

## DIFERENTES VELOCIDADES DA MUDANÇA DE COR EM LINHAGENS DE *Crenuchus spilurus* SUGEREM ADAPTAÇÕES AOS TIPOS DE ÁGUA ONDE VIVEM

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

Tiago Henrique da Silva PIRES<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

<sup>2</sup>Colaborador CBIO/INPA; <sup>3</sup>Orientador CBIO/INPA.

### INTRODUÇÃO

Muitas espécies de peixes modificam a coloração corpórea (Kodric-Brown 1998), se ajustando ao colorido do substrato predominante no ambiente (Healey 1999; Scott 2015). 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 (Stuart-Fox e Moussalli 2009). Dentre os tipos de cromatóforos, os melanóforos produzem pigmentos de cor preta ou marrom por meio da melanina; os xantóforos contêm pteridina ou carotenoides, que produzem a coloração amarela; e os eritróforos produzem a coloração vermelha (Kelsh 2004).

Os rios da Amazônia apresentam uma grande variedade de tipos de águas, com diferentes colorações que variam de acordo com determinadas substâncias dissolvidas (Goulding *et al.* 2003). Rios em bacias de águas brancas possuem águas mais barrentas devido à sua origem em regiões montanhosas, sendo estes mais ricos em sedimentos, argilas e partículas em suspensão (Zeidemann 2001). Os rios de água preta nascem em terrenos de planícies arenosas e absorvem tanino e húmus oriundos da decomposição incompleta de material vegetal da floresta circundante; em geral possuem coloração mais escura (amarelada a avermelhada) e grande quantidade de compostos orgânicos dissolvidos (Zeidemann 2001). Essas diferenças nos mecanismos que geram diferentes tipos de águas também geram uma grande variedade de habitats para os organismos que os habitam (Begon *et al.* 2009). Igarapés de bacias de águas brancas, apesar de não serem turbidos, possuem características físicas e químicas distintas de igarapés inseridos em bacias de águas pretas, e potencialmente podem diferir em termos de estruturas físicas, como maior quantidade de troncos, vegetação aquática e maior variabilidade de diferentes tipos de substratos. Dessa forma é possível esperar que organismos vivendo nesses diferentes ambientes apresentem adaptações ligadas às condições gerais do ambiente em que vivem (hipótese local) ou à exposição a ambientes de tipos de águas diferentes no passado, ocorrida durante o processo de expansão geográfica da espécie (hipótese regional). Além disso, análises moleculares indicam que populações de *C. spilurus* vivendo em igarapés de bacias hidrográficas com águas brancas e pretas são geneticamente diferentes (T.H.S. Pires, dados não publicados).

Neste trabalho nós investigamos a possível existência de diferenças na velocidade de modificação da coloração do corpo em quatro linhagens do peixe *Crenuchus spilurus* (Characiformes: Crenuchidae). Essas linhagens variam em função de suas origens geográficas e diferem em mais de 3% no marcador mitocondrial COI: duas de igarapés inseridas em bacias de águas brancas (Rio Madeira e Rio Solimões), e duas de igarapés ligadas a sistemas de rios de águas pretas da bacia do Rio Negro (Fazenda Dimona – PDBFF e UFAM). *Crenuchus spilurus* é uma espécie de pequeno porte que ocorre predominantemente em igarapés de primeira e segunda

ordem. Apresenta forte dimorfismo sexual, onde os machos têm as nadadeiras dorsal e anal hipertrofiadas e ornamentadas com manchas vermelhas, amarelas, pretas e brancas (Pires 2012).

Em observações feitas em laboratório e em ambiente natural, notamos que a coloração de *C. spilurus* apresenta variações que poderiam estar relacionadas aos diferentes ambientes em que as populações ocorrem naturalmente. Com isso levantamos a hipótese de que existiriam diferenças na velocidade de mudança da coloração, e que essas poderiam estar associadas ao ambiente em que estes indivíduos habitam naturalmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e manutenção dos peixes em laboratório

Indivíduos de *C. spilurus* foram coletados em quatro locais: igarapé da UFAM em Manaus (Bacia do Rio Negro, 3° 6'22.94"S 59°58'42.48"W); igarapé da Fazenda Dimona – PDBFF (Bacia do Rio Negro, 2°23'25.52"S 60°10'15.13"W); igarapé Belmont em Porto Velho (Bacia do Rio Madeira 8°41'0.00"S 63°51'0.00"W); e igarapé da região de Iquitos no Peru (Bacia do Rio Solimões, 3°50'25.30"S 73°22'51.60"W). Em laboratório, os peixes foram mantidos em aquários separados por população, com água aerada e filtrada e substrato composto por areia de cor predominantemente branca, temperatura constante (24°C) e fotoperíodo de 12h de luz; 12 horas de escuro. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes tropicais (Sera Vipagran®).

### Procedimento experimental

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, sendo que apenas dois compartimentos foram utilizados nos testes (Figura 1). Nos compartimentos 1 e 2 havia substrato composto por folhas mortas encharcadas (folhiço de igarapé ou serapilheira) de cor predominantemente marrom escuro. Nos compartimentos 4 e 5 havia substrato de areia branca de sílica. O substrato do compartimento 3 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 indivíduos testados. Esse compartimento intermediário, assim como os compartimentos 1 e 5, não foram utilizados diretamente nos testes (ver abaixo).



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

Para o experimento, um peixe retirado aleatoriamente do aquário estoque (que continha substrato de areia branca) era inserido no compartimento 2 (contendo folhiço). Nos 10 minutos seguintes, o peixe era fotografado a cada 5 segundos com intuito de verificar a mudança de coloração corpórea do indivíduo de forma progressiva. Posteriormente, o peixe era transferido para o compartimento 4, contendo areia branca e foi novamente fotografado a cada 5 segundos por um período de 10 minutos. Todas as imagens digitais foram registradas por uma câmera Nikon D90, com objetiva de 60 mm. A câmera foi posicionada a uma distância fixa do aquário de experimento para todas as fotos, sempre perpendicular ao compartimento que continha o peixe. Utilizou-se um sistema de iluminação com fonte incandescente, posicionado acima do aquário. Todas as imagens obtidas utilizaram a mesma configuração da câmera, em formato RAW (sem processamento de cores). O procedimento de obtenção das imagens foi repetido para um total de 62 peixes, sendo 16 indivíduos de Manaus (Tamanho: média  $3,84 \pm 0,37$  desvio padrão, medidas em cm de Comprimento Padrão - CP), 14 de Porto Velho ( $3,04 \pm 0,66$  cm CP), 18 do Peru ( $3,57 \pm 0,32$  cm CP), e 14 da Fazenda Dimona ( $3,41 \pm 0,29$  cm CP).

As fotos obtidas foram inicialmente calibradas utilizando um alvo de cores (*Color Checker Passport*), gerando um arquivo de calibração com o auxílio do software livre Agyll Color Management System. O software livre Darktable foi utilizado para a conversão das imagens em extensão RAW para BMP com correção das cores. Posteriormente, utilizamos as fotografias digitais para medir a coloração dos peixes com o auxílio do software livre Gpick. Informações de cores foram obtidas sob o sistema RGB (Red, Green, Blue, escala de 0 a 255). As medidas de coloração foram tomadas apenas na parte látero-superior direita ou esquerda do corpo do peixe (Figura 2), a partir da média de 5 medidas de coloração nessa área. Esse processo foi aplicado para todas as imagens obtidas de cada peixe sob os dois tratamentos (= tipos de substrato). Os valores de R (Red) foram mantidos como medida da variação dos eritróforos. Os valores de RGB foram convertidos para o sistema CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Black), que foram utilizados para obter o valor de preto (representando os melanóforos, valores de Black) e amarelo (representando os xantóforos, valores de Yellow).

Cada indivíduo em uma das duas situações experimentais (tipos de substrato) gerou três valores como resposta dos diferentes pigmentos (preto, vermelho e amarelo) para cada fotografia (N=11272 fotos).

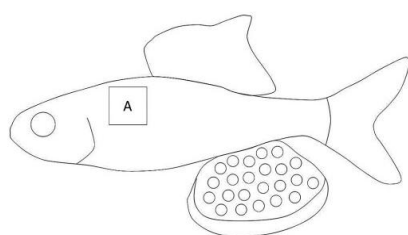


Figura 2. Desenho esquemático de um exemplar de *Crenuchus spilurus*, indicando o local de tomada de medidas de coloração. A área delimitada (A) indica o quadrante (1 x 1 cm) na porção látero-superior do corpo do animal onde foram feitas as medidas de coloração. Dentro deste quadrante, 5 medidas de coloração de escamas foram feitas, em pontos aleatórios, e a média desses valores representa a coloração, conforme o sistema RGB.

### Análises estatísticas

Para cada população e tratamento foram elaborados modelos lineares simples usando os valores de preto, vermelho ou amarelo como variáveis dependentes e a ordem das fotos (sequência cronológica de obtenção) como variável independente, dos quais foram extraídos os valores de inclinação da reta (b). Apenas esses

valores foram sujeitos a análises estatísticas formais. Os valores absolutos de b (= módulo de b) foram contrastados com três fatores: população (UFAM, Madeira, Peru e Dimona), tratamento (areia e folhiço) e cor (preto, vermelho e amarelo), em uma Análise de Variância de três fatores. As comparações internas foram realizadas usando testes *Post-hoc* de Tukey. Normalidade foi avaliada pela inspeção visual de histogramas e heterogeneidade da variância por meio de testes de Bartlett (todos < 0,05). Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software livre R (R Core Team 2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa na expressão das três cores, para os dois tratamentos e as quatro populações, bem como para a interação de tratamento e cor (Tabela 1). Os resultados obtidos indicam que: 1) Existe variação significativa na velocidade com que cada população modifica de cor; 2) O tratamento (=tipos de substrato), afeta a velocidade de resposta de cada linhagem; 3) Os tipos de células (cromatóforos), respondem de forma diferente para cada tratamento, com algumas células respondendo mais rápida que outras; 4) A velocidade com que as células mudam, é diferente para cada tratamento (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da ANOVA de três fatores para variação na intensidade de cor (Preto, Vermelho e Amarelo) de indivíduos de *Crenuchus spilurus* de quatro populações (UFAM, Dimona, Madeira e Peru), e submetidos a diferentes tipos de substrato (Areia e Folhiço). N = 62. GL= Graus de Liberdade.

	GL	F	p
População	3	11,969	0,000000174
Tratamento	1	8,494	0,00379
Célula	2	97,132	2E-16
Tratamento: Célula	2	5,481	0,00452

Testes *Post-hoc* de Tukey (Tabela 2) indicam que as populações da Dimona e da UFAM (ambas ligadas a sistemas de água preta) não apresentaram diferença significativa na resposta. De forma análoga, as populações do Peru e Madeira (ligadas a sistemas de águas brancas) também não apresentam diferença significativa de resposta. Por outro lado, todas as comparações entre populações oriundas de diferentes tipos de águas (branca x preta) apresentaram diferenças significativas, onde as populações da Dimona e UFAM apresentaram velocidade de resposta ao tratamento maior do que as populações do Peru e Madeira.

Tabela 2. Comparação da velocidade de resposta de mudança de cor em indivíduos de *Crenuchus spilurus* de quatro populações/tipos de água para diferentes tipos de substrato, por meio de testes de *Post-hoc* Tukey. A velocidade de resposta foi medida pelos valores de b de regressões lineares (vide Métodos para maiores detalhes). Populações: Dimona e UFAM= água preta; Peru e Madeira= água branca; tipos de substrato= folhiço e areia; cores= vermelho, amarelo e preto. (n= 62 peixes testados).

	Diferença	p	Comparação
Dimona-UFAM	-0,012639875	0,5088547	Preta-Preta
Madeira-UFAM	-0,037143789	0,0003498	Branca-Preta
Peru-UFAM	-0,04611557	0,0000007	Branca-Preta
Madeira-Dimona	-0,024503913	0,0484559	Branca-Preta
Peru-Dimona	-0,033475695	0,0010553	Branca-Preta
Peru-Madeira	-0,008971781	0,7441243	Branca-Branca

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que indivíduos de populações de *Crenuchus spilurus* de igarapés inseridos em bacias de rios de águas pretas apresentam mudanças de coloração mais rapidamente do que aqueles de populações de sistemas de água branca.

A pressão de seleção que gerou tais diferenças permanece, no entanto, aberta ao debate. Apesar dos peixes ocorrerem em igarapés associados a sistemas de águas pretas ou brancas, o ambiente dos igarapés onde os peixes de fato vivem são muito semelhantes, geralmente com águas claras ou ligeiramente tingidas (amarelado a âmbar). Portanto, as pressões seletivas locais (em igarapés) parecem ser muitas semelhantes. Entretanto, é importante notar que *C. spilurus*, apesar de ser um habitante de igarapés, ocorre em toda bacia do Amazonas, Orinoco e rios costeiros das Guianas. Para atingir tamanha extensão territorial (mais de 3 milhões de quilômetros quadrados) indivíduos migrantes devem se expor a outros tipos de ambientes, como lagos e canais de grandes rios, locais onde a pressão de seleção natural poderia ocorrer, favorecendo uma mudança de coloração mais rápida em ambientes de águas pretas. Ainda, essas variações locais podem refletir pressão de seleção sexual, se a capacidade de responder a variações no ambiente por meio de mudanças de cor tenha importância no comportamento de corte de *C. spilurus*. O forte dimorfismo sexual da espécie evidencia a importância de sinais visuais no ritual de corte. A mudança de cor apresentada pelas fêmeas de *C. spilurus* quando estão prontas para a desova (Pires 2012) pode ser um indicador adicional da importância desses sinais visuais na evolução da espécie.

No momento não é possível afirmar se as diferenças encontradas são melhor explicadas por seleção natural divergente em ambientes de igarapés (hipótese local), se essa atuou em ambiente ancestral que as populações vivenciaram (hipótese regional), ou até se a seleção sexual pode ter contribuído com pressão de seleção. Entretanto, sugerimos que as divergências encontradas indicam diferenças entre os dois tipos de ambientes (águas brancas e pretas), que mais facilmente podem ser explicadas por adaptações locais do que por processos estocásticos que potencialmente tornariam as populações idiossincráticas (o que não é compatível com o padrão observado neste trabalho).

## REFERÊNCIAS

- Begon, M.; Townsend, C.R.; Harper, J.L. 2009. *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. Artmed Editora, 752p.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian atlas of the Amazon*.
- 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.
- Kelsh, R.N. 2004. Review: pigment gene focus: genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment Cell Research*, 17(4): 326-336.
- Kodric-Brown, A. 1998. Sexual dichromatism and temporary color changes in the reproduction of fishes. *American Zoologist*, 38(1): 70-81.
- 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. 205p.
- R Development Core Team (2014). 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>.

- Scott, G. 2005. *Essential animal behavior*. Department of Biological Science, University of Hull, Hull.
- Stuart-Fox, D.; Moussalli, A. 2009. Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1516): 463-470.
- Zeidemann, V.K. 2001. O Rio das Águas Negras. *Florestas do Rio Negro*. Companhia das Letras, São Paulo. p. 62-87.