

# Estudo dos fatores genéticos e ecológicos associados com a origem de novas espécies de jacundá (Cichlidae, *Crenicichla*)

Frederico Henning

Universidade Federal do Rio de Janeiro

## Sumário

Introdução e Justificativa .....	1
Qualificações do Proponente .....	1
Introdução Teórica .....	2
Objetivo Geral .....	3
Objetivos Específicos.....	3
Material e Métodos.....	3
Cronograma de execução de atividades .....	5
Resultados Esperados .....	5
Referências bibliográficas.....	6
Condições do mantenedouro.....	7
Vínculos de outras solicitações .....	8

## Introdução e Justificativa

### *Qualificações do Proponente*

O solicitante é Professor na UFRJ, coordenador de grupo de pesquisa com 8 membros, pesquisador PQ-2 CNPq, Jovem Cientista FAPERJ e coordenador de projetos financiados por agências nacionais e internacionais. Participa de trabalho de campo regular e possui licença permanente. Recentemente coordenou expedições científicas com apoio logístico do ICMBio na

Projeto de Pesquisa

Unidade de Conservação do Parque Nacional do Iguaçu. Possui um histórico de publicações de alto nível nas disciplinas de genética e evolução, principalmente utilizando peixes de água doce da família Cichlidae. Conduz pesquisas há mais de 10 anos após o doutoramento incluindo trabalho com comportamento de organismos vivos (e.g. Henning & Matioli 2005, Henning et al. 2012, Henning et al. 2017).

*Introdução Teórica*

O presente projeto visa identificar os processos que regem a origem de novas espécies. Este conhecimento é fundamental para compreender os processos de origem da biodiversidade assim como mitigar a sua perda. Propomos aproveitar o potencial de novas tecnologias e de um ambiente biológico excepcional para entender a genética de traços ecologicamente relevantes que evoluíram de forma replicada na radiação adaptativa de *Crenicichla*. Embora o táxon focal do projeto seja *Crenicichla*, solicita-se também a autorização para coleta de um pequeno número de espécimes de espécies que são predadas por *Crenicichla* (peixes e macroinvertebrados). Dados de referência das espécies locais de macroinvertebrados não estão disponíveis, necessitamos desta etapa para usar métodos baseados em DNA para a identificação dos conteúdos gastrointestinais e investigar o grau de especialização ecológica que acompanha as novas espécies.

O longo tempo necessário para a especiação dificulta o teste dos fatores por trás dos estágios iniciais da origem de novas espécies (1). Modelos teóricos têm apontado que os principais traços que levam a especiação são a) escolha de parceiros e b) uma característica sob seleção natural divergente, mas dados genéticos sobre esses traços ainda são escassos (3). Radiações adaptativas são o resultado da origem de múltiplas espécies que ocupam uma diversidade de nichos ecológicos a partir de um único ancestral em um período curto de tempo, formando um “continuo de diferenciação” com estágios diferentes de divergência entre populações (2). Atualmente, com o avanço dos métodos de obtenção e análise de dados genômicos tornou-se mais viável estudar a “zona cinza” da especiação (4).

Peixes ciclídeos são um dos mais importantes modelos para o estudo da especiação, em função de sua rápida taxa de especiação, alta diversidade genética, ecológica e morfológica (1). Com 1713 espécies, contêm 10% da diversidade de peixes teleósteos (5). O gênero *Crenicichla*, conhecidos como Joanas ou Jacundás, é o mais diverso dos ciclídeos neotropicais e apresenta radiações adaptativas que são excelentes modelos para pesquisas evolutivas brasileiras (4). Na bacia do rio Iguaçu, ocorre uma radiação monofilética conhecida, o grupo *Iguassuensis*, onde há

## Projeto de Pesquisa

um fascinante cenário de adaptação fluvial em ecomorfologias distintas abrangendo piscivoria (*C. iguassuensis*), insetivoria (*C. tuca*), herbivoria (*C. tapii*) e moluscivoria (*C. tesay*). O traço de lábios hipertróficos, associado ao modo de forrageio em fendas rochosas também presente em outros ciclídeos (8) está presente em 3 diferentes espécies de *Crenicichla* e o relacionamento filogenético dessas espécies, sugere-se que lábios hipertróficos tenham evoluído diversas vezes (9). Apesar dessas espécies e ecomorfologias terem sido recentemente descritas, pouco se sabe sobre as diferentes estratégias de reprodução, comportamento, forrageamento, entre outros fatores.

## Objetivo Geral

Este trabalho visa desvendar as bases genéticas e ecológicas das radiações adaptativas de *Crenicichla* spp. Através da integração de dados genômicos, ecológicos e observações de animais em seu ambiente natural buscamos compreender a origem das adaptações e descrever as fontes de seleção ecológica e isolamento reprodutivo.

## Objetivos Específicos

- Testar se características adaptativas como os lábios hipertróficos estão sob seleção natural disruptiva e apresentam relação com a alimentação
- Testar se a diferenciação genômica está compatível com os modelos teóricos de crescimento de ilhas de diferenciação e introgressão adaptativa e seleção natural;
- Descrever a relação filogenética das espécies de *Crenicichla* e o grau de diferenciação e estruturação genética entre espécies e populações
- Descrever as diferenças alimentares e graus de especialização alimentar
- Descrever a base genética molecular das características adaptativas através de mapeamento genético e análise de expressão genica
- Descrever o comportamento de forrageio e escolha de parceiros
- Compreender o desenvolvimento ontogenético das diferentes morfologias tróficas através de análises longitudinais e estudos de plasticidade fenotípica em populações em cativeiro

## Material e Métodos

Peixes serão coletados utilizando uma ampla gama de metodologias de captura como redes de espera, de arrasto, anzol e tarrafa. Serão usadas redes de malhas 1.5, 2.0, 3.0 mm entre nós

Projeto de Pesquisa

adjacentes e 10m de comprimento cada. Eventualmente, serão utilizadas também armadilhas tipo covo para a captura de espécies de pequeno porte. Tarrafas de tamanhos e malhas variadas serão utilizadas principalmente para a captura de peixes associados aos ambientes de corredeiras e com substrato rochoso. Pesca com vara e anzol será eventualmente realizada para captura de algumas espécies. Após a coleta, os espécimes são mantidos vivos através de recipientes com aeradores ou sacos de transporte (breather bags, Kordon) para serem levados ao centro de processamento. Os espécimes são anestesiados utilizando MS-222 e fotografados em vida em um aquário de 2 litros posicionado em um miniestúdio fotográfico. Em seguida, são eutanasiados em MS-222 mantendo-os na solução por 15min após o cessamento do movimento opercular. A coleta de macroinvertebrados será conduzida de diferentes maneiras, tanto através de coleta manual, como através do uso de peneiras, surber e kicking. Após coletados serão dispensados em tubos de 50 ml ou sacos contendo álcool absoluto.

Para a obtenção de amostras de tecidos e DNA, diversos tecidos serão dissecados e preservados em álcool absoluto, RNAlater ou congelados. A extração de DNA genômico será realizada com kits comerciais. A integridade do DNA de cada amostra será avaliada a partir da eletroforese. Amostras serão submetidas ao sequenciamento de leituras longas “HiFi” na plataforma PacBio Revio. As análises de bioinformática serão realizadas em pacotes do R e em softwares adequados. A associação de regiões genômicas com as características-alvo será conduzida por GWA. Será realizada uma análise de componentes principais (PCA), considerando uma matriz de variância-covariância. A fim de testar o papel da introgressão nestas linhagens, será inferida e contrastada árvore filogenética de loci adaptativo vs. árvore filogenética de loci neutro. Múltiplos genomas completos serão produzidos para gerar um arcabouço para estas análises.

Iremos estudar a dieta usando uma variedade de abordagens. Dentre elas, metabarcoding, que utiliza a análise do DNA presente nas amostras de conteúdo estomacal ou fezes para identificar as presas consumidas. Essa técnica permite a detecção de uma ampla gama de espécies de presas de forma simultânea. Usaremos também a análise de isótopos estáveis, onde a proporção de isótopos em tecidos de um organismo reflete sua posição trófica e a origem de seus recursos alimentares consumidos. Por fim, serão feitas análises de conteúdo estomacal em estereomicroscópios. Combinadas, todas essas técnicas fornecem dados que permitem a compreensão dos hábitos alimentares das espécies. Indivíduos das diferentes espécies de interesse de *Crenicichla* e de algumas amostras dos possíveis itens alimentares ingeridos por elas, para que

# Solicitação de Autorização para Atividades com Finalidade Científica – IAT – Novembro de 2023

## Projeto de Pesquisa

seja possível a calibragem e referencias em análises moleculares e de isótopos. Todas as análises dentro deste objetivo contam com pesquisadores parceiros especialistas nos tópicos de alimentação/ ecologia de peixes (Laboratório de Ecologia de Peixes/ UFRJ, Dra. Míriam Albrecht) e macroinvertebrados aquáticos (Laboratório de Entomologia/ UFRJ, Doutorando André Alves). A identificação taxonômica dos dados moleculares dos conteúdos dos tratos digestórios dos peixes será obtida pela comparação com sequências conhecidas. O modo de forrageio e comportamento de escolha de parceiro serão investigados através de filmagens e registros fotográficos utilizando equipamentos variados (snorkel e GoPro, câmeras estáticas e drone subaquático). A análise de dados ecológico-comportamentais seguirá protocolos estabelecidos de quantificação do tipo “animal focal” e “scan sampling”. Os métodos para criação em cativeiro visando estudos comportamentais e de plasticidade fenotípica estão descritos em maiores detalhes na seção “Condições do Mantenedouro”.

### Cronograma de execução de atividades

O quadro abaixo detalha o andamento proposto do projeto. O quadro também detalha os responsáveis pela condução dos estudos no âmbito da formação de recursos humanos, sendo “D” para doutorado e “M” para mestrado.

	2023			2024			2025			2026			2027			2028											
	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Sep	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Sep	Out	Nov	Dez	
Coleta de Espécimes de Crenicichla																											
Registros e observações em ambiente natural																											
Coleta de espécies de referência para análise molecular de conteúdos estomacais																											
Análise de padrões de dieta usando metabarcoding e isotops																											
Análise filogenômica																											
Confeccção de genomas de referência																											
GWAS de características adaptativas																											
Bases moleculares do beijo por RNAseq																											
Evolução molecular da visão por RNAseq																											
Criação em mantedouros																											
Análise de comportamento em populações experimentais																											
Análise de expressão ontogenética																											
Plasticidade Fenotípica																											
Análise de comportamento de forrageio e cópula																											

## Resultados Esperados

Como resultado principal deste trabalho, esperamos descrever a base genética de diferentes características adaptativas e entender como estas características estão relacionadas aos processos

Projeto de Pesquisa

de escolha de parceiro e seleção natural divergente. Com estes dados, poderemos testar os principais modelos teóricos para a origem de novas espécies e verificar a) se a diferenciação genômica está compatível com os modelos teóricos de crescimento das ilhas de diferenciação e b) se há introgressão adaptativa dos genes ou gene responsável por essa característica. Com estes dados, esperamos produzir os seguintes produtos:

- Um conjunto de mais de 10 artigos científicos, sendo 3 de alto impacto, apresentações em congressos e material de disseminação do projeto visando a conscientização para a conservação;
- Formação de mais de 5 alunos de pós-graduação;
- No nível da comunidade local, esperamos aumentar a conscientização sobre a diversidade endêmica local e promover a capacitação de futuros exploradores e conservadores da natureza por meio da troca ativa de conhecimento. Já observamos isso em primeira mão em interações anteriores com jovens locais. Uma disseminação mais ampla para um público mais geral será alcançada através do compartilhamento de conteúdo digital nas redes sociais. Nosso extenso uso de dispositivos de gravação subaquática e, especialmente, nossas parcerias com fotógrafos locais subaquáticos, garantem que haverá muitas imagens deslumbrantes de peixes *Crenicichla* em seu habitat natural disponíveis para esse fim. Reconstruir a história molecular natural desses traços certamente criará mais um exemplo didático que levará à valorização e conservação desse sistema incrível.
- Será produzida uma base de dados moleculares de referência de macroinvertebrados e peixes que terá ampla aplicabilidade também para uso de DNA ambiental

## Referências bibliográficas

1. HENNING, F & A MEYER. The evolutionary genomics of cichlid fishes: explosive speciation and adaptation in the postgenomic era. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 15, p. 417-441, 2014.
2. SEEHAUSEN O et al. Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n. 3, p. 176, 2014. doi:10.1038/nrg3644
3. NOSIL, P., 2012 *Ecological speciation*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
4. DE QUEIROZ K. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

Projeto de Pesquisa

5. ESCHMEYER WN, R FRICKE, R VAN DER LAAN. Catalog of fishes: genera, species, references. 2017.
6. LUCENA, Carlos AS; KULLANDER, Sven O. The *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguai River drainage in Brazil. *Ichthyol Explor Fres*, v. 3, p. 97-192, 1992.
7. GREENWOOD, P. H. African cichlids and evolutionary theories. *Evolution of fish species flocks*, 1984.
8. HENNING, Frederico et al. Genetic dissection of adaptive form and function in rapidly speciating cichlid fishes. *Evolution*, v. 71, n. 5, p. 1297-1312, 2017.
9. VARELLA, Henrique Rosa. Revisão taxonômica das espécies de *Crenicichla* Heckel das bacias dos rios Paraná e Paraguai (Teleostei: Cichlidae). Master tesis. Universidade de São Paulo (USP). 2011.

## Condições do mantenedouro

Peixes ciclídeos do gênero *Crenicichla* serão transportados do local de coleta com o uso de recipientes de 20 litros (até 4 peixes por recipiente) contendo água proveniente do local de coleta e devidamente oxigenados por bombas. O transporte não será superior a 3 dias, o que não representa risco à sobrevivência dos animais. Animais serão mantidos em aquários de tamanho médio (30-200 litros) respeitando-se os protocolos estabelecidos de criação de peixes ciclídeos. Os aquários que irão receber os animais serão preparados previamente com água de características físico-químicas compatíveis com o ambiente de origem (e.g. pH e temperatura). Animais serão alimentados duas vezes ao dia com pellets comerciais de formulação específica para ciclídeos. A dieta será suplementada por larvas de *Artemia*. Trocas de água (70%) ocorrerão com frequência quinzenal. A água será mantida em boas condições de oxigênio e toxicidade através da circulação por uso de filtros e oxigenadores. O número de animais por aquário levará em conta a densidade mínima para o bem estar das espécies: mínimo de 20 l por indivíduo, mínimo de cinco indivíduos por aquário e razão sexual equilibrada. Os ambientes serão enriquecidos com esconderijos (rochas, telhas e tijolos). Pares em comportamento de cópula ou corte serão isolados, uma vez que podem tornar-se extremamente agressivos com os outros indivíduos. Caso haja acasalamentos bem sucedidos, as larvas serão transferidas para um aquário de 20 litros e mantidas com intensa circulação e alimentação com base em *Artemia*. Os indivíduos serão marcados com tags eletrônicas (PIT Tags), injetados na musculatura dorsal e serão monitorados periodicamente

Projeto de Pesquisa

para medição de características morfológicas (peso, tamanho e forma corporal). Leituras comportamentais serão utilizadas para determinar o nível de estresse à que os animais estão submetidos, e.g. a perda de apetite é um claro sinal de desconforto.

## Vínculos de outras solicitações

N. Solicitação: 86762

Justificativa: A presente solicitação complementa a licença permanente obtida recentemente pelo pesquisador (N. 86762) para permitir a coleta dentro de UC Estaduais no Estado do Paraná.