



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

**Forças evolutivas atuando sobre o gene *RH1* em ciclídeos
neotropicais com diferentes dietas**

Maringá
2021

BRUNO HENRIQUE MIOTO STABILE

Forças evolutivas atuando sobre o gene *RH1* em ciclídeos neotropicais com diferentes dietas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Limnologia.
Área de concentração: Ecologia e Limnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira
Coorientador: Dr. Thomaz Mansini Carrenho Fabrin

Maringá
2021

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

S775f Stabile, Bruno Henrique Mioto, 1997-
Forças evolutivas atuando sobre o gene *RHI* em ciclídeos neotropicais com diferentes dietas / Bruno Henrique Mioto Stabile. -- Maringá, 2021.
44 f. : il. (algumas color.).

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2021.
Orientadora: Prof. ^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira.
Coorientador: Dr. Thomaz Mansini Carrenho Fabrin.

1. Peixes ciclídeos (Cichlidae) - Sistema visual - Evolução molecular - Região neotropical. 2. Peixes de água doce - Sistema visual - Proteínas - Evolução molecular - Região neotropical. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. – 597.74138

BRUNO HENRIQUE MIOTO STABILE

Forças evolutivas atuando sobre o gene *RH1* em ciclídeos neotropicais com diferentes dietas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Limnologia e aprovada pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira
DBC/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Luciano Seraphim Gasques
Universidade Paranaense (UNIPAR)

Aprovado em: 19 de abril de 2021.

Local de defesa: Realizado em *home office*, via acesso remoto por videoconferência pelo aplicativo Google Meet, devido a situação do Covid-19.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Cláudia e Dorival, por sempre apoiarem meus sonhos e me aconselhar quando preciso. Neste último ano passamos mais tempo trabalhando em casa e pude ver todo o esforço e comprometimento que depositam em seu trabalho diário. Vocês são a base da minha formação e exemplo para toda minha vida.

À minha irmã, Andressa, pelo amor e ensinamentos partilhados comigo até hoje, você é um exemplo pessoal e profissional para mim.

À minha namorada, Laís, por ser minha companhia em todos os momentos. Espero dividir muitos outros momentos ao seu lado.

À minha orientadora, Alessandra Valéria de Oliveira, pela paciência e dedicação que sempre teve comigo. Seu exemplo como pesquisadora, professora e mãe (ao mesmo tempo) será lembrado por muitos à sua volta.

Ao meu coorientador, Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, por me apresentar à genética molecular e, mesmo estando longe atualmente, nunca deixar de me ensinar algo a mais.

Aos meus amigos que estiveram comigo no Laboratório de Genética, Adrian, Bárbara, Flávia, Geovana, João, Julia, Juliana, Laura, Lara Mayara, Mazé e Rodrigo. Durante este ano pude ver o quanto cada ensinamento, conversa e aniversário com vocês fez falta. Não vejo a hora de voltarmos ao trabalho.

Aos meus amigos da turma de mestrado de 2019 pelas conversas e ensinamentos trocados nas aulas e laboratórios.

Aos professores e funcionários do Nupélia e PEA, em especial, Bete e Jocemara, que fazem o impossível para facilitar o trabalho de todos.

Às professoras e professores da banca pelas sugestões para este trabalho.

Ao Nupélia ao COMCAP, pela infraestrutura e apoio oferecidos a este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

E por fim, agradeço ao SUS. Neste ano todos pudemos perceber a importância de um sistema de saúde único e gratuito para todos à nossa volta. E por este mesmo SUS, agradeço todos os dias por possibilitar um transplante para meu pai, fazendo com que fosse possível que eu dividisse este momento com minha família hoje.

Forças evolutivas atuando sobre o gene *RHI* em ciclídeos neotropicais com diferentes dietas

RESUMO

Ambientes aquáticos neotropicais possuem grande heterogeneidade de *habitats*, apresentando diferenças na intensidade luminosa na coluna d'água. A luminosidade está diretamente relacionada com o sistema visual dos vertebrados aquáticos, o que pode interferir em fatores ecológicos, como a alimentação. Em consideração à biodiversidade de espécies e diversas adaptações ecológicas observadas em ambientes aquáticos continentais, os ciclídeos neotropicais representam um bom modelo para estudos evolutivos. Este grupo possui diversas adaptações ao seu modo de vida e pode apresentar e acumular mutações em sítios específicos das proteínas visuais que podem ser relacionadas com tais adaptações. As proteínas visuais são codificadas por genes *opsins*, o que permite o estudo da intensidade de atuação da seleção natural sobre a proteína utilizando ferramentas moleculares. Com o objetivo de verificar se a dieta constitui um importante fator na diversificação do gene responsável pela visão escotópica destes vertebrados, foram utilizadas 40 espécies de ciclídeos neotropicais categorizadas de acordo com sua dieta e, por meio de diferentes análises de seleção de códons, foram observados diferentes sítios da proteína positivamente selecionados em espécies especialistas e generalistas. As linhagens de peixes predadores apresentaram evidências de uma rápida seleção do gene *RHI* quando comparadas a outros grupos, indicando a influência da dieta na evolução visual deste grupo.

Palavras-chave: Ecologia visual. Evolução de proteínas. Evolução molecular. Rodopsina.

Evolutionary forces acting on the *RHI* gene across Neotropical cichlids with different diets

ABSTRACT

Neotropical aquatic environments are highly heterogeneous and present a broad light spectral variation. Photic conditions can be closely related to aquatic vertebrates' visual system evolution, which can interfere with ecological factors, such as feeding. Therefore, due to the species' biodiversity and ecological adaptations observed in continental aquatic environments, Neotropical cichlids represent an important model for evolutionary studies. Cichlinae shows several adaptations regarding their life cycle and may present and accumulate mutations resulting in specific amino acid changes of visual proteins. These proteins are encoded by visual opsins genes, which allow some "measurement" of natural selection on the protein using molecular tools. Thus, it is possible to verify whether the diet constitutes an important factor in the diversification of the gene responsible for the scotopic vision of these vertebrates. In this study, 40 species of Neotropical cichlids were categorized according to their diet and, using different codon selection analyses, different protein sites positively selected were observed in specialist and generalist species. The lineages of predatory fish showed evidence of a stronger evolution of the *RHI* gene when compared to other groups, indicating the influence of the diet on this group's visual evolution.

Keywords: Molecular evolution. Protein evolution. Rhodopsin. Visual ecology.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Molecular Biology and Evolution*. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/pages/General_Author_Guidelines>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1	Obtenção do material e banco de dados	11
2.2	Partições e classificação	13
2.3	Extração de DNA, PCR e sequenciamento	14
2.4	Análises moleculares	15
3	RESULTADOS	16
4	DISCUSSÃO	27
	REFERÊNCIAS	32
	APÊNDICE A – Árvore gênica de máxima verossimilhança da região parcial do gene <i>RH1</i> de todas as espécies de ciclídeos neotropicais.	38
	APÊNDICE B - Sítios sob seleção para a partição Red-2 (Dieta-2) e Red-3 (Dieta-3) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade <i>a posteriori</i> > 0,9).	41
	APÊNDICE C - Sítios sob seleção para a partição Blue-2 (Dieta-2) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade <i>a posteriori</i> > 0,9).	42
	APÊNDICE D - Sítios sob seleção para a partição Blue-3 (Dieta-3) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade <i>a posteriori</i> > 0,9).	43
	APÊNDICE E - Sítios sob seleção para a partição Green-3 (Dieta-3) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade <i>a posteriori</i> > 0,9).	44

1 INTRODUÇÃO

Ambientes aquáticos continentais neotropicais possuem uma ampla variação na intensidade luminosa possibilitada pela heterogeneidade das características ambientais (Bowmaker 1995; Warrant and Johnsen 2013). Estes corpos aquáticos apresentam diferentes tipos de sedimentos e matéria orgânica dissolvida que resultam em diversos graus de atenuação da luz (Sioli 1984; Costa et al. 2013) e que podem exercer maior influência sobre a composição da comunidade do que o próprio *habitat* (Bogotá-Gregory et al. 2020).

A consequente heterogeneidade fótica na coluna d'água exerce uma importante pressão evolutiva sobre o sistema visual dos organismos (Kroger 2003), podendo acarretar em adaptações a nível molecular (Bowmaker 1995; Terai et al. 2006; Hauser et al. 2017). Este fato torna o sistema visual importante para os vertebrados aquáticos, interferindo em questões ecológicas, como escolha de parceiros, visualização de presas e predadores e comportamento alimentar (Hofmann et al. 2009; Miyagi et al. 2012; Carleton et al. 2020).

A rápida diversificação de alguns grupos de ciclídeos neotropicais (Cichlinae) (López-Fernández et al. 2010; Hauser et al. 2017) coloca este grupo como um complemento dos estudos estabelecidos com ciclídeos africanos em ambientes lacustres (Ilves et al. 2018). Esses peixes possuem diversas adaptações morfológicas, tróficas, sensoriais e comportamentais em relação a outros grupos (López-Fernández et al. 2013; López-Fernández et al. 2014; Arbour et al. 2020; Carleton and Yourick 2020), e que podem ser afetadas de diferentes formas pela presença ou não de luz (Schwalbe and Webb 2015).

A amplitude da variação luminosa em ambientes neotropicais, aliada à diversidade de peixes ciclídeos, podem demonstrar o processo evolutivo do sistema visual destes organismos, relacionando anatomia, fisiologia e biologia molecular à ecologia visual (Bowmaker 1995; Cronin et al. 2014). Fatores ecológicos como a turbidez da água, profundidade do *habitat*, dieta e preferências de forrageamento se mostraram como bons preditores em relação à adaptações na sensibilidade visual de ciclídeos africanos (Hofmann et al. 2009; Nagai et al. 2011; Ehlman et al. 2015; Irisarri et al. 2018).

O processo visual depende da absorção de luz realizada por células especializadas encontradas na retina de vertebrados, as células cones responsáveis pela visão de cores, e as células bastonetes responsáveis pela visão escotópica (baixa luminosidade) (Bowmaker 1995). Estas células possuem pigmentos visuais compostos por proteínas opsinas ligadas a cromóforos retiniais (aldeídos de vitamina A) sensíveis a determinados comprimentos de onda,

os quais são capazes de gerar uma alteração conformacional na molécula (11-*cis*-retinal → *all-trans*-retinal), dando início à cadeia de fototransdução, a transformação de um sinal luminoso em um impulso nervoso (Land and Nilsson 2012; Cronin et al. 2014).

Cada tipo de proteína opsina visual é codificada por um gene específico, os quais são classificados de acordo com seu pico máximo de absorção de luz no espectro (λ máx.) (Terakita 2005; Trezise and Collin 2005). Para as células cones, os genes responsáveis por expressar proteínas que absorvam comprimentos de ondas curtas são: *SWS1* (~360-440 nm), *SWS2A* e *SWS2B* (~400-450 nm); comprimentos de ondas médias: *RH2A* e *RH2B* (~450-530 nm); e comprimentos de ondas longas: *LWS* (~510-560 nm). No caso das células bastonetes, apenas um gene é responsável pela expressão da proteína utilizada para visão escotópica: *RH1* (~480-510 nm) (Yokoyama 2008).

Mutações nestes genes que acarretem em substituições não sinônimas e modifiquem aminoácidos específicos (neste trabalho, chamados de sítios-chave) que compõem as proteínas opsinas podem alterar sua absorção máxima (Yokoyama 2008). Mesmo uma diferença de poucos nanômetros na absorção do espectro de luz pela proteína pode gerar um impacto no comportamento do animal (Hauser et al. 2017; Hauser and Chang 2017). Além do mais, mutações em sítios que interfiram indiretamente sobre a visão (como as propriedades cinéticas da proteína) também podem impactar o estilo de vida do animal e serem selecionadas (Castiglione et al. 2017; Castiglione et al. 2018).

Ciclídeos neotropicais apresentaram uma intensa seleção positiva dos pigmentos visuais responsáveis pela visão escotópica (rodopsinas) (Schott et al. 2014; Torres-Dowdall et al. 2015; Hauser et al. 2017). Esta seleção positiva é indicada pela razão > 1 entre substituições não-sinônimas (d_N), quando ocorre a alteração de um aminoácido em decorrência de uma alteração nucleotídica, e substituições sinônimas (d_S), quando não ocorre a alteração aminoacídicas (Xu and Yang 2013).

Este fenômeno também foi demonstrado em algumas tribos de ciclídeos africanos com um alto grau de adaptação de acordo com seu modo de vida (ambiente raso/profundo) durante seu processo evolutivo (Nagai et al. 2011). Assim, uma vez que o ambiente aquático é altamente heterogêneo em relação às características fóticas, é possível que ocorra a alteração da percepção visual a partir de alterações na expressão dos genes *opsins*, o que pode ocorrer entre espécies simpátricas (Seehausen et al. 2008; Smith et al. 2011), e/ou substituições nucleotídicas que acarretem mudanças aminoacídicas em sítios-chave da proteína opsina (Hofmann et al. 2009; Miyagi et al. 2012).

Desta forma, ao longo da história evolutiva é possível identificar a seleção positiva a nível molecular de proteínas opsinas em ciclídeos, demonstrando a importância da evolução do sistema visual para a diversificação deste grupo tanto em ambientes lacustres africanos, como em outros ambientes que não foram tão estudados, como rios e lagos neotropicais (Schott et al. 2014; Torres-Dowdall et al. 2015; Hauser et al. 2017).

Estudos anteriores destacaram que a dieta possui grande influência no percurso da evolução de genes *opsins* (Hauser and Chang 2017; Irisarri et al. 2018) impactando diretamente o fitness dos indivíduos. A partir da diversidade e especialização de componentes alimentares, é possível categorizar os ciclídeos neotropicais em diferentes agrupamentos, segundo Arbour et al. (2020). Ao se diversificarem pelos ambientes neotropicais, diferentes linhagens de ciclídeos migraram de uma dieta mais generalista, baseada em detritos e pequenas presas, para uma dieta predatória, baseada em peixes e presas maiores. Tal diversificação pode ser explicada pelas mudanças nas condições ambientais e oportunidades ecológicas encontradas em novos ambientes.

Considerando a grande heterogeneidade visual existente em ambientes aquáticos neotropicais, diferentes dietas (Arbour et al. 2020) com itens alimentares que exijam variados níveis de dependência da percepção visual acomodam pressões ambientais distintas sobre as populações de peixes.

Com o objetivo de verificar se a dieta constitui um importante fator na diversificação do gene responsável pela visão escotópica destes vertebrados, hipotetizamos que ciclídeos neotropicais, com diferentes dietas, apresentam diferentes sítios sob seleção positiva para a proteína rodopsina, indicando uma possível adaptação visual destes organismos na história evolutiva por meio de aspectos ecológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material e banco de dados

Foram obtidos tecidos de 13 espécies de ciclídeos neotropicais provenientes de diversas localidades do Brasil e Paraguai (Tabela 1). Parte dos espécimes foram coletados por meio do Programa Ecológico de Longa Duração (PELD) (22°47' S; 53°19' W) – CNPq sítio 06 da Universidade Estadual de Maringá (protocolos do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEUA: 123/2010, 5680160117 e 1420221018; e SISBIO: 14028). Amostras de

tecido muscular foram obtidas a partir da coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), bem como da coleção ictiológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista, Botucatu (LBP).

Para que fosse possível utilizar a classificação proposta por Arbour et al. (2020) em relação à dieta dos ciclídeos nas análises, foram selecionadas do Genbank 34 sequências do gene *RH1*, todas de espécies de ciclídeos utilizadas em Arbour et al. (2020), além de quatro sequências de espécies de *Cichla* e uma sequência de *Geophagus brasiliensis*. Para padronização dos resultados, não foram utilizadas outras espécies além das contidas no trabalho de Arbour et al. (2020), com exceção de *Cichla*, único gênero que apresenta uma dieta piscívora. O banco de dados final contou com 40 espécies de ciclídeos neotropicais. Todas as sequências de origem brasileira utilizadas foram cadastradas no Sisgen (Nº Cadastro: A45A105).

Tabela 1. Lista de espécies de ciclídeos neotropicais.

Classificação	GenBank	Localidade	Referência
Astronotini			
<i>Astronotus ocellatus</i>	KX382934	Rio Negro, Brasil	Escobar-Camacho (2016)
Chaetobranchini			
<i>Chaetobranchius flavescens</i>	MF078369	Rio Tocantins, Brasil	Hauser et al. (2017)
Cichlasomatini			
<i>Acaronia nassa</i>	MF078374	Rio Nanay, Peru	Hauser et al. (2017)
<i>Aequidens tetramerus</i>	MF078378	Caño Santa Rita, Peru	Hauser et al. (2017)
<i>Cichlasoma pusillum</i> *	-	Rio Acaray, Paraguai	Este estudo
<i>Laetacara dorsigera</i>	MF078386	Aquarismo	Hauser et al. (2017)
Cichlini			
<i>Cichla intermedia</i>	MF078370	Rio Orinoco, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Cichla kelberi</i>	-	Alto rio Paraná, Brasil	Este estudo
<i>Cichla monoculus</i>	MK568304	Panamá	Escobar-Camacho (2019)
<i>Cichla temensis</i>	MF078371	Rio Pirara, Guiana	Hauser et al. (2017)
<i>Cichla vazzoleri</i>	MK562368	Brasil	Escobar-Camacho (2019)
Geophagini			
<i>Apistogramma commbrae</i> *	-	Alto Rio Paraná, Brasil	Este estudo
<i>Apistogramma hoignei</i>	JX576477	Caño Maporal, Venezuela	Schott et al. (2014)
<i>Apistogramma</i> sp.*	-	Igarapé Jaburu, Brasil	Este estudo
<i>Apistogramma</i> sp. *	-	Rio Iquiri, Brasil	Este estudo
<i>Biotodoma wavrini</i>	JX576485	Rio Cinaruco, Venezuela	Schott et al. (2014)
<i>Biotocus dicentrarchus</i>	MF078366	Rio Cinaruco, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Crenicichla</i> aff. <i>lugubris</i>	JX576471	Rio Mazaruni, Guiana	Schott et al. (2014)
<i>Crenicichla</i> aff. <i>wallaci</i>	JX576474	Rio Las Marias, Venezuela	Schott et al. (2014)

<i>Crenicichla iguassuensis</i> *	-	Rio Iguaçú, Brasil	Este estudo
<i>Crenicichla sp. *</i>	-	Tributário do rio Gurguéia, Brasil	Este estudo
<i>Dicrossus maculatus</i>	MF078404	Rio Tapajós, Brasil	Hauser et al. (2017)
<i>Geophagus abalios</i>	MF078405	Rio Orinoco, Venezuela	Hauser et al. (2017)
' <i>Geophagus</i> ' <i>brasiliensis</i>	-	Arroio Tamanduá, Brasil	Este estudo
<i>Geophagus dicrozoster</i>	JX576491	Rio Cinaruco, Venezuela	Schott et al. (2014)
<i>Geophagus parnaibae</i> *	-	Rio Seco, Brasil	Este estudo
' <i>Geophagus</i> ' <i>steindachneri</i>	MF087407	Rio Magdalena, Colômbia	Hauser et al. (2017)
<i>Guianacara dacrya</i>	MF078409	Rio Sawariwaw, Guiana	Hauser et al. (2017)
<i>Gymnogeophagus gymnogenys</i> *	-	Rio Ferreira, Brasil	Este estudo
<i>Gymnogeophagus rhabdotus</i> *	-	Arroio afluente Rio Soturno, Brasil	Este estudo
<i>Gymnogeophagus setequedas</i> *	-	Rio Iguaçú, Brasil	Este estudo
<i>Mikrogeophagus ramirezi</i>	MF078416	Caño Maporal, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Satanoperca daemon</i>	MF078417	Rio Cinaruco, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Satanoperca jurupari</i>	MF078418	Rio Orosa, Peru	Hauser et al. (2017)
<i>Satanoperca sp. *</i>	-	Caruaru Almirim - rio Jaré, Brasil	Este estudo
Heroini			
<i>Amatitlania siquia</i>	KP715367	Lago Xiloá, Nicarágua	Dowdall et al. (2015)
<i>Amphilophus citrinellus</i>	KP715355	Lago Apoyo, Nicarágua	Dowdall et al. (2015)
<i>Archocentrus centrarchus</i>	KP715361	Lago Managua, Nicarágua	Dowdall et al. (2015)
<i>Caquetaia kraussii</i>	MF078429	Caño Maporal, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Herichthys cyanoguttatus</i>	MF078367	Cataratas Dolan, Texas	Hauser et al. (2017)
<i>Heros sp common</i>	MF078442	Rio Ventuari, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Herotilapia multispinosa</i>	MF078443	Lagoa Tortuguero, Costa Rica	Hauser et al. (2017)
<i>Hoplarchus psittacus</i>	MF078444	Rio Ventuari, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Hypselecara coryphaenoides</i>	MF078445	Rio Cinaruco, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Mesonauta insignis</i>	MF078448	Rio Cinaruco, Venezuela	Hauser et al. (2017)
<i>Parachromis managuensis</i>	KP715365	Lago Nicaragua, Nicarágua	Dowdall et al. (2015)
<i>Petenia splendida</i>	MF078454	Lagoa Lacanjá, México	Hauser et al. (2017)
<i>Theraps irregularis</i>	MF078459	Rio Lacanjá, México	Hauser et al. (2017)
<i>Thorichthys meeki</i>	MF078462	Rio Lacanjá, México	Hauser et al. (2017)
<i>Trichromis salvini</i>	MF078434	Rio Tzendales, México	Hauser et al. (2017)
<i>Vieja melanurus</i>	MF078453	Lago Peten Itza, Guatemala	Hauser et al. (2017)
Outgroup			
<i>Gambusia affinis</i>	Y11146	-	Archer & Hirano (1997)
<i>Lucania goodei</i>	AY296738	-	Não publicado
<i>Melanotaenia australis</i>	FJ940704	-	Não publicado
<i>Oryzias latipes</i>	AB180742	-	Kawamura et al. (2005)

* Espécies não utilizadas nas análises evolutivas

2.2 Partições e classificação

Arbour et al. (2020) classificaram as espécies a partir da composição alimentar apresentada por cada uma, testando como estes fatores favoreceram a adaptação destes peixes durante a história evolutiva de colonização de ambientes neotropicais.

Representando a primeira e mais significativa divisão em relação à composição alimentar, o primeiro grupo (Red-2) representa uma alimentação de grandes presas, majoritariamente piscívora/macroinverteívora (peixes, macrocrustáceos, artrópodes terrestres e moluscos), enquanto o segundo grupo (Blue-2) representa uma dieta baseada em outros componentes (detritos, vegetação e pequenos invertebrados). A partir deste primeiro modelo de dois grupos, pode se considerar uma segunda separação de especialização trófica, com o grupo “Blue-2” sendo subdivido em outros dois grupos, um deles (Blue-3) com espécies que primariamente consomem invertebrados bentônicos (insetos aquáticos, vegetação e pequenos invertebrados) e outro (Green-3) com espécies consumindo vegetação e detritos (detritos animais/vegetais, vegetação aquática e plantas terrestres). Para critérios de entendimento, consideramos os grupos gerados a partir da primeira classificação (chamada neste trabalho de “Dieta-2”) com os nomes “Red-2” e “Blue-2”, enquanto a partir da segunda classificação mais restrita (chamada neste trabalho de “Dieta-3”), consideramos os nomes “Red-3”, “Blue-3” e “Green-3”.

Utilizamos também outras classificações testadas em trabalhos anteriores (Schott et al. 2014; Torres-Dowdall et al. 2015; Hauser et al. 2017) como “Biogeografia” (América Central/América do Sul) e “Ambiente” (Rio/Lago) (chamados nos outros trabalhos de “Geografia” e “Ecologia”, respectivamente). A classificação “Ambiente” foi adaptada em relação ao banco de dados deste trabalho, considerando também espécies que habitam lagoas como parte do grupo “Lago” além da criação da partição “Ambos”, que compreende ciclídeos com distribuição tanto em rios quanto em lagos/lagoas.

2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

A extração de DNA do tecido muscular dos peixes foi realizada utilizando os kits Wizard® Genomic DNA e ReliaPrep™ gDNA da Promega, seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram quantificadas utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%, comparando-se com DNA lambda de concentração conhecida.

Para a preparação da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 μM de cada primer, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase, água Milli-Q, e 10ng do DNA extraído.

Os primers utilizados na PCR foram *CICHRHI_5UTF_22* (5'-TCACTCTCCCAAACAGCCGGAA-3') e *CICHRHI_3UTR_1309* (5'-TGGACTGACCTGTCCTGCAACTG-3') (Weadick et al. 2012) para a amplificação completa do gene *RHI* (Fig. 1) de acordo com Schott (2014). Os produtos da amplificação foram purificados de acordo com Rosenthal et al. (1993). As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo específico utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1, e sequenciadas em sequenciador automático ABI 3730 Applied Biosystems no laboratório do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

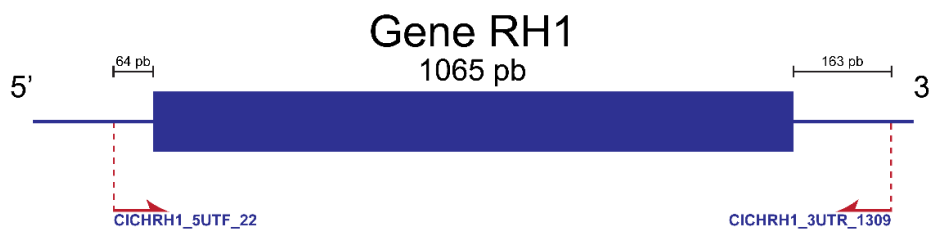


Fig. 1. Disposição dos primers utilizados em relação ao gene de referência.

2.4 Análises moleculares

As seqüências obtidas foram editadas utilizando o programa BioEdit (Hall 1999) e alinhadas com o MEGA 7 (Kumar et al. 2016) a partir do algoritmo ClustalW (Thompson et al. 1994). As regiões codificadoras foram alinhadas a partir do gene *RHI* bovino para determinação do posicionamento dos sítios-chave da proteína (Bowmaker 1995; Hofmann et al. 2009; Schott et al. 2014). O *webservice* RAxML-NG foi utilizado para a criação da árvore filogenética a partir do método estatístico de máxima verossimilhança (Kozlov et al. 2019) utilizando o melhor modelo de substituição nucleotídica (HKY + I + G) determinado pelo software jModelTest (Darriba et al. 2012). O software FigTree (Rambaut 2018) foi utilizado para a edição das árvores de acordo com cada partição (descritas na seção anterior) selecionada, além da edição posterior de outras árvores.

A função *codeml* implementada no programa pamlX (Xu and Yang 2013) também foi utilizada para estimar a variação de códons sob seleção positiva utilizando o modelo de sítios aleatórios, a partir dos modelos M0, M1a e M2a para estimar a taxa ω , que corresponde a medida de seleção natural atuando sobre a proteína a partir da razão de substituições não-sinônimas (d_N) e substituições sinônimas (d_S), e presença de seleção positiva sobre os códons.

A partir dos modelos M7 e M8, foram inferidos os sítios positivamente selecionados considerando a análise Bayes Empirical Bayes (BEB) com probabilidade posterior $> 80\%$ e $> 90\%$. Também foi utilizado o teste FUBAR (Fast Unconstrained Bayesian AppRoximation) implementado no *webservice* Datamonkey (Weaver et al. 2018) para a inferência dos sítios positivamente selecionados, considerando taxas de substituições sinônimas (α) e não-sinônimas (β) a partir de um algoritmo Bayesiano, reportando as taxas a significância da seleção positiva e negativa a partir de probabilidade *a posteriori* (Murrell et al. 2013). As análises sobre seleção de sítios foram feitas apenas para as partições “Dieta-2” e “Dieta-3”, por serem as novas partições criadas neste trabalho.

Para todos os modelos utilizados no pamlX, foram testados diferentes valores de ω iniciais (0,5, 1 e 10) para checar a convergência dos parâmetros estimados e evitar o ótimo local, sendo selecionado aquele que apresentou maior valor de ln de máxima verossimilhança (lnL) dentre os testados. O valor de significância entre modelo nulo e alternativo foram calculados a partir do teste de qui-quadrado também implementado no software pamlX.

Compreendendo que substituições não-sinônimas que podem provocar alterações no comprimento máximo da onda (λ_{\max}) de luz absorvido pela proteína opsina e/ou afetar a cinética da proteína, os sítios positivamente selecionados a partir dos modelos M8 e FUBAR foram ilustrados na proteína a partir do modelo da estrutura cristalizada da rodopsina ativa meta II do banco de dados PDB (código de acesso 3PQR) utilizando o software UCSF Chimera X (Pettersen et al. 2021).

Para analisar a seleção divergente do gene *RHI* entre diferentes partições (“Dieta-2”/“Dieta-3”/“Biogeografia”/“Ambiente”) foi utilizada a função Clade model C (CmC). Essa função compara os clados de uma filogenia considerando a premissa de que estes podem estar sob diferentes pressões seletivas, assumindo o modelo M2a_rel como modelo nulo (Weadick and Chang 2012).

3 RESULTADOS

Foram obtidas 13 sequências completas (1065 pb – 355 aa) do gene *RHI* de 13 espécies, sendo 11 novos registros ciclídeos neotropicais em relação aos dados disponíveis anteriormente, sendo elas: ‘*Geophagus brasiliensis*, *Geophagus parnaibae*, *Gymnogeophagus rhabdotus*, *Gymnogeophagus gymnogenys*, *Gymnogeophagus setequedas*, *Cichla kelberi*, *Apistogramma commbrae*, *Cichlasoma pusillum*, *Satanoperca* sp., *Crenicichla iguassuensis*, *Crenicichla* sp., *Apistogramma* sp. 1, e *Apistogramma* sp. 2 (Apêndice A).

Com o objetivo de utilizar o maior número possível de sequências a partir das espécies contidas no trabalho de Arbour et al. (2020), foi necessária a utilização de sequências mais curtas, que compreendem a região entre os aminoácidos 49 e 297 da proteína rodopsina, de acordo com a numeração da rodopsina bovina. Dessa forma, não foi possível comparar alguns sítios com o trabalho anterior com ciclídeos neotropicais, que utilizou toda a região codificante para esta proteína (Hauser et al. 2017).

Utilizando o banco de dados de espécies em comum com o trabalho de Arbour et al. (2020), foram totalizadas 40 espécies para as análises de seleção de códons e partições (Fig. 2). O alinhamento final contou com uma extensão de 747 pb (249 aa), compreendendo a região entre os aminoácidos 49 e 297, de acordo com o alinhamento com a rodopsina bovina, o que corresponde a quase a totalidade da região transmembrana da proteína (37-308, segundo o modelo PDB: 3PQR).

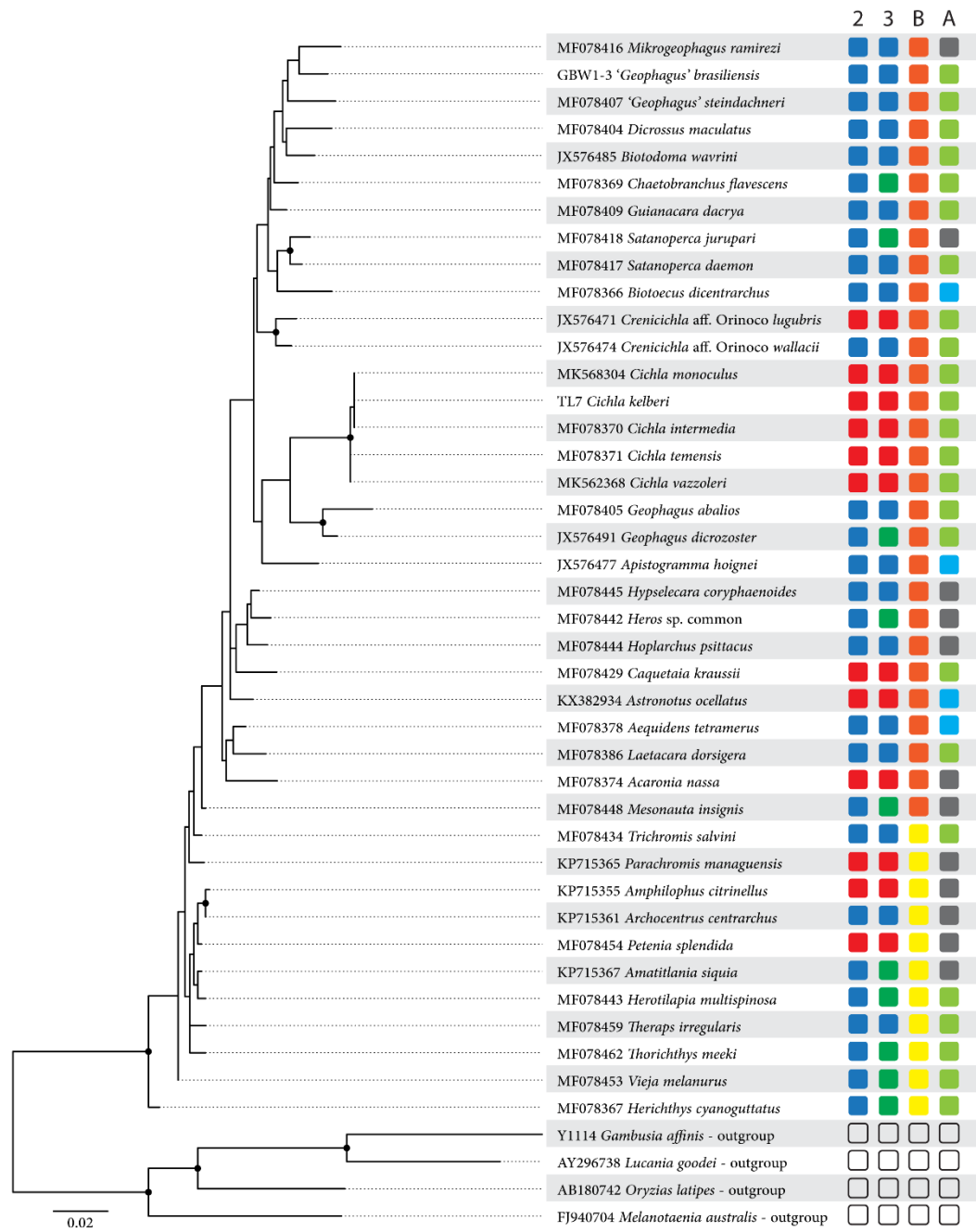


Fig. 2. Árvore gênica de máxima verossimilhança da região parcial do gene *RHI* (Modelo de substituição nucleotídica HKY + I + G) com 747 pb das espécies de ciclídeos utilizadas neste trabalho junto das partições utilizadas nas análises evolutivas. Círculos representam valor de bootstrap > 80. 2 = Dieta-2 (separado em vermelho: Red-2, azul: Blue-2); 3 = Dieta (separado em vermelho: Red-3, azul: Blue-3, verde: Green-3); B = Biogeografia (separado em amarelo: América Central, laranja: América do Sul); A = Ambiente (separado em verde claro: Rio, azul claro: Lago, cinza: Ambos).

Os modelos da função *codeml* estimaram um coeficiente de seleção ($\omega_0 = d_N/d_S$) maior nas partições Red-2/Red-3 ($\omega_0 = 0,36$) e Green-3 ($\omega_0 = 0,35$) em relação à partição com todos

os ciclídeos neotropicais do estudo ($\omega_0 = 0,20$) e às partições Blue-2 e Blue-3 ($\omega_0 = 0,24$ e $0,21$, respectivamente), indicando que cada partição relacionada à dieta evoluiu sob diferentes pressões de seleção purificadora, mais fraca para os grupos Red-2/Red-3 e Green e mais forte para os outros (Tabela 2).

Tabela 2. Modelos da função *codeml* e suas respectivas estimativas para as partições referentes a todo o grupo de ciclídeos e as partições de Dieta.

Grupos	Modelos	np	ln L	κ	Parâmetros ^a			Nulo	LRT	df
					ω_0/p	ω_1/q	$\omega_2/\omega p$			
Geral	M0	79	-2825,53	3,35	0,26			-	-	-
	M1a	80	-2704,19	2,95	0,01 (85,16%)	1 (14,84%)		M0	242,67**	1
	M2a	82	-2681,46	2,95	0,02 (86,76%)	1 (7,24%)	3,6 (6%)	M1a	45,47**	2
	M7	80	-2705,42	3,35	0,01	0,08		-	-	-
	M8	82	-2679,82	3,33	0,09	1,22	3,3 (7,2%)	M7	51,19**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 49, 50, 169, 172, 173, 210, 217, 218, 248, 270, 274, 281, 286, 287									
Red-2 & Red-3	M0	23	-1482,65	2,99	0,36			-	-	-
	M1a	24	-1465,96	2,70	0 (76,2%)	1 (23,8%)		M0	33,38**	1
	M2a	26	-1460,44	3,06	0 (85,3%)	1 (0%)	2,9 (14,7%)	M1a	11,04**	2
	M7	24	-1466,27	2,62	0,005	0,02		-	-	-
	M8	26	-1460,44	3,06	0,005	2,5	2,9 (14,7%)	M7	11,66**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 50, 156, 172, 173, 211, 213, 217, 218, 270, 281									
Blue-2	M0	55	-2452,19	3,18	0,24			-	-	-
	M1a	56	-2351,78	2,76	0,01 (86,7%)	1 (13,3%)		M0	198,82**	1
	M2a	58	-2334,70	3,15	0,02 (89,8%)	1 (3,1%)	3,2 (7,1%)	M1a	36,16**	2
	M7	56	-2353,82	2,73	0,01	0,06		-	-	-
	M8	58	-2334,52	3,16	0,09	1,84	3,1 (7,9%)	M7	38,59**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 49, 156, 166, 169, 172, 173, 217, 218, 248, 270, 274, 281, 286, 287									
Blue-3	M0	35	-2120,52	3,00	0,21			-	-	-
	M1a	36	-2057,14	2,72	0,01 (86,0%)	1 (14,0%)		M0	126,76**	1
	M2a	38	-2047,24	2,99	0,03 (91,6%)	1 (0%)	2,6 (8,4%)	M1a	19,8**	2
	M7	36	-2058,41	2,67	0,01	0,07		-	-	-
	M8	38	-2047,28	2,99	3,26	99	2,6 (8,4%)	M7	22,26**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 49, 156, 169, 172, 173, 217, 218, 270, 274, 281, 286, 287									
Green-3	M0	55	-1508,60	4,34	0,35			-	-	-
	M1a	56	-1487,88	3,93	0 (78,7%)	1 (21,3%)		M0	33,38**	1
	M2a	58	-1480,66	4,48	0 (83,4%)	1 (9,1%)	4,2 (7,4%)	M1a	11,04**	2
	M7	56	-1487,66	3,90	0,005	0,02		-	-	-
	M8	58	-1480,66	4,48	0,005	2,5	4,3 (7,4%)	M7	11,66**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 49, 172, 217, 270, 281, 287									

Obs.: np = número de parâmetros; ln L = ln verossimilhança; κ = transição/transversão; ω = substituição não-sinônima/substituição sinônima; LRT = razão de máxima verossimilhança; df = graus de liberdade.

^aValor de ω de cada classe de sítios com a proporção de cada classe de sítios entre parênteses. ωd é uma classe de sítios divergentes que possui um valor diferente para cada partição.

Itálico: $M8, BEB > 0,8$ e $< 0,9$; Negrito: $M8, BEB > 0,9$

Por outro lado, o grupo Red-2/Red-3 apresentou uma maior proporção de sítios sob seleção positiva (14,7%), o dobro em relação às demais partições de dieta, enquanto o grupo Green-3 indicou uma seleção positiva muito mais forte ($\omega_{M8} = 4,3$) quando comparado com outras partições, mas em uma proporção menor de sítios (7,4%).

Ao observar as demais partições, incluindo Biogeografia e Ambiente (Tabela 3), a partição América Central apresentou a maior taxa de seleção positiva ($\omega_{M8} = 15,09$), corroborando os dados anteriores (Hauser et al., 2017). Para o grupo Ambiente, as partições “Rio” e “Ambos” apresentaram forte seleção positiva ($\omega_{M8} = 3,57$ e $\omega_{M8} = 3,92$), no entanto, o baixo número de espécies no grupo restante “Lago” ($n=4$) pode ter impedido que as espécies fossem mais distribuídas entre as partições para resultados mais robustos.

Tabela 3. Modelos da função *codeml* e suas respectivas estimativas para as partições referentes à Biogeografia e Ambiente.

Grupos	Modelos	np	ln L	κ	Parâmetros ^a			Nulo	LRT	df
					ω_0/p	ω_1/q	$\omega_2/\omega p$			
América Central	M0	21	-1412,17	3,97	0,47			-	-	-
	M1a	22	-1251,55	3,21	0 (81,8%)	1 (18,2%)		M0	321,24**	1
	M2a	24	-1238,73	4,04	0 (97%)	1 (0%)	15,08 (3%)	M1a	25,64**	2
	M7	22	-1251,59	3,26	0,005	0,01		-	-	-
	M8	24	-1238,73	4,04	11,22	99	15,08 (3%)	M7	25,56**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 166, 172, 218, 281, 287									
América do Sul	M0	57	-2523,42	3,11	0,23			-	-	-
	M1a	58	-2433,37	2,80	0,01 (84,7%)	1 (15,3%)		M0	180,10**	1
	M2a	60	-2421,57	3,10	0,02 (87,4%)	1 (6,1%)	1,98 (6,4%)	M1a	23,60**	2
	M7	58	-2435,09	2,74	0,01	0,08		-	-	-
	M8	60	-2420,66	3,09	0,08	1,15	2,82 (7,5%)	M7	28,86**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 49, 50, 169, 173, 210, 217, 218, 248, 270, 274, 281, 286, 287									
Rio	M0	45	-2105,01	3,32	0,28			-	-	-
	M1a	46	-2040,40	2,94	0 (83,6%)	1 (16,4%)		M0	120,22**	1
	M2a	48	-2024,63	3,36	0,04 (90,4%)	1 (2,4%)	3,63 (7,1%)	M1a	31,54**	2
	M7	46	-2040,81	3,00	0,005	0,02		-	-	-
	M8	48	-2024,60	3,35	0,23	3,30	3,57 (7,4%)	M7	32,42**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 49, 75, 172, 210, 217, 218, 248, 270, 274, 281, 287									
Lago	M0	7	-1224,92	1,49	0,14			-	-	-
	M1a	8	-1239,92	1,42	0 (86,8%)	1 (13,2%)		M0	30**	1
	M2a	10	-1239,39	1,45	0 (91,3%)	1 (0%)	1,91 (8,7%)	M1a	1,06 ^{ns}	2
	M7	8	-1254,12	1,39	0,01	0,05		-	-	-
	M8	10	-1239,39	1,45	0,005	99	1,91 (8,7%)	M7	29,46**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 50, 156, 210									
Ambos	M0	27	-1623,97	4,37	0,28			-	-	-
	M1a	28	-1595,81	3,87	0 (82,8%)	1 (17,2%)		M0	56,32**	1
	M2a	30	-1587,75	4,33	0,05 (92,7%)	1 (0%)	3,92 (7,3%)	M1a	16,12**	2
	M7	28	-1596,06	3,95	0,005	0,02		-	-	-
	M8	30	-1587,75	4,33	4,75	99	3,92 (7,3%)	M7	16,62**	2
	Sítios positivamente selecionados (M8, BEB): 166, 172, 210, 218, 274, 281, 286, 287									

Obs.: np = número de parâmetros; ln L = ln verossimilhança; κ = transição/transversão; ω = substituição não-sinônima/substituição sinônima; LRT = razão de máxima verossimilhança; df = graus de liberdade.

^aValor de ω de cada classe de sítios com a proporção de cada classe de sítios entre parênteses. ωd é uma classe de sítios divergentes que possui um valor diferente para cada partição.

Itálico: M8, BEB > 0,8 e < 0,9; Negrito: M8, BEB > 0,9

As análises dos sítios positivamente selecionados feitas pelo algoritmo *codeml* e FUBAR indicaram 18 sítios positivamente selecionados (PP > 0,8), sendo 17 sítios selecionados no conjunto de todas as sequências de ciclídeos neotropicais (Resumo: Tabela 4;

FUBAR: Apêndice B, C, D e E). Dentro da partição Dieta-2, a subpartição Red-2 apresentou 3 sítios (50, 210 e 213) exclusivos sob seleção, enquanto a subpartição Blue-2 apresentou, de forma exclusiva, os sítios 49, 75, 166, 169, 248, 274 e 287 sob seleção positiva. Ao comparar os grupos da partição Dieta-3, a subpartição Red-3 continuou apresentando exclusivamente os sítios 50, 210 e 213 sob seleção positiva; Blue-3 apresentou, de forma exclusiva, os sítios 169 e 274 como positivamente selecionado; e Green-3 apresentou apenas o sítio 75 positivamente selecionado de forma exclusiva (Fig. 3 e 4).

Tabela 4. Sítios positivamente selecionados de acordo com cada partição a partir dos modelos M8 BEB (PP > 0,8) e FUBAR (PP > 0,9).

Ciclídeos neotropicais				Red-2&3				Blue-2				Blue-3				Green-3			
M8 BEB		FUBAR		M8 BEB		FUBAR		M8 BEB		FUBAR		M8 BEB		FUBAR		M8 BEB		FUBAR	
Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP	Sítio	PP
49	0,96	49	0,96	<i>50</i>	<i>0,87</i>	<i>50</i>	<i>0,92</i>	49	0,93	49	0,87	49	0,96	49	0,87	49	0,84	-	-
50	0,86	50	0,94	156	0,84	156	0,90	-	-	75	0,82	156	0,95	156	0,97	-	-	75	<i>0,91</i>
-	-	75	0,92	172	0,97	172	0,98	156	0,88	156	0,96	<i>169</i>	<i>0,86</i>	-	-	-	-	156	0,89
-	-	156	0,95	173	0,87	173	0,93	<i>166</i>	<i>0,84</i>	-	-	172	0,97	172	0,89	172	1,00	172	0,99
-	-	166	0,85	<i>210</i>	<i>0,86</i>	<i>210</i>	<i>0,88</i>	<i>169</i>	<i>0,98</i>	-	-	173	0,99	173	0,90	-	-	173	0,92
169	0,97	-	-	<i>213</i>	<i>0,82</i>	<i>213</i>	<i>0,92</i>	172	1,00	172	0,98	217	0,98	217	0,97	217	1,00	217	0,99
172	1,00	172	0,99	217	0,97	217	0,97	173	0,98	173	0,92	218	0,95	218	0,97	-	-	218	0,92
173	0,99	173	0,96	218	0,89	218	0,94	217	1,00	217	0,99	270	0,87	-	-	270	0,97	270	0,87
210	0,93	-	-	270	0,96	270	0,90	218	1,00	218	0,99	<i>274</i>	<i>0,99</i>	-	-	281	0,98	281	0,98
217	1,00	217	1,00	281	0,87	281	0,92	<i>248</i>	<i>0,87</i>	<i>248</i>	<i>0,81</i>	281	0,98	281	0,97	287	0,94	287	0,97
218	1,00	218	1,00	-	-	286	0,91	270	0,98	270	0,90	286	0,99	286	0,84				
248	0,95	248	0,89					<i>274</i>	<i>0,99</i>	<i>274</i>	<i>0,87</i>	287	0,91	-	-				
270	0,98	270	0,89					281	1,00	281	1,00								
274	0,98	274	0,86					286	0,98	-	-								
281	1,00	281	1,00					<i>287</i>	<i>0,99</i>	-	-								
286	0,95	-	-																
287	1,00	-	-																

Obs.:PP = Probabilidade *a posteriori*; Itálico = Sítios exclusivos da subpartição em relação à sua partição, desconsiderando o grupo “Ciclídeos neotropicais”.

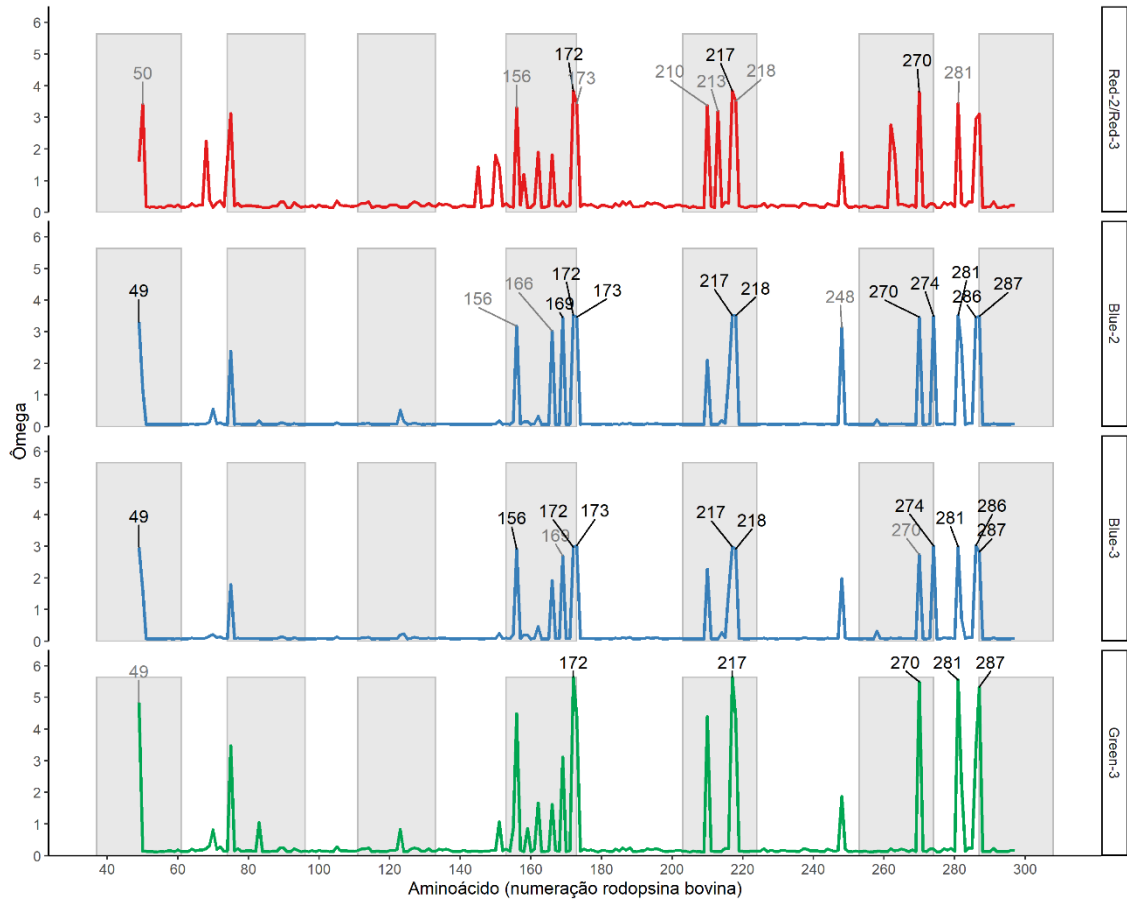


Fig. 3. Resultados da análise de sítios positivamente selecionados (M8, BEB) das partições Dieta-2 e Dieta-3. $PP > 0,8$ e $< 0,9$: fonte cinza; $PP > 0,9$: fonte preta. Regiões transmembrana da proteína apresentadas em cinza.

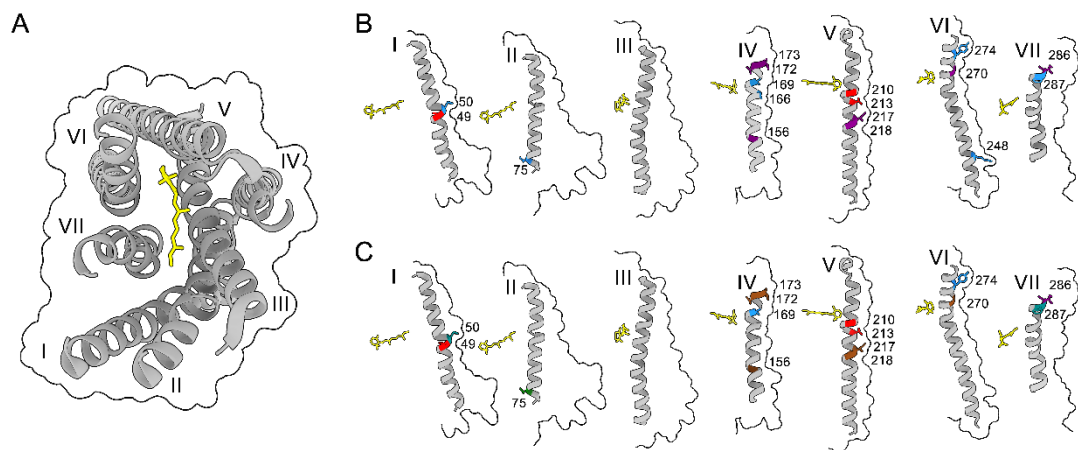


Fig. 4. Regiões da proteína rodopsina e sítios positivamente selecionados. (A) Hélices transmembrana da proteína rodopsina (I-VII) em torno do cromóforo retinal (amarelo) de acordo com a estrutura da rodopsina ativa meta II (bovino; PDB:3PQR), com vista da região extracelular. (B) Sítios positivamente selecionados da partição Dieta-2 em cada hélice transmembrana exibida em ordem com o cromóforo à esquerda. Vermelho: Red-2, Azul: Blue-2, Roxo: Red-2 e Blue-2. (C) Sítios positivamente selecionados da partição Dieta-3. Vermelho: Red-3, Azul: Blue-3, Verde: Green-3, Roxo: Red-3 e Blue-3, Turquesa: Blue-3 e

Green-3, Marrom: Red-2, Blue-3 e Green-3. Contorno preto indica a região de abrangência dos componentes da proteína.

Os resultados da análise de CmC (Tabela 5), cujo objetivo foi testar se fatores geográficos, alimentares ou ambientais, demonstraram que a melhor partição que explica a evolução do gene *RHI* em ciclídeos foi a “Biogeografia”, com o menor valor de AIC (7468,15), seguida da subpartição de “Biogeografia”, “AC”, com $\Delta AIC = 11,92$ em relação à melhor partição. Dentre os fatores ecológicos testados, a partição “Dieta-2” foi a melhor partição selecionada ($\Delta AIC = 14,03$), seguida da partição “Dieta-3” ($\Delta AIC = 16,08$). A partição Ambiente teve um valor menos representativo, com $\Delta AIC = 20,51$.

Tabela 5. Resultados da análise Clade model C (CMC) a partir de diferentes partições.

^aPartições separadas a partir de grupos superiores (Dieta-2, Dieta-3, Biogeografia e Ambiente) e explicadas anteriormente.

^bValor de ω de cada classe de sítios com a proporção de cada classe de sítios entre parênteses. ω_d é uma classe de sítios divergentes que possui um valor diferente para cada partição.

^cA diferença dos valores de AIC foi calculada em relação ao melhor modelo correspondente, Biogeografia, com um valor de AIC de 7468,15.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = não significativo.

Considerando somente as subpartições, apenas “AC”, “Red-2” e “Red-3” obtiveram resultados significativamente melhores que o modelo nulo (M2a_rel), dentre todas as testadas. Dessas subpartições significativas, todas apresentaram um alto valor de seleção positiva dentro de suas partições. A subpartição Green-3 apresentou um alto valor de seleção dentro da partição “Dieta-3” ($\omega_d = 6,79$), no entanto, não foi significativa quando testada em primeiro plano contra as outras espécies.

4 DISCUSSÃO

Grande parte dos estudos de genes *opsins* tem buscado observar a influência de mutações em sítios-chave com a variação espectral percebida pela proteína (Carleton et al. 2020), e recentemente alguns estudos demonstraram a importância de mutações com impacto em vias não espectrais (Castiglione et al. 2017; Dungan and Chang 2017; Hauser et al. 2017). Foram identificados em genes *opsins* 18 sítios positivamente selecionados, em sua maioria contidos na região transmembrana da proteína rodopsina (segundo modelo da estrutura da rodopsina bovina; PDB: 3P1R), localizada em torno do cromóforo (como pode ser observado na Fig. 3), onde substituições são mais prováveis de alterar a sensibilidade dos pigmentos visuais (Hofmann et al. 2009) pela proximidade do cromóforo. Entre os diversos sítios positivamente selecionados, alguns podem indicar possíveis adaptações ao ambiente, seja pela dieta ou outros fatores ecológicos e/ou biogeográficos. Ainda, a adição de 13 novas sequências do gene *RHI* de ciclídeos contribui com informações em relação à evolução visual deste grupo em ambientes neotropicais (Hauser and Chang 2017) e comparações mais robustas com o grupo de ciclídeos africano, um modelo evolutivo amplamente estudado (Carleton et al. 2016).

O sítio 210 foi identificado como positivamente selecionado no grupo Red-2/Red-3, e a variação de aminoácidos (V – Valina / C – Cisteína) pode estar relacionada com peixes de águas profundas (V) e peixes de água doce (C) (Chen et al. 2018). No entanto, o aminoácido Valina foi encontrado em espécies de Geophagini ou Chaetobranchini (uma espécie), sendo

assim, tal seleção poderia ser explicada pela presença de apenas uma espécie destas tribos na partição Red-2/Red-3. As partições de tribos não foram testadas por não haver um número de espécies relevante para cada tribo, por isso não é possível concluir se tal seleção se deve à adaptação visual direcionada pela dieta ou por um processo de seleção episódica em um ancestral destas tribos, que são grupos irmãos (Ilves et al., 2018), e tal mutação foi perpetuada pela história evolutiva dos grupos, havendo a seleção deste aminoácido por outros fatores.

Outro sítio exclusivamente selecionado na subpartição Red-2/Red-3 foi o sítio 213. Este sítio foi observado sendo positivamente selecionado em ciclídeos africanos, anchovas que habitam ambientes neotropicais e outros grupos (Schott et al. 2014; Van Nynatten et al. 2015; Lv et al. 2020), e sua localização próxima à abertura entre as hélices I e VII transmembrana da proteína o coloca como um possível sítio de importância durante a cadeia de fototransdução (Schott et al. 2014; Lv et al. 2020), sendo responsável por uma pequena alteração na taxa de liberação do cromóforo da proteína (Morrow and Chang 2015). Neste trabalho, apenas as espécies de *Cichla* apresentaram um aminoácido diferente (I) neste sítio e, por haver grande variação aminoacídica neste sítio entre diversos grupos animais, não é esperado que tal mutação cause grandes consequências visuais (Morrow and Chang 2015).

Na subpartição Blue-2, dentro da partição Dieta-2, o sítio 49 foi apresentado como positivamente selecionado, no entanto é improvável que tal sítio esteja relacionado com alterações na percepção do espectro visual (Yokoyama et al. 2008). Outro sítio positivamente selecionado para este grupo foi o sítio 166, cuja seleção foi observada em ciclídeos neotropicais (Hauser et al. 2017) e provavelmente tem influência sobre a variação espectral, como demonstrado com o ciclídeo africano *Astatotilapia calliptera* (Malinsky et al. 2015), Também é previsto que este sítio possua influência no processo de dimerização da rodopsina, ou seja, no processo de interação com outras proteínas da cadeia de fototransdução. Espécimes que habitam águas rasas apresentaram A166, cuja absorvância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) é 506 nm, enquanto espécies de águas profundas apresentavam o aminoácido S166 ($\lambda_{\text{máx}} = 503$ nm). Foi encontrado que grande parte das espécies apresentaram o aminoácido S166, além de T166, e A166 para uma espécie, sendo esta última mais encontrada em linhagens da América Central (Hauser et al. 2017).

O sítio 169, positivamente selecionado nas subpartições Blue-2 e Blue-3, também foi encontrado em trabalhos anteriores, tanto em ciclídeos neotropicais (Torres-Dowdall et al. 2015; Hauser et al. 2017) como de lagos africanos (Schott et al. 2014) e uma mutação neste ponto pode afetar a proteína rodopsina por fazer parte da interface de dimerização (Guo et al.

2005; Fotiadis et al. 2006; Schott et al. 2014). Outros sítios indicados com seleção positiva na partição Blue-2 são os sítios 274 e 287, que também foram identificados nos ciclídeos da América Central e do Sul (Schott et al. 2014; Torres-Dowdall et al. 2015; Hauser et al. 2017). Estes dois sítios estão próximos dos canais retiniais B e A, respectivamente (Hildebrand et al. 2009) e podem ter algum efeito sobre a proteína (Schott et al. 2014).

Os sítios 274 e 287 são sítios vizinhos de aminoácidos cuja mutação interfere significativamente na taxa de liberação do cromóforo (W273F, V286I e M288L) (Morrow and Chang 2015; Castiglione et al. 2017), havendo a possibilidade de que substituições nestes locais possam interferir indiretamente sobre o cromóforo (Morrow and Chang 2015). Tanto estes quanto os outros sítios não discutidos não foram estudados em relação às variações espectrais de absorção a partir de alterações aminoacídicas.

Nas análises de CmC, buscando comparar partições pré-definidas com a história evolutiva do gene *RHI*, a partição “Biogeografia” foi o melhor modelo encontrado para explicar as diferenças observadas quanto à força de seleção, que pode ser explicada por causa do isolamento entre os grupos durante a diversificação, enquanto “Dieta-2/Dieta-3” foi melhor do que “Ambiente”, indicando que, dentre os fatores ecológicos testados, a alimentação poderia representar uma melhor explicação para as diferenças das forças da pressão evolutiva observadas para o gene *RHI* do banco de dados estudado. Os resultados vão de encontro com o observado por Hauser et al. (2017), que também destacou a partição “Biogeografia” (com destaque para a subpartição da América Central) como melhor modelo para a variabilidade do gene *RHI*.

Hauser et al. (2017), utilizando a categorização de Torres-Dowdall et al. (2015), a partição “Ambiente” foi testada com subpartições mais restritas de “Rio” e “Lago”, além de utilizar alguns gêneros de peixes na partição “Lago” que também são encontrados em ambientes lóticos (Hauser et al. 2017), gerando um resultado não significativo, sendo este um dos motivos da mudança de espécie. Apesar de criarmos uma subpartição que compreendesse espécies encontradas nos dois tipos de ambientes (“Ambos”), tal categorização também não gerou resultados significativos, o que pode ser um efeito do baixo número de espécies contidas na subpartição “Lago” (n=4), ou mesmo que a expressão gênica, e não alterações aminoacídicas, estejam modulando a adaptação nestes ambientes (Torres-Dowdall et al. 2017; Torres-Dowdall et al. 2021).

Em relação às partições “Dieta-2/Dieta-3”, a subpartição “Red-2/Red-3” se mostrou significativa, demonstrando que a dieta teve papel importante na evolução da rodopsina em

ciclídeos neotropicais. Essa classificação vai de encontro com estudos anteriores na região (Torres-Dowdall et al. 2015; Hauser et al. 2017) que propuseram haver fundamentos de que a ecologia pode ter moldado a diversificação visual, tendo em vista a diversidade fenotípica do grupo ao ocupar novos ambientes (Arbour and López-Fernández 2016).

Arbour et al. (2020) concluíram que alguns grupos de ciclídeos neotropicais mudaram, durante a história evolutiva, de uma dieta baseada em pequenos invertebrados bentônicos, detritos ou vegetação para uma dieta predatória de peixes e invertebrados maiores de corpo duro. Esta mudança de composição alimentar foi interpretada como adaptativa, não havendo suporte apenas em alguma diversificação a partir das relações filogenéticas ou direcionamento aleatório sozinhos.

Uma adaptação em direção a linhagens predatórias foi descrita em outros ambientes (Montaña and Winemiller 2013), sendo as diferenças morfológicas relacionadas com a demanda trófica da busca ativa por presas (Collar et al. 2009). Linhagens predatórias possuem predadores primariamente visuais, que buscam presas mais ágeis e precisam ter adaptações morfológicas para tal demanda, enquanto linhagens mais generalistas possuem indivíduos que utilizam de outros sentidos para auxiliar na alimentação, como tato e paladar, os quais desempenham grande função no processamento do alimento, não necessariamente na busca ativa (López-Fernández et al. 2014; Escobar-Camacho and Carleton 2015).

A história evolutiva dos ciclídeos neotropicais é bem diferente em relação à rápida diversificação dos ciclídeos africanos (Brawand et al. 2014; Ilves et al. 2018), e o surgimento de linhagens especializadas dentre os ciclídeos neotropicais pode facilitar a rápida diversificação destes grupos, pois essa “explosão adaptativa” é menos provável em comunidades dominadas por onívoros do que especialistas tróficos (Ingram et al. 2012). Desta forma, a complexidade de adaptações deste grupo aos ambientes neotropicais pode ter contribuído com a diversidade ecológica dos ciclídeos (Arbour and López-Fernández 2014).

A ocupação de novos ambientes, como a América do Sul e posteriormente a América Central, possibilitou uma gama de novos ambientes aos ciclídeos neotropicais e gerou uma rápida diversificação em cada período evolutivo (López-Fernández et al. 2013; Arbour and López-Fernández 2016). Desta forma, o surgimento de linhagens especialistas em ciclídeos neotropicais pode ajudar a explicar a rápida diversificação das proteínas visuais deste grupo encontrada, enquanto oportunidades ecológicas (Wellborn and Langerhans 2015) facilitaram a diversificação na América Central (Hauser et al. 2017).

Estudos de expressão da rodopsina, bem como de outros genes *opsins*, podem contribuir com estudos relativos à adaptação destes peixes a ambientes neotropicais (Carleton et al. 2016; Torres-Dowdall et al. 2021). A partir da heterogeneidade ambiental nestes locais, diferentes tipos de água (Sioli 1984; Costa et al. 2013) também podem interferir na taxa de predação (Ortega et al. 2020) e exigem grande plasticidade visual destes organismos, havendo alterações na expressão de proteínas visuais além da adaptação molecular (Escobar-Camacho et al. 2019; Hauser et al. 2021).

O conhecimento gerado a partir de estudos de adaptação molecular de proteínas visuais pode contribuir para estudos em outras áreas que utilizem proteínas descritas em organismos obtidos em ambientes naturais para modelagem e/ou mutagênese (Yokoyama 2008; Morrow and Chang 2015), assim como para o desenvolvimento de abordagens computacionais a partir de *machine-learning* (Karasuyama et al. 2018; Musilova et al. 2018).

REFERÊNCIAS

- Arbour JH, López-Fernández H. 2014. Adaptive landscape and functional diversity of Neotropical cichlids: Implications for the ecology and evolution of Cichlinae (Cichlidae; Cichliformes). *J. Evol. Biol.* 27:2431–2442.
- Arbour JH, López-Fernández H. 2016. Continental cichlid radiations: Functional diversity reveals the role of changing ecological opportunity in the neotropics. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283.
- Arbour JH, Montaña CG, Winemiller KO, Pease AA, Soria-Barreto M, Cochran-Biederman JL, López-Fernández H. 2020. Macroevolutionary analyses indicate that repeated adaptive shifts towards predatory diets affect functional diversity in Neotropical cichlids. *Biol. J. Linn. Soc.* [Internet] 129:844–861.
- Bogotá-Gregory JD, Lima FCT, Correa SB, Silva-Oliveira C, Jenkins DG, Ribeiro FR, Lovejoy NR, Reis RE, Crampton WGR. 2020. Biogeochemical water type influences community composition, species richness, and biomass in megadiverse Amazonian fish assemblages. *Sci. Rep.* [Internet] 10:15349.
- Bowmaker JK. 1995. The visual pigments of fish. *Prog. Retin. Eye Res.* 15:1–31.
- Brawand D, Wagner CE, Li YI, Malinsky M, Keller I, Fan S, Simakov O, Ng AY, Lim ZW, Bezault E, et al. 2014. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* [Internet] 513:375–381.
- Carleton KL, Dalton BE, Escobar-Camacho D, Nandamuri SP. 2016. Proximate and ultimate causes of variable visual sensitivities: Insights from cichlid fish radiations. *Genesis* 54:299–325.
- Carleton KL, Escobar-Camacho D, Stieb SM, Cortesi F, Marshall NJ. 2020. Seeing the rainbow: mechanisms underlying spectral sensitivity in teleost fishes. *J. Exp. Biol.* [Internet] 223:jeb193334.
- Carleton KL, Yourick MR. 2020. Axes of visual adaptation in the ecologically diverse family Cichlidae. *Semin. Cell Dev. Biol.* [Internet]:1–10.
- Castiglione GM, Hauser FE, Liao BS, Lujan NK, Van Nynatten A, Morrow JM, Schott RK, Bhattacharyya N, Dungan SZ, Chang BSW. 2017. Evolution of nonspectral rhodopsin function at high altitudes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet] 114:7385–7390.
- Castiglione GM, Schott RK, Hauser FE, Chang BSW. 2018. Convergent selection pressures drive the evolution of rhodopsin kinetics at high altitudes via nonparallel mechanisms.

- Evolution* (N. Y). [Internet] 72:170–186.
- Chen JN, Samadi S, Chen WJ. 2018. Rhodopsin gene evolution in early teleost fishes. *PLoS One* 13:1–20.
- Collar DC, O’Meara BC, Wainwright PC, Near TJ. 2009. Piscivory limits diversification of feeding morphology in centrarchid fishes. *Evolution* (N. Y). [Internet] 63:1557–1573.
- Costa MPF, Novo EMLM, Telmer KH. 2013. Spatial and temporal variability of light attenuation in large rivers of the Amazon. *Hydrobiologia* [Internet] 702:171–190.
- Cronin TW, Johnsen S, Marshall NJ, Warrant. EJ. 2014. Visual Ecology. Princeton University Press
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* [Internet] 9:772–772.
- Dungan SZ, Chang BSW. 2017. Epistatic interactions influence terrestrial–marine functional shifts in cetacean rhodopsin. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284.
- Ehlman SM, Sandkam BA, Breden F, Sih A. 2015. Developmental plasticity in vision and behavior may help guppies overcome increased turbidity. *J. Comp. Physiol. A* [Internet] 201:1125–1135.
- Escobar-Camacho D, Carleton KL. 2015. Sensory modalities in cichlid fish behavior. *Curr. Opin. Behav. Sci.* [Internet] 6:115–124.
- Escobar-Camacho D, Pierotti MER, Ferenc V, Sharpe DMT, Ramos E, Martins C, Carleton KL. 2019. Variable vision in variable environments: the visual system of an invasive cichlid (*Cichla monoculus*) in Lake Gatun, Panama. *J. Exp. Biol.* [Internet] 222:jeb188300.
- Fotiadis D, Jastrzebska B, Philippsen A, Müller DJ, Palczewski K, Engel A. 2006. Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:252–259.
- Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H, Javitch JA. 2005. Crosstalk in G protein-coupled receptors: Changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:17495–17500.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Hauser FE, Chang BSW. 2017. Insights into visual pigment adaptation and diversity from model ecological and evolutionary systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.* [Internet] 47:110–120.

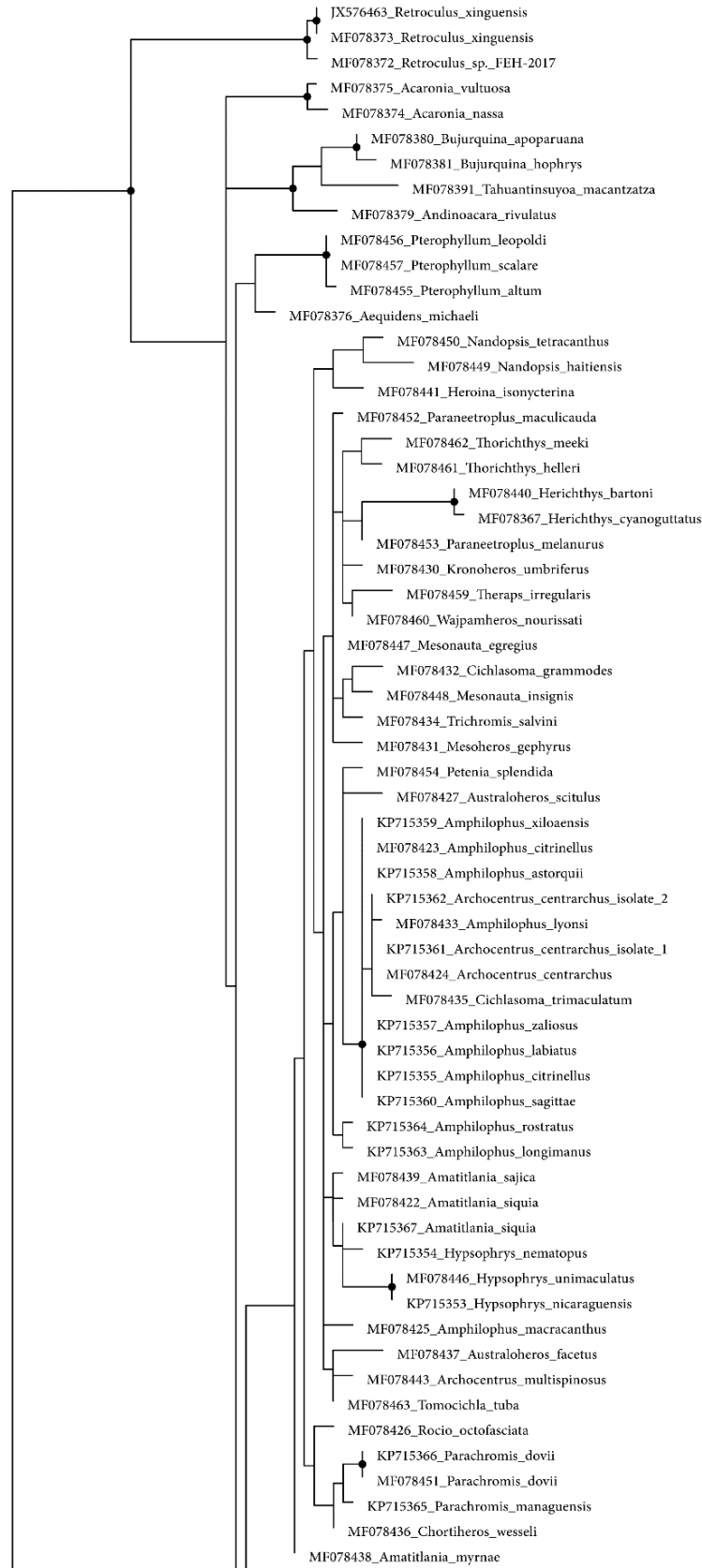
- Hauser FE, Ilves KL, Schott RK, Alvi E, López-Fernández H, Chang BS. 2021. Evolution, inactivation, and loss of short wavelength-sensitive opsin genes during the diversification of Neotropical cichlids. *Mol. Ecol.*:1688–1703.
- Hauser FE, Ilves KL, Schott RK, Castiglione GM, López-Fernández H, Chang BSW. 2017. Accelerated Evolution and Functional Divergence of the Dim Light Visual Pigment Accompanies Cichlid Colonization of Central America. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 34:2650–2664.
- Hildebrand PW, Scheerer P, Park JH, Choe HW, Piechnick R, Ernst OP, Hofmann KP, Heck M. 2009. A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin. *PLoS One* 4.
- Hofmann CM, O’Quin KE, Marshall NJ, Cronin TW, Seehausen O, Carleton KL. 2009. The Eyes Have It: Regulatory and Structural Changes Both Underlie Cichlid Visual Pigment Diversity. Noor MAF, editor. *PLoS Biol.* [Internet] 7:e1000266.
- Ilves KL, Torti D, López-Fernández H. 2018. Exon-based phylogenomics strengthens the phylogeny of Neotropical cichlids and identifies remaining conflicting clades (Cichliformes: Cichlidae: Cichlinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* [Internet] 118:232–243.
- Ingram T, Harmon LJ, Shurin JB. 2012. When should we expect early bursts of trait evolution in comparative data? Predictions from an evolutionary food web model. *J. Evol. Biol.* [Internet] 25:1902–1910.
- Irisarri I, Singh P, Koblmüller S, Torres-Dowdall J, Henning F, Franchini P, Fischer C, Lemmon AR, Lemmon EM, Thallinger GG, et al. 2018. Phylogenomics uncovers early hybridization and adaptive loci shaping the radiation of Lake Tanganyika cichlid fishes. *Nat. Commun.* [Internet] 9.
- Karasuyama M, Inoue K, Nakamura R, Kandori H, Takeuchi I. 2018. Understanding Colour Tuning Rules and Predicting Absorption Wavelengths of Microbial Rhodopsins by Data-Driven Machine-Learning Approach. *Sci. Rep.* [Internet] 8:15580.
- Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A. 2019. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. Wren J, editor. *Bioinformatics* [Internet] 35:4453–4455.
- Kroger RHH. 2003. Rearing in different photic and spectral environments changes the optomotor response to chromatic stimuli in the cichlid fish *Aequidens pulcher*. *J. Exp. Biol.* [Internet] 206:1643–1648.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 33:1870–1874.

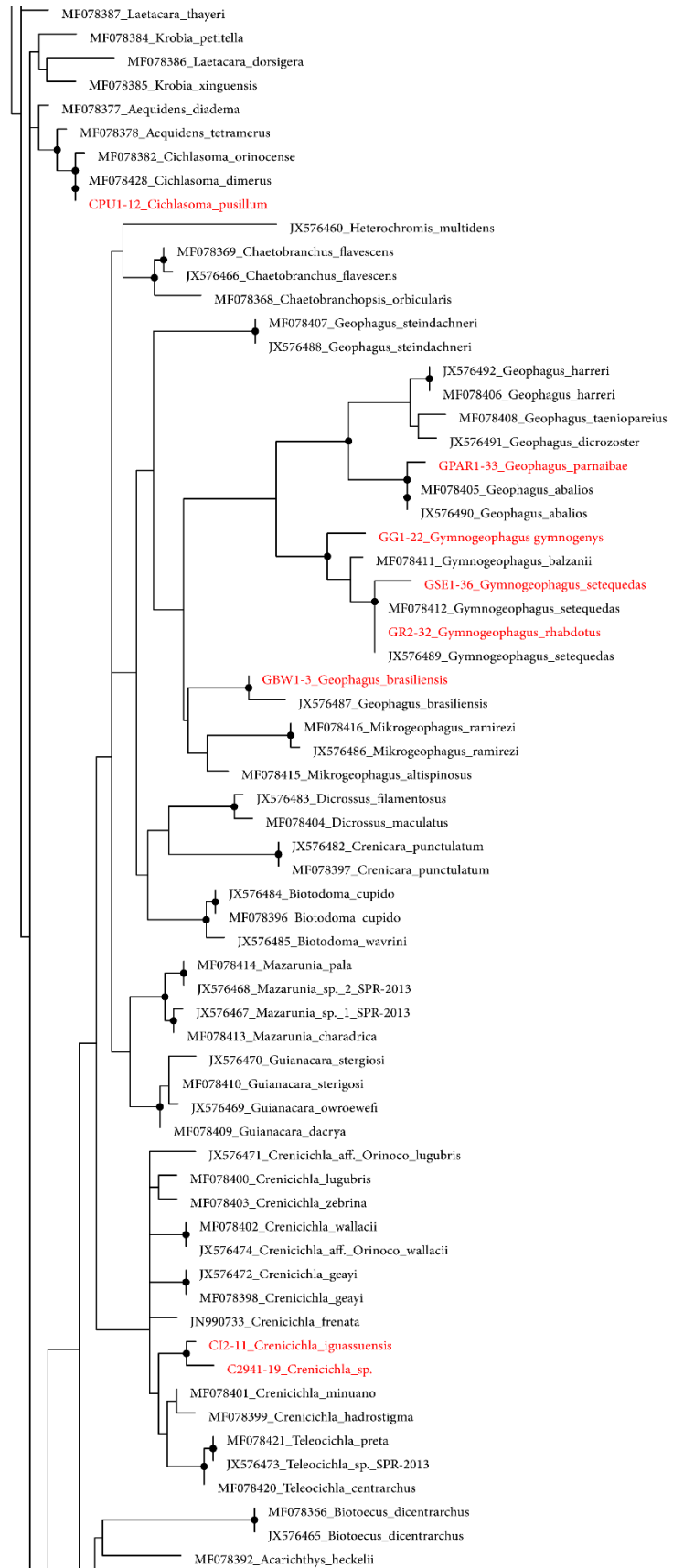
- Land MF, Nilsson D-E. 2012. *Animal Eyes*. 2nd ed. Oxford University Press
- López-Fernández H, Arbour J, Willis S, Watkins C, Honeycutt RL, Winemiller KO. 2014. Morphology and Efficiency of a Specialized Foraging Behavior, Sediment Sifting, in Neotropical Cichlid Fishes. Higgs DM, editor. *PLoS One* [Internet] 9:e89832.
- López-Fernández H, Arbour JH, Winemiller KO, Honeycutt RL. 2013. Testing for ancient adaptive radiations in neotropical cichlid fishes. *Evolution (N. Y.)*. 67:1321–1337.
- López-Fernández H, Winemiller KO, Honeycutt RL. 2010. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* [Internet] 55:1070–1086.
- Lv W, Lei Y, Deng Y, Sun N, Liu X, Yang L, He S. 2020. Accelerated evolution and positive selection of rhodopsin in Tibetan loaches living in high altitude. *Int. J. Biol. Macromol.* [Internet] 165:2598–2606.
- Malinsky M, Challis RJ, Tyers AM, Schiffels S, Terai Y, Ngatunga BP, Miska EA, Durbin R, Genner MJ, Turner GF. 2015. Genomic islands of speciation separate cichlid ecomorphs in an East African crater lake. *Science (80-.)*. [Internet] 350:1493–1498.
- Miyagi R, Terai Y, Aibara M, Sugawara T, Imai H, Tachida H, Mzighani SI, Okitsu T, Wada A, Okada N. 2012. Correlation between nuptial colors and visual sensitivities tuned by opsins leads to species richness in sympatric Lake Victoria cichlid fishes. *Mol. Biol. Evol.* 29:3281–3296.
- Montaña CG, Winemiller KO. 2013. Evolutionary convergence in Neotropical cichlids and Nearctic centrarchids: evidence from morphology, diet, and stable isotope analysis. *Biol. J. Linn. Soc.* [Internet] 109:146–164.
- Morrow JM, Chang BSW. 2015. Comparative Mutagenesis Studies of Retinal Release in Light-Activated Zebrafish Rhodopsin Using Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry* 54:4507–4518.
- Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, Scheffler K. 2013. FUBAR: A Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation for Inferring Selection. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 30:1196–1205.
- Musilova Z, Cortesi F, Matschiner M, Davies WIL, Stieb SM, Busserolles F de, Malmstroem M, Toerresen OK, Mountford JK, Hanel R, et al. 2018. Vision using multiple distinct rod opsins in deep-sea fishes. *bioRxiv* [Internet] 592:424895.
- Nagai H, Terai Y, Sugawara T, Imai H, Nishihara H, Hori M, Okada N. 2011. Reverse Evolution in RH1 for Adaptation of Cichlids to Water Depth in Lake Tanganyika. *Mol.*

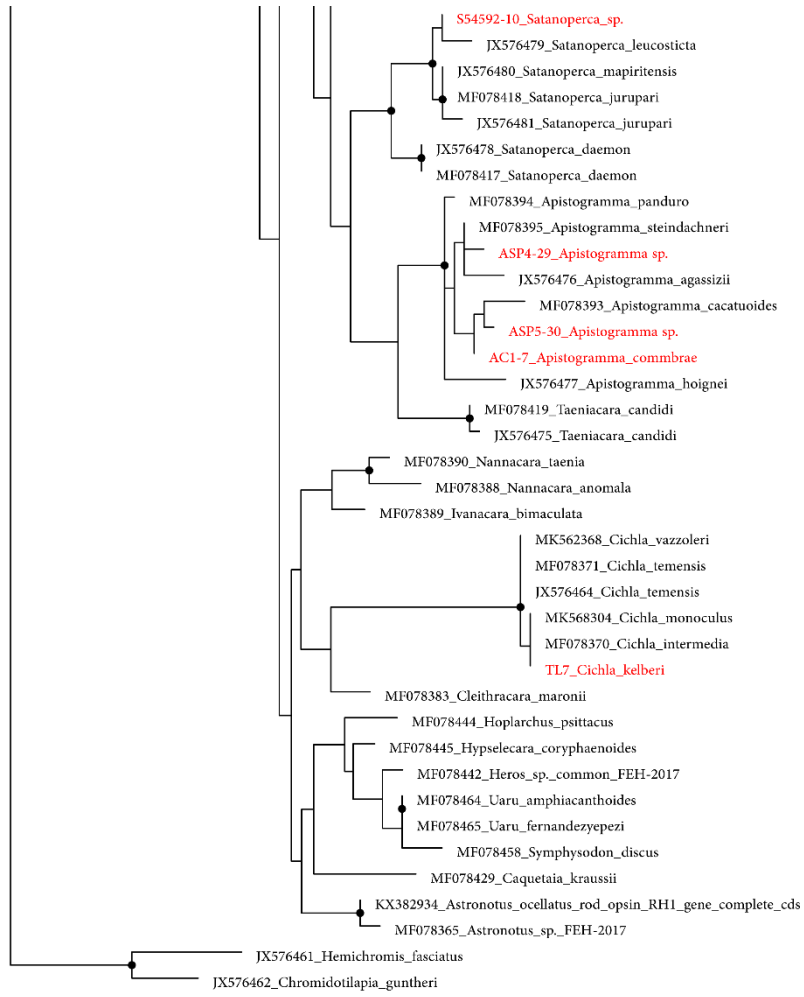
- Biol. Evol.* [Internet] 28:1769–1776.
- Van Nynatten A, Bloom D, Chang BSW, Lovejoy NR. 2015. Out of the blue: adaptive visual pigment evolution accompanies Amazon invasion. *Biol. Lett.* [Internet] 11:20150349.
- Ortega JCG, Figueiredo BRS, Graça WJ, Agostinho AA, Bini LM. 2020. Negative effect of turbidity on prey capture for both visual and non-visual aquatic predators. *J. Anim. Ecol.* 89:2427–2439.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. 2021. UCSF Chimera X: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* [Internet] 30:70–82.
- Rambaut A. 2018. FigTree.
- Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M. 1993. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.* [Internet] 21:173–174.
- Schott RK, Refvik SP, Hauser FE, López-Fernández H, Chang BSW. 2014. Divergent Positive Selection in Rhodopsin from Lake and Riverine Cichlid Fishes. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 31:1149–1165.
- Schwalbe MAB, Webb JF. 2015. The effect of light intensity on prey detection behavior in two Lake Malawi cichlids, *Aulonocara stuartgranti* and *Tramitichromis* sp. *J. Comp. Physiol. A* [Internet] 201:341–356.
- Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS, Carleton KL, Mrosso HDJ, Miyagi R, Van Der Sluijs I, Schneider M V., Maan ME, Tachida H, et al. 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* 455:620–626.
- Sioli H. 1984. The Amazon : Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. Springer Netherlands
- Smith AR, D’Annunzio L, Smith AE, Sharma A, Hofmann CM, Marshall NJ, Carleton KL. 2011. Intraspecific cone opsin expression variation in the cichlids of Lake Malawi. *Mol. Ecol.* [Internet] 20:299–310.
- Terai Y, Seehausen O, Sasaki T, Takahashi K, Mizoiri S, Sugawara T, Sato T, Watanabe M, Konijnendijk N, Mrosso HDJ, et al. 2006. Divergent selection on opsins drives incipient speciation in Lake Victoria cichlids. *PLoS Biol.* 4:2244–2251.
- Terakita A. 2005. The opsins. *Genome Biol.* 6:1–9.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* [Internet] 22:4673–4680.

- Torres-Dowdall J, Henning F, Elmer KR, Meyer A. 2015. Ecological and lineage-specific factors drive the molecular evolution of rhodopsin in cichlid fishes. *Mol. Biol. Evol.* 32:2876–2882.
- Torres-Dowdall J, Pierotti MER, Härer A, Karagic N, Woltering JM, Henning F, Elmer KR, Meyer A. 2017. Rapid and Parallel Adaptive Evolution of the Visual System of Neotropical Midas Cichlid Fishes. *Mol. Biol. Evol.* 34:2469–2485.
- Torres-Dowdall J, Karagic N, Härer A, Meyer A. 2021. Diversity in visual sensitivity across Neotropical cichlid fishes via differential expression and intraretinal variation of opsin genes. *Mol. Ecol.* [Internet]:mec.15855.
- Trezise AEO, Collin SP. 2005. Opsins: Evolution in Waiting. *Curr. Biol.* [Internet] 15:R794–R796.
- Warrant EJ, Johnsen S. 2013. Vision and the light environment. *Curr. Biol.* [Internet] 23:R990–R994.
- Weadick CJ, Chang BSW. 2012. An Improved Likelihood Ratio Test for Detecting Site-Specific Functional Divergence among Clades of Protein-Coding Genes. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 29:1297–1300.
- Weadick CJ, Loew ER, Rodd FH, Chang BSW. 2012. Visual Pigment Molecular Evolution in the Trinidadian Pike Cichlid (*Crenicichla frenata*): A Less Colorful World for Neotropical Cichlids? *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 29:3045–3060.
- Weaver S, Shank SD, Spielman SJ, Li M, Muse S V., Kosakovsky Pond SL. 2018. Datamonkey 2.0: A Modern Web Application for Characterizing Selective and Other Evolutionary Processes. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 35:773–777.
- Wellborn GA, Langerhans RB. 2015. Ecological opportunity and the adaptive diversification of lineages. *Ecol. Evol.* [Internet] 5:176–195.
- Xu B, Yang Z. 2013. PAMLX: A Graphical User Interface for PAML. *Mol. Biol. Evol.* [Internet] 30:2723–2724.
- Yokoyama S. 2008. Evolution of Dim-Light and Color Vision Pigments. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9:259–282.
- Yokoyama S, Tada T, Zhang H, Britt L. 2008. Elucidation of phenotypic adaptations: Molecular analyses of dim-light vision proteins in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:13480–13485.

APÊNDICE A – Árvore gênica de máxima verossimilhança da região parcial do gene *RHI* de todas as espécies de ciclídeos neotropicais. Modelo de substituição nucleotídica HKY + I + G com 747 pb. Círculos representam valores de bootstrap > 80. Nomes destacados em vermelho representam as espécies obtidas neste trabalho.







APÊNDICE B - Sítios sob seleção para a partição Red-2 (Dieta-2) e Red-3 (Dieta-3) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade *a posteriori* > 0,9).

Sítio	α	β	$\beta-\alpha$	Prob[$\alpha>\beta$]	Prob[$\alpha<\beta$]	BayesFactor[$\alpha<\beta$]
50	1,09	10,28	9,19	0,055	0,916	13,983
122	18,75	0,69	-18,06	0,923	0,061	0,083
133	25,69	0,70	-24,99	0,989	0,006	0,008
138	27,70	0,75	-26,95	0,991	0,005	0,006
156	1,51	10,77	9,27	0,064	0,902	11,849
167	32,38	0,70	-31,67	0,996	0,002	0,002
172	1,14	21,88	20,74	0,007	0,980	64,548
173	1,17	12,80	11,63	0,044	0,930	16,998
185	18,20	0,69	-17,51	0,917	0,065	0,090
189	14,80	0,73	-14,07	0,902	0,077	0,108
200	17,66	0,66	-17,00	0,914	0,068	0,093
201	20,06	0,69	-19,38	0,929	0,056	0,076
213	1,52	14,03	12,52	0,048	0,923	15,549
217	1,12	17,97	16,85	0,010	0,974	49,135
218	1,15	14,18	13,02	0,036	0,940	20,299
269	28,59	0,69	-27,90	0,992	0,004	0,006
279	34,61	0,78	-33,83	0,995	0,002	0,003
280	26,95	0,70	-26,26	0,991	0,005	0,006
281	1,09	10,71	9,62	0,054	0,918	14,383
286	1,50	12,00	10,50	0,058	0,910	13,100

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa. α = média posterior da taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = média posterior da taxa de substituição não-sinônima em cada sítio.

APÊNDICE C - Sítios sob seleção para a partição Blue-2 (Dieta-2) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade *a posteriori* > 0,9).

Sítio	α	β	$\beta-\alpha$	Prob[$\alpha>\beta$]	Prob[$\alpha<\beta$]	BayesFactor[$\alpha<\beta$]
56	12,10	0,36	-11,74	0,996	0,002	0,004
80	9,56	0,33	-9,23	0,996	0,002	0,004
100	3,86	0,31	-3,56	0,955	0,032	0,059
109	5,01	0,32	-4,69	0,964	0,025	0,046
119	4,66	0,33	-4,34	0,959	0,029	0,053
122	20,14	0,39	-19,76	0,999	0,001	0,001
137	4,18	0,35	-3,83	0,949	0,036	0,066
138	7,49	0,34	-7,15	0,992	0,005	0,008
141	4,97	0,32	-4,65	0,917	0,064	0,121
156	0,71	5,46	4,75	0,019	0,958	39,682
167	21,06	0,39	-20,66	1,000	0,000	0,000
168	3,08	0,30	-2,78	0,945	0,040	0,073
171	3,22	0,30	-2,92	0,948	0,038	0,069
172	1,36	12,36	10,99	0,001	0,976	70,510
173	1,49	6,93	5,44	0,013	0,921	20,462
174	5,52	0,32	-5,20	0,970	0,021	0,038
180	5,51	0,30	-5,21	0,988	0,008	0,013
189	13,60	0,38	-13,22	0,999	0,000	0,001
194	3,07	0,31	-2,76	0,942	0,042	0,078
200	12,50	0,34	-12,15	0,997	0,002	0,003
201	4,10	0,33	-3,77	0,904	0,074	0,141
202	9,31	0,34	-8,97	0,995	0,003	0,005
204	16,46	0,40	-16,06	1,000	0,000	0,000
213	4,54	0,33	-4,22	0,958	0,030	0,054
217	0,62	7,18	6,56	0,001	0,993	243,407
218	0,64	8,89	8,24	0,000	0,994	317,901
223	42,55	0,45	-42,10	1,000	0,000	0,000
228	4,04	0,31	-3,73	0,956	0,031	0,057
231	4,16	0,32	-3,84	0,910	0,070	0,133
263	3,67	0,30	-3,37	0,912	0,069	0,129
279	10,56	0,37	-10,19	0,983	0,012	0,021
281	0,62	8,64	8,02	0,000	0,996	422,939

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa. α = média posterior da taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = média posterior da taxa de substituição não-sinônima em cada sítio.

APÊNDICE D - Sítios sob seleção para a partição Blue-3 (Dieta-3) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade *a posteriori* > 0,9).

Sítio	α	β	$\beta-\alpha$	Prob[$\alpha>\beta$]	Prob[$\alpha<\beta$]	BayesFactor[$\alpha<\beta$]
56	10,95	0,41	-10,54	0,978	0,015	0,025
80	14,11	0,41	-13,70	0,997	0,001	0,002
100	5,74	0,38	-5,35	0,960	0,028	0,049
109	7,58	0,40	-7,18	0,969	0,022	0,037
122	37,93	0,46	-37,47	1,000	0,000	0,000
137	6,27	0,44	-5,83	0,956	0,030	0,052
138	11,53	0,42	-11,11	0,994	0,003	0,005
156	0,80	7,48	6,67	0,010	0,968	50,910
167	24,76	0,44	-24,32	1,000	0,000	0,000
168	4,51	0,38	-4,13	0,949	0,037	0,063
171	4,74	0,37	-4,36	0,952	0,034	0,059
173	1,89	9,01	7,11	0,014	0,900	15,004
174	11,32	0,41	-10,91	0,993	0,004	0,006
189	16,53	0,44	-16,09	0,997	0,001	0,002
194	4,48	0,39	-4,10	0,946	0,039	0,067
200	26,37	0,43	-25,94	0,999	0,000	0,000
201	6,51	0,40	-6,11	0,904	0,075	0,135
202	7,90	0,40	-7,50	0,972	0,019	0,033
204	20,22	0,45	-19,77	0,999	0,000	0,000
213	6,67	0,41	-6,26	0,963	0,026	0,044
217	0,68	6,39	5,71	0,011	0,971	56,534
218	0,72	6,77	6,05	0,011	0,971	55,416
223	33,34	0,47	-32,87	1,000	0,000	0,000
228	5,72	0,39	-5,32	0,959	0,029	0,050
231	6,79	0,39	-6,40	0,909	0,071	0,127
263	5,14	0,37	-4,77	0,903	0,076	0,136
281	0,68	6,58	5,90	0,010	0,973	60,035

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa. α = média posterior da taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = média posterior da taxa de substituição não sinônima em cada sítio.

APÊNDICE E - Sítios sob seleção para a partição Green-3 (Dieta-3) de acordo com o teste FUBAR (probabilidade *a posteriori* > 0,9).

Site	α	β	$\beta-\alpha$	Prob[$\alpha>\beta$]	Prob[$\alpha<\beta$]	BayesFactor[$\alpha<\beta$]
56	30,53	0,72	-29,81	0,993	0,004	0,005
75	1,46	11,78	10,32	0,062	0,905	12,527
122	33,14	0,70	-32,44	0,995	0,002	0,003
141	22,55	0,65	-21,90	0,941	0,046	0,063
167	16,22	0,67	-15,55	0,926	0,057	0,079
172	1,03	28,64	27,61	0,002	0,992	161,384
173	1,03	10,69	9,66	0,054	0,918	14,629
180	22,56	0,67	-21,89	0,985	0,009	0,012
189	26,71	0,73	-25,98	0,990	0,006	0,007
191	15,95	0,71	-15,25	0,901	0,078	0,111
200	27,50	0,66	-26,84	0,992	0,005	0,006
217	1,01	20,02	19,00	0,004	0,986	90,696
218	1,03	10,33	9,29	0,057	0,915	14,070
223	37,33	0,74	-36,58	0,999	0,000	0,000
245	15,08	0,63	-14,45	0,906	0,074	0,105
279	15,97	0,78	-15,19	0,901	0,077	0,109
281	1,01	17,13	16,12	0,009	0,976	53,804
287	1,50	20,33	18,83	0,015	0,966	37,169

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa. α = média posterior da taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = média posterior da taxa de substituição não sinônima em cada sítio.