

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ADRIELY MELO DE SOUZA

**EVOLUÇÃO DO RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES POR PISTAS SOCIAIS E
FENOTÍPICAS EM UM COMPLEXO DE ESPÉCIES DE PEIXES AMAZÔNICOS**

MANAUS-AM

2018

ADRIELY MELO DE SOUZA

**EVOLUÇÃO DO RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES POR PISTAS SOCIAIS E
FENOTÍPICAS EM UM COMPLEXO DE ESPÉCIES DE PEIXES AMAZÔNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade do Estado do Amazonas como requisito
à obtenção do título de Licenciada em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Dr. Cristina Motta Bührnheim
Coorientador: Dr. Tiago Henrique da Silva Pires

MANAUS-AM

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S729e	<p>Souza, Adriely Melo de</p> <p>Evolução do reconhecimento de espécies por pistas sociais e fenotípicas em um complexo de espécies de peixes amazônicos / Adriely Melo de Souza. Manaus : [s.n], 2018.</p> <p>33 f.: color.; 31 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas,</p> <p>Manaus, 2018. Inclui bibliografia</p> <p>Orientador: Cristina Motta Bührnheim</p> <p>Coorientador: Tiago Henrique da Silva Pires</p> <p>1. agregação social. 2. comportamento. 3. linhagem. 4. <i>Crenuchus spilurus</i>. I. Cristina Motta Bührnheim (Orient.). II. Tiago Henrique da Silva Pires (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Evolução do reconhecimento de espécies por pistas sociais e fenotípicas em um complexo de espécies de peixes amazônicos</p>
-------	---



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA AP1)

ALUNO: <u>APRIELY MELO DE SOUZA</u>
TÍTULO DO TCC: <u>EVOLUÇÃO DO RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES POR LISTAS SOCIAIS E FENOTÍPICAS em UM COMPLEXO DE ESPÉCIES DE PEIXES AMAZÔNICOS</u>

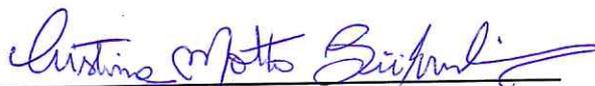
AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	10,0
b) 1º avaliador(a):	10,0
c) 2º avaliador(a):	8,0
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	9,3

MÉDIA DA NOTA: 9,3

Manaus, 30 de NOVEMBRO de 2018

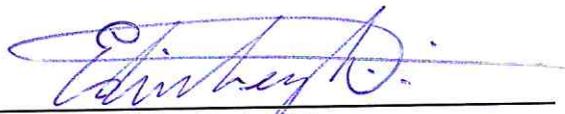
ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA



Orientador(a)



1º Avaliador(a)



2º Avaliador(a)

Aos meus pais
Adonias e Michelle

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Jansen Zuanon e Tiago Pires, que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante a elaboração desse trabalho. Serei sempre grata por todo o apoio, principalmente pela paciência e pelo tempo investido para me ensinar cuidadosamente a elaborar uma boa pesquisa.

A Cristina Bührnheim que durante a faculdade se mostrou uma excelente professora, e por acreditar em meu potencial como aluna.

Aos professores que tive ao longo da minha graduação, por todas as contribuições à minha formação.

Aos membros do LECE, Álvaro Lima, Élio Borghezan, Gabriel Stefanelli, Mahi Hemnani e Iza Sabrina, pela ajuda nas manutenções do laboratório, pelas discussões durante as reuniões semanais sobre ciência, e claro, pelas cidras e bolachas compartilhadas.

A Raquel Leite, por ter sido não só uma grande amiga da faculdade e de laboratório, mas uma pessoa que pude contar em todos os momentos. Temos muitas histórias boas, divertidas e outras não tão agradáveis assim para contar ao longo destes cinco anos.

Ao JICA e JST que por meio do projeto Museu na Floresta financiou os equipamentos do laboratório utilizados nesse trabalho.

A minha tia Ládía, que sempre esteve presente nos momentos em que mais precisei, pois mesmo lá de cima eu sei que ela reza por mim e torce a todo momento pelo meu sucesso como sempre foi.

Um agradecimento especial à minha família, que foi o meu porto seguro, as pessoas a quem eu mais dedico este trabalho, pois somente eles sabem o quanto foi difícil e turbulento durante esses quase cinco anos de graduação. Dedico a eles, que foram as pessoas que realmente estiveram comigo em todos os momentos.

Ao Eron Barbosa, por tantas vezes em que me ajudou da forma que podia, por ter me incentivado a alcançar meus objetivos, minha eterna gratidão pelo seu apoio pessoal em minha vida.

Aos amigos da faculdade, em especial as "Biolindas" por todo o companheirismo ao longo da nossa trajetória acadêmica, por toda ajuda e por tantas vezes em que choramos e rimos juntas. Aos amigos Julie, Ítalo, Rêgila, pelos últimos

trabalhos da faculdade, pela amizade que construímos nesse pequeno espaço de tempo, mas que foi o suficiente para nos divertimos muito, aprendido muito e pelas vezes em que revezamos nos trabalhos, em que comemos salgado de frango toda quinta à noite, além das conversas que rendem muitas risadas, seja por mensagem ou pessoalmente.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram com este trabalho e com meu crescimento profissional.

“Por mais que a gente cresça, há sempre alguma coisa que a gente não consegue entender.”

Engenheiros do Hawaii

RESUMO

Peixes são organismos notórios pela habilidade de formar grupos coesos de indivíduos da mesma espécie (cardumes). A formação de cardume frequentemente envolve o uso de similaridades morfológicas, *i.e.* os indivíduos podem se agrupar ao identificar outros de morfologia similar a nadar em direção a eles. A evolução desse comportamento gregário notável em peixes tem uma forte importância em relação ao risco de morte por predação: cardumes são mais seguros para que os indivíduos evitem ataques de predadores. De fato, o processo de agrupamento pode ser influenciado pela presença de um potencial predador. Portanto, o benefício individual na formação de cardumes é incrementado pela capacidade de reconhecimento de indivíduos coespecíficos. O reconhecimento de espécie pode evoluir rapidamente a partir de mecanismos de agregação social em que indivíduos só se aproximam de outros indivíduos com morfologia semelhante, o que ocorre (tipicamente) por meio pressão de predação. A capacidade de indivíduos em conseguir discriminar indivíduos da própria espécie e de espécies diferentes, ou seja, a evolução do reconhecimento de espécie pode ocorrer de duas formas: reforço (*reinforcement*) ou por pleiotropia. Nesse trabalho nós estudamos a espécie de peixe *Crenuchus spilurus* (Characiformes: Crenuchidae) e sugerimos nós considerarmos que a capacidade dos indivíduos de diferentes linhagens em segregar quando inseridos em um mesmo ambiente seria indicativo da existência de reconhecimento de coespecíficos desde uma fase inicial do processo de especiação. Adicionalmente, vimos que fêmeas das duas linhagens se reconhecem e se agregam após um determinado tempo, visto que elas não são hábeis em se reconhecer prontamente. O reconhecimento e a agregação entre indivíduos de uma mesma linhagem são mediados pelo uso de pistas visuais ou comportamentais e não pelo tempo de convivência, mas ainda são pouco evidentes para os pesquisadores.

Palavras-chave: agregação social, comportamento, linhagem, *Crenuchus spilurus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Macho (a) e fêmea (b) de <i>Crenuchus spilurus</i> da linhagem rio Negro.	15
Figura 2. Desenho esquemático do aquário utilizado no experimento 3. a) Fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> da linhagem rio Negro; b) Fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> da linhagem Amazonas; c) pedras utilizadas para enriquecimento do aquário; d) filmadora digital que realizava a captura de imagens em visão superior do aquário.	17
Figura 3. Vista aérea do aquário experimental e desenho esquemático das distâncias par-a-par entre todos os indivíduos das duas linhagens de <i>Crenuchus spilurus</i>	19
Figura 4. Desenho esquemático do aquário utilizado no experimento de pista visual. a) Fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> da linhagem rio Negro; b) Fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> da linhagem Amazonas; c) Fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> da linhagem Amazonas.	20
Figura 5. Representação gráfica da distância entre indivíduos de <i>Crenuchus spilurus</i> (boxplots em azul) e entre os indivíduos de <i>C. spilurus</i> e <i>Copella nattereri</i> (em rosa). São apresentados os valores máximos e mínimos, quartis superior e inferior e a mediana (barras horizontais pretas).	22
Figura 6. Representação gráfica dos dados. Em amarelo estão apresentadas as distâncias entre indivíduos da mesma linhagem/espécie, enquanto que em cinza estão representas as distâncias entre indivíduos de linhagens/espécies diferentes. São apresentados os valores máximos e mínimos, quartis superior e inferior e a mediana (barras horizontais pretas).	23
Figura 7. Tempo de associação. Em amarelo estão representados os tempos de associação entre indivíduos da linhagem Amazonas, enquanto que em cinza estão representados os tempos de associação entre indivíduos da linhagem rio Negro.	25

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	15
Aquisição e manutenção de indivíduos em laboratório	15
Tratamento com marcação de elastômeros	16
Validação do protocolo	16
.....	17
Procedimentos experimentais	17
1. Reconhecimento e agregação social	17
1.1 Obtenção de dados	18
2. Familiaridade	19
3. Experimento de reconhecimento de espécie mediado por pistas visuais .	20
3.1 Obtenção de dados	21
RESULTADOS	22
Reconhecimento e agregação social	23
Reconhecimento mediado por pista visual	24
Familiaridade	25
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	27
APÊNDICE A – Tamanho dos indivíduos utilizados no experimento de pista visual.	31

INTRODUÇÃO

O reconhecimento de espécie como processo fundamental na formação de novas espécies foi levantado pelos fundadores da nova síntese evolutiva (FISHER, 1930). Apesar de ser uma questão antiga, a importância do reconhecimento de espécie permanece em discussões atuais (MENDELSON & SHAW, 2012). Um aspecto central à essa discussão é que a evolução do isolamento reprodutivo por meio de rejeição de potenciais parceiros heteroespecíficos (ou seja, reconhecimento de espécie) pode ou não vir acompanhado de diferenças morfológicas entre espécies divergentes. Portanto, indivíduos de espécies distintas (*i.e.* isoladas, reprodutivamente), mas morfológicamente semelhantes, podem não ser capazes de discriminar contra parceiros que não geram descendentes ou que geram descendentes inférteis.

Reconhecer o que pode depender se há ou não contato entre as entidades linhagens que divergem, o que depende da biogeografia da especiação (BROWN & SMITH, 1994; CANDOLIN, 2003). Existem três modelos principais modelos de biogeografia da especiação que ocorre em organismos sexuais: especiação alopátrica, parapátrica e simpátrica (MAYR, 1963). Na especiação alopátrica, o fluxo gênico é completamente interrompido por uma barreira física, não havendo contato entre as linhagens divergentes. Nesse modelo, as duas populações podem desenvolver características distintas que podem atuar como barreiras intrínsecas ao isolamento reprodutivo (MAYR, 1942, 1963; ORR, SMITH, 1998; RICE, 1987; RITCHIE, 2007; SIMPSON, 1944). Essas características podem ser morfológicas ou não, de forma que as populações podem permanecer morfológicamente idênticas (*i.e.* há formação de espécies crípticas). Na especiação simpátrica não há isolamento geográfico, e no modelo de especiação parapátrica, o isolamento geográfico é parcial. Nesses dois casos há contato entre as linhagens divergentes, o que permite que a seleção natural atue diretamente sobre o reconhecimento de espécies (MENDELSON & SHAW, 2012).

A capacidade dos indivíduos em conseguir discriminar indivíduos da própria espécie e de espécies diferentes, ou seja, a evolução do reconhecimento de espécie, pode ocorrer de duas formas: por reforço, que pode ocorrer nos

cenários em que há contato entre linhagens divergentes; ou por pleiotropia, que é o único mecanismo de evolução compatível com especiação alopátrica.

No mecanismo de reforço (*reinforcement*) há seleção natural atuando diretamente sob o processo de reconhecimento de espécie. Isso ocorre quando populações alopátricas acumulam diferenças genéticas tão profundas que acarretam no isolamento reprodutivo entre elas quando eventualmente entram em contato secundário. Indivíduos que falham em discernir membros da sua própria espécie são penalizados por conta da baixa aptidão (*fitness*) dos potenciais híbridos formados. Decorre disso um processo de seleção natural que favorece a evolução do reconhecimento de espécie (WIERNASZ & KINGSOLVER, 1992).

No mecanismo pleiotrópico, o reconhecimento de espécie ocorre como um subproduto da seleção divergente (seleção natural) (SCHLUTER, 2001) e não requer que as linhagens se encontrem geograficamente (contato secundário). Por exemplo, o reconhecimento de espécie pode emergir da diversificação morfológica entre espécies irmãs em ambientes distintos que, possuindo diferenças morfológicas evidentes, são capazes de rejeitar parceiros (sociais ou reprodutivos) da espécie irmã.

O reconhecimento de membros da própria espécie pode também trazer benefícios de seleção natural não relacionados ao acasalamento. Para espécies gregárias, o reconhecimento de espécie pode ser fundamental (KRAUSE *et al.*, 2008), uma vez que viver em grupo de indivíduos coespecíficos permite a localização mais rápida de alimento ou redução da probabilidade de predação (KRAUSE *et al.*, 2008). O uso de sinais que são emitidos por indivíduos de uma mesma espécie possibilita o reconhecimento desses grupos, levando-os a formação de grupos com morfologia semelhante.

O reconhecimento de indivíduos coespecíficos pode ocorrer através do uso de diferentes modalidades sensoriais. Características morfológicas são percebidas pela visão, que pode ser importante durante o processo de reconhecimento de espécie. Contudo, o reconhecimento de espécie pode ser mais pronunciado por pistas químicas (ROSENTHAL, 2017). Linhagens também podem divergir em características comportamentais, tanto durante o comportamento de corte, quanto nas atividades tomadas na interação social que ocorrem durante a formação de grupos (ROSENTHAL, 2017). Portanto, é

esperado que o reconhecimento de espécie pode evoluir rapidamente a partir de mecanismos de agregação social em que indivíduos só se aproximam de outros indivíduos com morfologia semelhante (e.g. PULLIAM, 1973; ALE & BROWN, 2007).

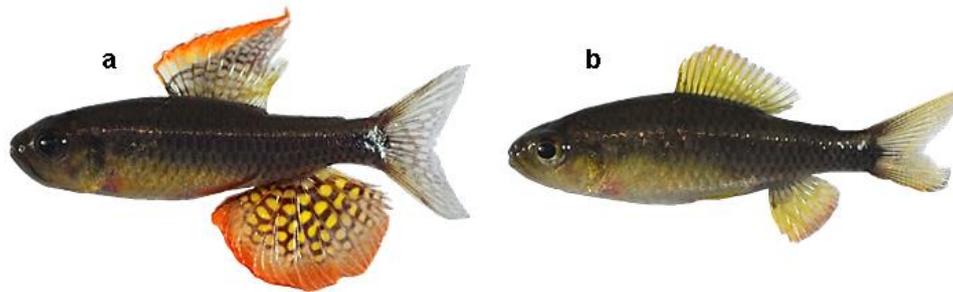
Peixes e outros organismos possuem a habilidade de formar grupos coesos de indivíduos da mesma espécie (cardumes). A formação de cardume frequentemente envolve o uso de similaridades morfológicas, *i.e.* os indivíduos podem se agrupar ao identificar outros de morfologia similar a nadar em direção a eles. A evolução desse comportamento gregário notável em peixes tem uma forte importância em relação ao risco de morte por predação: cardumes são mais seguros para que os indivíduos evitem ataques de predadores (CHIVERS *et al.*, 1995; GRIFFITHS *et al.*, 2004).

Crenuchus spilurus é uma espécie de peixe de pequeno porte, sexualmente dimórfica e dicromática (FIGURA 1), composta por duas linhagens evolutivas bastante distintas, “rio Negro” e “Amazonas”. Essas linhagens são geneticamente estruturadas e reconhecidas por divergências genéticas em nível mitocondrial e nuclear, e estão reprodutivamente isoladas (PIRES *et al.* 2018). Populações pertencentes à linhagem rio Negro ocorrem em igarapés ao longo de bacia de drenagem do rio Negro, enquanto que a linhagem Amazonas ocorre ao longo do restante da distribuição da espécie. Este cenário biogeográfico sugere fortemente que a formação destas duas linhagens (ou espécies não formalmente descritas) ocorreu em um cenário de alopatria. Embora ambas linhagens tenham grande divergência genética, os indivíduos são morfologicamente muito similares (PIRES *et al.*, 2018), no entanto, as fêmeas de *C. spilurus* possuem variação quanto ao tamanho do olho (PIRES *et al.*, manuscrito em revisão), o que sugere que essas características podem mediar o reconhecimento.

Neste estudo objetivamos estudar a evolução do reconhecimento de espécie entre as linhagens (= espécies) de *Crenuchus spilurus*. Visto que a especiação em *C. spilurus* provavelmente ocorreu alopatricamente, a existência de reconhecimento de espécie poderia apenas ser explicado pelos mecanismos de pleiotropia. Nós medimos a existência de reconhecimento de espécie por meio de agregação social entre as linhagens (= espécies). Nós consideramos que a capacidade dos indivíduos de diferentes linhagens em segregar quando

inseridos em um mesmo ambiente seria indicativo da existência de reconhecimento de coespecíficos. Neste trabalho nós utilizamos somente fêmeas de *C. spilurus* visto que os machos interagem agonisticamente entre si, enquanto que as fêmeas são mais sociáveis e se agregam mais prontamente do que os machos.

Figura 1. Macho (a) e fêmea (b) de *Crenuchus spilurus* da linhagem rio Negro.



Levando em consideração que espécies crípticas podem ser distinguíveis em seus aspectos fisiológicos e comportamentais, o intuito do projeto objetivou investigar a existência de reconhecimento de espécie na forma de agregação social entre as espécies crípticas de *C. spilurus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição e manutenção de indivíduos em laboratório

Os procedimentos realizados neste estudo foram registrados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa (CEUA), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob nº de processo 043/2017.

Grupos de indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram coletados num igarapé de um fragmento florestal urbano em Manaus (campus da Universidade Federal do Amazonas, bacia do rio Negro), denominada como "linhagem rio Negro" e foram importados indivíduos de uma população pertencente à "linhagem rio Amazonas" de um igarapé próximo à região de Iquitos, no Peru, e os peixes foram mantidos no Laboratório de Ecologia Comportamental e Evolutiva (LECE).

Os indivíduos foram mantidos em aquários estoques (60 cm x 40 cm x 40 cm, para aclimação em laboratório), cuja qualidade da água foi mantida com uso de filtro e aerador, e por meio de trocas parciais de água realizadas semanalmente.

A temperatura ambiente mantida foi de 24°C com auxílio de condicionadores de ar, e um regime de iluminação de 12 h claro e 12 h escuro foi mantido com o intuito de simular características do ambiente natural. Os indivíduos foram alimentados *ad libitum* diariamente com ração comercial para peixes ornamentais.

Tratamento com marcação de elastômeros

Tendo em vista a similaridade morfológica entre os indivíduos das duas linhagens, a marcação dos indivíduos previamente à inserção em ambiente comum se fez necessária. Foi utilizada marcação com elastômeros subcutâneos, por ser uma técnica capaz de marcar peixes de pequeno porte. As fêmeas das duas linhagens passaram por um processo de marcação no dorso com uma pequena quantidade de elastômero fluorescente (uma cor para cada linhagem).

Os indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram removidos dos aquários estoques com uma rede e anestesiados em solução de eugenol (0,10 ml L⁻¹ de água). Assim que foi notada redução da atividade natatória e do batimento opercular, os indivíduos foram medidos quanto ao comprimento padrão (usando um paquímetro digital) e receberam a injeção subcutânea de elastômero. Essas injeções foram realizadas com seringas descartáveis de insulina sobre uma bancada estéril. Quarenta peixes foram marcados dessa forma, sendo vinte de cada linhagem.

Validação do protocolo

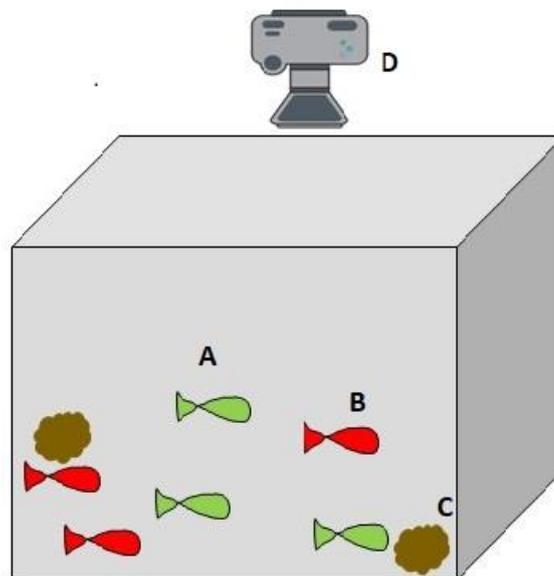
Até onde sabemos, o protocolo experimental adotado neste estudo nunca havia sido realizado. Dessa forma, um teste preliminar para a validação do procedimento foi idealizado. Foi realizado um teste piloto utilizando indivíduos de *Crenuchus spilurus* e *Copella nattereri* Stendachner, 1876, que são de famílias,

Crenuchidae e Lebiasinidae respectivamente, e espécies distintas, com características morfológicas claramente diferentes. Três indivíduos de cada espécie foram marcados com elastômeros, com cores diferentes para cada espécie e inseridos em aquários separados.

Após um período de 48 h de recuperação do procedimento, os peixes foram medidos com paquímetro digital e em seguida foram inseridos simultaneamente em um aquário de 30 cm largura x 40 cm comprimento com coluna d'água de 10 cm de altura. Uma máquina fotográfica foi posicionada na parte superior, de forma a poder registrar fotografias das posições dos peixes.

Este procedimento foi repetido três vezes, onde em cada repetição foram utilizados três indivíduos de cada espécie, com o total de 18 peixes submetidos ao protocolo experimental.

Figura 2. Desenho esquemático do aquário utilizado no experimento 3. a) Fêmea de *Crenuchus spilurus* da linhagem rio Negro; b) Fêmea de *Crenuchus spilurus* da linhagem Amazonas; c) pedras utilizadas para enriquecimento do aquário; d) filmadora digital que realizava a captura de imagens em visão superior do aquário.



Procedimentos experimentais

1. Reconhecimento e agregação social

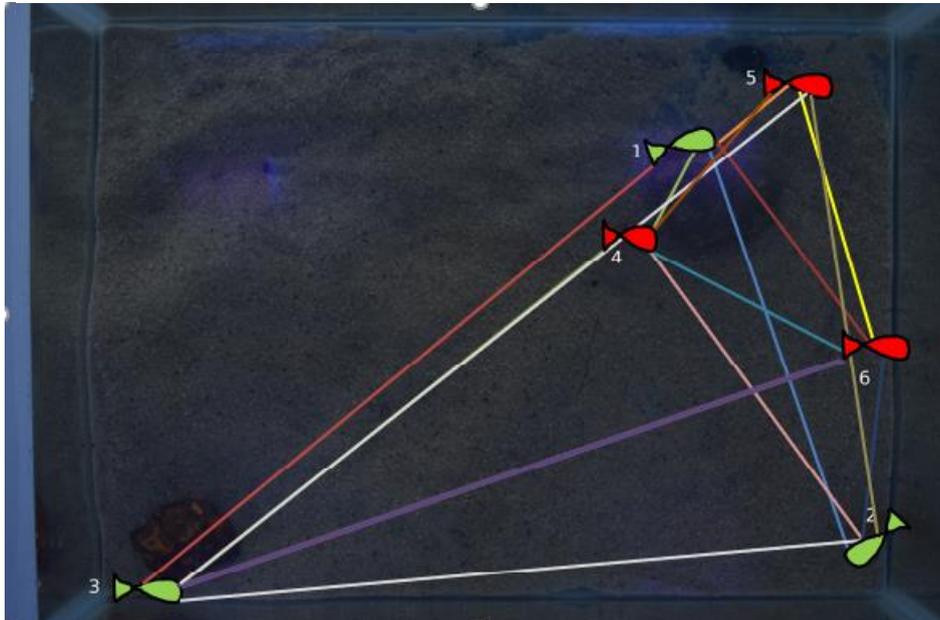
Após dois dias de recuperação do procedimento de marcação com elastômeros, três indivíduos de cada espécie de *Crenuchus spilurus* foram inseridos simultaneamente em um aquário experimental (com uma máquina fotográfica posicionada na parte superior). Luzes negras foram instaladas acima do aquário para permitir melhor visualização das marcas fluorescentes. Após 10 minutos de aclimatação, foram tiradas cinco fotos a cada cinco minutos: 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após o período de aclimatação. Para não perturbar os peixes, as fotos eram obtidas remotamente utilizando um computador, de forma que o experimentador se encontrava longe do aquário experimental e fora da visão dos peixes. Em cada período de cinco minutos eram tomadas cinco fotografias com o intuito de selecionar apenas uma, a que tivesse melhor qualidade.

Este procedimento experimental foi realizado quatro vezes, sem repetição dos indivíduos. Todo experimento foi repetido três vezes em dias consecutivos. Após a realização de cada experimento, os peixes eram retirados do aquário experimental com uma rede e inseridos em aquários previamente inabitados.

1.1 Obtenção de dados

Os peixes permaneceram no aquário experimental por trinta minutos, período no qual foram fotografados a cada cinco minutos. Foram selecionadas as fotografias com a melhor qualidade de imagem. Utilizando o *software* livre ImageJ, foram extraídas 15 distâncias par-a-par entre todos os indivíduos da fotografia para identificar as espécies através dos elastômeros e as distâncias entre indivíduos coespecíficos (marcas de elastômero de mesma cor) e heteroespecíficos (marcas de cores diferentes). Foram analisadas 30 fotos.

Figura 3. Vista aérea do aquário experimental e desenho esquemático das distâncias par-a-par entre todos os indivíduos das duas linhagens de *Crenuchus spilurus*.



1.2 Análises estatísticas

As distâncias em pixels entre indivíduos de mesma espécie e de espécies diferentes foram tomadas e submetidas a um modelo linear misto, (equivalente a uma ANOVA de medidas repetidas) utilizando o software R. Nós adotamos como variável resposta a distância entre os indivíduos, e como variável preditora o tipo de medida, considerada como um fator de dois níveis: “distância entre mesma espécie” e “distância entre espécies diferentes”. Para não violar a premissa de normalidade dos dados, os valores originais de distância em pixels foram transformados pela raiz quadrada.

2. Familiaridade

Uma vez que os indivíduos utilizados no teste de reconhecimento de espécie eram oriundos de ambientes sociais distintos (aquários), nós consideramos que nossos resultados poderiam potencialmente ser explicados

pela familiaridade dos indivíduos em cada aquário estoque. Para medir se a familiaridade poderia explicar os nossos resultados nós testamos se indivíduos da mesma espécie de *Crenuchus spilurus*, que estavam mantidos em aquários estoque separados (60 cm x 40 cm x 40 cm), poderiam se reconhecer. O procedimento experimental para avaliar o reconhecimento dos indivíduos por meio da familiaridade foi idêntico ao experimento de reconhecimento e agregação social entre as espécies de *Crenuchus spilurus*, com a única diferença de que os indivíduos inseridos no aquário experimental eram pertencentes à mesma linhagem, mas que previamente habitavam aquários distintos. O procedimento estatístico foi o mesmo implementado para a análise de agregação entre espécies.

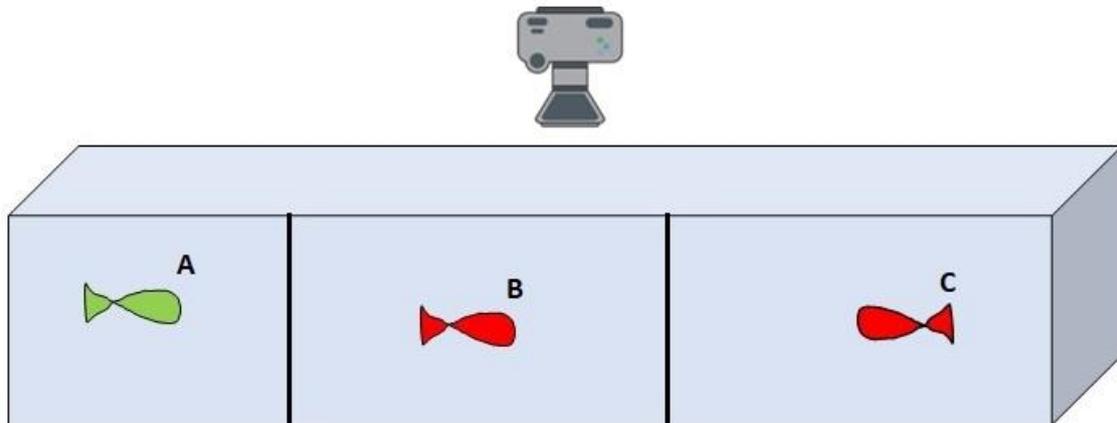
3. Experimento de reconhecimento de espécie mediado por pistas visuais

Esse experimento foi conduzido com a finalidade de testar se o reconhecimento entre os indivíduos das espécies de *Crenuchus spilurus* estava relacionado com o uso de uma modalidade sensorial específica mediada pela visão, e.g. mecanismo de pista visual, tendo em vista que características na variação do olho das fêmeas de *C. spilurus* podem estar relacionadas ao reconhecimento, onde a diferença entre as fêmeas é basicamente no tamanho dos olhos (PIRES *et al.*, manuscrito em revisão). Aquários experimentais possuindo três divisórias internas de vidro e medindo 60 x 15 x 15 cm foram utilizados (FIGURA 4).

Foi inserida uma fêmea de *Crenuchus spilurus* na divisória. A linhagem desta fêmea foi denominada "espécie focal". Em seguida foram inseridas, em cada divisória lateral, uma fêmea da espécie focal, e na outra divisória foi inserida uma fêmea da espécie diferente da focal. Ao todo, foram utilizadas 24 fêmeas de *C. spilurus* a cada bateria experimental, previamente selecionadas de acordo com tamanhos similares e medidas em comprimento padrão com o auxílio de um paquímetro digital.

Figura 4. Desenho esquemático do aquário utilizado no experimento de pista visual. a) Fêmea de *Crenuchus spilurus* da linhagem rio Negro; b)

Fêmea de *Crenuchus spilurus* da linhagem Amazonas; c) Fêmea de *Crenuchus spilurus* da linhagem Amazonas.



As fêmeas passaram por um período de aclimação de 15 minutos. Após este período de aclimação, foi acionada uma filmadora posicionada na parte superior dos aquários e a movimentação dos peixes foi gravada em vídeo por um período de uma hora. Após os experimentos, os peixes foram retirados dos aquários experimentais com o auxílio de uma rede, e posteriormente inseridos em aquários sumidouros separados para cada espécie de *Crenuchus spilurus*.

3.1 Obtenção de dados

Após as filmagens, os vídeos foram analisados no *software* Swistrack e em seguida no R, para extrair as posições X e Y dos indivíduos no aquário. A partir desses valores nós obtivemos o tempo que a fêmea do compartimento central passou próxima a cada uma das fêmeas nos compartimentos laterais. Foi considerado como “próximo” quando a fêmea se encontrava à 10 cm de distância de um dos compartimentos laterais.

3.2 Análises estatísticas

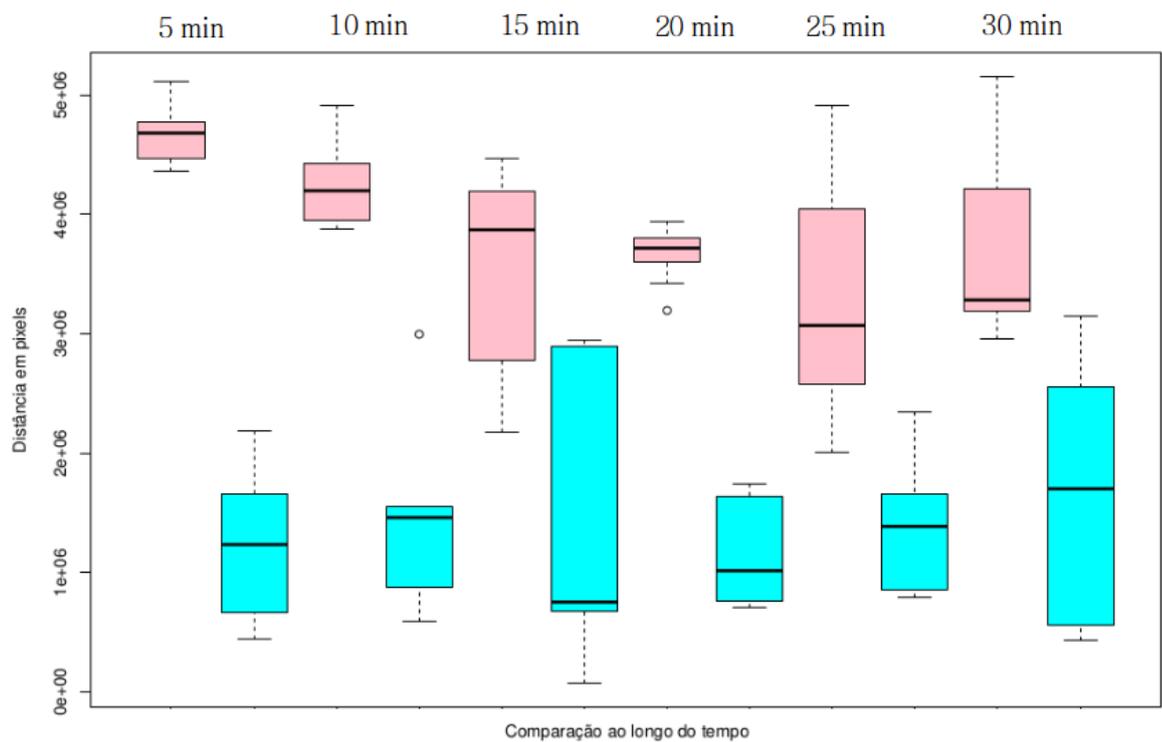
Foi feito um modelo linear misto em que a variável dependente era o tempo despendido próximo aos compartimentos laterais e as variáveis independentes eram a linhagem da fêmea focal, a linhagem à qual ela se associou e a interação entre esses dois fatores. Uma vez que havia dependência dos dados (a fêmea só poderia estar em um dos lados do aquário), a identidade do experimento foi utilizada como fator aleatório.

RESULTADOS

Validação do protocolo

No experimento com *Crenuchus spilurus* e *Copella nattereri*, a distância entre indivíduos da mesma espécie foi significativamente menor do que a distância entre indivíduos de espécies diferentes (GL= 89; $t = -10,37$, $P = 0,0001$; Figura 5). Esta diferença pode ser visualizada ao longo de todos os tempos amostrados, validando assim o protocolo experimental. Os resíduos desta relação se mostraram normais (Teste de Shapiro-Wilk - $W = 0,98$, $P = 0,24$), validando assim o teste empregado.

Figura 5. Representação gráfica da distância entre indivíduos de *Crenuchus spilurus* (boxplots em azul) e entre os indivíduos de *C. spilurus* e *Copella nattereri* (em rosa). São apresentados os valores máximos e mínimos, quartis superior e inferior e a mediana (barras horizontais pretas).

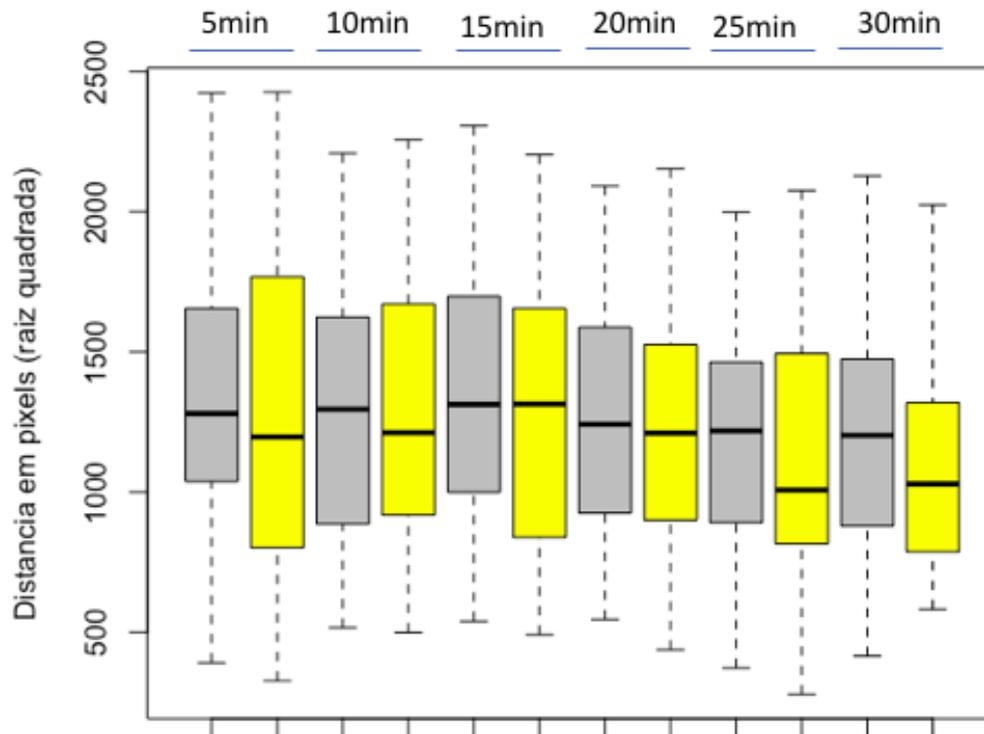


Reconhecimento e agregação social

Para a comparação entre as duas linhagens de *Crenuchus spilurus* não houve normalidade de resíduos. Houve uma distância significativamente maior entre indivíduos de linhagens distintas para os tempos 25 e 30 minutos (25 min: GL= 89, $t = -1,92$, $P = 0,002$; 30 min: GL= 99, $t = -1,68$, $P = 0,047$). As demais comparações não se mostraram estatisticamente significativas (Figura 6).

Figura 6. Representação gráfica dos dados. Em amarelo estão apresentadas as distâncias entre indivíduos da mesma linhagem/espécie, enquanto que em cinza estão representas as distâncias

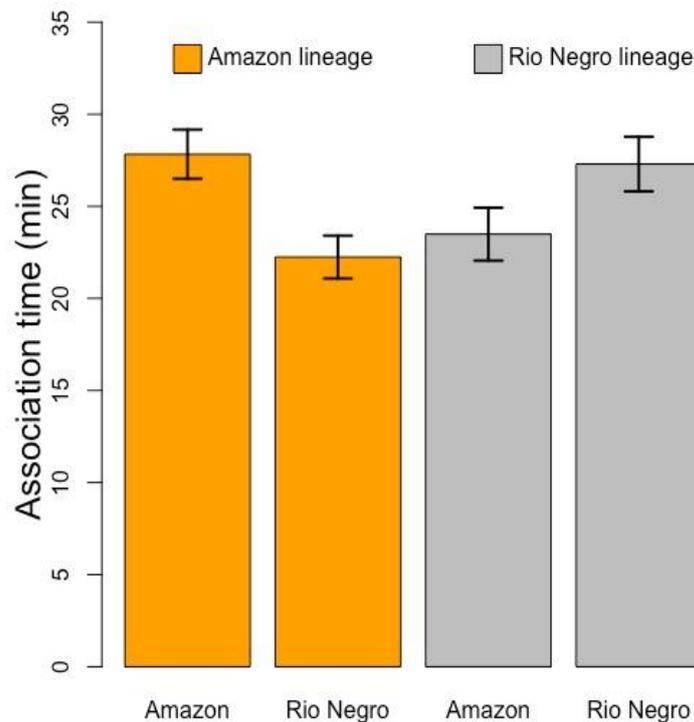
entre indivíduos de linhagens/espécies diferentes. São apresentados os valores máximos e mínimos, quartis superior e inferior e a mediana (barras horizontais pretas).



Reconhecimento mediado por pista visual

Os resultados do experimento apresentaram que a preferência por indivíduos de uma das linhagens dependia da identidade da espécie focal ($t= 3.38$, $GL= 44$, $P= 0,001$) e que fêmeas da linhagem Rio Amazonas preferencialmente se associam (*i.e.* ficaram mais tempo próximo) com fêmeas da própria linhagem ($t= 2.33$, $GL= 44$, $P< 0,01$). De forma similar, fêmeas da linhagem rio Negro se associaram por mais tempo com fêmeas da própria linhagem ($t= 2,45$, $GL= 44$, $P= 0,01$) (Figura 7).

Figura 7. Tempo de associação. Em amarelo estão representados os tempos de associação entre indivíduos da linhagem Amazonas, enquanto que em cinza estão representados os tempos de associação entre indivíduos da linhagem rio Negro.



Familiaridade

Não encontramos relação entre o grau de familiaridade (procedência de do mesmo aquário estoque) e tendência a se agrupar, uma vez que não houve diferença na distância entre peixes procedentes do mesmo aquário e de aquários diferentes ($F= 5,04$, $DF= 433$, $P= 0,93$)

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que houve uma menor distância entre indivíduos de uma mesma linhagem/espécie do que entre indivíduos de linhagens/espécies diferentes, indicando a existência de mecanismo de reconhecimento de espécie. Uma vez que as linhagens de *Crenuchus spilurus* vivem alopaticamente (PIRES *et al.*, 2018), os resultados não podem ser explicados pelo mecanismo de reforço. Desse modo, nosso estudo dá suporte à

existência de mecanismo pleiotrópico na evolução do reconhecimento de espécies (SCHLUTER, 2001).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as fêmeas das linhagens rio Negro e Amazonas de *Crenuchus spilurus* se agregam e se reconhecem após um determinado tempo (em torno de 25 minutos em nosso experimento), o que indica que estas não foram hábeis em se reconhecer imediatamente. Isso indica que, em virtude da grande similaridade morfológica entre as duas linhagens de *Crenuchus spilurus*, o reconhecimento é dependente de um processo de avaliação e reconhecimento individual.

Na natureza, a organização social dos indivíduos depende do reconhecimento, e para isso, existem meios que podem mediar o reconhecimento de coespecíficos e heteroespecíficos. A familiaridade entre os indivíduos testados não possui influência no reconhecimento entre as fêmeas de *Crenuchus spilurus*, pois a agregação com base na escolha de indivíduos coespecíficos está relacionada com a similaridade comportamental (e morfológica, ver abaixo) em que os indivíduos das linhagens mantiveram num mesmo ambiente. Isso sugere que os indivíduos desenvolveram a habilidade de reconhecer membros da própria espécie por meio de associação com coespecíficos.

Experimentos anteriores verificaram a importância de aspectos específicos do fenótipo ou pistas usadas pelas fêmeas durante o reconhecimento de espécies (WAAGE 1975; SILBERGLIED & TAYLOR, 1978), como em fêmeas de *Pieris occidentalis*, Lepidoptera, que conseguem discriminar entre machos coespecíficos e heteroespecíficos com base no padrão dorsal da asa masculina em populações simpátricas de espécies irmãs (WIERNASZ, 1989; WIERNASZ & KINGSOLVER, 1992). Nos resultados obtidos do experimento relacionado ao reconhecimento mediado por meio de pistas visuais, verificamos que as fêmeas das duas linhagens (Rio Negro e Amazonas) de *Crenuchus spilurus* reconheceram os indivíduos coespecíficos na mesma proporção durante os primeiros trinta minutos de experimento (Fig.7). Essa preferência das fêmeas em identificar membros da própria linhagem indica que o reconhecimento pode ser mediado por pistas sensoriais com base na visão,

em que são reconhecidas características morfológicas ou no próprio comportamento dos indivíduos coespecíficos que distinguem dos heteroespecíficos. O presente estudo sugere que características na variação do tamanho do olho em fêmeas de *C. spilurus* podem estar sujeitas ao reconhecimento, já que fêmeas de linhagens distintas apresentam diferentes tamanhos do formato do olho.

O padrão do comportamento que membros de uma linhagem de *Crenuchus spilurus* apresentam em relação a outra podem influenciar no reconhecimento, visto que indivíduos que identificam membros que possuem um comportamento similar se reconhecem e se agregam após um certo tempo de associação (Fig. 6). As diferenças interespecíficas podem desenvolver habilidades no processo do reconhecimento de coespecíficos e heteroespecíficos em peixes (BARNET, 1982; MYRBERG & RIGGIO, 1985; QUINN & BUSACK, 1985) onde o contexto ecológico é empregado.

CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos realizados em nosso estudo permitem concluir que indivíduos da mesma linhagem de *Crenuchus spilurus* são capazes de se reconhecer e se agregam, mas o processo de reconhecimento e agregação demanda um certo tempo (não parece ser imediato). O reconhecimento e a agregação entre indivíduos de uma mesma linhagem são mediados pelo uso de pistas visuais ou comportamentais e não pelo tempo de convivência, mas ainda são pouco evidentes para os pesquisadores.

REFERÊNCIAS

- ALE, S. B. & BROWN, J. S. The contingencies of group size and vigilance. **Evolutionary Ecology Research**, v.9, p.1263-1276, 2007.
- AMORIM, M. C. P., SIMÕES, J. M., FONSECA, P. J., & TURNER, G. F. Species differences in courtship acoustic signals among five Lake Malawi cichlid species (*Pseudotropheus* spp.). **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 6, p.1355–1368, 2008.

BARNETT, C. The chemosensory responses of young cichlid fish?? to parents and predators. **Animal Behaviour**, v. 30, p.35-42, 1982.

BATEMAN, A. J. Intra-sexual selection in *Drosophila*. **Heredity** v. 2, p.349-368, 1948.

BORCARD, D., GILLET, F. & LEGENDRE, P. Numerical ecology with R. Springer, New York. 2011.

BORGHEZAN, E. A. Fêmeas discriminam contra parceiros sexuais em função da dissimilaridade genética e desenvolvimento ontogenético no peixe *Crenuchus spilurus*. **Dissertação de Mestrado. PPG BADPI, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus. 38 pp, 2017.

BROWN, G. E., SMITH, R. J. F. Fathead minnows use chemical cues to discriminate shoalmates from unfamiliar conspecifics. **Journal Chemical Ecology**, v .20, p. 3051–3061, 1994.

CANDOLIN, U. The use of multiple cues in mate choice. **Biological Reviews**, v.78, n. 4, p.575-595, 2003.

CHIVERS, D. P., BROWN, G. E. & SMITH, R. J. F. Familiarity and shoal cohesion in fathead minnows (*Pimephales promelas*): implications for anti-predator behaviour. **Canadian Journal of Zoology**, v.73, p. 955-960, 1995.

FISHER, R. A. The genetical theory of natural selection. **Oxford, The Clarendon Press**.308 pp, 1930.

GRIFFITHS, S. W., BROCKMARK, S., HOJESJO, J., JOHNSON, J. I. Coping with divided attention: The advantage of familiarity. **Biological Sciences**. v. 271, n. 1540, p.695-699, 2004.

KRAUSE, J. & RUXTON, G. D. Living in groups. **Oxford: Oxford University Press**. 210 pp, 2002.

KRAUSE, J., WARD, A.J.W., CROFT, D.P., JAMES, R., CROFT, D. P. Group living and social networks. **Fish Behaviour**, Enfield (NH) Science Publisher, 2008.

MAYR, E. Animal species and evolution. Cambridge: **Harvard University Press**, 1963.

MAYR, E. Systematics and the origin of species. **Columbia University Press**, New York, 372 pp, 1942.

MENDELSON, T. C, SHAW, K. L. The (mis)concept of species recognition. **Trends in Ecology & Evolution**, v.27, p. 421-427, 2012.

MYRBERG, A. A.J., RIGGIO, R. J. Acoustically mediated individual recognition by a coral reef fish (*Pomacentrus partius*). **Animal Behaviour**, v. 33, p. 411±416, 1985.

ORR, MATTHEW R.; SMITH, THOMAS B. Ecology and Speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.13, n.12, p.502-506. 1998.

PIRES, T. H. S. 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 pp, 2012.

PIRES, T. H. S., FARAGO, T. B., CAMPOS, D. F., CARDOSO, G. M. & ZUANON, J. Traits of a lineage with extraordinary geographical range: ecology, 40 behavior and life-history of the sailfin tetra *Crenuchus spilurus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 99, n. 12, p. 925–937, 2016.

PIRES, T. H. S, BORGHEZAN, E.A, MACHADO, V. N., POWELL, D.L., RÖPKE, C.P., OLIVEIRA, C., ZUANON, J., FARIAS, I.P. Testing Wallace's intuition: water type, reproductive isolation and divergence in an Amazonian fish. **Journal of Evolutionary Biology**.v.1, p. 1-11, 2018.

PIRES, T. H. S., CUNHA, S. L. R., BORGHEZAN, E. A., LEITÃO, R., ZUANON, J. Sensory drive in colorful waters: morphological variation suggests combined natural and sexual selection in an Amazonian fish. Manuscrito em revisão.

PULLIAM, H. R. On the advantages of flocking. **Journal of Theoretical Biology**. v. 38: p. 419-422, 1973.

QUINN, T. P., BUSACK, C. A. Chemosensory recognition of siblings in juvenile salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Animal Behaviour**, v. 33, p. 51-56, 1985.

RICE, W. R. Speciation via habitat specialization: the evolution of reproductive isolation as a correlated character. **Evolutionary Ecology**, v.1, n.4, p.301-314. 1987.

RITCHIE, M. G. Sexual selection and speciation. **Annual Review of Ecology System**, v.38, p.79-102. 2007.

ROSENTHAL, G. G. Mate choice: the evolution of sexual decision making from microbes to humans. Princeton: **Princeton University Press**, , 2017.

RUEFFLER, C. VAN DOOREN, T.J., LEIMAR, O., ABRAMS, P.A. Disruptive selection and then what? **Trends in Ecology and Evolution**, v.21, n.5, p.238-245. 2006.

SCHLUTER, D. Ecology and the origin of species. **Trends in ecology & evolution**. v. 16, n, 7, p.372-380, 2001.

SIMPSON, G. G. Tempo and mode in evolution. New York: **Columbia University**. 1944.

WAAGE, J. K. Reproductive isolation and the potential for character displacement in the damselflies *Calopteryx maculata* and *C. aequabilis*. **Systematic Zoology**, v.24, p. 24-36, 1975.

WARD, A. J. W. & HART, P. J. B. Foraging benefits of shoaling with familiars may be exploited by outsiders. **Animal Behaviour**, v. 69, p. 329-335, 2004.

WARD, A. J. W., HART, P. J. B. & KRAUSE, J. The effects of habitat-and diet-based cues on association preferences in three-spined sticklebacks. **Behavioral Ecology**, v. 15, p. 925-929, 2004.

WARD, A .J. W., HOLBROOK, R. I., KRAUSE, J. & HART, P. J. B. Social recognition in sticklebacks: the role of direct experience and habitat cues. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 57, p. 575-583, 2005.

WEBSTER, M. M., WARD, A. J. W. & HART, P. J. B. Boldness is influenced by social context in threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). **Behaviour**, v. 144, p. 351-371, 2007.

WIERNASZ, D. C. Female choice and sexual selection on male wing melanin pattern in *Pieris occidentalis* (Lepidoptera). **Evolution**, v. 43, p. 1672-1682, 1989.

WIERNASZ, D. C., KINGSOLVER, J. G. Wing melanin pattern mediates species recognition in *Pieris occidentalis*. **Animal Behaviour**, v. 43, n. 1, p. 89-94, 1992.

WRIGHT, D. S., DEMANDT, N., ALKEMA, J.T., SEEHAUSEN, O., GROOTHUIS, T.G.G., MAAN, M.E. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 30, p. 289-299, 2017.

APÊNDICE A – Tamanho dos indivíduos utilizados no experimento de pista visual.

Peixe	Linhagem	UFAM	PERU	Vídeo
Peixe 1	UFAM	NA	NA	v0-bat1-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	NA	NA	v0-bat1-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	NA	NA	v1-bat1-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	18,12	34,19	v1-bat1-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	28,35	23,85	v2-bat1-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	27,07	17,26	v2-bat1-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	26,09	25,35	v3-bat1-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	28,71	22,93	v3-bat1-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	15,61	24,85	v0-bat2-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	45,49	11,15	v0-bat2-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	17,62	31,29	v1-bat2-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	41,62	13,06	v1-bat2-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	14,92	38,81	v2-bat2-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	34,88	10,58	v2-bat2-visualufam.csv

Peixe 1	UFAM	24,04	23,11	v3-bat2-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	20,02	22,66	v3-bat2-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	30,23	20,45	v0-bat3-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	27,67	27,1	v0-bat3-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	8,29	47,48	v1-bat3-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	11,24	47,11	v1-bat3-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	28,44	28,03	v2-bat3-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	23,4	32,46	v2-bat3-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	22,71	30,15	v0-bat4-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	15,28	38,73	v0-bat4-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	17,85	21,68	v1-bat4-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	26,51	27,62	v1-bat4-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	28,96	20,59	v2-bat4-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	39,78	13,92	v2-bat4-visualufam.csv
Peixe 1	UFAM	29,1	29,1	v3-bat4-visualufam.csv
Peixe 2	UFAM	12,14	13,15	v3-bat4-visualufam.csv
Peixe 1	PERU	16,96	34,51	v0-bat1-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	29,79	23,24	v0-bat1-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	24,66	24,91	v1-bat1-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	28,36	26,18	v1-bat1-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	26,68	29,36	v2-bat1-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	32,72	22,5	v2-bat1-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	19,14	34,52	v3-bat1-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	35,1	16,77	v3-bat1-visualperu.csv

Peixe 1	PERU	21,43	30,96	v0-bat2-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	31,07	18,59	v0-bat2-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	16,56	24,47	v1-bat2-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	45,08	12,42	v1-bat2-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	37,7	14,78	v2-bat2-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	37,36	21,25	v2-bat2-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	29,7	27,25	v3-bat2-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	29,3	22,96	v3-bat2-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	38,81	16,75	v2-bat3-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	25,54	10,92	v2-bat3-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	8,17	42,54	v3-bat3-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	21,47	36,07	v3-bat3-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	23,93	26,44	v0-bat4-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	31,2	21,65	v0-bat4-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	38,78	7,57	v1-bat4-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	20,2	34,21	v1-bat4-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	22,55	33,12	v2-bat4-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	20,31	23,89	v2-bat4-visualperu.csv
Peixe 1	PERU	23,71	12,05	v3-bat4-visualperu.csv
Peixe 2	PERU	52,67	6,05	v3-bat4-visualperu.csv