.hildrew@qmul.ac.uk](mailto:a.hildrew@qmul.ac.uk)) or Professor Colin Townsend ([colin.townsend@otago.ac.nz](mailto:colin.townsend@otago.ac.nz)) by e-mail.

#### **SPECIAL ISSUES**

*Freshwater Biology* publishes two-three themed issues yearly. Visit the [Special Issues](#) page for more information. Only papers for those Special Issues that have been agreed with the Special Issues Editor ([Professor Dave Strayer](#)) should be submitted via *Freshwater Biology* – S1M. Guest Editors should consult the [Guidelines for Guest Editors of Special Issues](#).

#### **REQUIRED INFORMATION**

*Freshwater Biology* – S1M will require Authors to confirm the following:

- (i) that the work as submitted has not been published or accepted for publication, nor is being considered for publication elsewhere, either in whole or substantial part.
- (ii) that the work conforms to the legal requirements of the country in which it was carried out, including those relating to conservation and welfare, and to the journal's policy on these matters ([see above](#)).
- (iii) that all authors and relevant institutions have read the submitted version of the manuscript and approve its submission.
- (iv) that all persons entitled to authorship have been so included.

Manuscripts must be in English and spelling should conform to the *Concise Oxford Dictionary of Current English*. Editors reserve the right to modify manuscripts that do not conform to scientific, technical, stylistic or grammatical standards, and minor alterations of this nature will normally be seen by authors only at the proof stage.

## PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

A single file should be prepared containing the title page, summary, text, acknowledgments, references and tables (see guidelines below). Additional files may be created for each figure. Microsoft Office 2007/2010 file formats (i.e. .docx, .xlsx etc.) are acceptable on S1M.

- Please leave the right-hand margin unjustified
- Turn the hyphenation option off
- Use tabs, not spaces to separate data in tables

(a) *Title page*. This should include the title, list of authors names, institute or laboratory of origin, name, postal address and email address of the author to whom proofs should be sent, an abbreviated title for use as a running head line and five keywords, which should be relevant for literature searching and each normally comprising not more than two words.

(b) *Summary*. All papers should include a summary, in short numbered paragraphs, limited to about 3% of the length of the text, and in any case to not more than 500 words. This should provide a concise statement of the scope of the work and its principal findings and be fully intelligible without reference to the main text.

(c) *Introduction*. This should contain a clear statement of the reason for doing the work, outlining essential background information but should not include either the results or conclusions.

(d) *Methods*. This should be concise but provide sufficient details to allow the work to be repeated. **Product and manufacturer names:** Where specific named materials/products are mentioned or named equipment used (including software packages), these should be identified by their manufacturer, followed by the manufacturer's location (e.g. town, state, country), or a source reference should be given if a standard or replicated procedure is being followed.

(e) *Results*. This should not include material appropriate to the Discussion.

(f) *Discussion*. This should highlight the significance of the results and place them in the context of other work.

(g) *Acknowledgments*.

(h) *References*.

(i) *Tables*.

(j) *Figure legends*.

(k) *Illustrations*. The original drawings should not be sent until the Editor requests them.

Please see section '[Tables, Figures and Illustrations](#)' for further information on electronic submission of artwork.

There are no formal limits to the length of papers, but page space in the journal is tight, and most papers (except review articles) should be no longer than 9,000 words in total (text plus references, excepting Figs and Tables).

## **ABBREVIATIONS AND UNITS**

Full names with uncommon abbreviations must be given with the first mention; new abbreviations should be coined only for unwieldy names and should not be used at all unless the names occur frequently. In the title and summary unusual abbreviations should be identified, in the introduction and discussion they should be used sparingly. SI units are preferred. Contributors should consult the Royal Society pamphlet *Quantities, Units and Symbols* (1975) and the IBP pamphlet *Quantities Units and Symbols for IBP Synthesis* (1975).

## **SCIENTIFIC NAMES**

The complete scientific name (genus and species) should be cited for every organism when first mentioned. Subsequent to its first appearance in the text, the generic name may be abbreviated to an initial except where intervening references to other genera would cause confusion. Common names of organisms, if used, must be accompanied by the correct scientific name on first mention. Scientific (e.g. Latin) names should be italicized.

Naming authorities need not be given, except in cases where the species identity is a focus of the scientific content (for instance where identity is being established, or is controversial or in question). In such cases naming authorities should be given only on first mention and should not be given in the title or summary. Tables are often useful in collating specific names and, if used in this way, should be referred to early in the text.

## **REFERENCES**

**References in articles** - We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

In the text, references should be made by giving the author's name with the year of publication, with one or both in parentheses. Thus, 'Smith (2002) found that...' OR 'Fish were found mainly in deep water (Smith, 2002)'. The same style is used for two-author papers. When reference is made to a work by three authors, all names should be given when cited for the first time and thereafter using only the first name and adding "*et al.*". For four or more authors, the first



name followed by "et al." should be used on all occasions. If several papers by the same author(s) and from the same year are cited -- a, b, c, etc., should be put after the year of publication. In the reference list, provide all authors for papers with six and fewer authors. For papers with more than six authors, list the first six authors followed by "et al.". References should be listed in alphabetical order at the end of the paper in the following standard form:

Avise J.C. (1994a) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.

Avise J.C. (1994b) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. PhD Thesis, Chapman University, New York.

Cornut J. E., Elger A., Lambrigot D., Marmonier P. M. & Chauvet E. (2010) Early stages of leaf decomposition are mediated by aquatic fungi in the hyporheic zone of woodland streams. *Freshwater Biology*, **55**, 2541-2556.

Simon C. (1991) Molecular systematics at the species boundary. In: *Molecular Techniques in Taxonomy* (Eds G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston & J.P.W. Young), pp. 33–71. NATO ASI Series, Vol. 57. Springer-Verlag, Berlin.

Simon C. (1992) Molecular systematics. In: *Proceedings of First International Symposium on Molecular Techniques in Taxonomy* (Ed. J.C. Avise), pp. 23–34. Denton, Texas, 4–6 November 1992. Springer, Berlin.

Titles of journals should not be abbreviated. Unpublished material, except for PhD theses, should not be included among the references, but should be cited as 'X. Xxxxx, unpubl. data' in the text.

## TABLES, FIGURES AND ILLUSTRATIONS

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals with a fully informative caption as a heading. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. Vertical lines should not be used to separate columns. Electronic tables should be provided in an editable format (.rtf or .doc). All illustrations (including photographs) are classified as figures and should be numbered consecutively.

Authors should submit artwork electronically. **Photographs** should be saved at 300 d.p.i. in TIF format, or in JPG format with low compression. **Line figures** should preferably be submitted in vector graphics format, and either embedded as such in a Word document or saved in PDF or EPS format. If this is not possible, they should be saved separately as pixel-based graphics at 600 d.p.i. (at the required print size) and saved in TIF (not JPG) format, or embedded as such in a Word document. **Combination figures** (e.g. with photographic and line/text content) should be prepared as for line figures. For help in preparing your figures please go to our Electronic Artwork Information page [here](#).

In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

## COLOUR ILLUSTRATIONS

It is the policy of Freshwater Biology for authors to pay the full cost for the reproduction of their artwork in colour in print. The cost of colour printing is 150 GBP for the first figure and all subsequent figures 50 GBP each. Therefore, please complete and return a Colour Work Agreement form before your paper can be published. This form is required only for figures to be processed in colour in print and can be downloaded as a PDF\* [here](#). If you are unable to download the form, please contact the Production Editor at [fwb@wiley.com](mailto:fwb@wiley.com) and you will be emailed or faxed a form.

The Colour Work Agreement Form must be returned ONLY by post to the Publisher's office.

Publisher's office:

Customer Services (OPI)

John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre

New Era Estate

Oldlands Way

Bognor Regis

West Sussex

PO22 9NQ

UK

For queries pertaining to colour figure charges, please approach the [Production Editor](#).

\* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, it is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

## SUPPORTING INFORMATION

Supporting Information can be published as web materials on the Freshwater Biology web site at the Editor's discretion. Note that if material is integral to the article it should be published as part of the article and not as Supporting Information. Supporting Information must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the journal. Supporting Information may include raw data in tables, more detailed versions of tables containing information of use to specialists but not necessary to understand the article, long species lists, detailed site information and distribution maps, descriptions of complex models, worked examples of complex statistical procedures, etc. Where there is

Supporting Information, the printed paper will carry a brief title succinctly describing the contents of each item (e.g. Fig. S1, S2; Table S1 etc). It should not normally exceed 50 words. Such brief titles should be listed together after the references section of the main paper. A full, self explanatory title, with further details and definitions, should then accompany the Supporting Information file itself, and will appear in the online version of the paper only. In preparing the main text, Supporting Information should be cited just as other Figs and Tables. On first mention, please cite as, for instance "... (see Appendix S1 in Supporting Information). Subsequent references to further items of Supporting Information can be cited as, for instance, "... (see Table S1).

In order to provide long term access to Supporting Information, such material must be mounted on the Freshwater Biology web site rather than on authors' sites. The Supporting Information will be accessible by hot links from the on-line version of Freshwater Biology. Authors should note that Supporting Information is merely 'linked' to the article but will not be organised into any easily searched database; nor will it be subject to copy-editing. Authors are responsible for the preparation of Supporting Information, which should be supplied in a format that will be most accessible by readers. It is published as supplied by the author and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For more information, please see our guidelines at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>. Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database, such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh ([www.freshwaterbiodiversity.eu](http://www.freshwaterbiodiversity.eu)).

## **WELFARE AND LEGAL POLICY**

Researchers must have proper regard for conservation and animal welfare considerations. Attention is drawn to the 'Guidelines for the Use of Animals in Research' published in each January issue of the journal *Animal Behaviour* since 1991. Any possible adverse consequences of the work for populations or individual organisms must be weighed against the possible gains in knowledge and its practical applications. Authors are required to sign a declaration that their work conforms to the legal requirements of the country in which it was carried out ([see below](#)), but editors may seek advice from referees on ethical matters and the final decision will rest with the editors.

## **AUTHOR MATERIAL ARCHIVE POLICY**

Please note that unless specifically requested, **Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication**. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

## **EARLY VIEW**

Freshwater Biology is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

## **PROOFS**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof.

## **OFFPRINTS**

The final PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and will be available via Wiley Blackwell Author Services only. Please register for free access by visiting <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> and enjoy the many other benefits the service offers. The PDF offprint may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

## **AUTHOR SERVICES**

Online production tracking is now available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their

article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [this page](#) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

## LICENSING AGREEMENTS

Within a few days of receipt of the accepted paper by the publisher from the Editorial Office, the corresponding author will receive an email via Wiley's [Author Services](#) asking them to log in and presenting them with the appropriate license for completion. The corresponding author should complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement:

(a) If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs at [CTA Terms and Conditions](#)

(b) If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution-NonCommercial License OAA
- Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License OAA

For authors funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK):

If you choose OnlineOpen, you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license, which means that you will comply with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement> and view this [video](#).

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the [Copyright FAQs](#) hosted on Wiley Author Services.

For more information regarding Creative Commons License, please visit [Copyright & License](#) hosted on Wiley Open Access.

Authors who did not select OnlineOpen when they originally accessed the copyright form via Author Services but who subsequently wish to make their articles open access should see the section [OnlineOpen](#). Similarly, authors who

wish to switch to the OnlineOpen selection after their article is published online as Early View should see the section [OnlineOpen](#).

#### **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

#### **ONLINEOPEN**

With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms). Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp).

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.