

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

THOMAZ MANSINI CARRENHO FABRIN

Seleção divergente do gene *LWS* entre ciclídeos neotropicais e africanos

Maringá
2019

THOMAZ MANSINI CARRENHO FABRIN

Seleção divergente do gene *LWS* entre ciclídeos neotropicais e africanos

Tese 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 Doutor em Ecologia e Limnologia.

Área de concentração: Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Maringá
2019

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

F127s Fabrin, Thomaz Mansini Carrenho, 1990-
Seleção divergente do gene *LWS* entre ciclídeos neotropicais e africanos / Thomaz Mansini Carrenho Fabrin. -- Maringá, 2019.
73 f. : il.

Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

1. Peixes ciclídeos (Cichlidae) - Sistema visual - 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
NBR/CIP - 12899 AACR/2

THOMAZ MANSINI CARRENHO FABRIN

Seleção divergente do gene *LWS* entre ciclídeos neotropicais e africanos

Tese 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 Doutor em Ecologia e Limnologia e aprovado pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Ana Luiza de Brito Portela Castro
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof.^a Dr.^a Nédia de Castilhos Ghisi
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Aprovado em: 25 de fevereiro de 2019.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho à minha
família.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre esteve presente, me apoiou e tornou possível a conclusão de mais uma etapa.

À minha esposa, Verônica Birello, que foi, e sempre será, meu auxílio e porto seguro nessa caminhada.

Ao prof. Dr. Alberto José Prioli, pela orientação, e à profa. Dra. Sônia Maria Alves Pinto Prioli, pelo incentivo. Ambos por terem aberto espaço para arriscar novas ideias.

A todos os colegas de laboratório que contribuíram direta e indiretamente durante nossas conversas.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas sugestões para este trabalho.

A todos aqueles que não foram listados aqui, mas que com certeza incentivaram mesmo estando longe.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) por todo o conhecimento adquirido nesse período.

Às secretárias do PEA, Aldenir, Jocemara e Elizabete, que nos auxiliam sempre que necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado e apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

“O que não ocorreu lembrar-se foi que as ações da realidade são igualmente sem sentido e infantis, até mais absurdas, pois os sonhadores se empenham em considerá-las cheias de sentido e intenção, enquanto o cego universo persiste em continuar a estudar, sem objetivo, do nada a alguma coisa e, mais uma vez, de alguma coisa ao nada...”.

(A Chave de Prata, H.P. Lovecraft)

Seleção divergente do gene *LWS* entre ciclídeos neotropicais e africanos

RESUMO

Cichlidae apresenta grande diversificação ecomorfológica, tanto nos grandes lagos africanos quanto nas regiões neotropicais. Por utilizarem amplamente a visão para alimentação, seleção sexual, além de influenciar em outras características comportamentais, é necessário a obtenção de dados moleculares que tratem a respeito da evolução de genes que expressam os pigmentos visuais. Dentre esses genes, o responsável por absorver os comprimentos longos de onda de luz (*Long Wavelength Sensitive, LWS*) é um dos mais utilizados estudos evolutivos, por apresentar maior variação. Verificou-se os códons sob seleção de fragmentos parciais da sequência codificadora do gene *LWS* comparando ciclídeos neotropicais e africanos, além de estimar a taxa de variação desse gene em ciclídeos neotropicais e correlacioná-la à variação do gene mitocondrial da Subunidade I da Citocromo c Oxidase (*COI*). Fragmentos parciais dos genes *LWS* e *COI* de ciclídeos neotropicais foram sequenciados e sequências de espécies de ciclídeos africanos foram obtidas no *GenBank*. Identificou-se a seleção divergente entre os dois grupos, neotropical e africano, além de diferentes taxas de variação do gene *LWS* entre os diferentes clados neotropicais, com base nas estimativas temporais prévias. Os resultados contribuem para o entendimento da evolução molecular do sistema visual de ciclídeos neotropicais, uma vez que sítios-chave da proteína *LWS* estão sob seleção no grupo, além de possivelmente características ecomorfológicas implicarem na taxa de variação do gene *LWS*.

Palavras-chave: Sistema visual. Proteínas opsinas. Ecologia. Cichlidae. Evolução molecular.

Divergent selection of the *LWS* between Neotropical and African cichlids

ABSTRACT

Cichlidae presents great ecomorphological diversification, in both African lakes and Neotropical regions. Because these organisms use the vision for feeding, sexual selection, as well influencing other behavioural characteristics, it is important obtaining molecular data about the evolution of the genes which expresses visual pigments. Among these genes, the long-wavelength sensitive (*LWS*) gene it is important for evolutionary studies, because your great variation. So was observed the codons under selection using partial fragments of the codifying sequence of the *LWS* gene, comparing Neotropical and African cichlids, besides estimate the rate variation of this gene in Neotropical group and correlate this to the variation of the mitochondrial gene *COI*. Partial fragments of the genes *LWS* and *COI* of the Neotropical cichlids were sequenced, and sequences of the African species were obtained from *GenBank*. It was possible to detect the divergent selection between them, Neotropical and African cichlids, besides different rate variation of the *LWS* gene among different Neotropical clade, considering previous temporal divergence. The results obtained contribute to the understand of the molecular evolution in the visual system of the Neotropical cichlids, once key-sites of the *LWS* protein are under selection in this group, and possibly ecomorphological characteristic imply the rate variation of the *LWS* gene.

Keywords: Visual system. Opsin proteins. Ecology. Cichlidae. Molecular evolution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2 SELEÇÃO POSITIVA DIVERGENTE DO GENE *LWS* EM CICLÍDEOS NEOTROPICAIS

Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança do fragmento parcial do gene *LWS* contendo somente os éxons 2-5 (870 pb); somente os valores de *bootstrap* acima de 70 são apresentados..... 27

3 ATEMPORALIDADE DO GENE OPSINA *LWS* EM CICLÍDEOS NEOTROPICAIS

Figura 1. Árvore gênica de máxima verossimilhança utilizando o fragmento parcial do gene *LWS*, considerando somente os éxons (630 pb). Os suportes dos ramos correspondem às reamostragens de *bootstrap* > 70. 54

Figura 2. Árvore gênica de máxima verossimilhança utilizando o fragmento parcial do gene *LWS*, considerando éxons e íntrons (875 pb). Os suportes dos ramos correspondem às reamostragens de *bootstrap* > 70. 55

Figura 3. Árvore gênica de máxima verossimilhança utilizando o fragmento parcial do gene *COI* (468 pb). Os suportes dos ramos correspondem às reamostragens de *bootstrap* > 70. 56

Figura 4. Relações das distâncias patrísticas obtidas a partir das reconstruções de máxima verossimilhança para as espécies de ciclídeos neotropicais estudadas, utilizando fragmentos parciais dos genes *COI* e *LWS*..... 58

LISTA DE TABELAS

2 SELEÇÃO POSITIVA DIVERGENTE DO GENE *LWS* EM CICLÍDEOS NEOTROPICAIS

Tabela 1. Espécies de ciclídeos utilizadas neste estudo.	23
Tabela 2. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos neotropicais de acordo com o teste FUBAR (probabilidade <i>a posteriori</i> > 0.90).....	28
Tabela 3. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos africanos de acordo com o teste FUBAR (probabilidade <i>a posteriori</i> > 0.90).....	29
Tabela 4. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos neotropicais de acordo com o teste FEL ($p < 0.1$).....	30
Tabela 5. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos neotropicais de acordo com o teste FEL ($p < 0.1$).....	31
Tabela 6. Modelos da função <i>codeml</i> e suas respectivas estimativas.....	31
Tabela 7. Resumo dos sítios estimados como estando sob seleção de acordo com os modelos FUBAR (Fb), FEL (F) e M8 BEB (M).....	32

3 ATEMPORALIDADE DO GENE OPSINA *LWS* EM CICLÍDEOS NEOTROPICAIS

Tabela 1. Espécies utilizadas neste estudo, código de acesso das sequências obtidas no GenBank, coleções de depósito dos espécimes (quando disponível) e seus respectivos códigos.....	51
Tabela 2. Testes de saturação e melhores modelos de substituição e partições para os marcadores estudados.....	53
Tabela 3. Taxas de substituição da sequência codificadora parcial do gene <i>LWS</i> considerando os tempos de divergência propostos por Genner et al. (2007), McMahan et al. (2013) e Friedman et al. 2013.	57
Tabela 4. Taxas de substituição da sequência codificadora parcial do gene <i>LWS</i> considerando os tempos de divergência propostos por López-Fernández et al. (2013).	57

Tese elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas *Hydrobiologia*, disponível em: <www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10750> e *Genetica*, disponível em: <<http://www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/10709>>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
	REFERÊNCIAS	14
2	SELEÇÃO POSITIVA DIVERGENTE DO GENE <i>LWS</i> ENTRE CICLÍDEOS NEOTROPICAIS E AFRICANOS	18
	RESUMO	18
2.1	INTRODUÇÃO	20
2.2	METODOLOGIA	22
2.2.1	Coleta do material.....	22
2.2.2	Extração de DNA, PCR e sequenciamento	23
2.2.3	Análises genéticas.....	24
2.3	RESULTADOS.....	26
2.4	DISCUSSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE A – Estimativas do λ_{\max} (nm) das espécies ciclídeos estudadas.....	45
3	ATEMPORALIDADE DO GENE <i>LWS</i> EM CICLÍDEOS NEOTROPICAIS	46
	RESUMO	46
3.1	INTRODUÇÃO	48
3.2	METODOLOGIA	50
3.2.1	Amostras, extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	50
3.2.2	Análises genéticas.....	52
3.3	RESULTADOS.....	53
3.4	DISCUSSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE B – Distâncias genéticas K2P <i>LWS</i> (éxons).....	69
	APÊNDICE C – Distâncias genéticas K2P <i>LWS</i> (éxons + íntrons).....	69
	APÊNDICE D – Distâncias genéticas K2P para os fragmentos do gene <i>COI</i>	70
	APÊNDICE E – Reconstrução gênica (<i>COI</i>).....	71
	APÊNDICE F – Reconstrução gênica (<i>LWS</i>)	72
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cichlidae encontra-se dispersa pelo globo e suas espécies estão amplamente distribuídas nos continentes Americanos, apresentando exemplos de radiação adaptativa nesses locais, assim como no continente africano (López-Fernández et al., 2005; Willis et al., 2007; Musilová et al., 2008). Como o grupo usa amplamente a visão para alimentação e reconhecimento intra e interespecífico, é importante o estudo do sistema visual desses organismos e o desenvolvimento de pesquisas sobre os genes relacionados à visão (Terakita, 2005; Trezise & Collin, 2005; Fabrin et al., 2016), que também são considerados genes candidatos para a diversificação desse grupo (Brawand et al., 2014).

Os pigmentos visuais são formados por diferentes proteínas opsinas, cada uma delas capaz de absorver um comprimento de onda de luz específico (Schwanzara, 1967; Bowmaker, 1995), mas poucos estudos foram realizados utilizando os ciclídeos neotropicais como modelo (Weadick et al., 2012; Schott et al., 2014; Fabrin et al., 2017; Hauser et al., 2017; Härer et al. 2018).

Os genes nucleares que expressam os pigmentos visuais fazem parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (Bowmaker, 1995). Dentre esses genes, o que apresenta a maior variação é o que expressa o pigmento visual responsável por absorver os comprimentos longos de onda de luz (*Long-Wavelength Sensitive, LWS*) (Yokoyama, 2008), sendo objeto de vários estudos (Terai et al., 2002; Seehausen et al. 2008; Miyagi et al., 2012). Considerando os *habitats* aquáticos em ambientes neotropicais, que apresentam variação das características associada à transparência da água (Ribeiro et al., 2004) os ciclídeos neotropicais tornam-se um modelo interessante, por existir uma forte associação entre a variação molecular desses genes e o ambiente que os organismos habitam (Yokoyama, 2008).

O objetivo deste estudo foi obter sequências dos genes da Subunidade I da Citocromo c Oxidase (*COI*) e *LWS* de espécies de ciclídeos neotropicais, e estimar quais códons do gene *LWS* estão sob seleção ao comparar um grupo de ciclídeos neotropicais com espécies de ciclídeos africanos. Assim como obter a taxa de variação do gene *LWS* em ciclídeos neotropicais, com base em estimativas de tempo prévias para os diferentes grupos neotropicais e variação do gene *COI*, por este apresentar uma taxa constante de variação para os peixes ósseos (Bermingham et al., 1997; Pereira et al., 2013). Sendo assim, se faz importante estudos da evolução dos genes que expressam proteínas relacionadas aos pigmentos visuais, por contribuir para o entendimento da história evolutiva deste grupo.

REFERÊNCIAS

- Bermingham, E., S.S. McCafferty & A. P. Martin, 1997. Fish Biogeography and Molecular Clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. In: Molecular Systematics of Fishes. Elsevier, 113–128.
- Bowmaker, J., 1995. The visual pigments of fish. Progress in Retinal and Eye Research 15: 1–31.
- Brawand, D., C. E. Wagner, Y. I. Li, M. Malinsky, I. Keller, S. Fan, O. Simakov, A. Y. Ng, Z. W. Lim, E. Bezault, J. Turner-Maier, J. Johnson, R. Alcazar, H. J. Noh, P. Russell, B. Aken, J. Alföldi, C. Amemiya, N. Azzouzi, J.-F. Baroiller, F. Barloy-Hubler, A. Berlin, R. Bloomquist, K. L. Carleton, M. a. Conte, H. D’Cotta, O. Eshel, L. Gaffney, F. Galibert, H. F. Gante, S. Gnerre, L. Greuter, R. Guyon, N. S. Haddad, W. Haerty, R. M. Harris, H. A. Hofmann, T. Hourlier, G. Hulata, D. B. Jaffe, M. Lara, A. P. Lee, I. MacCallum, S. Mwaiko, M. Nikaido, H. Nishihara, C. Ozouf-Costaz, D. J.

Penman, D. Przybylski, M. Rakotomanga, S. C. P. Renn, F. J. Ribeiro, M. Ron, W. Salzburger, L. Sanchez-Pulido, M. E. Santos, S. Searle, T. Sharpe, R. Swofford, F. J. Tan, L. Williams, S. Young, S. Yin, N. Okada, T. D. Kocher, E. a. Miska, E. S. Lander, B. Venkatesh, R. D. Fernald, A. Meyer, C. P. Ponting, J. T. Streebman, K. Lindblad-Toh, O. Seehausen & F. Di Palma, 2014. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* 513: 375–381.

Fabrin, T. M. C., L. S. Gasques, S. M. A. P. Prioli & A. J. Prioli, 2016. Opsin genes: research perspectives with Neotropical cichlids (Perciformes: Cichlidae) and their relevance in floodplain studies. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 38: 241–246.

Fabrin, T. M. C., S. M. A. P. Prioli & A. J. Prioli, 2017. Long-wavelength sensitive opsin (*LWS*) gene variability in neotropical cichlids (teleostei: Cichlidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89: 213–222.

Harer, A., Meyer, A., Torres-Dowdall, J. Convergent phenotypic evolution of the visual system via different molecular routes: How Neotropical cichlid fishes adapt to novel light environments. *Evolution Letters* 2: 341–354.

Hauser, F. E., K. L. Ilves, R. K. Schott, G. M. Castiglione, H. López-Fernández & B. S. W. Chang, 2017. Accelerated evolution and functional divergence of the dim light visual pigment accompanies cichlid colonization of Central America. *Molecular Biology and Evolution* 37: 2650–2664.

López-Fernández, H., R. L. Honeycutt & K. O. Winemiller, 2005. Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). *Molecular phylogenetics and evolution* 34: 227–244.

Miyagi, R., Y. Terai, M. Aibara, T. Sugawara, H. Imai, H. Tachida, S. I. Mzighani, T. Okitsu, A. Wada & N. Okada, 2012. Correlation between nuptial colors and visual sensitivities tuned by opsins leads to species richness in sympatric Lake Victoria cichlid

- fishes. *Molecular biology and evolution* 29: 3281–3296.
- Musilová, Z., O. Ríčan, K. Janko & J. Novák, 2008. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Molecular phylogenetics and evolution* 46: 659–672.
- Pereira L.H.G., R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira, 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* 14: 20. doi: 10.1186/1471-2156-14-20
- Ribeiro, R., D. A. Rocha & M. Thomaz, 2004. Variação temporal de fatores limnológicos em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (PR / MS – Brasil). 261–271.
- Schott, R. K., S. P. Refvik, F. E. Hauser, H. López-Fernández & B. S. W. Chang, 2014. Divergent positive selection in rhodopsin from lake and riverine cichlid fishes. *Molecular biology and evolution* 31: 1149–1165.
- Schwanzara, S., 1967. The visual pigments of freshwater fishes. *Vision research* 7: 121–148.
- Seehausen, O., Y. Terai, I. S. Magalhaes, K. L. Carleton, H. D. J. Mrosso, R. Miyagi, I. van der Sluijs, M. V Schneider, M. E. Maan, H. Tachida, H. Imai & N. Okada, 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* 455: 620–626.
- Terai, Y., W. E. Mayer, J. Klein, H. Tichy & N. Okada, 2002. The effect of selection on a long wavelength-sensitive (*LWS*) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 15501–15506.
- Terakita, A., 2005. The opsins. *Genome Biology* 6: 213.
- Trezise, A. & S. Collin, 2005. Opsins: evolution in waiting. *Current biology* 15: 794–796.

Weadick, C. J., E. R. Loew, F. H. Rodd & B. S. W. Chang, 2012. Visual pigment molecular evolution in the Trinidadian pike cichlid (*Crenicichla frenata*): a less colorful world for neotropical cichlids?. *Molecular biology and evolution* 29: 3045–3060.

Willis, S. C., M. S. Nunes, C. G. Montaña, I. P. Farias & N. R. Lovejoy, 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 44: 291–307.

Yokoyama, S., 2008. Evolution of dim-light and color vision pigments. *Annual review of genomics and human genetics* 9: 259–282.

2 SELEÇÃO POSITIVA DIVERGENTE DO GENE *LWS* ENTRE CICLÍDEOS NEOTROPICAIS E AFRICANOS

RESUMO

Cichlidae é constituída de peixes teleósteos com uma grande diversidade de formas, colorações e comportamentos. O grupo usa amplamente a visão para reconhecimento interespecífico, alimentação e seleção de *habitat*, sendo seu comportamento sensível a alterações das condições fóticas. Assim, considerando que o grupo de ciclídeos neotropicais está submetido a diversos tipos de *habitats* aquáticos, estudos sobre a variação molecular de genes que expressem pigmentos visuais seriam importantes para a compreensão da história evolutiva do grupo. Dentre esses, o gene (*Long-wavelength sensitive – LWS*) é o que apresenta a maior variação. Assim, o objetivo deste estudo foi estimar os códons sob seleção no grupo de ciclídeos neotropicais, e compará-los com espécies de ciclídeos africanos. Trechos parciais do gene *LWS* foram sequenciados, compreendendo os éxons 2 ao 5, e foram analisados em diversos modelos de seleção de códons. Foi possível observar a divergência quanto aos códons selecionados, comparando os grupos neotropical e africano. Além disso, um dos cinco sítios-chave da proteína *LWS* está sob seleção positiva em ambos os grupos. Esse trabalho contribui com novas informações a respeito da evolução do sistema visual em ciclídeos neotropicais, além de trazer estimativas do comprimento de onda de luz máximo absorvido por essa proteína para as espécies estudadas.

Palavras-chave: opsina; FUBAR; codeml; *Crenicichla*; sistema visual; evolução.

2 DIVERGENT POSITIVE SELECTION OF THE *LWS* GENE BETWEEN NEOTROPICAL AND AFRICAN CICHLIDS

ABSTRACT

Cichlidae's fish present great morphological, coloration and behavioral diversity. This group uses the vision for interspecific recognition, feeding and habitat selection, and your behavior depends of photic conditions. Thus, as Neotropical cichlids are submitted to different aquatic habitats, are necessary studies on the molecular variation of the genes responsible by the expression of the visual pigments. The *LWS* gene presents higher variation. So, the aim of this study was to estimate the codons under selection in the Neotropical cichlids group, and to compare them with African cichlids species, considering the *LWS* gene. Partial fragments of the *LWS* gene were sequenced, covering the exons 2 to 5, which were analyzed using different models of codon selection. It was possible observe the divergence between them, Neotropical and African groups. Beside this, one of the five key-sites of the LWS protein is under positive selection in both groups. This study contributes with novel data about the evolution of the visual system in Neotropical cichlids and bring the estimative of the maximum wavelength absorbed by this protein for the analyzed species.

Keywords: opsin; FUBAR; codeml; *Crenicichla*; visual system; evolution.

2.1 INTRODUÇÃO

Cichlidae constitui uma família de peixes teleósteos com uma grande diversidade de formas, colorações e comportamentos. Esta família encontra-se dispersa pelo globo nos continentes Africano e Asiático, Madagascar, e regiões neotropicais. Os ciclídeos Neotropicais estão amplamente distribuídos nos continentes Americanos, apresentando exemplos de radiação adaptativa (López-Fernández et al., 2005; Willis et al., 2007; Musilová et al., 2008), assim como os ciclídeos Africanos (Elmer & Reggio, 2009; Brawand et al., 2014).

O grupo usa amplamente a visão para reconhecimento interespecífico (Miyagi et al., 2012), alimentação (Parry et al., 2005) e seleção de *habitat* (Carleton, 2009), sendo seu comportamento sensível a alterações das condições fóticas e espectrais (Kroger, 2003). Dada a importância dessa característica, uma das formas de se estudar o sistema visual desses organismos é o desenvolvimento de pesquisas sobre os genes relacionados à visão, especificamente os genes que expressam os pigmentos visuais (Terakita, 2005; Trezise & Collin, 2005; Fabrin et al., 2016), sendo, inclusive, considerados genes candidatos para a diversificação dos ciclídeos (Brawand et al., 2014).

Os pigmentos visuais são formados por cromóforos retiniais (aldeídos de vitamina A) ligados às proteínas opsinas, cada uma delas capaz de absorver um comprimento de onda de luz específico (Schwanzara, 1967; Bowmaker, 1995). Nos ciclídeos Africanos são encontrados oito genes opsinas, correspondendo a sete cone opsinas (*SWS1*, *SWS2A*, *SWS2B*, *RH2A α* , *RH2A β* , *RHA2B* e *LWS*), responsáveis pela visão de cores, que absorvem do comprimento de onda de luz ultravioleta ao vermelho, e um gene (*RH1*), responsável pela visão escotópica (Spady et al., 2005; Carleton et al., 2010).

Estudos desses genes com espécies de ciclídeos Neotropicais iniciaram-se com análises moleculares para a espécie *Crenicichla frenata*, (Weadick et al., 2012). Posteriormente, também foi evidenciada evolução divergente entre as espécies de ciclídeos Africanos e Neotropicais para o gene *RHI* (Schott et al., 2014; Hauser et al., 2017), assim como para o gene *LWS* (Fabrín et al., 2017). A adaptação do sistema visual de espécies de ciclídeos Neotropicais também foi estudada (Escobar-Camacho et al., 2017), bem como a adaptação molecular (Härer et al., 2018).

Como os *habitats* aquáticos dos ambientes neotropicais apresentam alterações limnológicas, como a variação da luminosidade e turbidez, que são características associadas à transparência da água (Ribeiro et al., 2004), é importante o estudo da variação desses genes em espécies de ciclídeos neotropicais, uma vez que as regiões polimórficas em ciclídeos neotropicais parecem não sobrepor-se às dos ciclídeos africanos (Schott et al., 2014; Fabrín et al., 2017), existindo uma forte associação entre os tipos de pigmentos visuais e o ambiente que esses organismos habitam (Yokoyama, 2008).

Uma forma mais sensível de alteração do comprimento de onda de luz absorvido seriam mutações nas sequências de DNA que acarretam mudanças aminoacídicas na proteína codificada (Carleton, 2009; Carleton et al., 2016). Assim, uma das maneiras de se verificar modificações no sistema visual destes organismos é a quantificação da expressão destes genes, que é influenciada tanto por mecanismos genéticos quanto ambientais (Smith et al., 2011). Porém, também é importante o estudo da evolução molecular das sequências codificadoras desses genes, pois alterações em sítios-chave das proteínas opsinas podem acarretar em sensíveis modificações no comprimento de onda de luz absorvido por determinado pigmento visual (Yokoyama, 2008).

Desta maneira, é levantada a hipótese da seleção divergente ao serem comparados ciclídeos africanos e neotropicais. O objetivo deste trabalho foi identificar alterações do gene opsinina *LWS* em sequências nucleotídicas e aminoacídicas de ciclídeos neotropicais e compará-los aqueles obtidos em sequências do gene *LWS* de ciclídeos africanos, disponibilizadas em bancos de dados públicos, considerando os cinco sítios-chave para alterações do espectro de absorção dessa proteína (Yokoyama, 2008).

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Coleta do material

Foi obtido material de 11 espécies de ciclídeos neotropicais, compreendendo 7 gêneros, (Tabela 1) de diversos locais do Brasil e países vizinhos. Todos os espécimes utilizados estão depositados em coleções ictiológicas. Os espécimes de ciclídeos neotropicais utilizados foram obtidos por meio de coletas do Programa Ecológico de Longa Duração (PELD) (22°47' S; 53°19' W) – CNPq sítio 06 da Universidade Estadual de Maringá (protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal número CEUA 123/2010). Amostras de tecido muscular também foram obtidas por meio da coleção do Museu de Ictiologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e da coleção ictiológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Todas as amostras foram armazenadas em etanol 96% e mantidas em freezer -20 °C até a extração de DNA.

Tabela 1. Espécies de ciclídeos utilizadas neste estudo.

	Referência	GenBank	Localidade	Espécie
NEOTROPICAIS	Este trabalho	-	Alto Rio Paraná (PR)	<i>Astronotus ocellatus</i>
	Escobar-Camacho et al. (2017)	KX382916	Rio Negro (AM)	<i>Astronotus ocellatus</i>
	Escobar-Camacho et al. (2017)	KX382918	Rio Negro (AM)	<i>Pterophyllum scalare</i>
	Escobar-Camacho et al. (2017)	KX382920	Rio Negro (AM)	<i>Symphysodon. discus</i>
	Este trabalho	-	Rio Acaray (Paraguai)	<i>Cichlasoma pusillum</i>
	Este trabalho	-	Alto Rio Paraná (PR)	<i>Crenicichla britskii</i>
	Weadick et al. (2012)	JN990732	Rio Aripo (Trinidad e Tobago)	<i>Crenicichla frenata</i>
	Este trabalho	-	Alto Rio Paraná (PR)	<i>Crenicichla haroldoi</i>
	Este trabalho	-	Bacia do Rio Paraná (PR)	<i>Crenicichla niederleini</i>
	Este trabalho	-	Alto Rio Paraná (PR)	<i>Crenicichla sp.</i>
	Este trabalho	-	Alto Rio Paraná (PR)	<i>Apistogramma commbrae</i>
	Este trabalho	-	Arroio praia dos Castelhanos (SP)	<i>Geophagus brasiliensis</i>
	Este trabalho	-	Rio Ferreira (RS)	<i>Gymnogeophagus gymnogenys</i>
	Este trabalho	-	Arroio linha das Flores (RS)	<i>Gymnogeophagus labiatus</i>
Este trabalho	-	Alto Rio Paraná (PR)	<i>Satanoperca pappaterra</i>	
AFRICANOS	Halstenberg et al. (2005)	AY660540	Lago Tanganyika	<i>Astatotilapia burtoni</i>
	Spady et al. (2005)	AY780517	Lago Malawi	<i>Aulonocara hueseri</i>
	Spady et al. (2005)	AY780514	Lago Malawi	<i>Copadichromis borleyi</i>
	Spady et al. (2005)	AY780521	Lago Malawi	<i>Cynotilapia afra</i>
	Miyagi et al. (2012)	AB667150	Lago Victoria	<i>Haplochromis fischeri</i>
	Miyagi et al. (2012)	AB667117	Lago Victoria	<i>Haplochromis sp. 'macula'</i>
	Carleton e Kocher (2001)	AF247127	Lago Malawi	<i>Labeotropheus fuelleborni</i>
	Spady et al. (2005)	AY780515	Lago Malawi	<i>Labidochromis chisumulae</i>
	Spady et al. (2005)	AY780519	Lago Malawi	<i>Lethrinops parvidens</i>
	Spady et al. (2005)	AY780522	Lago Malawi	<i>Maravichromis lateristriga</i>
	Spady et al. (2005)	AY780518	Lago Malawi	<i>Melanochromis auratus</i>
	Carleton e Kocher (2001)	AF247126	Lago Malawi	<i>Metriaclima zebra</i>
	Spady et al. (2005)	AY780513	Lago Tanganyika	<i>Neolamprologus brichardi</i>
	Spady et al. (2005)	AY780512	Lago Tanganyika	<i>Ophthalmotilapia ventralis</i>
	Miyagi et al. (2012)	AB667135	Lago Victoria	<i>Platytaeniodus degeni</i>
	Carleton et al. (2005)	AY673688	Lago Victoria	<i>Pundamilia nyererei</i>
	Carleton et al. (2005)	AY673689	Lago Victoria	<i>Pundamilia pundamilia</i>
	Spady et al. (2005)	AY780523	Lago Malawi	<i>Stigmatochromis modestus</i>
	Spady et al. (2005)	AY780516	Lago Tanganyika	<i>Tropheus duboisi</i>
	Spady et al. (2005)	AY780520	Lago Malawi	<i>Tyrannochromis maculatus</i>
Miyagi et al. (2012)	AB667126	Lago Victoria	<i>Yssichromis pyrrhocephalus</i>	

2.2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

A extração de DNA dos espécimes obtidos 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.

Posteriormente as amostras de DNA foram armazenadas em freezer -20 °C.

Para a preparação da reação em cadeia da polimerase (PCR) de cada amostra foi utilizado Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl) (2,50 µl), 1,5 mM MgCl₂

(0,75 µl), 2,5 µM de cada primer (0,40 µl de cada primer), 0,1 mM de cada dNTP (0,25 µl de cada dNTP), 2,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase (0,2 µl), água Milli-Q (17,75 µl), e a amostra do DNA extraído (2 µl), obtendo um volume final de 25 µl.

Os primers utilizados para a PCR foram o F1E1 (5'-GCGGTACCATGAAGATAACAACAA-3') e R1E6 (5'-GGATACTTCAGAACCATCATC-3'), descritos por Weadick et al. (2012), amplificando parcialmente o gene *LWS*, abrangendo do início do éxon 1 até o final do éxon 6 do gene (~2100 pb). Posteriormente os produtos da PCR foram armazenados em freezer -20 °C. O programa de amplificação seguiu o proposto por Fabrin et al. (2017).

As amostras amplificadas foram purificadas segundo Rosenthal et al. (1993) para o sequenciamento, o qual foi realizado em sequenciador automático. Posteriormente, foram preparadas com o kit de sequenciamento Big Dye Terminator v3, seguindo instruções do fabricante, no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Universidade Estadual de Campinas, onde o sequenciamento foi realizado na plataforma 3730XL da *Applied Biosystems*.

2.2.3 Análises genéticas

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando os programas BioEdit (Hall, 1999) e MEGA 7 (Kumar et al., 2016), respectivamente. O algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994) foi utilizado para o alinhamento. O alinhamento das regiões codificadoras seguiu o posicionamento dos sítios do gene rhodopsin *RHI* bovino (Bowmaker, 1995; Hofmann et al., 2009; Smith & Carleton, 2010; Schott et al., 2014). Os programas MEGA 7 e DnaSP 5 foram utilizados para a caracterização dos fragmentos obtidos (Librado & Rozas, 2009). Também foram incluídas sequências do gene *LWS* de 21 espécies de ciclídeos africanos e 4 espécies de ciclídeos neotropicais,

disponíveis no *Genbank* (Tabela 1). No total, foram utilizadas 35 espécies da família Cichlidae neste trabalho.

As reconstruções filogenéticas consideraram as sequências do fragmento parcial obtido do éxon 2 ao 5 do gene *LWS*, e seguiram as partições e modelos propostos pelo programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2012). Foi utilizado o método estatístico de máxima verossimilhança no programa RAxML 8 (Stamatakis, 2014).

Para as análises de seleção de códons foi utilizado o fragmento parcial do gene *LWS* (éxons 2 - 5), sem os íntrons, compreendendo 870 pb e 290 aminoácidos. Essa região foi utilizada por apresentar códons de interesse onde substituições não-sinônimas podem provocar alterações no comprimento máximo da onda (λ_{\max}) de luz absorvido pela proteína opsina, permitindo a estimativa do λ_{\max} para cada espécie estudada (Yokoyama, 2008).

Foram utilizados os testes implementados no *webservice Datamonkey* (Delpont et al., 2010): FUBAR e FEL. O teste FUBAR (*Fast Unconstrained Bayesian AppRoximation*), por sua vez, detecta sítios sob seleção positiva ou purificadora, utilizando, também, as taxas dS e dN, porém utiliza um algoritmo Bayesiano para inferir as taxas e reporta a significância da seleção positiva a partir de probabilidade *a posteriori* (Murrell et al., 2013). O teste FEL (*Fixed Effects Likelihood*) infere taxas de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) a partir de um alinhamento e filogenia, testando a hipótese de que dN é significativamente superior a dS para os sítios dos respectivos códons, utilizando um teste de razão de verossimilhança (Kosakovsky Pond & Frost, 2005). Os grupos utilizados foram divididos em ciclídeos africanos e neotropicais.

A função *codeml* foi implementada no programa pamlX (Xu e Yang, 2013) também foi utilizada para estimar a variação e códons sob seleção positiva utilizando o

modelo de sítios aleatórios, a partir dos modelos M0, M1a, M2a, M7, e M8, para estimar a taxa ω , que corresponde a medida de seleção natural atuando sobre a proteína, e presença de seleção positiva sobre os códons. Os modelos M0, M1a e M2a, são úteis para comparar a variação da taxa ω , enquanto M7 e M8 são úteis para teste de seleção positiva (Yang, 2007). Posteriormente foi utilizada a razão de máxima verossimilhança (LRT) para a escolha do melhor modelo para estimar ω e os sítios sob seleção positiva, considerando a função *codeml*. Metodologia semelhante foi utilizada por Schott et al. (2014).

As estimativas do λ_{\max} de acordo com as mutações do gene *LWS* obtidas foram feitas de acordo com o revisado por Yokoyama (2008). Ward et al. (2008) utilizaram uma metodologia parecida para estimar a absorção de *Poecilia reticulata*. Para estimar os efeitos na proteína, de acordo com cada sítio sob seleção, foi considerada a cristalografia da rodopsina bovina do banco de dados *UniProt* (código de acesso P02699).

2.3 RESULTADOS

Foram obtidos fragmentos parciais de 1217 pb para o gene *LWS*, incluindo éxons e íntrons, porém utilizamos somente os éxons para nossas análises, obtendo um fragmento de 870 pb, do éxon 2 ao 5 (códon 22-312). Foram obtidas novas sequências de 11 espécies de ciclídeos neotropicais para este gene, além de sequências de 4 espécies de ciclídeos neotropicais obtidas no *Genbank*, totalizando 15 espécies neotropicais. Para as análises utilizamos um total de 35 espécies, considerando as espécies de ciclídeos africanas. As sequências utilizadas apresentaram a proporção de 30,7% (T), 24,4% (C), 20,8% (A), e 24% (G), com taxa de transição/transversão de 1,27.

A partir da reconstrução gênica utilizando o fragmento parcial da sequência codificadora do gene *LWS* foi possível obter dois clados distintos separando os grupos neotropical e africano; ambos os clados apresentaram bons valores de suporte (> 70). Também, as espécies congêneres foram agrupadas em clados monofiléticos para o grupo neotropical (Figura 1).

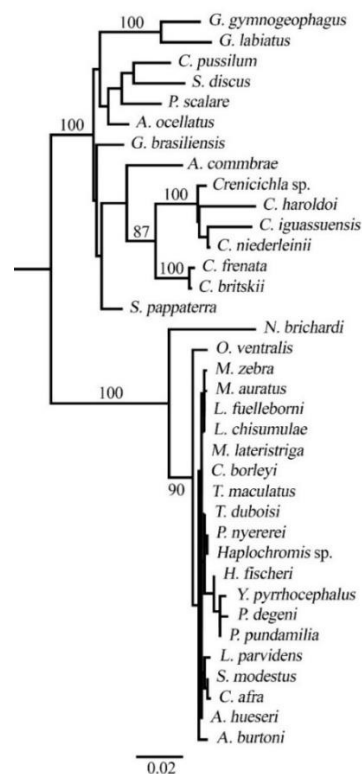


Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança do fragmento parcial do gene *LWS* contendo somente os éxons 2-5 (870 pb); somente os valores de *bootstrap* acima de 70 são apresentados.

Posteriormente, foram realizados os testes de seleção de códons. O teste de seleção FUBAR indicou 28 sítios sob seleção para o grupo dos ciclídeos neotropicais, dos quais 7 estariam sob seleção positiva e 21 sob seleção negativa. A maioria dos sítios sob seleção estimados estão presentes no éxon 2 (Tabela 2).

Para o grupo de ciclídeos africanos o teste de seleção FUBAR indicou 13 sítios sob seleção, 8 sob seleção positiva e 5 sob seleção negativa (Tabela 3). Os éxons 2, 3 e

4 apresentaram a mesma quantidade de sítios selecionados, mas o éxon 3 teve a maioria dos sítios sob seleção positiva. Entre os dois grupos, somente dois sítios sob seleção se sobrepuseram, um sob seleção negativa (sítio 98), e outro sob seleção positiva (sítio 164). Considerando o teste FUBAR os ciclídeos neotropicais tiveram mais do que o dobro de sítios selecionados para o fragmento do gene LWS utilizado quando comparados com o grupo de ciclídeos africanos.

Tabela 2. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos neotropicais de acordo com o teste FUBAR (probabilidade *a posteriori* > 0,90).

E	Sítio	α	β	$\beta - \alpha$	Prob[$\alpha > \beta$]	Prob[$\alpha < \beta$]	BayesFactor [$\alpha < \beta$]	PSRF	Neff
2	23	33,181	0,484	-32,69	1	0	0	1,001	391,711
	27	27,755	0,952	-26,80	0,999	0	0	1	465,807
	34	8,914	0,602	-8,31	0,979	0,009	0,012	1,008	190,761
	39	0,811	5,698	4,88	0,039	0,927	17,547	1	500,549
	46	21,731	0,514	-21,21	0,998	0,001	0,001	1,003	308,145
	61	6,068	0,486	-5,58	0,945	0,039	0,056	1,004	279,128
	62	14,73	0,497	-14,23	0,996	0,002	0,003	1,003	319,787
	63	15,439	1,15	-14,28	0,976	0,006	0,008	1,004	270,748
	81	0,851	7,156	6,30	0,027	0,942	22,524	1,001	410,344
	89	1,016	5,741	4,72	0,051	0,91	14,105	1	533,916
	98	9,614	0,494	-9,12	0,901	0,078	0,117	1,008	196
	105	3,9	0,541	-3,35	0,902	0,07	0,104	1,005	245,989
	114	12,734	0,541	-12,19	0,991	0,004	0,005	1,005	245,832
	115	0,991	7,495	6,50	0,03	0,934	19,553	1,003	307,22
	3	132	6,014	0,49	-5,52	0,944	0,039	0,057	1,004
151		31,866	0,507	-31,3	1	0	0	1,006	232,106
160		6,579	0,49	-6,08	0,949	0,035	0,051	1,004	278,198
164		0,79	7,811	7,02	0,021	0,954	28,83	1,001	398,069
4	185	23,269	0,506	-22,76	0,999	0	0	1,002	362,869
	213	15,133	0,507	-14,62	0,982	0,011	0,016	1,004	267,17
	217	0,834	15,059	14,22	0,001	0,989	127,91	1,021	97,735
	218	0,759	10,427	9,66	0,004	0,981	73,108	1,01	169,749
5	254	8,867	0,505	-8,36	0,963	0,025	0,036	1,004	274,949
	272	7,563	0,489	-7,07	0,957	0,029	0,042	1,004	279,269
	275	6,331	0,487	-5,84	0,948	0,036	0,053	1,004	279,481
	277	6,102	0,486	-5,61	0,945	0,038	0,055	1,004	279,107
	284	15	0,468	-14,53	0,983	0,012	0,016	1,005	242,551
	293	12,68	0,538	-12,14	0,974	0,017	0,024	1,005	264,8

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

posterior da taxa de substituição não-sinônima em cada sítio; PSRF = potencial de escala do fator de redução (valores próximos de 1 indicam convergência da cadeia); Neff = tamanho efetivo da amostra.

Tabela 3. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos africanos de acordo com o teste FUBAR (probabilidade *a posteriori* > 0,90).

E	Sítio	α	β	$\beta - \alpha$	Prob[$\alpha > \beta$]	Prob[$\alpha < \beta$]	BayesFactor [$\alpha < \beta$]	PSRF	Neff
2	49	1,697	14,146	12,44	0,053	0,917	13,494	0,999	651,659
	70	19,258	0,741	-18,51	0,914	0,068	0,088	1,009	184,098
	98	43,622	0,823	-42,79	0,999	0	0	0,998	843,475
	119	1,484	13,439	11,95	0,049	0,922	14,447	0,999	639,001
3	123	1,462	13,161	11,69	0,051	0,92	14,062	0,999	613,156
	137	17,939	0,783	-17,15	0,906	0,075	0,099	1,009	175,958
	162	1,775	16,891	15,11	0,042	0,931	16,415	0,998	720,701
	164	1,62	33,893	32,27	0,004	0,986	88,614	1	528,641
4	184	16,663	0,721	-15,94	0,902	0,077	0,102	1,011	163,783
	193	16,663	0,705	-15,95	0,903	0,076	0,101	1,011	161,819
	206	1,484	13,439	11,95	0,049	0,922	14,447	0,999	639,001
	214	1,983	28,497	26,51	0,012	0,971	40,377	0,999	594,769
5	262	1,932	17,493	15,56	0,048	0,924	14,715	0,999	643,602

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa. E = éxon; α = média posterior da taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = média posterior da taxa de substituição não-sinônima em cada sítio; PSRF = potencial de escala do fator de redução (valores próximos de 1 indicam convergência da cadeia); Neff = tamanho efetivo da amostra.

Para o teste FEL, a maioria dos sítios selecionados no grupo neotropical também foi estimada no éxon 2. O total de sítios selecionados para o grupo foi de 34 sítios, mas somente 3 estando sob seleção positiva, e o restante sob seleção negativa, ou purificadora (Tabela 4). Para o grupo africano, o teste FEL estimou 14 sítios sob seleção, sendo somente um sob seleção positiva (Tabela 5). De acordo com esse teste, os dois grupos compartilham 4 sítios sob seleção negativa, e um sítio sob seleção positiva. Além disso, novamente o grupo neotropical apresentou mais do que o dobro de sítios sob seleção, ao ser comparado com o grupo de ciclídeos africanos.

Tabela 4. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos neotropicais de acordo com o teste FEL ($p < 0,1$).

E	Sítio	α	β	$\beta = \alpha$	LRT	p-value
2	23	15,689	0	3,298	17,024	0
	27	13,284	0,733	3,354	9,418	0,002
	34	4,133	0	1,997	4,293	0,038
	46	12,593	0	2,176	9,889	0,002
	61	3,55	0	1,142	4,449	0,035
	62	6,319	0	1,781	7,369	0,007
	63	6,408	0,874	2,486	3,486	0,062
	70	3,524	0	0,551	3,659	0,056
	97	3,347	0	0,602	3,377	0,066
	98	6,253	0	0,683	4,357	0,037
	102	4,161	0	0,833	3,134	0,077
	105	2,423	0	1,195	2,807	0,094
	110	3,75	0	0,731	3,209	0,073
	114	6,11	0	1,904	6,65	0,01
3	132	3,51	0	1,201	4,204	0,04
	136	10000	1,827	2,866	5,447	0,02
	148	3,741	0	0,759	3,126	0,077
	151	18,92	0	2,041	12,605	0
	160	3,755	0	1,223	4,386	0,036
	164	0	4,191	2,319	3,506	0,061
4	185	11,218	0	2,525	11,142	0,001
	195	3,702	0	0,639	3,444	0,063
	213	9,41	0	1,505	7,105	0,008
	217	0	6,151	4,335	4,099	0,043
	218	0	4,768	2,881	3,879	0,049
5	254	5,232	0	1,337	5,295	0,021
	261	3,36	0	0,799	2,819	0,093
	263	3,561	0	0,695	3,217	0,073
	268	3,492	0	0,804	2,879	0,09
	272	4,209	0	1,203	4,909	0,027
	275	3,689	0	1,157	4,555	0,033
	277	3,543	0	1,142	4,445	0,035
	284	9,105	0	1,161	7,776	0,005
	293	7,714	0	1,634	5,949	0,015

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa/purificadora. E = éxon; α = taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = taxa de substituição não-sinônima em cada sítio; $\beta = \alpha$ = taxa estimada sob um modelo neutro;;LRT = teste estatístico de verossimilhança da razão $\beta = \alpha$.

Tabela 5. Sítios sob seleção para o grupo de ciclídeos africanos de acordo com o teste FEL ($p < 0,1$).

	E	Sítio	α	β	$\beta = \alpha$	LRT	p-value
2		31	15,222	0	2,831	3,296	0,069
		65	19,074	0	3,366	3,376	0,066
		70	32,879	0	2,897	4,189	0,041
		98	90,452	0	12,967	13,423	0
3		137	18,017	0	2,668	3,797	0,051
		158	11,995	0	2,968	2,744	0,098
		164	0	23,901	14,785	3,596	0,058
4		184	15,264	0	2,348	3,621	0,057
		193	19,074	0	2,34	4,104	0,043
		205	16,293	0	2,68	3,335	0,068
5		236	15,264	0	2,897	3,187	0,074
		254	11,995	0	2,968	2,744	0,098
		275	13,214	0	2,856	2,865	0,091
		307	14,964	0	3,037	2,954	0,086

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção positiva, e as não sombreadas indicam sítios sob seleção negativa/purificadora. E = éxon; α = taxa de substituição sinônima em cada sítio; β = taxa de substituição não-sinônima em cada sítio; $\beta = \alpha$ = taxa estimada sob um modelo neutro; LRT = teste estatístico de verossimilhança da razão $\beta = \alpha$.

Os modelos utilizados no *codeml* estimaram as taxas de transição/transversão e de substituição não-sinônima/sinônima, e o valor ω foi quase o dobro para o grupo de ciclídeos africanos quando comparado ao grupo neotropical (Tabela 6).

Tabela 6. Modelos da função *codeml* e suas respectivas estimativas.

	Mod.	np	$\ln L$	κ	ω_0/p	ω_1/q	ω_2/ω_0	Nulo	LRT	df	p
Neotrop.	M0	30	- 2620,51	1,81	0,36	-	-	NA	-	-	-
	M1a	31	- 2573,80	1,72	0,01 (71,85%)	1 (28,15%)	-	M0	94,42	1	0,0000
	M2a	33	- 2567,16	1,80	0,05 (76,78%)	1 (17,28%)	3,1 (5,90%)	M1a	15,28	2	0,0004
	M7	31	- 2575,16	1,68	0,03	0,08	-	NA	-	-	-
	M8	33	- 2567,24	1,81	0,06	0,40	3,04 (10,83%)	M7	17,84	2	0,0001
Africano	M0	42	- 1616,23	2,30	0,62	-	-	NA	-	-	-
	M1a	43	- 1606,32	2,08	0 (61,37%)	1 (38,62%)	-	M0	20,82	1	0,0000
	M2a	45	- 1599,65	2,29	0 (65,01%)	1 (29,75%)	8,01 (5,22%)	M1a	15,34	2	0,0004
	M7	43	- 1606,33	2,10	0,005	0,005	-	NA	-	-	-
	M8	45	- 1600,22	2,27	0,005	1,89	3,99(17,69%)	M7	14,22	2	0,0008

Obs.: Mod. = modelo; np = número de parâmetros; $\ln L$ = valor de máxima verossimilhança; κ = transição/transversão; ω = substituição não-sinônima/substituição sinônima; M0 – M2a = proporção de cada classe de sítios em cada ω ; M7 e M8, p e q = forma dos parâmetros da distribuição beta; LRT = razão de máxima verossimilhança; df = grau de liberdade do modelo; p = valor de significância ao comparar modelo nulo e alternativo.

Por fim, os sítios sob seleção foram compilados e as regiões e funções na proteína *LWS* foram indicadas (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo dos sítios estimados como estando sob seleção de acordo com os modelos FUBAR (Fb), FEL (F) e M8 BEB (M).

	Sítio	Mod.	Neo	Afr	Região	Efeito	Ref.
ÉXON 2	23	Fb/F	X	-	TDe		
	27	Fb/F	X	-	TDe		
	31	F	-	X	TDe		
	34	Fb/F	X	-	TDe		
	36	M	X	X	TDe		
	39*	Fb/M	X	X	TM1		
	40	M	-	X	TM1		
	46	Fb/F	X	-	TM1		
	49 ^M	Fb/M	X	X	TM1		
	55	M	X	-	TM1	Ligação de H entre hélices aos sítios 83 e 299	Palczewski et al. (2000)
	57	M	X	-	TM1		
	59	M	X	X	TM1		
	61	Fb/F	X	-	TM1		
	62	Fb/F	X	-	TDc		
	63	Fb/F	X	-	TDc		
	70	Fb/F	-	X	TDc		
	81*	Fb/M	X	-	TM2		
	89*	Fb/M	X	-	TM2		
	92	M	X	-	TM2		
	97	F	X	-	TDe		
98	Fb/F	X	X	TDe			
102	F	X	-	TDe			
105	Fb	X	-	TDe			
110	F	X	-	TDe			
111	M	X	-	TM3			
114	Fb/F	X	-	TM3			
115*	Fb/M	X	-	TM3			
119 ^F	Fb/M	-	X	TM3			
ÉXON 3	123 ^F	Fb/M	-	X	TM3		
	124	M	X	X	TM3		
	132	Fb/F	X	-	TM3		
	135	M	-	X	TDc	Bloqueio iônico envolvido na estabilização da forma	Palczewski et al. (2000) e Blankenship et al. (2015)
	136	F/M	X	-	TDc	Bloqueio iônico envolvido na estabilização da forma	Palczewski et al. (2000) e Blankenship et al. (2015)
	137	Fb/F	-	X	TDc		
	148	F	X	-	TDc		
	151	Fb/F	X	-	TDc		
	155	M	X	X	TM4		
	158	F	-	X	TM4		
	160	Fb/F	X	-	TM4		
162 ^F	Fb/M	-	X	TM4			

	164* ^{NE} ↔	Fb/F/M	X	X	TM4	- 7 nm λ_{\max} (S164A)	Asenjo et al. (1994) e Yokoyama (2008)
	166 ^Y	M	X	X	TM4		
	169	M	-	X	TM4		
	172	M	X	-	TM4		
ÉXON 4	178	M	-	X	TDe		
	184	Fb/F	-	X	TDe		
	185	Fb/F	X	-	TDe		
	193	Fb/F	-	X	TDe		
	195	F	X	-	TDe		
	196	M	X	-	TDe		
	201	M	X	-	TDe	Ligação iônica metálica (Zinco)	Palczewski et al. (2000) e Teller et al. (2001)
	203	M	-	X	TM5		
	205	F	-	X	TM5		
	206 ^P	Fb/M	-	X	TM5		
	209	M	X	X	TM5		
	213	Fb/F	X	-	TM5	Próximo ao anel de ligação retinal	Stenkamp et al. (2002)
	214 ^P	Fb/M	-	X	TM5		
	217* ^{EX}	Fb/F/M	X	X	TM5		
218* ^{EX}	Fb/F/M	X	X	TM5			
	220	M	X	-	TM5		
	236	F	-	X	TDe		
	254	Fb/F	X	X	TM6		
	259 ^Y	M	X	X	TM6		
	261	F/M	X	X	TM6	- 10 nm λ_{\max} (Y261F) e próximo ao anel de ligação retinal	Asenjo et al. (1994), Yokoyama (2008) e Stenkamp et al. (2002)
	262 ^T	Fb/M	-	X	TM6		
	263	F	X	-	TM6		
ÉXON 5	268	F	X	-	TM6	Carga positiva na cadeia retinal e próximo ao sítio-chave 269	Stenkamp et al. (2002) e Yokoyama (2008)
	270	M	X	-	TM6	Próximo ao sítio-chave 269	Yokoyama (2008)
	272	Fb/F	X	-	TM6		
	275	Fb/F	X	X	TDe		
	277	Fb/F	X	-	TDe		
	284	Fb/F	X	-	TDe		
	293	Fb/F	X	-	TM7	Próximo ao sítio-chave 292	Yokoyama (2008)
	304	M	-	X	TM7		
	307	F	-	X	TM7		

Obs.: linhas sombreadas indicam sítios sob seleção em comum entre os grupos. Símbolos: * seleção positiva FUBAR (Neo); ^P seleção positiva FUBAR (Afr); ^E seleção positiva FEL (Neo); ^E seleção positiva FEL (Afr); ^Y seleção positiva M8 (Neo); ^T seleção positiva M8 (Afr). TDe = domínio extracelular; TM = hélice transmembrânica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; TDe = domínio citoplasmático. Alinhamento de acordo com a rodopsina bovina.

Considerando todos os modelos utilizados, foram estimados 75 sítios sob seleção para os dois grupos para pelo menos um dos modelos; dentre esses, 15 estão sob seleção em ambos os grupos. Apesar disso, o mesmo sítio que está sob seleção positiva em um dos grupos, não está sob este tipo de seleção no outro. Por exemplo, os sítios 217 e 218 estão sob seleção positiva para o grupo neotropical, mas não no grupo africano, o contrário não foi observado. Os ciclídeos neotropicais apresentaram 38 sítios sob seleção exclusivos do grupo, enquanto os ciclídeos africanos apresentaram 22, uma diferença de mais de 70%. Ainda, os ciclídeos neotropicais apresentaram 10 sítios sob seleção positiva, estimado em pelo menos um dos testes utilizados, enquanto os ciclídeos africanos apresentaram 8; destes, os dois grupos compartilham somente dois sítios sob seleção positiva. As estimativas do λ_{\max} do comprimento de onda de luz para esse pigmento visual, de acordo com os polimorfismos observados, são apresentadas no Apêndice A.

É particularmente interessante a seleção positiva para os sítios 217 e 218 para os ciclídeos neotropicais e negativa para os ciclídeos africanos. Para o sítio 217 o grupo neotropical apresenta as variações 217^{Gly}, 217^{Ala} e 217^{Ser}, enquanto o grupo africano apresenta também, além dessas variações, 217^{Thr}. A maioria dos ciclídeos neotropicais apresenta 217^{Ser}, e os africanos, 217^{Ala}. Para o sítio 218 as duas variações observadas, em ambos os grupos, foram 218^{Val} e 218^{Ile}, porém a maioria das espécies neotropicais apresentam 218^{Val}, enquanto as espécies africanas apresentam 218^{Ile}.

2.4 DISCUSSÃO

O fragmento codificador parcial do gene *LWS* suportou a monofilia dos clados de ciclídeos Neotropicais e Africanos, e o mesmo foi observado para o gene *RHI* (López-Fernández et al., 2010; Schott et al., 2014), porém não houve suporte do gene *LWS* para os clados das tribos Neotropicais. Fabrin et al. (2017) também demonstraram a monofilia dos clados Neotropical e Africano anteriormente, apesar disso, não consideraram todos os sítios-chave para estimar o λ_{\max} das espécies amostradas, utilizando fragmentos parciais que abrangeram do éxon 2 ao 4, com um conjunto de espécies Neotropicais diferentes das utilizadas neste estudo. Terai et al. (2002) e Seehausen et al. (2008) também utilizaram o fragmento parcial do gene *LWS* que compreende do éxon 2 ao 5 para caracterizar as diferenças genéticas desse gene entre espécies de ciclídeos Africanos do lago Victoria e inferir a importância deste gene para a especiação desse grupo, encontrando uma alta variação interespecífica desse gene, assim como variação intraespecífica, respectivamente.

Neste estudo, foi possível a estimação do λ_{\max} da proteína opsina *LWS*, como feito em trabalhos anteriores (Ward et al., 2008; Watson et al., 2011). Ao serem estimados os λ_{\max} das espécies Neotropicais, a maioria apresentou a estimativa de comprimento de absorção de 560 nm, enquanto a maioria das espécies africanas apresentou a estimativa de comprimento de absorção de 553 nm. Essas diferenças possivelmente são importantes para a adaptação a ambientes com diferentes luminosidades e até mesmo para a especiação de ciclídeos (Carleton et al., 2016). Diferente alelos do gene *LWS* em fêmeas de ciclídeos podem, inclusive, ser relacionados à coloração dos machos, uma vez que tenham significado reprodutivo (Miyagi et al., 2012). Além disso, os códons sob seleção divergiram ao serem comparados os dois grupos.

A seleção divergente entre os ciclídeos Neotropicais e Africanos já foi observada para os genes *RHI* e *LWS* (Schott et al., 2014; Fabrin et al., 2017). Os resultados obtidos foram parecidos, porém o sítio-chave 164 foi indicado como estando sob seleção positiva para o grupo Neotropical. Anteriormente este sítio não havia sido inferido como estando sob seleção para este grupo, somente para os ciclídeos Africanos (Fabrin et al., 2017). Este sítio é considerado importante devido a modificação do aminoácido Serina para Alanina acarretar em uma redução de 7 nm no espectro de luz absorvido para essa proteína (Asenjo et al., 1994; Yokoyama, 2008). Todos os testes estimaram esse códon como estando sob seleção positiva em ambos os grupos, indicando que a taxa de substituição não-sinônima foi significativamente superior à taxa de substituição sinônima. Escobar-Camacho et al. (2017) também demonstraram a importância de ambientes da bacia Amazônica na evolução dos pigmentos visuais das espécies *P. scalare*, *S. discus* e *A. ocellatus*, no qual a substituição S164A do gene *LWS* foi observada, mas não foi realizado testes de seleção.

Outro sítio-chave estimado como estando sob seleção pelos modelos FEL e M8 BEB foi o 261, mas sob seleção negativa/purificadora. Assim, o inverso ocorre, e a taxa de substituição sinônima é superior à taxa de substituição não-sinônima. Este sítio pode acarretar em uma redução de 10 nm no espectro de luz absorvido pela proteína opsina *LWS* (Yokoyama, 2008). Apesar de não terem sido detectados indícios de seleção nos outros sítios-chave (181, 269 e 292), foi detectada seleção negativa/purificadora nos sítios “vizinhos”, somente para o grupo Neotropical. Porém, não há dados na literatura sobre o significado desses sítios para a estrutura da proteína opsina *LWS* em ciclídeos neotropicais. Assim como ocorre para os sítios 217 e 218, que estão sob seleção positiva para o grupo neotropical e negativa para o grupo africano.

Härer et al. (2018) também analisaram sequências de DNA do gene *LWS* em ciclídeos neotropicais e estimaram 8 sítios de aminoácidos apresentando variações entre as espécies estudadas. Destes, 7 sítios abrangeram a mesma região utilizada neste estudo, dos quais 6 sítios também apresentaram variação. Além disso, estimaram, também, 3 sítios como estando sob seleção positiva (40, 45 e 217), dentre os quais o sítio 217 também foi identificado neste trabalho, indicando que apesar de ser um grupo de diferentes espécies, de outra localidade, este sítio também está sob seleção positiva. Apesar disso, Härer et al. (2018) não indicaram o sítio-chave 164 estando sob seleção positiva.

Além de a seleção ser divergente entre os grupos, os códons sob seleção positiva também divergiram entre eles. Neste sentido, devem ser consideradas as características inerentes a cada grupo delimitado nas análises. Uma vez que a quantidade de sítios sob seleção estimados para o grupo neotropical foi bastante superior em relação ao grupo africano, deve-se considerar que os ciclídeos dos grandes lagos africanos compreendem um grupo relativamente recente, tendo surgido entre 5 e 2 milhões de anos (Ma) atrás, e a diversidade de habitats aos quais estão submetidos abrangerem principalmente ambientes lacustres (Genner et al., 2007; Koblmüller et al., 2011). O grupo neotropical, por sua vez, pode ser considerado mais antigo, com idade variando entre 17 Ma e 70 Ma, dependendo do grupo e calibração considerada (Genner et al., 2007), o que significaria um tempo maior para que ocorresse a diversificação, e justificaria a quantidade elevada de sítios sob seleção negativa, uma vez que a quantidade de sítios sob seleção positiva é quase a mesma entre os dois grupos, e compartilhem somente dois sítios (39 e 164).

Ao comparar o gene *RHI* entre ciclídeos neotropicais da América Central e América do Sul, Hauser et al. (2017) observaram a seleção positiva divergente entre os

clados, e que os ciclídeos sul-americanos apresentaram número maior de sítios positivamente selecionados, possivelmente devido à grande quantidade de grupos e, além disso, não perceberam diferenças entre ambientes lênticos e lóticos, como previamente (Schott et al., 2014). Assim, deve-se levar em consideração que talvez as divergências observadas possam ser explicadas por especializações ecomorfológicas, que podem expandir os nichos visuais (Hauser et al., 2017), ao mesmo tempo que também poderiam limitá-los.

O gene *LWS* é um dos que apresentam maior variação dentre os outros genes dessa família (Terai et al., 2002). Mas o valor ω , estimado pelos modelos implementados na função *coldeml*, de forma geral foi superior para grupo de ciclídeos africanos ao ser comparado com os ciclídeos neotropicais, indicando que o grupo neotropical pode estar sob intensa seleção purificadora, considerando essa proteína. Isso faz sentido, considerando as diferenças observadas quanto à idade dos grupos neotropical e africano (Genner et al., 2007). Dessa forma, uma vez que a linhagem dos ciclídeos neotropicais é mais antiga, esse grupo estaria submetido por mais tempo a diversas pressões seletivas, dada a diversidade de habitats em se tratando de regiões neotropicais (Ribeiro et al., 2004). Isso poderia ter levado a uma maior diversificação do gene *LWS*, quanto à restrição da variação do mesmo. Assim, uma vez que determinadas mutações foram fixadas, o surgimento de novas variações que não contribuam para adaptação da espécie seria limitado, desde que continuem ocupando ambientes semelhantes que não exerçam novos tipos de pressões seletivas.

Não foram delimitados subgrupos para o grupo neotropical, mas *Crenicichla* apresentou tanto a variação S164, quanto A164 (Apêndice A), para diferentes espécies. Assim, como não foi observada seleção divergente entre grupos de ciclídeos americanos para o gene *RHI* quanto aos diferentes ambientes, e a seleção talvez esteja relacionada

principalmente às características inerentes às espécies (Hauser et al., 2017). Possivelmente essa variação dentro do gênero seja direcionada por restrições ecomorfológicas, uma vez que tanto *Crenicichla britskii* quanto *C. haroldoi* ocupam o mesmo tipo de ambiente e apresentam os mesmos hábitos alimentares (Graça & Pavanelli, 2007). O mesmo não foi observado para *Gymnogeophagus*, porém foram utilizadas menos espécies.

Ainda, Smith e Carleton (2010) também observaram variações para o gene *LWS* entre espécies congêneres, e hipotetizaram que talvez as mesmas permitam modificações espectrais em situações em que a expressão dessas proteínas possa ser restringida. Seehausen et al. (2008), por sua vez, demonstraram que a seleção divergente do gene *LWS* pode estar relacionada à especiação. Ambas as explicações poderiam justificar as variantes observadas para *Crenicichla*.

Em resumo, foi demonstrada a seleção divergente do gene *LWS* para o grupo de ciclídeos neotropicais e africanos, considerando todos os sítios-chave dessa proteína (Yokoyama, 2008), permitindo também estimativas do λ_{\max} . Além disso, a seleção positiva também foi divergente entre os grupos analisados, e um dos sítios-chave foi identificado como estando sob seleção positiva para ambos os grupos, apesar da intensa seleção purificadora para o grupo neotropical. Dessa forma, esse trabalho contribui com novas informações a respeito da evolução do sistema visual em ciclídeos neotropicais, e que podem contribuir para explicar a diversificação do grupo em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- Asenjo, A. B., J. Rim & D. D. Oprian, 1994. Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* 12: 1131–1138.
- Blankenship, E., A. Vahedi-Faridi & D. T. Lodowski, 2015. The high-resolution structure of activated opsin reveals a conserved solvent network in the transmembrane region essential for activation. *Structure* 23: 2358–2364.
- Bowmaker, J., 1995. The visual pigments of fish. *Progress in Retinal and Eye Research* 15: 1–31.
- Brawand, D., C. E. Wagner, Y. I. Li, M. Malinsky, I. Keller, S. Fan, O. Simakov, A. Y. Ng, Z. W. Lim, E. Bezault, J. Turner-Maier, J. Johnson, R. Alcazar, H. J. Noh, P. Russell, B. Aken, J. Alföldi, C. Amemiya, N. Azzouzi, J.-F. Baroiller, F. Barloy-Hubler, A. Berlin, R. Bloomquist, K. L. Carleton, M. a. Conte, H. D’Cotta, O. Eshel, L. Gaffney, F. Galibert, H. F. Gante, S. Gnerre, L. Greuter, R. Guyon, N. S. Haddad, W. Haerty, R. M. Harris, H. A. Hofmann, T. Hourlier, G. Hulata, D. B. Jaffe, M. Lara, A. P. Lee, I. MacCallum, S. Mwaiko, M. Nikaido, H. Nishihara, C. Ozouf-Costaz, D. J. Penman, D. Przybylski, M. Rakotomanga, S. C. P. Renn, F. J. Ribeiro, M. Ron, W. Salzburger, L. Sanchez-Pulido, M. E. Santos, S. Searle, T. Sharpe, R. Swofford, F. J. Tan, L. Williams, S. Young, S. Yin, N. Okada, T. D. Kocher, E. a. Miska, E. S. Lander, B. Venkatesh, R. D. Fernald, A. Meyer, C. P. Ponting, J. T. Streebman, K. Lindblad-Toh, O. Seehausen & F. Di Palma, 2014. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* 513: 375–381.
- Carleton, K., 2009. Cichlid fish visual systems: mechanisms of spectral tuning. *Integrative zoology* 4: 75–86.
- Carleton, K. L., B. E. Dalton, D. Escobar-Camacho & S. P. Nandamuri, 2016. Proximate and ultimate causes of variable visual sensitivities: Insights from cichlid fish radiations. *Genesis* 54: 299–325.
- Carleton, K. L., C. M. Hofmann, C. Klisz, Z. Patel, L. M. Chircus, L. H. Simenauer, N. Soodoo, R. C. Albertson & J. R. Ser, 2010. Genetic basis of differential opsin gene expression in cichlid fishes. *Journal of evolutionary biology* 23: 840–853.
- Delpont, W., A. F. Y. Poon, S. D. W. Frost & S. L. Kosakovsky Pond, 2010. Datamonkey 2010: A suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26: 2455–2457.

- Elmer, K. & C. Reggio, 2009. Pleistocene desiccation in East Africa bottlenecked but did not extirpate the adaptive radiation of Lake Victoria haplochromine cichlid fishes. *Proceedings of the ...*, <http://www.pnas.org/content/106/32/13404.short>.
- Escobar-Camacho, D., E. Ramos, C. Martins & K. L. Carleton, 2017. The opsin genes of amazonian cichlids. *Molecular Ecology* 26: 1343–1356.
- Fabrin, T. M. C., L. S. Gasques, S. M. A. P. Prioli & A. J. Prioli, 2016. Opsin genes: research perspectives with Neotropical cichlids (Perciformes: Cichlidae) and their relevance in floodplain studies. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 38: 241–246.
- Fabrin, T. M. C., S. M. A. P. Prioli & A. J. Prioli, 2017. Long-wavelength sensitive opsin (LWS) gene variability in neotropical cichlids (teleostei: Cichlidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89: 213–222.
- Genner, M. J., O. Seehausen, D. H. Lunt, D. A. Joyce, P. W. Shaw, G. R. Carvalho & G. F. Turner, 2007. Age of cichlids: New dates for ancient lake fish radiations. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1269–1282.
- Graça, W. J. & C. S. Pavanelli, 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. EDUEM, Maringá.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41: 95–98.
- Harer, A., Meyer, A., Torres-Dowdall, J. Convergent phenotypic evolution of the visual system via different molecular routes: How Neotropical cichlid fishes adapt to novel light environments. *Evolution Letters* 2: 341–354.
- Hauser, F. E., K. L. Ilves, R. K. Schott, G. M. Castiglione, H. López-Fernández & B. S. W. Chang, 2017. Accelerated evolution and functional divergence of the dim light visual pigment accompanies cichlid colonization of Central America. *Molecular Biology and Evolution* 37: 2650–2664.
- Hofmann, C. M., K. E. O’Quin, N. J. Marshall, T. W. Cronin, O. Seehausen & K. L. Carleton, 2009. The eyes have it: regulatory and structural changes both underlie cichlid visual pigment diversity. *PLoS biology* 7: e1000266.
- Koblmüller, S., W. Salzburger, B. Obermüller, E. Eigner, C. Sturmbauer & K. M. Sefc, 2011. Separated by sand, fused by dropping water: habitat barriers and fluctuating water levels steer the evolution of rock-dwelling cichlid populations in Lake Tanganyika. *Molecular ecology* 20: 2272–2290.
- Kosakovsky Pond, S. L. & S. D. W. Frost, 2005. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular*

Biology and Evolution 22: 1208–1222.

Kroger, R. H. H., 2003. Rearing in different photic and spectral environments changes the optomotor response to chromatic stimuli in the cichlid fish *Aequidens pulcher*. *Journal of Experimental Biology* 206: 1643–1648.

Kumar, S., G. Stecher & K. Tamura, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

Lanfear, R., B. Calcott, S. Y. W. Ho & S. Guindon, 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701.

Librado, P. & J. Rozas, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

López-Fernández, H., R. L. Honeycutt & K. O. Winemiller, 2005. Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). *Molecular phylogenetics and evolution* 34: 227–244.

López-Fernández, H., K. O. Winemiller & R. L. Honeycutt, 2010. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular phylogenetics and evolution* Elsevier Inc. 55: 1070–1086.

Miyagi, R., Y. Terai, M. Aibara, T. Sugawara, H. Imai, H. Tachida, S. I. Mzighani, T. Okitsu, A. Wada & N. Okada, 2012. Correlation between nuptial colors and visual sensitivities tuned by opsins leads to species richness in sympatric Lake Victoria cichlid fishes. *Molecular biology and evolution* 29: 3281–3296.

Murrell, B., S. Moola, A. Mabona, T. Weighill, D. Sheward, S. L. Kosakovsky Pond & K. Scheffler, 2013. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Molecular biology and evolution* 30: 1196–1205.

Musilová, Z., O. Rícan, K. Janko & J. Novák, 2008. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Molecular phylogenetics and evolution* 46: 659–672.

Nelson, J., 2006. *Fishes of the World*. Wiley, New Jersey.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto & M. Miyano, 2000. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289: 739–745.

Parry, J., K. Carleton, T. Spady & A. Carboo, 2005. Mix and match color vision: tuning spectral sensitivity by differential opsin gene expression in Lake Malawi cichlids.

Current Biology 15: 1–6.

Ribeiro, R., D. A. Rocha & M. Thomaz, 2004. Variação temporal de fatores limnológicos em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (PR / MS – Brasil). 261–271.

Rosenthal, A., O. Coutelle & M. Craxton, 1993. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. Nucleic acids research 21: 173–174.

Schott, R. K., S. P. Refvik, F. E. Hauser, H. López-Fernández & B. S. W. Chang, 2014. Divergent positive selection in rhodopsin from lake and riverine cichlid fishes. Molecular biology and evolution 31: 1149–1165.

Schwanzara, S., 1967. The visual pigments of freshwater fishes. Vision research 7: 121–148.

Seehausen, O., Y. Terai, I. S. Magalhaes, K. L. Carleton, H. D. J. Mrosso, R. Miyagi, I. van der Sluijs, M. V Schneider, M. E. Maan, H. Tachida, H. Imai & N. Okada, 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. Nature 455: 620–626.

Smith, A. R. & K. L. Carleton, 2010. Allelic variation in Malawi cichlid opsins: a tale of two genera. Journal of molecular evolution 70: 593–604.

Smith, A. R., L. D'Annunzio, A. E. Smith, A. Sharma, C. M. Hofmann, N. J. Marshall & K. L. Carleton, 2011. Intraspecific cone opsin expression variation in the cichlids of Lake Malawi. Molecular ecology 20: 299–310.

Spady, T. C., O. Seehausen, E. R. Loew, R. C. Jordan, T. D. Kocher, & K. L. Carleton, 2005. Adaptive molecular evolution in the opsin genes of rapidly speciating cichlid species. Molecular biology and evolution 22: 1412–1422.

Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30: 1312–1313.

Stenkamp, R. E., S. Filipek, C. A. G. G. Driessen, D. C. Teller & K. Palczewski, 2002. Crystal structure of rhodopsin: A template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1565: 168–182.

Teller, D. C., T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski & R. E. Stenkamp, 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Biochemistry 40: 7761–7772.

Terai, Y., W. E. Mayer, J. Klein, H. Tichy & N. Okada, 2002. The effect of selection on a long wavelength-sensitive (*LWS*) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:

15501–15506.

Terakita, A., 2005. The opsins. *Genome Biology* 6: 213.

Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

Trezise, A. & S. Collin, 2005. Opsins: evolution in waiting. *Current biology* 15: 794–796.

Ward, M. N., A. M. Churcher, K. J. Dick, C. R. J. Laver, G. L. Owens, M. D. Polack, P. R. Ward, F. Breden & J. S. Taylor, 2008. The molecular basis of color vision in colorful fish: four long wave-sensitive (*LWS*) opsins in guppies (*Poecilia reticulata*) are defined by amino acid substitutions at key functional sites. *BMC evolutionary biology* 8: 210.

Watson, C. T., S. M. Gray, M. Hoffmann, K. P. Lubieniecki, J. B. Joy, B. A. Sandkam, D. Weigel, E. Loew, C. Dreyer, W. S. Davidson & F. Breden, 2011. Gene duplication and divergence of long wavelength-sensitive opsin genes in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Journal of molecular evolution* 72: 240–252.

Weadick, C. J., E. R. Loew, F. H. Rodd & B. S. W. Chang, 2012. Visual pigment molecular evolution in the Trinidadian pike cichlid (*Crenicichla frenata*): a less colorful world for neotropical cichlids?. *Molecular biology and evolution* 29: 3045–3060.

Willis, S. C., M. S. Nunes, C. G. Montaña, I. P. Farias & N. R. Lovejoy, 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 44: 291–307.

Xu, B. & Z. Yang, 2013. PamlX: A graphical user interface for PAML. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2723–2724.

Yang, Z., 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586–1591.

Yokoyama, S., 2008. Evolution of dim-light and color vision pigments. *Annual review of genomics and human genetics* 9: 259–282.

APÊNDICE A – Estimativas do λ_{\max} (nm) das espécies ciclídeos estudadas.

Grupo	Referência	GenBank	Espécie	Sítios chave ¹					Estimativa λ_{\max} (nm)	
				1 6 4	1 8 1	2 6 1	2 6 9	2 A		
Neotropicais	Astronotinae	Este trabalho	-	<i>A. ocellatus</i>	S	H	Y	T	A	560
	Astronotinae	Escobar-Camacho et al. (2016)	KX382916	<i>A. ocellatus</i>	S	H	Y	T	A	560
	Cichlasomatinae	Escobar-Camacho et al. (2016)	KX382918	<i>P. scalare</i>	S	H	Y	T	A	560
	Cichlasomatinae	Escobar-Camacho et al. (2016)	KX382920	<i>S. discus</i>	A	H	Y	T	A	553
	Cichlasomatinae	Este trabalho	-	<i>C. pusillum</i>	S	H	Y	T	A	560
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>C. britskii</i>	S	H	Y	T	A	560
	Geophaginae	Weadick et al. (2012)	JN990732	<i>C. frenata</i>	S	H	Y	T	A	560
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>C. haroldoi</i>	A	H	Y	T	A	553
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>C. niederleini</i>	A	H	Y	T	A	553
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>Crenicichla</i> sp.	A	H	?	T	A	553/-
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>A. commbrae</i>	A	H	Y	T	A	553
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>G. brasiliensis</i>	A	H	Y	T	A	553
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>G. gymnogenys</i>	S	H	Y	T	A	560
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>G. labiatus</i>	S	H	Y	T	A	560
	Geophaginae	Este trabalho	-	<i>S. pappaterra</i>	S	H	Y	T	A	560
Africanos	Pseudocrenilabrinae	Halstenberg et al. (2005)	AY660540	<i>A. burtoni</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780517	<i>A. hueseri</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780514	<i>C. borleyi</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780521	<i>C. afra</i>	A	H	F	T	A	543
	Pseudocrenilabrinae	Miyagi et al. (2012)	AB667150	<i>H. fischeri</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Miyagi et al. (2012)	AB667117	<i>H. sp. macula</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Carleton e Kocher (2001)	AF247127	<i>L. fuelleborni</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780515	<i>L. chisumulae</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780519	<i>L. parvidens</i>	S	H	Y	T	A	560
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780522	<i>M. lateristriga</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780518	<i>M. auratus</i>	S	H	Y	T	A	560
	Pseudocrenilabrinae	Carleton e Kocher (2001)	AF247126	<i>M. zebra</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780513	<i>N. brichardi</i>	S	H	Y	T	A	560
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780512	<i>O. ventralis</i>	S	H	Y	T	A	560
	Pseudocrenilabrinae	Miyagi et al. (2012)	AB667135	<i>P. degeni</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Carleton et al. (2005)	AY673688	<i>P. nyererei</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Carleton et al. (2005)	AY673689	<i>P. pundamilia</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780523	<i>S. modestus</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780516	<i>T. duboisi</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Spady et al. (2005)	AY780520	<i>T. maculatus</i>	A	H	Y	T	A	553
	Pseudocrenilabrinae	Miyagi et al. (2012)	AB667126	<i>Y. pyrrhocephalus</i>	A	H	Y	T	A	553

¹Alinhado de acordo com o gene rhodopsin bovino; para o LWS considerar: 180, 197, 277, 285 e 308, respectivamente. Estimativas em nm das mutações de acordo com o revisado por Yokoyama (2008).

3 ATEMPORALIDADE DO GENE *LWS* EM CICLÍDEOS NEOTROPICAIS

RESUMO

Cichlidae compreende peixes que desempenham um importante papel em estudos evolutivos, e o grupo neotropical tem se tornado objetivo de estudos recentes envolvendo análises de genes da família opsina, que expressam proteínas relacionadas aos diferentes pigmentos visuais. Dentre esses genes, o gene responsável por absorver os comprimentos longos de ondas de luz (*Long-wavelength sensitive – LWS*) é um dos mais estudados. O objetivo deste estudo foi comparar as taxas de substituição estimadas para o gene *LWS* em diferentes grupos de ciclídeos neotropicais e correlacionar a variação do gene mitocondrial da subunidade I da Citocromo c oxidase (*COI*) e *LWS* utilizando distâncias patrísticas. As análises consideraram as correlações entre as distâncias patrísticas e taxas de substituição estimadas. Foram obtidas sequências parciais dos genes *COI* e *LWS*. Não foi observada correlação entre os dois genes, e considerando estimativas prévias de tempo de divergência para o grupo neotropical, foram observadas diferentes taxas de substituição para a sequência codificadora parcial do gene *LWS*. Neste sentido, a variação da região codificadora do gene *LWS* parece ser limitada por restrições ecológicas e maior em clados que apresentam altas taxas de diversificação, considerando as diferenças ecológicas e morfológicas que os grupos possam apresentar. Por fim, os resultados indicam uma possível inconsistência temporal das mudanças que ocorrem na sequência codificadora do gene *LWS* em espécies de ciclídeos neotropicais, e conseqüentemente a relevância desse gene para a diversificação do grupo neotropical.

Palavras-chave: Cichlidae; pigmentos visuais; sistema visual; *COI*.

3 TIMELESSNESS OF THE *LWS* GENE IN NEOTROPICAL CICHLIDS

ABSTRACT

Cichlidae comprehends a group of fish that plays an important role in evolutionary studies, and the Neotropical group has been objective of recent studies involving molecular analysis of opsin genes family, which express proteins related to the different visual pigments. Among these genes, the long-wavelength sensitive (*LWS*) gene is responsible by the absorption of the long-wavelength spectrum of light, which is one of the most studied opsin genes. The objective of this study was to compare substitution rates estimated to the *LWS* gene in different Neotropical cichlids groups and to correlate the variation of the Subunit I of the Cytochrome c Oxidase (*COI*) and *LWS* using patristic distances. The analysis considered the correlation of patristic distances and substitution rates. There were obtained partial sequences of the nuclear *LWS* gene and the mitochondrial *COI* gene. There was no correlation between the two genes and considering the divergence time estimated previously were observed different substitution rates of the partial codifying *LWS* gene. In this way, the variation of the *LWS* gene seems to be limited by ecological restrictions and increased in a clade which presents high diversification, considering the ecological and morphological differences among the groups. Finally, our data indicate the temporal inconsistency of the codifying sequences of the *LWS* gene in Neotropical cichlids species of our study and the possible relevance in diversification of this group.

Keywords: Cichlidae; visual pigments; visual system, *COI*.

1 3.1 INTRODUÇÃO

2

3 Cichlidae desempenha um papel importante para estudos evolutivos utilizando
4 ferramentas moleculares, principalmente os ciclídeos africanos (Shaw et al. 2000;
5 Schwarzer et al. 2009; Baldo et al. 2011). Ciclídeos são peixes que apresentam grande
6 diversidade comportamental e morfológica (Nelson 2006; Burress 2014), e constituem
7 um modelo para análises moleculares de genes de importância ecológica, realizados
8 principalmente nos grandes lagos africanos (Seehausen et al. 2008; Smith et al. 2012b,
9 a). Além disso, os ciclídeos neotropicais têm começado a ser objetivo, também, de
10 estudos recentes que envolvem dados e análises moleculares de genes responsáveis por
11 expressar pigmentos visuais (Fabrín et al. 2017; Torres-Dowdall et al. 2017; Escobar-
12 Camacho et al. 2017; Härer et al. 2018).

13 O grupo de genes nucleares responsáveis por expressar os pigmentos visuais em
14 vertebrados faz parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (Bowmaker
15 1995), sendo a família opsina uma das que a compõe (Trezise e Collin 2005). Esses
16 genes são responsáveis por expressar pigmentos visuais que se ligam a cromóforos
17 retiniais, aldeídos de vitamina A, e são responsáveis por absorver determinados
18 comprimentos de onda de luz (Bowmaker 1995; Trezise e Collin 2005). Há, ainda, uma
19 divisão quanto às opsinas *cone* e *rod* opsinas, o primeiro grupo sendo responsável por
20 expressar pigmentos que absorverão as cores do espectro de onda de luz, do ultravioleta
21 ao vermelho, e o segundo, pela visão de baixa luminosidade (Spady et al. 2006; Nagai
22 et al. 2011).

23 Dentre os principais genes estudados dessa família, encontra-se o que expressa
24 os pigmentos visuais responsáveis por absorverem comprimentos longos de onda de luz
25 (*Long-Wavelength Sensitive, LWS*), com a capacidade de absorção de comprimento

26 entre 510 nm e 560 nm, variando de acordo com as substituições nucleotídicas que a
27 sequência de DNA do gene possa apresentar (Yokoyama 2008). Esse gene é foco de
28 vários estudos, por ser um dos principais genes da família opsina sob seleção (Terai et
29 al. 2002), além de sua variação poder ser relacionada também a alterações
30 comportamentais em espécies de ciclídeos (Seehausen et al. 2008; Miyagi et al. 2012).

31 O gene *LWS* também foi testado como marcador molecular para estimar relações
32 de parentesco entre ciclídeos Neotropicais, apresentando congruência entre as
33 topologias de trabalhos filogenéticos anteriores (Fabrin et al. 2015). Outro marcador
34 molecular utilizado para estimar relações filogenéticas em peixes neotropicais é o gene
35 mitocondrial da Subunidade I da Citocromo c Oxidase (*COI*) (Pereira et al. 2013). O
36 gene *COI*, além de ser útil para reconstrução de relações evolutivas, também possui uma
37 taxa constante de variação, permitindo inferências em relação às escalas temporais
38 (Bermingham et al. 1997). Dessa maneira, a verificação da variação obtida entre os
39 marcadores moleculares *LWS* e *COI* seria útil, também, para estimar diferenças na
40 variação do gene *LWS* nas diferentes espécies ciclídeos neotropicais.

41 Considerando a importância da proteína *LWS*, é interessante o estudo da
42 variação da sequência de DNA deste gene em ciclídeos neotropicais em relação a outros
43 marcadores moleculares utilizados para inferência filogenética. Assim, uma das
44 maneiras de comparar as taxas evolutivas entre genes de uma mesma espécie é a
45 utilização de regressões entre distâncias patrísticas obtidas de árvores
46 gênicas/filogenéticas, possibilitando inferências a partir das diferenças obtidas entre as
47 taxas de substituição (Fourment e Gibbs 2006).

48 O objetivo deste estudo foi (1) o de comparar padrões de variação entre o gene
49 mitocondrial *COI* e do gene nuclear da família opsina *LWS* em espécies de ciclídeos
50 neotropicais utilizando distâncias patrísticas e (2) estimar taxas de substituição da

51 sequência codificadora parcial do gene *LWS* utilizando tempos de divergência estimados
52 previamente para diferentes grupos de ciclídeos neotropicais. A hipótese levantada é a
53 de que a variação das distâncias patrísticas do gene *LWS* não apresentará correlação
54 com a variação do gene *COI*, indicando uma possível limitação da variação deste gene
55 devido a algum tipo de pressão que o meio exerce sobre um gene que apresenta
56 importância ecológica e comportamental em peixes ciclídeos.

57

58 3.2 METODOLOGIA

59

60 3.2.1 Amostras, extração de DNA, PCR e sequenciamento

61 Fragmentos de tecido muscular de espécimes de 14 espécies de ciclídeos neotropicais
62 foram obtidas do museu de Ictiologia da Universidade Estadual de Maringá e coleção
63 ictiológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Os
64 espécimes foram obtidos nas bacias do Paraná (estado do Paraná), rio Jacuí (estado do
65 Rio Grande do Sul), rio Negro (estado do Tocantins), e rio Acaray (Paraguai). As
66 espécies, código de depósito das sequências no *Genbank*, e coleção de depósito dos
67 espécimes são apresentados na Tabela 1. As espécies africanas *Haplochromis fisheri*
68 (código de acesso ao *Genbank* AB667150 – *LWS*) e *H. burtoni* (código de acesso ao
69 *Genbank* EU888024 – *COI*, e NM_001286325 – *LWS*) foram utilizadas como grupo
70 externo. Os espécimes obtidos pelo Laboratório de Genética Molecular do Núcleo de
71 Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade
72 Estadual de Maringá foram coletados e eutanasiados seguindo o protocolo 123/2010,
73 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de
74 Maringá.

75

76 Tabela 1. Espécies utilizadas neste estudo, código de acesso das sequências obtidas no
 77 *GenBank*, coleções de depósito dos espécimes (quando disponível) e seus respectivos
 78 códigos.

Espécie	LWS	COI	Coleção	Depósito
<i>Cichla kelberi</i>	Este estudo.	KT382894	Lab. Genética NUPÉLIA (LWS)	-
<i>Cichla piquiti</i>	Este estudo.	Este estudo.	Lab. Genética NUPÉLIA	-
<i>Cichla monoculus</i>	Este estudo.	KT382888	Lab. Genética NUPÉLIA (LWS)	-
<i>Gymnogeophagus labiatus</i>	Este estudo.	Este estudo.	Col. Ictiológica PUC-RS	MCP212429
<i>Gymnogeophagus gymnogenys</i>	Este estudo.	Este estudo.	Col. Ictiológica PUC-RS	MCP21487
<i>Astronotus ocellatus</i>	Este estudo.	Este estudo.	Lab. Genética NUPÉLIA	PELD
<i>Satanoperca pappaterra</i>	Este estudo.	Este estudo.	Lab. Genética NUPÉLIA	PELD
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Este estudo.	KP218750	Col. Ictiológica PUC-RS	MCP31493
<i>Cichlasoma pusillum</i>	Este estudo.	Este estudo.	Col. Ictiológica NUPÉLIA	-
<i>Symphysodon discus</i>	KX382920	KU569029	-	-
<i>Apistogramma commbrae</i>	Este estudo.	Este estudo.	Col. Ictiológica NUPÉLIA	NUP13463
<i>Crenicichla niederleinii</i>	Este estudo.	Este estudo.	Col. Ictiológica NUPÉLIA	SFU5846
<i>Crenicichla iguassuensis</i>	Este estudo.	Este estudo.	Col. Ictiológica NUPÉLIA	T484018
<i>Crenicichla britski</i>	Este estudo.	Este estudo.	Lab. Genética NUPÉLIA	PELD
<i>Crenicichla haroldoi</i>	Este estudo.	JN988829	Lab. Genética NUPÉLIA (LWS)	PELD
<i>Pterophyllum scalare</i>	KX382918	NC_026535	-	-

79

80 O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o kit de extração Promega
 81 Wizard® Genomic DNA, seguindo as instruções do fabricante, e posteriormente foram
 82 armazenadas em freezer a -20°C e utilizadas para a amplificação dos genes utilizados
 83 neste estudo. Para a amplificação do gene mitocondrial COI foram utilizados os *primers*
 84 H7152 (5'-CACCTCAGG GTGTCCGAARAAYCARAA-3') e L6448-F2 (5'-
 85 TCGACTAATCATAAAGA TATCGGCAC-3'), descritos por Ivanova et al. (2007), e
 86 para a amplificação do gene nuclear LWS foram utilizados os *primers* LWS F1E1 (5'-
 87 GCGGTACCATG AAGATACAACAA-3') e R1E6 (5'- GGATACTT
 88 CAGAACCATCATC-3'), descritos por Weadick et al. (2012). Os programas de
 89 amplificação utilizados para os genes COI e LWS seguiram o proposto por Gasques et
 90 al. (2015) e Fabrin et al. (2015), respectivamente.

91 As reações em cadeia da polimerase (PCR) tiveram volume final de 25 µl (2,5 U
 92 de Taq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 µM de cada primer, 1,5 mM de
 93 MgCl₂, Tris-KCl, e água Milli-Q). Posteriormente os produtos amplificados foram
 94 purificados (Rosenthal et al. 1993) e sequenciados em sequenciador automático *Applied*
 95 *Biosystems* ABI 3700XL.

96

97 3.2.2 Análises genéticas

98 As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando os programas BioEdit (Hall
99 1999) e MEGA 6 (Tamura et al. 2013), considerando o algoritmo de alinhamento
100 Clustal W (Thompson et al. 1994), respectivamente. Para as análises de saturação e
101 sinal filogenético foi utilizado o programa DAMBE 5 (Xia 2013).

102 Para as reconstruções gênicas foi utilizado o método estatístico de máxima
103 verossimilhança, utilizando o programa RAxML (Stamatakis 2014), considerando o
104 algoritmo *rapid bootstrap* e 1000 reamostragens. O programa PartitionFinder (Lanfear
105 et al. 2012) foi utilizado para inferir as melhores subpartições e modelos de substituição
106 para o gene *COI* quanto às bases dos códons e também as melhores partições entre
107 íntrons e éxons para o gene *LWS*, considerando o critério de informação bayesiana
108 (BIC). O programa MEGA 6 também foi utilizado para o cálculo das distâncias
109 genéticas utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura 1980), seleção do
110 melhor modelo de substituição aminoacídica e reconstruções gênicas aminoacídicas dos
111 genes utilizados, considerando 1000 reamostragens de *bootstrap*.

112 A fim de estimar as taxas de substituição nucleotídica da sequência codificadora
113 do gene *LWS* a cada um milhão de anos, foram utilizadas estimativas de tempo de
114 divergência previamente estimadas para os diferentes grupos de ciclídeos Neotropicais
115 (Genner et al. 2007; López-Fernández et al. 2013; McMahan et al. 2013; Friedman et al.
116 2013). Posteriormente foi utilizada a função *baseml*, implementada no programa pamlX
117 (Xu e Yang 2013), para estimar a taxa de substituição nucleotídica da sequência
118 codificadora parcial do gene *LWS*.

119 Após as reconstruções gênicas de ambos os marcadores, o programa
120 PATRISTIC v1.0 (Fourment e Gibbs 2006) foi utilizado para analisar a regressão entre

121 as distâncias patrísticas obtidas a partir dos comprimentos dos ramos das árvores de
 122 máxima verossimilhança. Foram realizadas as seguintes combinações: *COI* (árvore
 123 gênica nucleotídica) vs. *COI* (árvore gênica aminoacídica); *COI* (árvore gênica
 124 nucleotídica) vs. *LWS* (árvore gênica nucleotídica, somente éxons); *COI* (árvore gênica
 125 aminoacídica) vs. *LWS* (árvore gênica aminoacídica); *COI* (árvore gênica nucleotídica)
 126 vs. *LWS* (árvore gênica nucleotídica; éxons + íntrons).

127

128 3.3 RESULTADOS

129

130 Foram obtidas 14 sequências do fragmento parcial do gene nuclear *LWS* (875 pb)
 131 abrangendo do éxon 2 ao éxon 4 e 11 sequências do fragmento parcial do gene
 132 mitocondrial *COI* (468 pb), totalizando 25 novas sequências, que foram utilizadas neste
 133 estudo. As proporções de bases dos fragmentos, resultados dos testes de saturação e os
 134 melhores modelos para as reconstruções são apresentados na Tabela 2.

135

136 Tabela 2. Testes de saturação e melhores modelos de substituição e partições para os
 137 marcadores estudados.

Locus	Proporção				Saturação ¹		PartitionFinder RAxML
	A	C	G	T	Iss	Iss.c	
COI	0,24	0,29	0,17	0,30	0,236	0,707	1 ^a ; 2 ^a ; 3 ^a (GTR + G)
LWS (e)	0,20	0,23	0,25	0,32	0,072	0,741	1 ^a + 2 ^a + 3 ^a (GTR + G)
LWS (e + i)	0,24	0,21	0,22	0,33	0,144	0,761	e2 + e3 + e4; i2 + i3 (GTR + G)

138 ¹ Iss < Iss.c corresponde a pouca saturação, segundo Xia et al. (2003), sendo útil para inferências
 139 filogenéticas. Obs.: e = éxons; i = íntrons.

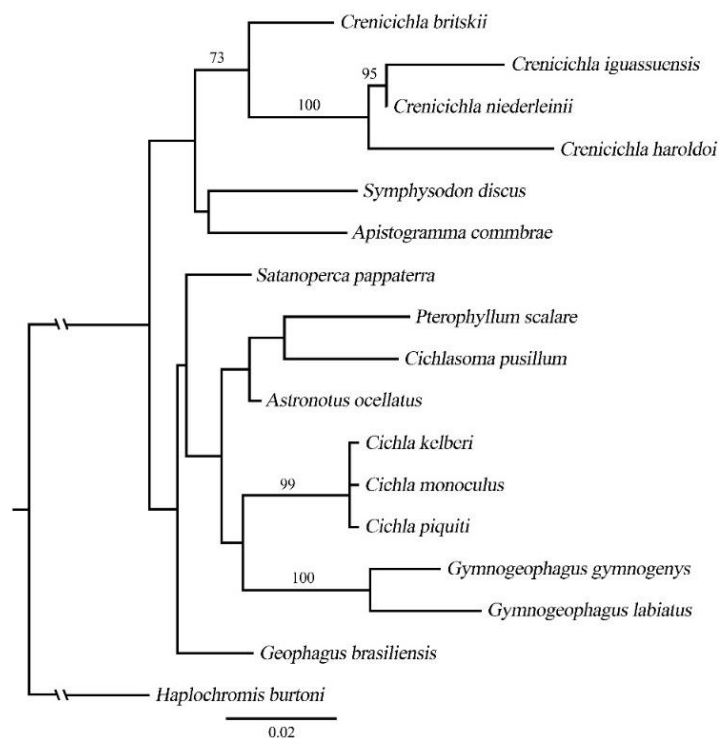
140

141 Os fragmentos sequenciados não apresentaram saturação, portanto foram
 142 utilizados para as reconstruções. As distâncias genéticas K2P estimadas para os
 143 fragmentos do gene *LWS* contendo somente os éxons variaram entre 0,3% e 10% para
 144 os ciclídeos neotropicais estudados, porém, considerando os fragmentos contendo os

145 íntrons as distâncias variaram entre 0,2% e 11%. As matrizes de distância são
 146 apresentadas nas Apêndices B e C. O gene mitocondrial *COI* apresentou variação da
 147 distância genética K2P entre 1% e 33% para as espécies de ciclídeos neotropicais
 148 estudadas (Apêndice D).

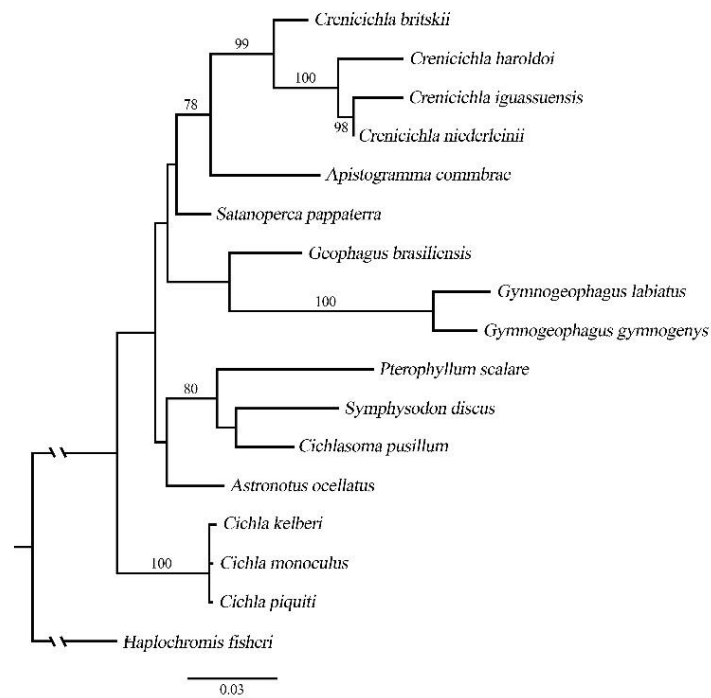
149 As árvores gênicas são apresentadas nas Figuras 1 e 2. Considerando somente os
 150 éxons, os ramos não apresentaram bons suportes (> 70) (Figura 1), o mesmo ocorrendo
 151 para a reconstrução considerando o fragmento incluindo os íntrons (Figura 2), apesar de
 152 apresentar mais ramos com altos valores de *bootstrap*. As diferentes reconstruções para
 153 o gene *LWS* apresentaram, também, diferentes topologias. Apesar disso, espécies do
 154 mesmo gênero foram agrupadas corretamente, além da espécie-especificidade dos
 155 fragmentos.

156



157

158 Figura 1. Árvore gênica de máxima verossimilhança utilizando o fragmento parcial do
 159 gene *LWS*, considerando somente os éxons (630 pb). Os suportes dos ramos
 160 correspondem às reamostragens de *bootstrap* > 70 .



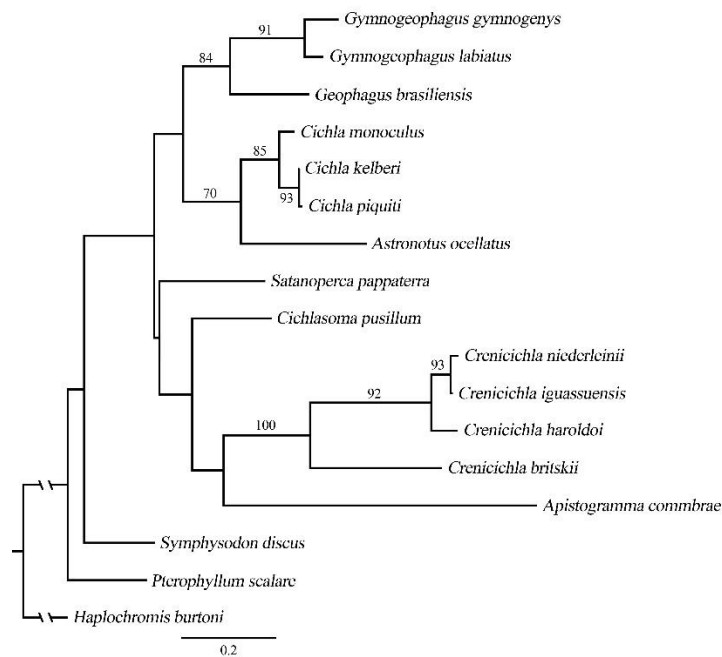
161

162 Figura 2. Árvore gênica de máxima verossimilhança utilizando o fragmento parcial do
 163 gene *LWS*, considerando éxons e íntrons (875 pb). Os suportes dos ramos correspondem
 164 às reamostragens de *bootstrap* > 70.

165

166 A topologia da reconstrução gênica (Figura 3) também divergiu em relação as
 167 outras duas topologias inferidas para o gene *LWS*, e apresentou baixos valores de
 168 *bootstrap*. Posteriormente, também foram obtidas árvores gênicas utilizando a
 169 sequência de aminoácidos dos fragmentos de DNA utilizados neste estudo (Apêndices E
 170 e F).

171



172

173 Figura 3. Árvore gênica de máxima verossimilhança utilizando o fragmento parcial do
 174 gene *COI* (468 pb). Os suportes dos ramos correspondem às reamostragens de *bootstrap*
 175 > 70.

176

177 O tempo de divergência dos ciclídeos neotropicais utilizadas neste estudo
 178 considerou o tempo estimado por Genner et al. (2007), McMahan et al. (2013),
 179 Friedman et al. (2013) (Tabela 3) e López-Fernández (2013), dependendo do grupo
 180 analisado. Como López-Fernández et al. (2013) apresentaram estimativas de tempo de
 181 divergência para todos os grupos na mesma árvore, os resultados baseados em suas
 182 inferências são apresentados em uma tabela separada (Tabela 4). Posteriormente, os
 183 tempos de divergência foram utilizados para estimar as taxas de substituição da
 184 sequência codificadora parcial do gene *LWS* (Tabelas 3 e 4).

185 Tabela 3. Taxas de substituição da sequência codificadora parcial do gene *LWS*
 186 considerando os tempos de divergência propostos por Genner et al. (2007), McMahan et
 187 al. (2013) e Friedman et al. 2013.
 188

Grupo	Idade (intervalos) ¹	Referência	Taxa de substituição ² (SE)
Subfamília Cichlinae	29,2 (25,5 - 34,8)	Friedman et al, (2013)	0,00108257 (0,019976)
	35,5 (33,9 - 39,3)	Genner et al, (2007)	0,00089045 (0,016417)
	63 (54 - 74)	McMahan et al, (2013)	0,00050177 (0,009224)
	70,6 (52,8 - 85)	Genner et al, (2007)	0,00044776 (0,008226)
Geophagini ³	21,3 (16,8 - 23)	Genner et al, (2007)	0,00150189 (0,016087)
	61 (40,2 - 80)	Genner et al, (2007)	0,00052444 (0,005595)
	52 (40 - 51)	McMahan et al, (2013)	0,00061520 (0,006568)

189 ¹ Idade em Ma (mínimo – máximo).

190 ² Taxas de substituição/Ma.

191 ³ *Satanoperca*, *Apistogramma*, *Geophagus*, *Gymnogeophagus*, *Crenicichla*.

192

193 Tabela 4. Taxas de substituição da sequência codificadora parcial do gene *LWS*
 194 considerando os tempos de divergência propostos por López-Fernández et al. (2013).
 195

Grupo	Idade (intervalos) ¹	Taxa de substituição ² (SE)
Subfamília Cichlinae	124,43 (103,6 - 145,76)	0,00025407 (0,004653)
<i>Astronotus</i> + <i>Cichlasomatini</i> + <i>Heroini</i> ³	112,36 (92,95 - 133,94)	0,00017841 (0,005477)
Geophagini ⁴	106,82 (88,54 - 125,62)	0,00029949 (0,003187)
Geophagines ⁵	78,67 (63,99 - 95,28)	0,00034207 (0,005602)
<i>Crenicichla</i>	65,38 (50,19 - 79,97)	0,00039613 (0,006082)
<i>Cichla</i>	17,38 (9,19 - 27,49)	0,00009206 (0,075714)

196 ¹ Idade em Ma (mínimo – máximo);

197 ² Taxa de substituição/Ma

198 ³ *Astronotus*, *Cichlasoma*, *Pterophyllum*.

199 ⁴ *Satanoperca*, *Apistogramma*, *Geophagus*, *Gymnogeophagus*, *Crenicichla*.

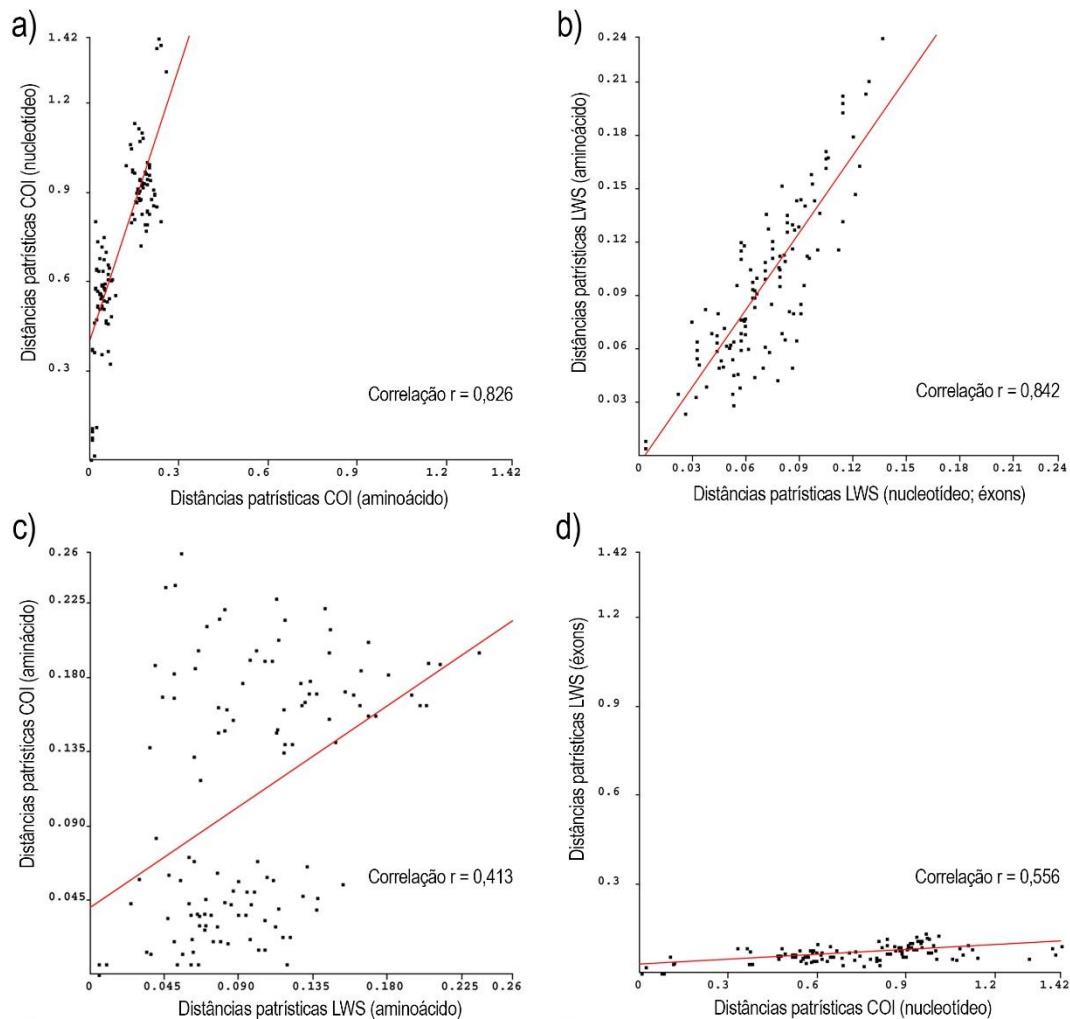
200 ⁵ *Geophagus*, *Gymnogeophagus*.

201

202 Independentemente do tempo de divergência estimado, Geophagini e
 203 Geophagine apresentaram altas taxas de substituição quando comparado com a média
 204 obtida para a subfamília Cichlinae; e quando comparados *Cichla* e *Crenicichla* (Tabela
 205 4), o segundo gênero apresenta uma taxa de substituição maior. Aparentemente, não há
 206 relação entre tempo de divergência e taxa de substituição, considerando os dados desse
 207 estudo, assim como quando são comparados os grupos *Astronotus* + *Cichlasomatini* +
 208 *Heroini* e Geophagini, no qual a taxa de substituição média da sequência codificadora
 209 parcial do gene *LWS* é menor no primeiro grupo, apesar de ele ser mais antigo (112,36
 210 Ma) quando comparado com o segundo (106,82 Ma).

211 As distâncias patrísticas utilizadas nas regressões lineares para estimar a
 212 correlação da variação entre os diferentes fragmentos de DNA estudados, foram obtidas
 213 partir das árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (Figura 4).

214



215

216 Figura 4. Relações das distâncias patrísticas obtidas a partir das reconstruções de
 217 máxima verossimilhança para as espécies de ciclídeos neotropicais estudadas, utilizando
 218 fragmentos parciais dos genes *COI* e *LWS*. Obs.: a) Distâncias patrísticas obtidas da
 219 árvore gênica *COI* (nucleotídeo) vs. *COI* (aminoácido); b) Distâncias patrísticas obtidas
 220 da árvore gênica *LWS* (aminoácido) vs. *LWS* (nucleotídeo); c) Distâncias patrísticas
 221 obtidas da árvore gênica *COI* (aminoácido) vs. *LWS* (aminoácido); d) Distâncias
 222 patrísticas obtidas da árvore gênica *LWS* (nucleotídeo; éxons) vs. *COI* (nucleotídeo).

223

224 Altos valores de correlação foram observados para as regressões obtidas entre as
 225 distâncias patrísticas aminoacídicas e nucleotídicas obtidas das árvores gênicas dos

226 genes *COI* e *LWS* (éxons) (Figuras 4a e 4b, respectivamente). O contrário foi observado
227 nas regressões entre as distâncias patrísticas aminoacídicas *COI* vs. *LWS* (Figura 4c) e
228 distâncias patrísticas nucleotídicas *COI* vs. *LWS* (Figura 4d).

229

230 3.4 DISCUSSÃO

231

232 Esta é a primeira tentativa de estimar taxas de substituição entre diferentes grupos de
233 ciclídeos considerando a sequência codificadora parcial gene *LWS*. Diferentes genes
234 apresentam diferentes taxas de substituição nucleotídica (King e Jukes 1969).
235 Dependendo do gene analisado, pode ser considerada uma taxa de substituição
236 constante, que pode implicar numa relação temporal ao serem realizadas inferências
237 filogenéticas, sendo útil para o cálculo de relógios moleculares e estimativas de tempo
238 de divergência, como ocorre com o gene mitocondrial *COI*, ao ser considerado o grupo
239 de peixes ósseos (Bermingham et al. 1997; Bromham e Penny 2003). Por outro lado,
240 outros genes, que estão relacionados à expressão de proteínas que impliquem em
241 características comportamentais do organismo e de interesse ecológico, como o gene
242 *LWS* (Spady et al. 2005; Seehausen et al. 2008; Smith et al. 2012a), podem não
243 apresentar taxa de substituição constante e relacionar-se a uma escala temporal (Trezise
244 e Collin 2005; Spady et al. 2005).

245 Além do significado ecológico do gene nuclear *LWS*, a avaliação do trecho
246 utilizado neste estudo, ao serem incluídos os íntrons, foi útil, também, para a inferência
247 filogenética de ciclídeos neotropicais, como demonstrado por Fabrin et al. (2015),
248 mantendo a mesma topologia estimada em uma filogenia multi-locus do grupo (López-
249 Fernández et al. 2010). Apesar disso, utilizando somente a sequência codificadora desse

250 gene a topologia é modificada, sendo ineficaz para estabelecer relações de parentesco e
251 reforçando sua relevância quanto à evolução deste gene no grupo.

252 Ao ser relacionada a variação do gene mitocondrial *COI* e da sequência
253 codificadora do gene nuclear *LWS*, não foi possível estabelecer um padrão de correlação
254 entre eles, considerando as distâncias patrísticas obtidas a partir das inferências
255 filogenéticas de máxima verossimilhança (Figura 4d). Logo, uma vez que a correlação
256 de distâncias patrísticas é útil para comparação das taxas de mutação de diferentes genes
257 (Fourment e Gibbs 2006), e os resultados apontarem para um acúmulo maior de
258 mutações para a sequência parcial do gene mitocondrial *COI* ao ser comparado com a
259 sequência codificadora do gene nuclear *LWS*, há indícios da presença de pressões
260 seletivas as quais este gene poderia estar submetido, pois a correlação dessa variação
261 parece não seguir uma escala temporal ($r = 0,556$), não acompanhando
262 proporcionalmente a variação do gene mitocondrial *COI*.

263 O gene *COI* apresenta uma taxa constante de variação par-a-par por volta de
264 1,2% a cada um milhão de anos para peixes ósseos (Bermingham et al. 1997),
265 equivalendo à 0,6% de variação linhagem-específica. Porém, utilizando os tempos de
266 divergência estimados (Tabelas 3 e 4) para estimar a variação da sequência codificadora
267 parcial do gene *LWS*, foi possível observar diferentes taxas de substituição dependendo
268 do grupo de ciclídeos neotropicais analisados, variando entre 0,00009206 e 0,00150189
269 dependendo da calibração utilizada. Assim, considerando o tempo de divergência da
270 subfamília Cichlinae como proposto por Friedman et al. (2013), 29,2 Ma, e a taxa
271 constante de variação do gene *COI*, seria esperado uma relação linear se um gene segue
272 uma escala temporal, o que não foi observado (Figura 4d).

273 As estimativas do tempo de divergência dos diversos grupos de ciclídeos
274 neotropicais apresentam vários cenários possíveis dependendo do método de calibração

275 considerado para reconstruir a história evolutiva do grupo. Considerando a
276 fragmentação continental de Gondwana para estimar o tempo de divergência de
277 Cichlidae, a diversificação do grupo Neotropical teria ocorrido há 70,6 Ma (52,8; 85
278 Ma), e a diversificação de Geophagini teria ocorrido por volta de 61 Ma (40,2; 80 Ma)
279 atrás. Entretanto, considerando a calibração fóssil, a diversificação do grupo
280 Neotropical teria ocorrido há 35,5 Ma (33,9; 39,3 Ma), e a diversificação de
281 Geophagini há 21,3 Ma (16,8; 23 Ma) (Genner et al., 2007). Apesar disso, López-
282 Fernández et al. (2013) apresentaram diferentes idades para diversos grupos de ciclídeos
283 neotropicais (Tabela 4), assim como Friedman et al. (2013) e McMahan et al. (2013)
284 (Tabela 3).

285 Considerando as árvores de máxima verossimilhança para a sequência
286 codificadora do gene *LWS* e as estimativas prévias do tempo de divergência (Genner et
287 al. 2007; López-Fernández et al. 2013; McMahan et al. 2013; Friedman et al. 2013),
288 houve diferenças para as taxas de substituição nucleotídica dos diferentes grupos
289 analisados (Tabelas 3 e 4). Como López-Fernández et al. (2013) apresentaram
290 diferentes estimativas de tempo para todos os grupos de ciclídeos neotropicais em uma
291 mesma árvore, são discutidos os resultados obtidos a partir de suas estimativas. A taxa
292 de substituição média da sequência codificadora parcial do gene *LWS* foi de 0,02/Ma
293 considerando as espécies de Cichlinae deste estudo. Apesar disso, as taxas de
294 substituição estimadas para Geopagini foi 0,03/Ma, indicando uma taxa de substituição
295 maior. O mesmo foi observado quando os tempos de divergência inferidos por Genner
296 et al. (2007) são considerados (Tabela 3). Quando *Cichla* e *Crenicichla* são
297 comparados, *Cichla* apresenta uma taxa de substituição de 0,01/Ma e *Crenicichla*
298 apresenta uma taxa de substituição de 0,04/Ma (Tabela 4).

299 Duas hipóteses podem ser levantadas a respeito das diferenças observadas entre
300 as taxas de substituição das sequências codificadoras parciais do gene *LWS* estimadas
301 para os diferentes clados. Primeiro, as espécies utilizadas neste estudo pertencentes à
302 Geophagini, apresentam diferenças ecológicas e morfológicas proeminentes entre elas,
303 como especialização trófica (Yafe et al. 2002; López-Fernández et al. 2005; Bastos et al.
304 2011). Por exemplo, *Crenicichla britskii* apresenta uma dieta generalista insetívora,
305 enquanto *Crenicichla iguassuensis* apresenta uma dieta onívora, mas se alimenta
306 principalmente de peixes (Gibran et al. 2001; Hahn e Fugi 2008), além disso,
307 *Crenicichla* compreende o gênero de maior diversificação dentro do grupo de ciclídeos
308 neotropicais (Kullander et al. 2009).

309 Assim, enquanto o tamanho do grupo e as diferenças inerentes a cada espécie,
310 elas poderiam estar submetidas a diversas pressões seletivas, o que poderia acarretar
311 numa maior taxa de mutação e conseqüente seleção, alterando as propriedades
312 espectrais de absorção de luz dessas proteínas por modificações nas sequências
313 codificadoras (Schott et al. 2014; Escobar-Camacho et al. 2017) . Essa hipótese faz
314 sentido à luz do que foi observado para *Cichla*, que apresentou uma taxa de variação
315 bastante inferior. Isso se daria ao fato de que as espécies desse gênero são bastante
316 parecidas e apresentam, possivelmente, restrições funcionais ecológicas, ocupando
317 sempre o papel de predador ao ser inserido numa nova comunidade (Kullander e
318 Ferreira 2006). Assim, essa taxa seria alterada somente se novas variações que
319 comprometessem a propriedade espectral da proteína surgissem (Yokoyama 2008) e,
320 além disso, fossem posteriormente selecionadas.

321 Segundo, Geophagini apresenta uma alta taxa evolutiva quando comparada com
322 outras subfamílias de ciclídeos neotropicais (Farias et al. 1999), assim a elevada taxa de
323 substituição para a sequência codificadora parcial do gene *LWS* corresponderia a uma

324 característica inerente ao grupo. Dessa maneira, a hipótese mais bem suportada pelos
325 dados obtidos seria a primeira, de que a variação do gene *LWS* seria limitada por
326 restrições ecológicas e aumentada pela diversificação observada nos clados, dada as
327 diferenças ecológicas e morfológicas.

328 Finalmente, estes dados apontam a aparente atemporalidade da variação da
329 sequência codificadora parcial do gene nuclear *LWS* em ciclídeos neotropicais. Tal fato
330 contribui para futuros estudos evolutivos, indicando a possível importância dos genes da
331 família opsina na evolução do sistema visual e na diversificação de espécies do grupo,
332 como apontado em outros trabalhos (Seehausen et al. 2008; Brawand et al. 2014).

333 **REFERÊNCIAS**

334

335 Baldo L, Santos ME, Salzburger W (2011) Comparative transcriptomics of Eastern
336 African cichlid fishes shows signs of positive selection and a large contribution of
337 untranslated regions to genetic diversity. *Genome Biol Evol* 3:443–55. doi:
338 10.1093/gbe/evr047

339 Bastos RF, Condini MV, Varela AS, Garcia AM (2011) Diet and food consumption of
340 the pearl cichlid *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae): Relationships with
341 gender and sexual maturity. *Neotrop Ichthyol* 9:825–830. doi: 10.1590/S1679-
342 62252011005000049

343 Bermingham E, McCafferty SS, Martin AP (1997) Fish Biogeography and Molecular
344 Clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. In: *Molecular Systematics of*
345 *Fishes*. Elsevier, pp 113–128.

346 Bowmaker J (1995) The visual pigments of fish. *Prog Retin Eye Res* 15:1–31. doi:
347 1350-9462(95)00001-1

348 Brawand D, Wagner CE, Li YI et al (2014) The genomic substrate for adaptive
349 radiation in African cichlid fish. *Nature* 513:375–381 . doi: 10.1038/nature13726

350 Bromham L, Penny D (2003) The modern molecular clock. *Nat Rev Genet* 4:216–224.
351 doi: 10.1038/nrg1020

352 Burress, E. D. (2014) Cichlid fishes as models of ecological diversification: patterns,
353 mechanisms, and consequences. *Hydrobiologia* 748: 7–27.

354 Escobar-Camacho D, Ramos E, Martins C, Carleton KL (2017) The opsin genes of
355 amazonian cichlids. *Mol Ecol* 26:1343–1356. doi: 10.1111/mec.13957

356 Fabrin TMC, Gasques LS, Prioli SMAP, Prioli AJ (2015) A novel molecular marker for
357 the study of Neotropical cichlid phylogeny. *Genet Mol Res* 14:18131–18139. doi:
358 10.4238/2015.December.22.39

359 Fabrin TMC, Prioli SMAP, Prioli AJ (2017) Long-wavelength sensitive opsin (LWS)
360 gene variability in neotropical cichlids (teleostei: Cichlidae). *An Acad Bras Cienc*
361 89:213–222. doi: 10.1590/0001-3765201720150692

362 Farias IP, Ortí G, Sampaio I, et al (1999) Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family
363 Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. *J*
364 *Mol Evol* 48:703–711. doi: 10.1007/PL00006514

365 Fourment M, Gibbs MJ (2006) PATRISTIC: a program for calculating patristic
366 distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol Biol*

- 367 6:1. doi: 10.1186/1471-2148-6-1
- 368 Friedman, M., B. P. Keck, A. Dornburg, R. I. Eytan, C. H. Martin, C. D. Hulsey, P. C.
369 Wainwright, Near, T. J. (2013) Molecular and fossil evidence place the origin of cichlid
370 fishes long after Gondwanan rifting. *Proc R Soc* 280: 20131733–20131733.
- 371 Gasques LS, Fabrin TMC, Prioli SMAP, Prioli AJ (2015) Prospecting of molecular
372 markers for species of the *Cichla* genus. *Acta Sci Biol Sci* 37:455–462.
- 373 Genner MJ, Seehausen O, Lunt DH, et al (2007) Age of cichlids: new dates for ancient
374 lake fish radiations. *Mol Biol Evol* 24:1269–82. doi: 10.1093/molbev/msm050
- 375 Gibran FZ, Ferreira KM, Castro RMC (2001) Diet of *Crenicichla britskii* (Perciformes:
376 Cichlidae) in a stream of Rio Aguapeí basin, Upper Rio Paraná system, southeastern
377 Brazil. *Biota Neotrop* 1:1–5. doi: BN01001122001
- 378 Hahn NS, Fugi R (2008) Environmental Changes, Habitat Modifications and Feeding
379 Ecology of Freshwater Fish. In: Cyrino JEP, Bureau DP, Kapoor BG (eds) *Feeding and*
380 *Digestive Functions of Fishes*, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, p 594.
- 381 Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
382 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
- 383 Härer, A., A. Meyer, Torres-Dowdall, J. (2018) Convergent phenotypic evolution of the
384 visual system via different molecular routes: How Neotropical cichlid fishes adapt to
385 novel light environments. *Evolution Letters* 2: 341–354. doi: 10.1002/evl3.71.
- 386 Ivanova N V., Zemplak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails
387 for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes* 7:544–548. doi: 10.1111/j.1471-
388 8286.2007.01748.x
- 389 Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base
390 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–
391 120.
- 392 King JL, Jukes TH (1969) Non-Darwinian Evolution. *Science* 164:788–798. doi:
393 10.1126/science.164.3881.788
- 394 Kullander SO, Ferreira EJG (2006) A review of the South American cichlid genus
395 *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyol Explor*
396 *Freshwaters* 17:289–398.
- 397 Kullander SO, Norén M, Fridriksson GB, Santos de Lucena CA (2009) Phylogenetic
398 relationships of species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from southern South
399 America based on the mitochondrial cytochrome b gene. *J Zool Syst Evol Res* 48:248–
400 258. doi: 10.1111/j.1439-0469.2009.00557.x

- 401 Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012) PartitionFinder: Combined selection
402 of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol Biol*
403 *Evol* 29:1695–1701. doi: 10.1093/molbev/mss020
- 404 López-Fernández H, Honeycutt RL, Stiassny MLJ, Winemiller KO (2005) Morphology,
405 molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine
406 cichlids (Perciformes, Labroidei). *Zool Scr* 34:627–651. doi: 10.1111/j.1463-
407 6409.2005.00209.x
- 408 López-Fernández H, Winemiller KO, Honeycutt RL (2010) Multilocus phylogeny and
409 rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Mol*
410 *Phylogenet Evol* 55:1070–86. doi: 10.1016/j.ympev.2010.02.020
- 411 López-Fernández, H., J. H. Arbour, K. O. Winemiller, Honeycutt, R. L. (2013) Testing
412 for ancient adaptive radiations in neotropical cichlid fishes. *Evolution* 67: 1321–1337.
- 413 McMahan, C. D., P. Chakrabarty, J. S. Sparks, W. L. Smith, Davis, M. P. (2013)
414 Temporal Patterns of Diversification across Global Cichlid Biodiversity
415 (Acanthomorpha: Cichlidae). *PLoS ONE* 8: e71162. doi: 10.1371/journal.pone.00711
416 62.
- 417 Miyagi R, Terai Y, Aibara M, et al (2012) Correlation between nuptial colors and visual
418 sensitivities tuned by opsins leads to species richness in sympatric Lake Victoria cichlid
419 fishes. *Mol Biol Evol* 29:3281–96. doi: 10.1093/molbev/mss139
- 420 Nagai H, Terai Y, Sugawara T, et al (2011) Reverse evolution in RH1 for adaptation of
421 cichlids to water depth in Lake Tanganyika. *Mol Biol Evol* 28:1769–76. doi:
422 10.1093/molbev/msq344
- 423 Nelson J (2006) *Fishes of the World*, 4th edn. Wiley, New Jersey.
- 424 Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013) Can DNA barcoding accurately
425 discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet* 14:20. doi:
426 10.1186/1471-2156-14-20
- 427 Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M (1993) Large-scale production of DNA sequencing
428 templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res* 21:173–174.
- 429 Schott RK, Refvik SP, Hauser FE, et al (2014) Divergent positive selection in rhodopsin
430 from lake and riverine cichlid fishes. *Mol Biol Evol* 31:1149–65. doi:
431 10.1093/molbev/msu064
- 432 Schwarzer J, Misof B, Tautz D, Schlieven UK (2009) The root of the East African
433 cichlid radiations. *BMC Evol Biol* 9:186. doi: 10.1186/1471-2148-9-186
- 434 Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS et al (2008) Speciation through sensory drive in

435 cichlid fish. *Nature* 455:620–626. doi: 10.1038/nature07285

436 Shaw PW, Turner GF, Idid MR, et al (2000) Genetic population structure indicates
437 sympatric speciation of Lake Malawi pelagic cichlids. *Proc Biol Sci* 267:2273–80. doi:
438 10.1098/rspb.2000.1279

439 Smith AR, Ma K, Soares D, Carleton KL (2012a) Relative LWS cone opsin expression
440 determines optomotor thresholds in Malawi cichlid fish. *Genes Brain Behav* 11:185–92.
441 doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00739.x

442 Smith AR, van Staaden MJ, Carleton KL (2012b) An evaluation of the role of sensory
443 drive in the evolution of lake Malawi cichlid fishes. *Int J Evol Biol* 2012:647420. doi:
444 10.1155/2012/647420

445 Spady TC, Parry JWL, Robinson PR et al (2006) Evolution of the cichlid visual palette
446 through ontogenetic subfunctionalization of the opsin gene arrays. *Mol Biol Evol*
447 23:1538–47. doi: 10.1093/molbev/msl014

448 Spady TC, Seehausen O, Loew ER, et al (2005) Adaptive molecular evolution in the
449 opsin genes of rapidly speciating cichlid species. *Mol Biol Evol* 22:1412–22. doi:
450 10.1093/molbev/msi137

451 Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-
452 analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–13. doi:
453 10.1093/bioinformatics/btu033

454 Tamura K, Stecher G, Peterson D et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary
455 Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–29. doi: 10.1093/molbev/mst197

456 Terai Y, Mayer WE, Klein J et al (2002) The effect of selection on a long wavelength-
457 sensitive (LWS) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A*
458 99:15501–6. doi: 10.1073/pnas.232561099

459 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity
460 of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
461 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–80. doi:
462 10.1093/nar/22.22.4673

463 Torres-Dowdall J, Pierotti MER, Härer A et al (2017) Rapid and Parallel Adaptive
464 Evolution of the Visual System of Neotropical Midas Cichlid Fishes. *Mol Biol Evol*
465 34:2469–85. doi: 10.1093/molbev/msx143

466 Trezise A, Collin S (2005) Opsins: evolution in waiting. *Curr Biol* 15:794–96.

467 Weadick CJ, Loew ER, Rodd FH, Chang BSW (2012) Visual pigment molecular
468 evolution in the Trinidadian pike cichlid (*Crenicichla frenata*): a less colorful world for

- 469 neotropical cichlids? *Mol Biol Evol* 29:3045–60. doi: 10.1093/molbev/mss115
- 470 Xia X (2013) DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in
471 molecular biology and evolution. *Mol Biol Evol* 30:1720–28. doi:
472 10.1093/molbev/mst064
- 473 Xia X, Xie Z, Salemi M et al (2003) An index of substitution saturation and its
474 application. *Mol Phylogenet Evol* 26:1–7. doi: 10.1016/S1055-7903(02)00326-3
- 475 Xu B, Yang Z (2013) PamlX: A graphical user interface for PAML. *Mol Biol Evol*
476 30:2723–24. doi: 10.1093/molbev/mst179
- 477 Yafe A, Loureiro M, Scasso F, Quintans F (2002) Feeding of two cichlidae species (
478 Perciformes) in an hypertrophic urban lake. *Iheringia Série Zool* 92:73–79. doi:
479 10.1590/S0073-47212002000400009
- 480 Yokoyama S (2008) Evolution of dim-light and color vision pigments. *Annu Rev*
481 *Genomics Hum Genet* 9:259–82. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164228
- 482

APÊNDICE B - Distâncias genéticas K2P para os fragmentos do gene *LWS* contendo somente éxons.

	Ac	Gb	Gl	Cn	Ch	Sp	Ci	Cpu	Gg	Ck	Cp	Cm	Cb	Ao	Sd
Gb	0,05														
Gl	0,07	0,06													
Cn	0,05	0,05	0,07												
Ch	0,07	0,07	0,09	0,03											
Sp	0,04	0,02	0,05	0,05	0,07										
Ci	0,06	0,06	0,08	0,02	0,05	0,07									
Cpu	0,06	0,04	0,07	0,05	0,08	0,04	0,07								
Gg	0,07	0,05	0,03	0,08	0,10	0,05	0,08	0,06							
Ck	0,07	0,04	0,05	0,07	0,09	0,04	0,08	0,05	0,05						
Cp	0,07	0,04	0,06	0,07	0,09	0,04	0,08	0,05	0,05	0,00					
Cm	0,07	0,04	0,05	0,07	0,09	0,04	0,08	0,04	0,05	0,00	0,00				
Cb	0,04	0,04	0,07	0,03	0,06	0,04	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,05			
Ao	0,05	0,02	0,05	0,05	0,07	0,02	0,07	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04		
Sd	0,05	0,05	0,07	0,05	0,07	0,04	0,07	0,04	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05	0,04	
Ps	0,07	0,04	0,06	0,07	0,09	0,04	0,08	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,06	0,03	0,04

Obs.: Cp = *C. piquiti*; Ck = *C. kelberi*; Cm = *C. monoculus*; Ac = *A. commbrae*; Cpu = *C. pusillum*; Ci = *C. iguassuensis*; Cn = *C. neiderleinii*; Ao = *A. ocellatus*; Cb = *C. britskii*; Gg = *G. gymnogenys*; Gl = *G. labiatus*; Sp = *S. pappaterra*; Gb = *G. brasiliensis*; Sd = *S. discus*; Ch = *C. haroldoi*; Ps = *P. scalare*.

APÊNDICE C - Distâncias genéticas K2P para os fragmentos do gene *LWS* contendo éxons e íntrons.

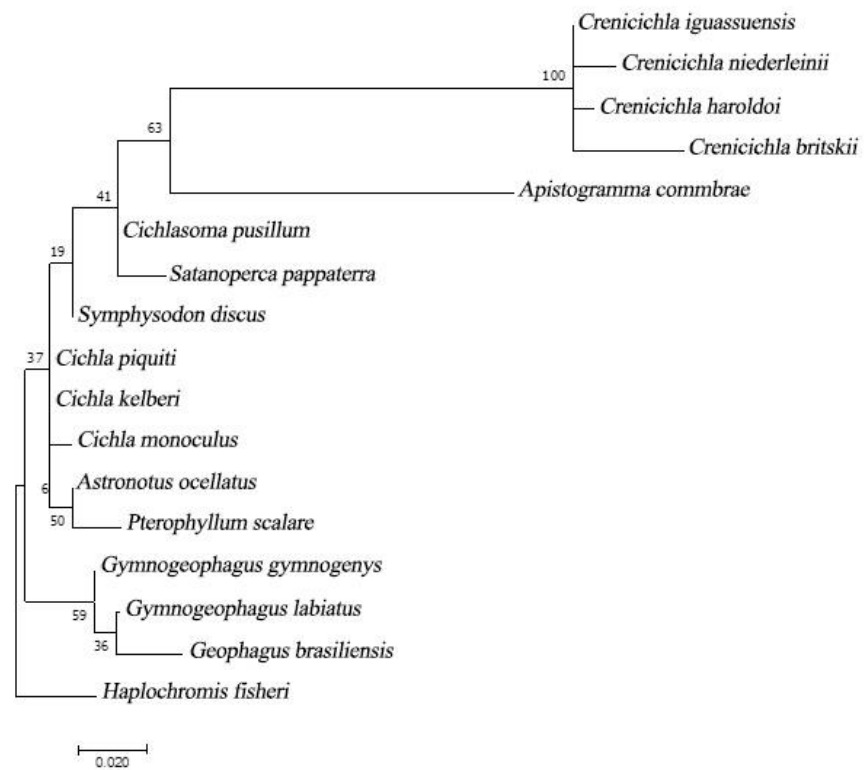
	Ac	Gb	Gl	Cn	Ch	Sp	Ci	Cpu	Gg	Ck	Cp	Cm	Cb	Ao	Ps
Gb	0,07														
Gl	0,09	0,09													
Cn	0,06	0,06	0,09												
Ch	0,08	0,08	0,11	0,03											
Sp	0,04	0,04	0,07	0,05	0,07										
Ci	0,07	0,07	0,10	0,02	0,04	0,07									
Cpu	0,07	0,06	0,10	0,06	0,08	0,05	0,07								
Gg	0,09	0,08	0,03	0,10	0,11	0,07	0,10	0,09							
Ck	0,08	0,07	0,09	0,08	0,10	0,05	0,09	0,06	0,08						
Cp	0,08	0,06	0,09	0,08	0,10	0,05	0,09	0,06	0,08	0,00					
Cm	0,08	0,07	0,09	0,08	0,09	0,05	0,09	0,05	0,08	0,00	0,00				
Cb	0,05	0,06	0,09	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06	0,09	0,07	0,07	0,07			
Ao	0,07	0,05	0,08	0,06	0,08	0,03	0,08	0,04	0,07	0,05	0,05	0,05	0,06		
Ps	0,09	0,07	0,09	0,09	0,11	0,06	0,10	0,05	0,09	0,06	0,07	0,07	0,09	0,06	
Sd	0,07	0,07	0,10	0,06	0,08	0,05	0,08	0,04	0,10	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06

Obs.: Cp = *C. piquiti*; Ck = *C. kelberi*; Cm = *C. monoculus*; Ac = *A. commbrae*; Cpu = *C. pusillum*; Ci = *C. iguassuensis*; Cn = *C. neiderleinii*; Ao = *A. ocellatus*; Cb = *C. britskii*; Gg = *G. gymnogenys*; Gl = *G. labiatus*; Sp = *S. pappaterra*; Gb = *G. brasiliensis*; Sd = *S. discus*; Ch = *C. haroldoi*; Ps = *P. scalare*.

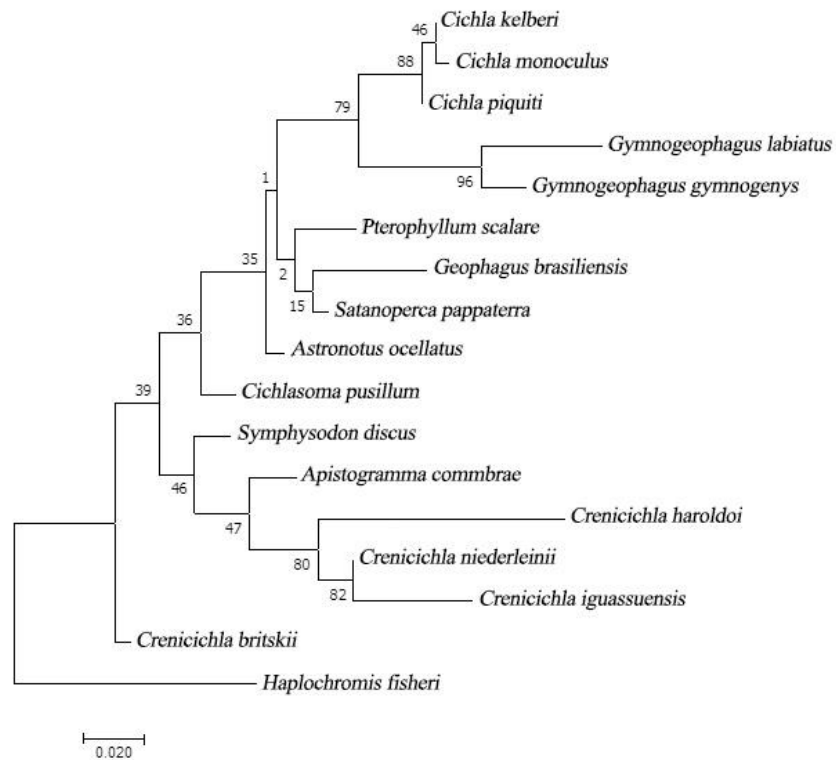
APÊNDICE D - Distâncias genéticas K2P para os fragmentos do gene *COI*.

	Cp	Ck	Cm	Ac	Cpu	Ci	Cn	Ao	Cb	Gg	Gl	Sp	Gb	Sd	Ch
Ck	0,01														
Cm	0,06	0,05													
Ac	0,27	0,28	0,30												
Cpu	0,16	0,17	0,18	0,25											
Ci	0,33	0,32	0,29	0,32	0,27										
Cn	0,32	0,32	0,29	0,33	0,27	0,02									
Ao	0,14	0,15	0,15	0,31	0,18	0,29	0,29								
Cb	0,27	0,27	0,25	0,30	0,25	0,21	0,23	0,29							
Gg	0,19	0,19	0,18	0,31	0,17	0,27	0,27	0,20	0,31						
Gl	0,19	0,18	0,18	0,29	0,18	0,28	0,28	0,18	0,29	0,08					
Sp	0,18	0,19	0,19	0,25	0,18	0,26	0,27	0,19	0,26	0,18	0,20				
Gb	0,20	0,20	0,20	0,26	0,20	0,25	0,25	0,21	0,29	0,17	0,17	0,17			
Sd	0,17	0,18	0,16	0,28	0,17	0,29	0,28	0,19	0,26	0,20	0,20	0,19	0,21		
Ch	0,31	0,31	0,28	0,30	0,26	0,08	0,09	0,29	0,21	0,28	0,27	0,24	0,25	0,31	
Ps	0,20	0,20	0,18	0,29	0,21	0,25	0,26	0,19	0,29	0,22	0,23	0,22	0,20	0,17	0,29

Obs.: Cp = *C. piquiti*; Ck = *C. kelberi*; Cm = *C. monoculus*; Ac = *A. combrae*; Cpu = *C. pusillum*; Ci = *C. iguassuensis*; Cn = *C. neiderleinii*; Ao = *A. ocellatus*; Cb = *C. britskii*; Gg = *G. gymnogenys*; Gl = *G. labiatus*; Sp = *S. pappaterra*; Gb = *G. brasiliensis*; Sd = *S. discus*; Ch = *C. haroldoi*; Ps = *P. scalare*.



APÊNDICE E - Reconstrução gênica pelo método de máxima verossimilhança utilizando a sequência aminoacídica do fragmento parcial do gene *COI* (156 aa), de acordo com o modelo de substituição aminoacídica mtREV+G. Os suportes dos ramos correspondem às reamostragens de *bootstrap*.



APÊNDICE F - Reconstrução gênica pelo método de máxima verossimilhança utilizando a sequência aminoacídica do fragmento parcial do gene LWS (206 aa), de acordo com o modelo de substituição aminoacídica cpREV + G. Os valores acima dos ramos correspondem às reamostragens de *bootstrap*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do projeto de pesquisa resultou na identificação da seleção divergente dos códons do gene *LWS* ao serem comparados os grupos de ciclídeos neotropicais e africanos, utilizando fragmentos parciais que abrangeram os cinco sítios-chave da proteína *LWS* e estimar do λ_{\max} das espécies estudadas. Uma das hipóteses foi corroborada, pois a seleção foi divergente quanto aos códons selecionados entre os grupos, no qual somente dois se sobrepuseram. Os ciclídeos neotropicais estão sob intensa seleção purificadora, porém novos estudos são necessários a fim de confirmar se tal seleção é consequência temporal ou da diversidade de *habitats* a qual estão submetidas as espécies analisadas.

Quanto ao grupo de ciclídeos neotropicais, ao serem utilizados fragmentos parciais dos genes *LWS* e *COI*, observou-se que a taxa de variação do gene *LWS* foi diferente entre os clados, respondendo a hipótese de que haveria essa diferença. Provavelmente, a variação desse gene seja limitada por restrições ecológicas inerentes aos grupos estudados. Por conseguinte, é necessário verificar se a relação da variação ocorre de acordo com as características de cada grupo ou com a diversidade de *habitat*, considerando principalmente variáveis fóticas, e a realização de estimativas mais precisas por meio do uso de outros marcadores e pontos de calibração.

Para tanto, os resultados contribuíram para o melhor entendimento da evolução molecular do sistema visual dos ciclídeos neotropicais, uma vez que esse sistema desempenha um papel importante na diversificação desse grupo. Porém, são necessários novos estudos relacionados a populações de espécies nativas que ocorrem em diferentes ambientes para estimar a fixação de polimorfismos em genes dessa família, e que possam implicar na variação do λ_{\max} , indicando seleção intraespecífica.