

## MUDANÇA DE COLORAÇÃO DE ACORDO COM O SUBSTRATO EM *Crenuchus spilurus* GUNTHER, 1863 (CHARACIFORMES: CRENUCHIDAE)

Kalebe da Silva PINTO<sup>1</sup>

T. H. S. PIRES<sup>2</sup>

Jansen Alfredo Sampaio ZUANON<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq <sup>2</sup>Orientador CBIO/INPA

<sup>3</sup>Orientador CBIO/INPA.

### INTRODUÇÃO

Camuflagem (i.e. assemelhar-se com o ambiente circundante) é uma estratégia comumente vista na natureza e pode servir a diversas finalidades. Por exemplo, predadores podem se tornar inconspícuos para evitar afugentar suas presas. Contudo, a camuflagem é mais comumente vista na natureza como forma de defesa, na qual as presas evitam atrair a atenção de predadores (Ryer *et al.* 2008).

Ser inconspícuo aos predadores depende primariamente do ambiente circundante. Formas simples de se obter camuflagem podem ocorrer por meio da seleção de habitat, onde indivíduos selecionam locais que são mais parecidos com o seu padrão de coloração (Scott 2005), ou a camuflagem, onde o indivíduo altera seu padrão de colorido, para se assemelhar aos padrões do ambiente em que se encontra (Healey 1999). A seleção de hábitat consiste em uma escolha ativa de ambiente que, de alguma forma, possa beneficiar a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos (Krebs e Davies 1993). Já a camuflagem ocorre por meio de plasticidade fenotípica, através de mudanças da coloração corpórea do animal, conforme o ambiente em que ele se encontra (Scott 2005). Essa segunda forma é comumente reportada em peixes.

Muitas espécies de peixes modificam a coloração corpórea, se ajustando ao colorido do substrato predominante no ambiente. Boa parte da coloração vista nas escamas e pele dos peixes é proveniente de células pigmentares chamadas cromatóforos, que são classificadas com base nas cores que expressam (Kelsh 2004). Há os melanóforos, que através da melanina produzem pigmentos de cor preta ou marrom; os xantóforos, que através da pteridina ou carotenoides produzem a coloração amarela; e os eritróforos, que produzem a coloração vermelha (Kelsh 2004).

Neste trabalho nós investigamos a ocorrência de modificações na coloração do corpo como resposta à modificação do substrato no peixe *Crenuchus spilurus* (Characiformes: Crenuchidae). Esta espécie faz parte de uma das linhas de pesquisa do Projeto Igarapés, o qual busca entender os aspectos evolutivos e comportamentais da ictiofauna de igarapés da Amazônia. *Crenuchus spilurus* é uma espécie de pequeno porte que ocorre predominantemente em igarapés de primeira e segunda ordem, podendo viver em bacias de drenagens compostas por diferentes tipos de água: clara, branca ou preta (Pires 2012). Igarapés podem apresentar ambientes bastante heterogêneos, o que proporciona uma variedade de habitats aos organismos que o habitam. Esses ambientes incluem bancos de folhoso submerso, composto por folhas mortas e depositadas no substrato (de coloração predominantemente marrom), bancos de areia (de coloração predominantemente branca) e bancos de plantas aquáticas (predominantemente verdes), e ocorrem com frequência em igarapés íntegros. Em observações feitas em laboratório e em ambiente natural, notamos que a coloração de *C. spilurus* varia bastante, desde indivíduos com tonalidade amarelada até indivíduos amarronzados (mais escuros). Adicionalmente, foi notado que a tonalidade de vermelho na lateral do corpo dessa espécie pode variar conforme o local de origem do indivíduo. Com isso, acreditamos que o ambiente de entorno em que estes indivíduos ocupam pode influenciar na coloração corpórea e influenciar a distribuição e expressão dos cromatóforos de formas diferentes.

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de diferentes tipos de substratos sobre o padrão de coloração expresso por indivíduos de *C. spilurus*, sob condições experimentais controladas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta e manutenção dos peixes em laboratório*

Indivíduos de *C. spilurus* foram coletados em igarapés da região de Manaus. Em laboratório, os peixes foram mantidos em um aquário de 70 x 35 x 35 cm contendo, aproximadamente, 52 L de água aerada e filtrada e substrato composto por areia de cor predominantemente marrom. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes tropicais (Sera Vipagran tm).

### *Procedimento experimental*

Foram utilizados 23 Indivíduos, machos adultos ( $3,73 \pm 0,23$  cm de Comprimento Padrão - CP). Os testes foram realizados em um aquário de 100 x 20 x 20 cm, contendo aproximadamente 40 L de água. Esse aquário foi compartimentado em cinco seções por meio de quatro placas de vidro (Figura 1). Cada partição continha um tipo de substrato diferente. No primeiro compartimento havia substrato composto por areia marrom (igual ao substrato do aquário estoque de onde os peixes vieram), o terceiro compartimento continha substrato de areia preta; e o quinto compartimento continha substrato de areia branca. O substrato dos compartimentos 2 e 4 foi dividido ao meio, onde cada metade era idêntica ao substrato do compartimento adjacente (Figura 1). Essa subdivisão do substrato foi feita, pois as placas divisórias eram transparentes, e, portanto, havia contato visual do peixe com os compartimentos adjacentes, o que poderia influenciar a coloração corpórea dos peixes testados. Esses compartimentos intermediários não foram utilizados diretamente nos testes (ver abaixo).

Para o experimento, um peixe retirado aleatoriamente do aquário estoque era inserido no compartimento 1 por um período de 10 minutos. Após esse período de aclimação, o peixe foi fotografado dentro do aquário. Posteriormente, o peixe foi transferido para o compartimento 3, contendo areia preta, e após 10 minutos o peixe foi fotografado. Por último, o peixe foi transferido para o compartimento 5, que continha areia branca, e o mesmo processo de registro de imagens foi aplicado. Todas as fotografias foram tiradas de uma mesma distância. Após os experimentos, todos os peixes usados no experimento foram medidos com uso de paquímetro (acurácia= 0,01 mm) e em seguida colocados em um aquário de estoque diferente.

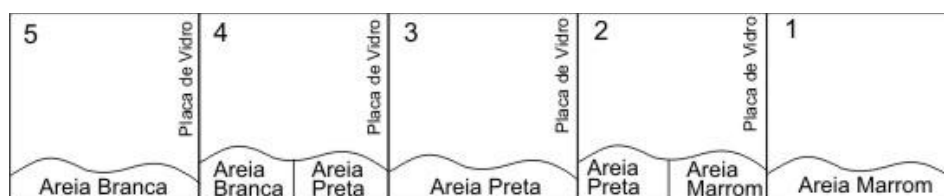


Figura 1. Desenho esquemático do aquário utilizado nos experimentos. (1) compartimento controle onde o indivíduo era inserido inicialmente, nesse compartimento continha areia marrom, o mesmo tipo de substrato dos aquários de estoque dos peixes utilizados no experimento; (3) compartimento que continha substrato de areia preta; (5) compartimento que continha substrato de areia branca; (2, 4) compartimentos que não recebiam o peixe, mas que continham substratos similares aos dos compartimentos adjacentes.

Com uso do software Adobe Photoshop Cs5, utilizamos as fotografias digitais para medir a coloração dos peixes. Para isso, utilizamos o sistema CIELAB, que gera medidas de cores de forma simplificada, ao resumir os vários componentes da cor através de fórmulas matemáticas, cobrindo todo o espectro visível pelo olho humano. Os valores são representados numa escala de valores positivos ou negativos (entre -100,0 a +100,0), sendo possível detectar pequenas diferenças de tonalidade numa determinada cor (Melgosa 1999). As medidas de coloração foram tomadas apenas na parte látero-superior direita do corpo do peixe (Figura 2). Um quadrante de 1 x 1cm era delimitado na imagem sobre o corpo do animal, e era calculada a média de 16 medidas de coloração nessa área. Esse processo foi aplicado para as três imagens obtidas de cada peixe sob os três tratamentos (= tipos de substrato).

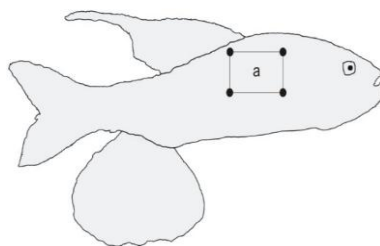


Figura 2. Desenho esquemático de um exemplar de *Crenuchus spilurus*, indicando o local de análise de nível de coloração. A área delimitada (a) demonstra o quadrante (1 x 1cm) na porção látero-superior direita do corpo do animal que foi utilizado para medir a coloração. Dentro deste quadrante, 16 medidas de coloração de escamas foram feitas, em pontos aleatórios, e a média desses valores representa a coloração, conforme o sistema CIELAB.

### Análises estatísticas

Dado que um mesmo indivíduo foi utilizado em diferentes momentos em três tratamentos, uma Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas foi aplicada. Cada indivíduo em uma das três situações experimentais (tipos de substrato) gerou três valores como respostas dos diferentes pigmentos (luminosidade = melanóforos, tonalidade vermelha = eritróforos e tonalidade amarela = xantóforos). Assim, a análise envolveu dois fatores (substrato e pigmento), em um modelo de ANOVA fatorial de medidas repetidas. Essa análise nos permite verificar uma possível influência do tratamento (mudança de substrato) em cada pigmento separadamente e também verificar a possível interação entre os fatores. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Os valores de significância (p) apresentados foram corrigidos pelo critério de Greenhouse-Geisser, que é bastante conservador e corrige casos em que a esfericidade é violada, embora apenas a interação entre os fatores tenha violado a esfericidade.

Nós conduzimos testes t pareados para verificar as diferenças dentro dos tratamentos (como sugerido por Field et al. 2012) (Tabela 2).

Todas as análises foram feitas utilizando o software livre R (R Core Team 2014) utilizando os pacotes qqplot2 para análises estatísticas (Lawrence 2013) e o pacote ggplot2 (Wickham 2009) para gerar o gráfico da Figura 3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nós detectamos uma variação significativa na expressão dos três pigmentos em cada tipo de substrato e uma influência da interação entre esses dois fatores (Tabela 1). Os resultados mostram que a mudança de substrato teve efeito sobre a pigmentação do peixe de forma geral. Além disso, os pigmentos responderam de forma diferente aos tratamentos.

Tabela 1. Resultados da ANOVA fatorial de medidas repetidas para variações de coloração em indivíduos de *Crenuchus spilurus* submetidos a diferentes tipos de substrato (n= 23 peixes testados). GL= Graus de Liberdade.

	GL	F	p
Substrato	2	125,40	3,38 <sup>-16</sup>
Pigmento	2	1501,19	1,9 <sup>-29</sup>
Interação Substrato:Pigmento	4	122,80	2,6 <sup>-28</sup>

As análises par-a-par mostraram que apenas os valores de amarelo (xantóforos) não diferiram entre os substratos Marrom e Preto; todas as outras comparações resultaram em diferenças significativas (Tabela 2). A Figura 3 apresenta uma representação gráfica dos nossos resultados.

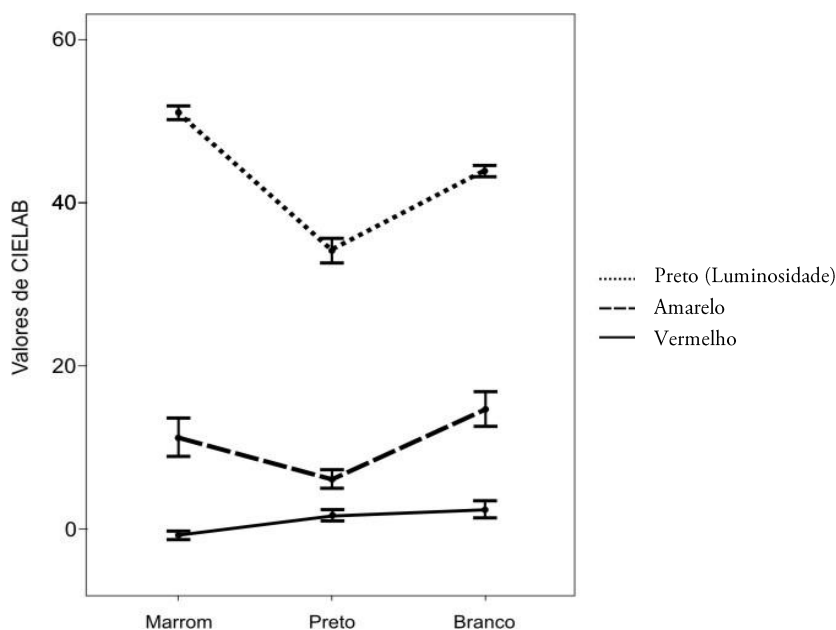


Figura 3. Representação gráfica dos valores médios de coloração vermelha, amarela e luminosidade, medidos em indivíduos de *Crenuchus spilurus* sob diferentes tratamentos experimentais (tipos de substrato). (n= 23 peixes testados).

Tabela 2. Resultados dos testes t pareados para valores de CIELAB referentes a três tipos de pigmentos (preto, vermelho e amarelo) para indivíduos de *Crenuchus spilurus* expostos a três cores de substrato (marrom, preto e branco). Resultados de comparações entre pigmentos foram omitidos por simplicidade. (n= 23 peixes testados).

Substrato/Pigmento	Marron vs Preto	Marron vs Branco	Preto vs Branco
Melanóforos	1,2 <sup>-13</sup>	2 <sup>-13</sup>	4,1 <sup>-9</sup>
Eritróforos	0,0008	0,0002	0,09
Xantóforos	5,4 <sup>-5</sup>	3,1 <sup>-5</sup>	4,2 <sup>-7</sup>

## CONCLUSÃO

Neste trabalho nós reportamos uma mudança significativa da coloração de indivíduos de *C. spilurus* como resposta aos diferentes substratos aos quais os peixes foram expostos. A variação de cores e de tonalidade (claro/escuro) é bastante comum em peixes de forma geral. Entretanto, de forma menos esperada, nós notamos que os tons de vermelho e amarelo também se modificaram rapidamente, e de forma independente. Isso indica uma atuação separada dos pigmentos vermelho e amarelo, e não apenas uma maior exposição pela redução da atuação dos melanóforos, ou a simples consequência de uma alimentação rica em carotenóides. Adicionalmente, nossos resultados indicam que a capacidade de ajustar a coloração avermelhada do corpo pode ser uma estratégia de camuflagem selecionada em ambientes de águas pretas, que, na realidade, apresentam tonalidade avermelhada ou âmbar (especialmente em vista subaquática).

A existência de cromatóforos que respondem rapidamente a variações no ambiente de entorno foi reportada por Zuanon *et al.* (2006) para *Ammocryptocharax elegans*, outra espécie da mesma família (Crenuchidae). Uma vez que *C. spilurus* é a espécie basal da família (Buckup 1998), nossos resultados indicam que a impressionante habilidade de mudança de cor de *A. elegans* pode não ser um evento evolutivo único naquela espécie, e pode ter evoluído como modificação de mecanismos menos elaborados de mudança de cor já presentes em *C. spilurus*. É importante notar, contudo, que a habilidade de mudança de cor de *A. elegans* se dá por conseguir tornar-se completamente verde, e em nosso trabalho nós não medimos a resposta de coloração aos substratos verdes em *C.*

*spilurus*. Embora nossas observações de campo e em cativeiro deixem claro que a espécie não é capaz de se tornar completamente verde, pode ser que isso ocorra de forma mais sutil, ao compor tons de marrom.

Como perspectivas futuras, serão feitos estudos que incluem quantificações do tempo de mudança de cor para cada pigmento e uma relação desses valores às condições corpóreas dos indivíduos. Dessa forma, espera-se poder avaliar as relações entre a intensidade do sinal visual (indivíduos em boa condição corpóreas podem ser mais aptos em mimetizar a coloração do substrato) e quantificar a resposta dos diferentes pigmentos. Também seria importante controlar as características de reflexão de luz pelas partículas que compõem o substrato, pois isso pode interferir nas respostas dos cromatóforos às diferentes cores testadas. Por fim, se pretende investigar o papel do órgão pineal presente no alto da cabeça de *C. spilurus* nas mudanças de coloração. Este órgão tem função desconhecida, mas sabe-se que a glândula pineal é sensível à luz, e é possível que tenha um papel importante na mudança de cor nessa espécie de peixe.

## REFERÊNCIAS

- Buckup P.A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi) In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S. editors. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre. pp. 123–144.
- Field, A.; Miles, J.; Field, Z. 2012. *Discovering Statistics Using R*. 3<sup>rd</sup>. Ed. SAGE Publications Ltd., 992 p.
- Healey, E.G. 1999. The skin pattern of young plaice and its rapid modification in response to graded changes in background tint and pattern. *Journal of Fish Biology*, 55: 937–971.
- Wickham, H. 2009. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer New York.
- Kelsh, R.N. 2004. Review: pigment gene focus: genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment Cell Research*, 17(4): 326-336.
- Krebs, J.R.; Davies, N.B. 1993. *An introduction to behavioural ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Melgosa, M. 1999. Testing CIELAB-based color difference formulas. *Color Research and Application*, 25.
- Lawrence, M.A. 2013. ez: Easy analysis and visualization of factorial experiments. R package version 4.2-2. <http://CRAN.R-project.org/package=ez>
- Pires T.H.S. 2012. *O papel da seleção sexual na manutenção de linhagens evolutivas: evidências baseadas no comportamento e ecologia de Crenuchus spilurus Günther, 1863 (Characiformes: Crenuchidae)*. Dissertação de Mestrado. PPG BADPI, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 205 p.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ryer, C.H.; Lemke, J.L.; Boersman, K.; Levas, S. 2008. Adaptive coloration, behavior and predation vulnerability in three juvenile north Pacific flatfishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 62-66.
- Scott, G. 2005. *Essential animal behavior*. Department of Biological Science, University of Hull, Hull.
- Zuanon, J.A.S.; Carvalho, L.N.; Sazima, I. 2006. A chamaeleon characin: the plant-clinging and colour-changing *Ammocryptocharax elegans* (Characidiinae: Crenuchidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 17(3): 225-232.