UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Variação intraespecífica e efeito da temperatura no estabelecimento do fenótipo
durante a ontogenia de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Osteichthyes:
Characidae)**

Bianca Bonini Campos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada

Ribeirão Preto - SP

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Variação intraespecífica e efeito da temperatura no estabelecimento do fenótipo
durante a ontogenia de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Osteichthyes:
Characidae)**

Bianca Bonini Campos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada

Orientadora: Prof^ª Dr^a Tiana Kohlsdorf

Ribeirão Preto - SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bonini-Campos, Bianca

Variação intraespecífica e efeito da temperatura no estabelecimento do fenótipo durante a ontogenia de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Osteichthyes: Characidae). Ribeirão Preto, 2020.

176 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientadora: Kohlsdorf, Tiana.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pela bolsa concedida para realização desse trabalho (Processo: 130140/2018-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada por todo o apoio e estrutura necessária para que esse projeto pudesse ser desenvolvido.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão por me acolher pelos últimos sete anos.

Ao Laboratório de Evolução e Biologia Integrativa (LEBI), por proporcionar toda a estrutura física necessária para a execução desse projeto, além de um ambiente acolhedor e integrado de discussões enriquecedoras, não apenas concernentes a projetos específicos, mas também no que tange a prática científica e o papel do pesquisador na sociedade.

À minha orientadora, Tiana Kohlsdorf, por me lembrar diariamente o quanto a ciência é encantadora, empolgante e gratificante. Por ser um exemplo de profissional e ser humano. Por todos os aprendizados, conselhos e discussões. Obrigada por comemorar conosco com tanto entusiasmo as pequenas e grandes descobertas: *“olha que lindas essas bandas de HoxA2!”*.

Aos meus pais, Juliana e André, pois sem eles nada disso seria possível. Agradeço imensamente por todo o apoio ao longo dessa trajetória e por todo amor e carinho que nunca faltaram. Obrigada por respeitarem as minhas escolhas pessoais e profissionais.

Ao Laboratório de Ecologia Comportamental e Evolutiva (LECE), especialmente ao Tiago Pires, à Marina Carmona e ao Élio Borghezan que me

receberam em Manaus com as portas e corações abertos, me ajudaram com os meus experimentos e me ensinaram muito do que sei hoje, desde a manutenção de aquários até o comportamento reprodutivo de peixes, além de possibilitarem essa experiência extremamente gratificante. Obrigada também ao do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Jansen Zuanon e ao Danilo Castanho, e à Faculdade Federal do Amazonas (UFAM), e a todos aos funcionários do Departamento de Biologia e aos curadores das coleções.

Ao Museu de Zoologia da USP (MZUSP), em especial ao Aléssio Datovo e Michel Donato Gianeti pelo auxílio com os animais da coleção ictiológica e por se disponibilizarem prontamente para me auxiliar em tudo que fosse necessário.

Ao Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto (LIRP) em especial ao André Esguicero por possibilitar o acesso à coleção ictiológica, auxiliar na elaboração e execução do protocolo de diafanização e por fomentar discussões que contribuíram significativamente para esse trabalho.

Ao Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC) por fornecer toda a estrutura necessária para a aquisição de imagens dos espécimes fixados e diafanizados, em especial à Ana Francisca Tamburus e Nielson França, que me auxiliaram também na etapa de extração do RNA.

Ao Leandro Lofeu, por me auxiliar desde o início da minha trajetória na pesquisa científica, por compartilhar não apenas um sistema biológico, mas também tantos aprendizados. Obrigada por todos os ensinamentos regados a muita água dos aquários, pelas discussões de Plasticidade e por seguir me ajudando com a molecular!

À Vera de Lucca, por tornar o dia-a-dia sempre mais tranquilo e eficiente. Obrigada por nos guiar com tanto carinho por meio às enormes pilhas de papéis da pós-graduação.

À Melissa Bars Closel, por toda a paciência do mundo para me auxiliar em absolutamente tudo que eu precisei, desde análises estatísticas até coleta de peixes no

final de semana. Obrigada por compartilhar comigo sua experiência no mundo acadêmico. Obrigada por tantas histórias, tanto Tira Gosto e, principalmente, tanta cerveja!

À Nathalia Rossigalli (Mini), por ser minha parceira de biotério e de picos de produtividade noite adentro. Obrigada por estar sempre tão presente e por ser uma das mulheres cientistas que me inspiram diariamente.

Ao Fábio Barros (Sabiá), que junto com o Felipe Zampieri (Pinguim), iniciou o “*Ciclo sem Fim*”, e teve uma contribuição imensurável no delineamento experimental e análises estatísticas desse e de outros projetos desenvolvidos no laboratório.

Ao Mario Bronzati (Roque), por me auxiliar nas análises filogenéticas e discutir os desdobramentos das Análises das Sequências de Ossificação. Obrigada por ser um exemplo de persistência e dedicação, e por proporcionar vivências que foram além do desenvolvimento de peixes, passaram por embriões de galinha e chegaram em jacarés no “*Pan-ta-nal*”.

Ao George Mattox (Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, *campus* Sorocaba), que foi referência em diversos pontos desse trabalho e me auxiliou com questões práticas e discussões teóricas imprescindíveis para a conclusão da minha pesquisa.

Ao Christopher Griffin (Virginia Polytechnic Institute and State University), Zachary Morris (Harvard University), Matthew Colbert (University of Texas at Austin) e Timothy Rowe (University of Texas at Austin) por prontamente resolverem todas as minhas dúvidas sobre as Análises das Sequências Ontogenéticas (OSA) e suas ferramentas que foram surgindo ao longo deste trabalho.

Aos piscicultores e colaboradores, Jesus, Xina e Jomar, pois sem eles nada disso seria possível.

À Anne Freitas, por estar comigo desde o início da vida acadêmica, por compartilhar tantos momentos cruciais nessa trajetória. Obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelos almoços e jantinhas, pelas noites de estudo, pelos relatórios, pelos conselhos, pelas baladas, pelos colos e pelos choros. Obrigada por me conhecer melhor do que eu mesma e por ser sempre meu porto seguro.

À Jade Castro, pela companhia no período que compartilhamos um lar e pelo carinho e cuidado que se mantém mesmo com a distância. Obrigada por me inspirar a ser uma pessoa melhor todos os dias, por compartilhar comigo um encantamento e uma animação pela vida e pela ciência. Obrigada por tantas conversas que transitam entre a racionalidade intransponível e a espiritualidade alentadora com uma facilidade impressionante. *Quanto mais gelatina, mais gelatina.*

Ao Guilherme Vargas (Castanha), por me mostrar que a vida pode ser o que queremos dela, e que podemos estar sempre nos inventando e reinventando. *Te amo, Suricato!*

Ao André Bálico (Dildo), que de uma maneira tão única nos faz sentir que temos uma família que escolhemos. Obrigado por estar presente sempre que precisamos e por compartilhar tantos momentos especiais. *Irmão não abandona irmão.*

À Ana Paula (Azia) e a Keity Nishikawa, as biólogas que me inspiram diariamente a seguir os meus sonhos sem perder a leveza. Obrigada por todo o carinho e colchetes. *Dorimê.*

Ao Gabriel Ferreira (Gina), ao Vinícius Anelli (Pedi) e ao Martín Escobar, por compartilharem comigo tantas risadas em meio a discussões calorosas sobre o futuro da ciência no Brasil e tantos momentos incríveis experienciados nesse laboratório, que se diz hostil, mas na verdade é extremamente acolhedor. *Pru. Parabéns Guilherme.*

À Aline Luchetta (Chupeta) por me reerguer a cada abraço e cada conversa cativante. Obrigada por cada lembrança e cada sorriso.

Aos amigos do Laboratório de Evolução e Biologia Integrativa que acompanharam a minha trajetória, sempre me incentivando e sendo, cada um à sua maneira, as melhores companhias que eu poderia ter: Stella Kyomen, Lorian Cobra Straker (Dri e Ian), Gabriela Leite, Renata Brandt, Priscila Rothier, Lucas Mariotto, Renato Nali, Luisa Prado, Thayna Medeiros (Catú), Renan Lopes Rodriguez (Gaga), Aline Dragalzew e Vitor Yamada.

À Carol e ao Bruno, por tornarem as feijoadas e os happy hours muito mais divertidos. Obrigada pelos campeonatos de bambolê, shots de leite, workshops de slime, super pesquisa do bonito/feio/legal/chato, shows de ginástica artística, carolmelizada, treinamento para adestrar a Cléo e Imagem e Ação: *Lorian, Lorian, Lorian!*

Aos esquisitos mais incríveis do mundo: Felipe Borges (Marcha), Bruno Garcia (James), Laura Nery (Recruta), Mayara Yoshiyassu (Birdo), Marina Jardim (Pist), Rafaela Rosseti (Ruffles), Laíssa Paz (Pomba), Graziela Moura e Beatriz Hübner (Edna), por tornarem Ribeirão Preto verdadeiramente um lar, com a família que eu escolhi.

Ao Leonardo, que representa uma saudade enorme e é protagonista de tantas memórias que aquecem meu coração. *Tuesday é mais legal.*

As minhas amigas de longa data que mesmo de longe estão sempre presentes: Annelise, Mariana Granucci, Mariana Trosdorf e Luna.

À Lucia Helena Nunes, pelo cuidado de uma vida toda, *muito obrigada querida!*

Aos meus tios, Adriana e Márcio Mariguela, e a minha primã, Luana Mariguela. Por me abraçarem na minha completude, por todo o carinho, o cuidado, o amor e a troca.

Ao meu avô Ary, por todo o amor do mundo. *Uh, uh!*

Aos meus grandes amigos do Rondon: Kelly, Mat, Taísa, Mayara, Luiz, Carol, Matheus e Thainá. *Isso é Rondon!*

Ao Moto, Bruce e Alavanca, por me acolherem nessa reta final *na medida*.

À minha analista, Alessandra, que me ajudou a ressignificar diversas vezes meus projetos, minhas relações e minhas percepções durante toda essa trajetória.

RESUMO

BONINI-CAMPOS, B. **Variação intraespecífica e efeito da temperatura no estabelecimento do fenótipo durante a ontogenia de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Osteichthyes: Characidae)**. 2020. 176 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A origem da variação fenotípica é um problema complexo e de suma importância para o entendimento dos processos evolutivos, pois estes residem na existência de variantes fenotípicas reveladas. Uma vez que o estabelecimento do fenótipo ocorre durante o desenvolvimento, entender os mecanismos que agem na ontogenia é crucial para a compreensão da origem da variação fenotípica. Uma propriedade intrínseca dos sistemas de desenvolvimento consiste na produção de formas fenotípicas alternativas que podem diferir quanto à morfologia, à fisiologia ou ao comportamento em resposta às condições ambientais - essa propriedade é denominada Plasticidade Fenotípica. Um dos fatores ambientais que exerce grande influência no estabelecimento do fenótipo é a temperatura do ambiente de desenvolvimento. O presente trabalho teve por objetivo central testar a hipótese de associações entre a temperatura do ambiente de desenvolvimento e a magnitude de respostas plásticas do fenótipo resultantes em peixes *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875). Para tal, foi investigada a morfologia externa de espécimes adultos em condições naturais e o estabelecimento do fenótipo, incluindo a morfologia externa, os processos de ossificação e expressão gênica, em peixes criados em laboratório em condições ambientais que diferiram quanto à temperatura [Alta (26°C) e Baixa (20°C)] e fluxo de água (com fluxo de água e sem fluxo de água). A temperatura do ambiente de desenvolvimento influenciou a magnitude das respostas plásticas do fenótipo morfológico associadas ao fluxo de água e também as trajetórias ontogenéticas e variações nas sequências de ossificação. Adicionalmente, os níveis de expressão gênica dos genes associados ao desenvolvimento das estruturas ósseas variaram conforme as condições de desenvolvimento e a janela ontogenética. Os resultados desse trabalho corroboram o potencial do ambiente de desenvolvimento em influenciar a distribuição e a magnitude da variação fenotípica dentro de uma população.

ABSTRACT

BONINI-CAMPOS, B. **Intraspecific variation and temperature effect on the phenotype establishment during the ontogeny of *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) (Osteichthyes: Characidae).** 2020. 176 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The origin of phenotypic variation is a complex and important problem for the understanding of the evolutionary processes, once these reside in the existence of revealed phenotypic variants. Since the establishment of the phenotype occurs during development, understanding the mechanisms that act in ontogeny is crucial for understanding the origin of the phenotypic variation. An intrinsic property of development systems is the production of alternative phenotypic forms that may differ in terms of morphology, physiology or behavior in response to environmental conditions - this property is called Phenotypic Plasticity. One of the environmental factors that has a great influence on the establishment of the phenotype is the temperature of the development environment. The main goal of this work was to test the hypothesis of associations between the temperature of the development environment and the magnitude of plastic responses of the phenotype resulting in *Astyanax lacustris* fish (Lütken, 1875). For this purpose, the external morphology of adult specimens under natural conditions and the establishment of the phenotype, including external morphology, ossification processes and gene expression, were investigated in laboratory-reared fish under environmental conditions that differed in temperature [High (26 ° C) and Low (20 ° C)] and water flow (with water flow and without water flow). The temperature of the development environment influenced the magnitude of the plastic responses of the morphological phenotype associated with the water flow and also the ontogenetic trajectories and ossification sequences variation. In addition, the levels of gene expression of genes associated with the development of bone structures varied according to development conditions and the ontogenetic window. The results of this work corroborate the potential of the development environment to influence the distribution and magnitude of phenotypic variation within a population.

Palavras-chave: Desenvolvimento, Eco-Evo-Devo, Peixes, Sinais Ambientais.

Key-words: Development, Eco-Evo-Devo, Environmental Signals, Fishes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Conceitos relacionados à Teoria Evolutiva. Adaptado de (Fábregas-Tejeda & Vergara-Silva, 2018) e (Pigliucci & Muller, 2010).....	24
Figura 2 Esquema ilustrando os processos envolvidos no estabelecimento de variantes fenotípicas e o papel do ambiente em mecanismos de desenvolvimento e evolução por Seleção Natural.....	27
Figura 3 Normas de Reação hipotéticas. (a) Norma de reação não-plástica. (b) Norma de reação plástica. Adaptado de Schlichting & Pigliucci (1998).	29
Figura 4 Relação entre conceitos e processos relacionados ao surgimento e estabelecimento de variantes fenotípicas ao longo do processo evolutivo. Adaptado de Laland et al. (2015).	31
Figura 5 Esquema dos métodos aplicados nesse trabalho com o objetivo de responder perguntas específicas em diferentes níveis de organização. O asterisco (*) indica etapas que requerem estudos subsequentes.....	43
Figura 6 Medidas Lineares obtidas com auxílio de um paquímetro digital dos espécimes adultos de <i>Astyanax lacustris</i> depositados em Coleções Ictiológicas. Vista Lateral (a): ALP - Altura do Pedúnculo Caudal; SL - Comprimento do Corpo; PVL - Comprimento da Nadadeira Pélvica; PVD - Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica; ALC - Altura máxima do Corpo; ADL - Comprimento da Nadadeira Adiposa; ADH - Altura da Nadadeira Adiposa; VAD - Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal. Vista Dorsal (b): HW - Largura da Cabeça; MBW - Largura máxima do Corpo; MW - Largura da Boca; ID - Distância entre os Olhos; PTL - Comprimento da Nadadeira Peitoral; CPW - Largura do Pedúnculo Caudal.	45
Figura 7 Registro fotográfico e medidas lineares obtidas (SL: Comprimento do Corpo, ALC: Altura do Corpo e ALP: Altura do Pedúnculo).....	49
Figura 8 Estruturas ósseas utilizadas para a construção das matrizes de condrição e ossificação da Análise das Sequências Ontogenéticas (OSA). Aparelho de Weber [Processos laterais (aw), Arcos neurais das vértebras 3 e 4 (an34), Centros vertebrais 1, 2, 3 e 4 (cv14) e Supraneural 3 (sn3)]; Pós-Aparelho de Weber [Centros Vertebrais (cvpw), Arcos hemais (ahpw), Arcos neurais (anpw), Parapófises (parp), Supraneurais (snw) e Intramusculares (intra)]; Cintura peitoral [Escápula e Coracóide (cpt), Cleitro (cle), Raios da nadadeira peitoral (rpt) e Radiais da nadadeira peitoral (rdpt)]; Nadadeira caudal [hipurais (hip1, hip2, hip3, hip4, hip5 e hip6), Centro ural e pré-ural 1 (cpu1), Arcos hemais das pu2/pu3 (ahpu23), Arcos neurais pu2/pu3 (anpu23), Epurais 1 e 2 (ep), Paripurais (PP), Raios principais (rc), Raios procorrentes dorsais (rpd) e Raios procorrentes ventrais (rpcv)]; Nadadeira dorsal [Raios (rd), Radiais próximo-mediais (rpd), Radiais distais (rdd) e Peça terminal (ptmd)]; Nadadeira anal [Raios (ra), Radiais próximo-mediais (rpa) e Radiais distais (rda)]; Cintura pélvica [Raios (rpl), Radiais (rdpl) e Osso pélvico (cpl)].	53
Figura 9 Gráficos resultantes da Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando medidas lineares obtidas em espécimes adultos depositados em coleções ictiológicas.	59
Figura 10 Registro Fotográfico de espécimes nos estágios 21, 33 e 45 Dias pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento: Amarelo - Temperatura Alta Sem Fluxo; Laranja - Temperatura Alta Com Fluxo; Verde - Temperatura Baixa Sem Fluxo; e Azul - Temperatura Baixa Com Fluxo.	61
Figura 11 Gráficos comparando os resíduos das regressões alométricas da Altura do Corpo (ALC) e da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em três estágios do desenvolvimento: 21, 33 e 42 Dias pós-eclosão (DPE), para cada uma das condições de desenvolvimento: Laranja –	

Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo - Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.....	63
Figura 12 Box-plots da Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) dos espécimes com 21, 33 e 42 Dias pós-eclosão (DPE). As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho - Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo - Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul - Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde - Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.....	65
Figura 13 Regressão linear por SMA da Altura do Corpo (ALC) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) para todos os indivíduos amostrados. As cores correspondem às condições de desenvolvimento.	67
Figura 14 Regressão linear por SMA da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) para todos os indivíduos amostrados. As cores correspondem às condições de desenvolvimento.....	68
Figura 15 Regressões lineares por SMA da Altura do Corpo (ALC) e da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) para todos os espécimes amostrados, agrupados nas janelas ontogenéticas de 21 a 30, 33 a 42 e acima de 45 Dias pós-eclosão (DPE). As cores correspondem às condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.	71
Figura 16 Comprimento médio do Corpo (SL) em milímetros (mm) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, agrupado de acordo com a Temperatura. As cores correspondem às condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.....	72
Figura 17 Altura do Corpo (mm) e Altura do Pedúnculo Caudal (mm) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, agrupados de acordo com a Temperatura. As cores correspondem às condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.....	73
Figura 18 Comprimento médio do Corpo (SL) em milímetros (mm) em relação ao Dia pós-eclosão (DPE) em cada uma das Condições de Desenvolvimento, com valores agrupados de acordo com o Fluxo de Água. As cores indicam as condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.....	73
Figura 19 Comprimento do Corpo (mm) em relação ao Dia pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com valores agrupados segundo a Temperatura e o Fluxo de Água. As cores indicam as condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.	74
Figura 20 Coeficientes de Variação (CV) do Comprimento do Corpo (SL) de espécimes amostrados nas diferentes Condições de Desenvolvimento e comparações entre as Condições de Desenvolvimento. As cores correspondem às condições de desenvolvimento, as setas indicam as comparações, e as letras correspondem às etapas do desenvolvimento: (a) Todos os estágios; (b) 21 a 30 Dias pós-eclosão (DPE); (c) 33 a 42 DPE; (d) Acima de 45 DPE.	75
Figura 21 Comprimento médio do Corpo (SL) em relação ao Dia pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com barras indicando o Desvio Padrão. As cores	

correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo..... 76

Figura 22 Coeficientes de Variação (CV) da Altura do Corpo (SL) dos espécimes das diferentes Condições de Desenvolvimento e comparações entre Condições de Desenvolvimento. As cores correspondem às condições de desenvolvimento, as setas indicam as comparações, e as letras correspondem às etapas do desenvolvimento: (a) Todos os estágios; (b) 21 a 30 Dias pós-eclosão (DPE); (c) 33 a 42 DPE; (d) Acima de 45 DPE. 77

Figura 23 Altura média do Corpo (ALC) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com barras indicando o Desvio Padrão. As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo..... 78

Figura 24 Coeficientes de Variação (CV) da Altura do Pedúnculo (ALP) de espécimes amostrados em diferentes Condições de Desenvolvimento e comparações entre Condições de Desenvolvimento. As cores correspondem às condições de desenvolvimento, as setas indicam as comparações, e as letras correspondem às etapas do desenvolvimento: (a) Todos os estágios; (b) 21 a 30 Dias pós-eclosão (DPE); (c) 33 a 42 DPE; (d) Acima de 45 DPE. 79

Figura 25 Altura média do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com barras indicando o Desvio Padrão. As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo..... 80

Figura 26 Normas de reação para a Altura do Corpo (ALC) em relação ao Fluxo de água na condição de desenvolvimento. As cores indicam a condição de desenvolvimento: Vermelho e Amarelo - Temperatura Alta; Azul e Verde – Temperatura Baixa. 82

Figura 27 Normas de reação para a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Fluxo de água na condição de desenvolvimento. As cores indicam a condição de desenvolvimento: Vermelho e Amarelo - Temperatura Alta; Azul e Verde – Temperatura Baixa..... 82

Figura 28 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas da cintura peitoral: cle – Cleitro; rpt – Raios da nadadeira peitoral; cpt - Cintura peitoral (Escápula e Coracóide); rdpt – Distais da nadadeira peitoral. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água. 84

Figura 29 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas da nadadeira caudal e Intramusculares: hip1, hip2, hip3, hip4, hip5 e hip6 – Hipurais; cpu1 - Centro ural e pré-ural 1; ahpu23 - Arcos hemais das pu2/pu3; anpu23 - Arcos neurais pu2/pu3; ep - Epurais 1 e 2; pp – Paripural; rc - Raios principais da nadadeira caudal; rped - Raios procorrentes dorsais; rpev - Raios procorrentes ventrais; intra – Intramusculares. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água. 86

Figura 30 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas das nadadeiras dorsal e anal: rd - Raios da nadadeira dorsal; rpd - Radiais próximo –mediais da nadadeira dorsal; rdd - Radiais distais da nadadeira dorsal; ptmd - Peça terminal; ra – Raios da nadadeira anal; rpa - Radiais próximo-mediais da nadadeira anal; rda - Radiais distais da nadadeira anal. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras

representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.	88
Figura 31 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas do Aparelho de Weber, Centros Vertebrais e Supraneurais: cv14 – Centros vertebrais 1, 2, 3 e 4; an34 – Arcos neurais das vértebras 3 e 4; aw - Processos laterais; sn3 - Supraneural 3; cvpw - Centros vertebrais pós aparelho de Weber; anpw – Arcos neurais; ahpw – Arcos hemais; parp – Parapófises; snw – Supraneurais. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.....	90
Figura 32 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas da cintura pélvica: rpl – Raios da nadadeira pélvica; cpl – Osso pélvico; rdpl – Radiais da nadadeira pélvica. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.	92
Figura 33 Árvores normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Alta Sem Fluxo de água.	94
Figura 34 Árvores normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Alta Com Fluxo de água.	94
Figura 35 Árvores consenso normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.	95
Figura 36 Árvores consenso normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Baixa Com Fluxo de água.....	95
Figura 37 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Alta Com Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.	97
Figura 38 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Baixa Com Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.	98
Figura 39 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Alta Sem Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.	99
Figura 40 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Baixa Sem Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.	100
Figura 41 Gráfico da amplificação do gene de interesse BMP4 e do endógeno controle GAPDH em indivíduos mantidos em diferentes condições de desenvolvimento. <i>Threshold</i> =1,495.....	101
Figura 42 Gráfico da amplificação do gene de interesse CX43 e do endógeno controle GAPDH para as condições de desenvolvimento. <i>Threshold</i> =1,495.	102
Figura 43 Comparação dos níveis de expressão de BMP4, obtidos a partir do método Delta-Delta Ct, para cada condição de desenvolvimento em indivíduos nos estágios 21 e 33 Dias pós-eclosão (DPE).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Registro da Média e Desvio Padrão da temperatura dos aquários para cada uma das Condições de Desenvolvimento.	47
Tabela 2 Relação do número de espécimes amostrados. DPE: Dia Pós-Eclosão.....	48
Tabela 3 Resultado da Análise de Componentes Principais (PCA) com os pesos (<i>loadings</i>) de cada uma das variáveis testadas.	59
Tabela 4 Média e Desvio Padrão do Comprimento do Corpo (mm) para cada Condição de Desenvolvimento em peixes amostrados entre os estágios de 21 e 72 dias pós-eclosão (DPE). 60	
Tabela 5 Resultados (<i>p-value</i>) das Análises de Variância (ANOVAs) para a Altura do Corpo e a Altura do Pedúnculo, nos dias 21, 33 e 42 pós-eclosão (DPE), em relação ao fluxo de água e à temperatura nas Condições de Desenvolvimento. Os valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.	62
Tabela 6 Médias dos resíduos das regressões entre as variáveis de interesse e o tamanho do corpo, ambos logaritimizados, para 21, 33 e 42 dias pós-eclosão (DPE).	63
Tabela 7 Resultados (<i>p-value</i>) dos Pós-testes de Tukey para a Altura do Corpo e a Altura do Pedúnculo, nos Dias 21, 33 e 42 pós-eclosão (DPE), em relação ao Fluxo de água e à Temperatura das Condições de Desenvolvimento. Os valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.	64
Tabela 8 Resultados das Regressões por SMA para a Altura do Corpo (ALC) e a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com as Condições de Desenvolvimento. Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes; CI - Intervalo de Confiança; Lim. Inf. – Limite Inferior; Lim. Sup. – Limite Superior; β – Inclinação da reta (<i>slope</i>); α – Elevação da reta (<i>elevation</i>).....	66
Tabela 9 Comparação entre grupos (<i>p-value</i>) das regressões por SMA (<i>Standardized Major Axis</i>) para Altura do Corpo (ALC) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com a Condição de Desenvolvimento. Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.....	67
Tabela 10 Comparação entre grupos (<i>p-value</i>) das regressões por SMA (<i>Standardized Major Axis</i>) para a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com a Condição de Desenvolvimento. Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.	68
Tabela 11 Resultados das Regressões por SMA para a Altura do Corpo (ALC) e a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) para amostras obtidas nos Dias 21 a 30, 33 a 42 e acima de 45 pós-eclosão (DPE). Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes; β – Inclinação da reta (<i>slope</i>); α – Elevação da reta (<i>elevation</i>).....	69
Tabela 12 Comparação entre grupos (<i>p-value</i>) nas regressões por SMA (<i>Standardized Major Axis</i>) para Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com a Condição de Desenvolvimento, nos grupos 21 a 30, 33 a 42, e acima de 45 dias pós-eclosão (DPE). Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.	70
Tabela 13 Resultado (<i>p-value</i>) dos testes de homogeneidade das variâncias (Levene) para cada grupo ('amostra', correspondente aos Dias pós-eclosão [DPE]) por condição de desenvolvimento e por temperatura. Valores em negrito representam diferenças estatisticamente significantes.....	81

Tabela 14 Médias dos Cts (<i>Threshold Cycles</i>) para cada uma das condições de desenvolvimento para os genes BMP4, CX43 e GAPDH em peixes com 21, 33 e 48 dias pós-eclosão (DPE). Os traços representam valores que foram eliminados da análise preliminar em decorrência da não amplificação.	102
Tabela 15 Níveis de expressão gênica de BMP4 para cada uma das condições de desenvolvimento com 21 e 33 Dias Pós-Eclosão (DPE) calculados a partir do método Delta-Delta Ct.	103
Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. .	131
Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento.	142
Tabela 18 Aparecimento das estruturas em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE).....	157
Tabela 19 Quantificação do RNA e preparação das alíquotas.	175

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Medidas Lineares

ADH	Altura da Nadadeira Adiposa
ADL	Comprimento da Nadadeira Adiposa
ALC	Altura máxima do Corpo
ALP	Altura do Pedúnculo Caudal
CPW	Largura do Pedúnculo Caudal
HW	Largura da Cabeça
ID	Distância entre os Olhos
MBW	Largura máxima do Corpo
MW	Largura da Boca
PTL	Comprimento da Nadadeira Peitoral
PVD	Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica
PVL	Comprimento da Nadadeira Pélvica
SL	Comprimento do Corpo
VAD	Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal

Elementos Ósseos

AW	Aparelho de Weber (Processos laterais)
AHPW	Arcos hemais Pós-Aparelho de Weber
AHPU23	Arcos hemais PU2/PU3
ANPW	Arcos neurais Pós-Aparelho de Weber
ANPU23	Arcos neurais PU2/PU3
AN34	Arcos neurais vértebras 3 e 4
CPU1	Centro Ural e Pré-Ural 1
CV14	Centros Vertebrais 1, 2, 3 e 4
CVPW	Centros Vertebrais Pós-Aparelho de Weber
CPT	Cintura Peitoral (Escápula e Coracóide)
CPL	Oso Pélvico
CLE	Cleitro
EP	Epurais 1 e 2
HIP1	Hipural 1
HIP2	Hipural 2
HIP3	Hipural 3
HIP4	Hipural 4
HIP5	Hipural 5
HIP6	Hipural 6
INTRA	Intramusculares
PARP	Parapófises
PP	Paripural
PTMD	Peça terminal da Nadadeira Dorsal
RDPT	Radiais da Nadadeira Peitoral
RDPL	Radiais da Nadadeira Pélvica
RDA	Radiais Distais da Nadadeira Anal
RDD	Radiais Distais da Nadadeira Dorsal

RPA	Radiais próximo-mediais da Nadadeira Anal
RPD	Radiais próximo-mediais da Nadadeira Dorsal
RA	Raios da Nadadeira Anal
RD	Raios da Nadadeira Dorsal
RPT	Raios da Nadadeira Peitoral
RPL	Raios da Nadadeira Pélvica
RC	Raios Principais da Nadadeira Caudal
RPCD	Raios Procorrentes Dorsais
RPCV	Raios Procorrentes Ventrais
SNW	Supraneurais Pós-Aparelho de Weber
SN3	Supraneural 3

Outras Abreviaturas

CI	Intervalo de Confiança
DPE	Dias Pós-Eclosão
OSA	Análise das Sequências Ontogenéticas
Evo-Devo	Biologia Evolutiva do Desenvolvimento

SUMÁRIO

1	Contextualização Teórica.....	23
1.2	Glossário	34
2	Introdução	36
3	Material e Métodos.....	43
3.1	Avaliação das variáveis morfológicas.....	44
3.1.1	Padronização dos Métodos de Mensuração.....	44
3.1.2	Coleta de dados	44
3.1.3	Análise dos dados	45
3.2	Manipulação das Condições de Desenvolvimento em Laboratório	46
3.2.1	Aclimação e Manutenção	46
3.2.2	Coleta, Fixação e Preservação.....	48
3.3	Morfologia Externa	49
3.3.1	Obtenção e processamento dos dados	49
3.3.2	Análise dos dados	49
3.4	Análise Osteológica.....	51
3.4.1	Diafanização.....	52
3.4.2	Obtenção e processamento dos dados	52
3.4.3	Análise dos dados	54
3.5	Expressão Gênica	55
3.5.1	Obtenção dos dados.....	55
3.5.2	Análise dos dados.....	57
4	Resultados	58
4.1	Avaliação das variáveis morfológicas.....	58
4.2	Condições de Desenvolvimento: Morfologia Externa	60
4.3	Condições de Desenvolvimento: Análises Osteológicas.....	83
4.3.1	Tempo de desenvolvimento das estruturas osteológicas	83
4.3.2	Variação das Sequências Ontogenéticas	93
4.4	Expressão Gênica	101
5	Discussão.....	104
6	Literatura Citada.....	109

7	Anexos.....	124
7.1	Anexo A - Scripts R	124
7.2	Anexo B - Protocolo de Diafanização.....	126
7.3	Anexo C - Protocolo das Análises de Sequências Ontogenéticas (OSA)	128
7.4	Anexo D - Dados das Coleções Ictiológicas	130
7.5	Anexo E - Dados da Morfologia Externa.....	142
7.6	Anexo F - Aparecimento das estruturas cartilaginosas e ósseas	157
7.7	Anexo G - Arquivos NEXUS das matrizes de Condrificação e Ossificação	159
7.8	Anexo H - Árvores Consenso com Sinapomorfias mapeadas.....	167
7.9	Anexo I - Extração de RNA e qPCR.....	175

1 Contextualização Teórica

Origem da Variação Fenotípica

A biologia evolutiva é uma ciência que estuda mudanças fenotípicas ao longo do tempo, e essa mesma ciência por muito tempo considerou variações nos dados como ruído (West-Eberhard, 2005). Entretanto, considerar a variação intraespecífica é fundamental para a explicação de padrões observados nas trajetórias evolutivas. Para compreendermos a importância da variação fenotípica para o processo evolutivo, o primeiro passo consiste em definir a variação e suas origens.

A natureza da variação fenotípica é um problema complexo (Kirschner & Gerhart, 2010). Antes da Síntese Moderna, não se sabia ao certo a origem da variação sobre a qual a Seleção Natural iria agir e nem os meios pelos quais essa variação poderia ser herdada. Com a incorporação da Genética e outras contribuições da Síntese Moderna para a Teoria Evolutiva, os mecanismos responsáveis pelo surgimento da variação fenotípica começaram a ser elucidados. Porém, por muito tempo, a explicação para a origem dessa variação e, conseqüentemente, das novidades evolutivas, estava atrelada exclusivamente a mudanças genéticas (West-Eberhard, 2005; Freeman & Herron, 2007; Klingenberg, 2019), especificamente por mutações pontuais em genes associados a funções específicas (West-Eberhard, 2003).

Conforme o arcabouço teórico e as ferramentas para o estudo da Biologia Evolutiva foram sendo expandidos e aprimorados, a explicação pautada apenas na informação genética dos organismos (Genótipo) já não era mais suficiente para explicar a complexidade dos processos observados. A partir desse momento, ocorre uma ampliação da visão tradicional atrelada à ideia de que todos os organismos vivos estão, inevitavelmente, sujeitos aos processos de desenvolvimento e a interações com o ambiente ao seu redor, seja ele a atmosfera, outro organismo ou uma célula. Portanto, dilui-se a ideia de genes como protagonistas na origem da variação, e o Fenótipo passa a assumir uma posição central na explicação dos processos evolutivos (Bradshaw, 1965; West-Eberhard, 2003).

É importante ressaltar que os conceitos anteriormente estabelecidos pela Teoria da Evolução proposta por Darwin e pela Síntese Moderna não deixam de ser considerados na explicação dos processos evolutivos. Na configuração atual, são

acrescentados novos conceitos e mecanismos que, juntamente com os conceitos já consolidados, estabelecem uma perspectiva mais ampla e multifacetada do processo evolutivo (Laland *et al.*, 2014, 2015) (Figura 1).

Figura 1 Conceitos relacionados à Teoria Evolutiva. Adaptado de (Fábregas-Tejeda & Vergara-Silva, 2018) e (Pigliucci & Muller, 2010).

Evolução e Desenvolvimento

De acordo com a Teoria da Seleção Natural, a evolução do fenótipo ocorre por meio da sobrevivência e reprodução diferencial dos indivíduos que exibem determinados traços seletivamente vantajosos em relação aos outros indivíduos dentro da população (Pigliucci & Muller, 2010). A existência de variação fenotípica é, portanto, indispensável para o processo evolutivo, pois representa o substrato para ocorrência dos mecanismos evolutivos (Kirschner & Gerhart, 2010). A evolução por Seleção Natural age como um filtro sobre a distribuição da variação fenotípica já existente entre indivíduos que, por sua vez, resultam dos processos de desenvolvimento. Consequentemente, a variação fenotípica, revelada pelos processos de desenvolvimento, é pré-requisito para a evolução por Seleção Natural (Sears, 2014).

Embora o contexto epistêmico atual permita a elucidação desse paralelo de maneira tão clara, por muitos anos as linhas de pesquisa da Biologia Evolutiva e da Biologia do Desenvolvimento permaneceram parcialmente ou totalmente dissociadas (Love & Raff, 2003; Marques-Souza *et al.*, 2012). Apesar da existência de estudos anteriores que estabeleceram o diálogo entre essas duas áreas, foi com o advento da Biologia Evolutiva do Desenvolvimento, ou Evo-Devo, que o paralelo entre o estabelecimento do fenótipo ao longo do desenvolvimento e a diversidade fenotípica dirigida por processos evolutivos passou a ser o eixo central de alguns programas de pesquisa (West-Eberhard, 2003).

Uma das questões centrais da Evo-Devo consiste em compreender os mecanismos de desenvolvimento relacionados com as novidades evolutivas (Müller, 2007; Sanger & Rajakumar, 2019). Uma vez que todo fenótipo adulto passou pelo processo de desenvolvimento, uma das formas de compreender os mecanismos responsáveis pela mudança fenotípica ou novidade evolutiva reside na avaliação do desenvolvimento das estruturas de interesse e do organismo como um todo (Jeffery, 2009a). O desenvolvimento, por sua vez, não é apenas uma tradução da matriz G (Genótipo) para a matriz F (Fenótipo); em outras palavras, os processos de multiplicação e diferenciação celular no embrião não consistem apenas em traduzir a informação genética (Stearns & Hoekstra, 2000; Nishikawa & Kinjo, 2018). A dinâmica e a mudança das interações entre genes expressos no desenvolvimento ao longo do tempo e espaço revelam propriedades emergentes exclusivas dos sistemas de desenvolvimento. Essas propriedades são capazes tanto de restringir quanto de potencializar a variação, em possíveis desdobramentos que constituem o chamado Viés do Desenvolvimento ou *Developmental Bias* (Laland *et al.*, 2015; Uller *et al.*, 2018).

Dado que os processos de desenvolvimento atuam com as “ferramentas” disponíveis (informação genética e sinais ambientais), algumas trajetórias são inexequíveis e, apesar das várias possibilidades existentes, ocorrem algumas limitações no que diz respeito aos possíveis fenótipos revelados - é nesse sentido que o desenvolvimento age restringindo a variação. Esse mecanismo está relacionado com o conceito de Canalização proposto por Waddington (1942). Por outro lado, esse mesmo conjunto de informações genéticas e sinais ambientais está sujeito a alterações que podem originar trajetórias de desenvolvimento inéditas e, eventualmente, novidades evolutivas (Psujek & Beer, 2008; Parsons *et al.*, 2019). Uma das “ferramentas” mais

importantes descritas pela Evo-Devo consiste no conjunto de genes regulatórios, que são genes envolvidos no controle da expressão de um ou mais genes (Schlichting & Pigliucci, 1993). Muitos desses genes são fatores de transcrição envolvidos em diversas cascatas de sinalização e diferentes vias de desenvolvimento. Pequenas alterações nessas vias de desenvolvimento podem ser suficientes para desencadear grandes alterações no estabelecimento do fenótipo (Sears, 2014; Sultan, 2015), como descrito para o formato dos dentes em mamíferos (Jernval, 2000) e para a diversificação craniofacial em peixes ciclídeos (Albertson et al., 2005). Nesse sentido, é importante ressaltar que os genes, ou o genótipo, só afetam o fenótipo quando são expressos e, uma vez que isso ocorre ao longo do estabelecimento do fenótipo, fica evidente a importância da ontogenia para compreender como processos de desenvolvimento influenciam trajetórias evolutivas (West-Eberhard, 2005).

Evolução, Desenvolvimento e Ambiente

A ampliação da perspectiva dos mecanismos responsáveis pelos processos evolutivos e a alocação do Fenótipo como elemento central desse processo resalta a importância de estudos acerca dos processos de estabelecimento do fenótipo durante o desenvolvimento. Processos de estabelecimento do fenótipo não estão isentos de interferências internas e externas. Sinais ambientais de diversas origens, bióticas e abióticas, são percebidos de diferentes formas pelos organismos em desenvolvimento (Gilbert, 2001). Portanto, o ambiente no qual os indivíduos estão inseridos tem um papel que ultrapassa as pressões de Seleção que agem como um filtro, dado seu potencial de induzir novas variantes fenotípicas (Lofeu & Kohlsdorf, 2015) (Figura 2). Existe um desequilíbrio na visão tradicional do processo evolutivo na literatura vigente, no que tange a contribuição de fatores genéticos e ambientais no estabelecimento dos fenótipos (West-Eberhard, 2003). Uma caracterização adequada da organização fenotípica, incluindo os eventos que ocorrem durante o estabelecimento do fenótipo, presume a incorporação da influência do ambiente, não apenas como seletor da variação expressa, mas também como indutor de variação nas discussões acerca do tema (West-Eberhard, 2003).

Figura 2 Esquema ilustrando os processos envolvidos no estabelecimento de variantes fenotípicas e o papel do ambiente em mecanismos de desenvolvimento e evolução por Seleção Natural.

A resposta dos organismos a diferentes combinações dos sinais ambientais é denominada Plasticidade Fenotípica, uma propriedade intrínseca dos sistemas de desenvolvimento de produzir formas fenotípicas alternativas que podem diferir quanto à morfologia, fisiologia ou comportamento em resposta às condições ambientais (Stearns, 1989; West-Eberhard, 1989, 2005; Taborsky, 2017). A literatura vigente congrega diversos exemplos de como diferentes tipos de sinais ambientais podem agir no estabelecimento do fenótipo em vários níveis e sistemas biológicos (Sultan, 2007; Moczek, 2015; Burggren & Dubansky, 2018). Esses sinais ambientais agregam tanto fatores bióticos, como a presença de predadores, quanto abióticos, como a salinidade (Gilbert, 2001; Gilbert & Epel, 2009). Por exemplo, um sinal ambiental que interfere diretamente no desenvolvimento é o fotoperíodo que, relacionado com a sazonalidade, pode influenciar os padrões de coloração das asas das borboletas (Kingsolver & Huey, 1998; Nijhout, 1999). Outro sinal ambiental com clara influência nos padrões fenotípicos é a temperatura de desenvolvimento, que afeta o fenótipo morfológico de

diferentes espécies de borboletas tropicais (Van Bergen *et al.*, 2017). O efeito da temperatura no estabelecimento do fenótipo e nas respostas plásticas também pode ser observado na morfologia foliar das plantas (Atkin *et al.*, 2006), no tamanho, formato do corpo, taxas de crescimento e desempenho em lagartos (Shine, Elphick, & Harlow, 1997), no desempenho de natação (Watkins & Vraspir, 2006) e no comprimento dos membros e tempo para completar a metamorfose em girinos (Gomez-Mestre & Buchholz, 2006), além do crítico máximo em diferentes espécies de anuros (Simon, 2010; Simon, Ribeiro, & Navas, 2015).

É importante ressaltar que a variação observada em populações naturais, mesmo quando apresentando forte correlação com o ambiente, só pode ser atribuída à Plasticidade Fenotípica se essa for formalmente investigada ao longo da ontogenia de indivíduos expostos a diferentes condições ambientais (Dewitt & Scheiner, 2004). Com essa abordagem, são discriminadas diferentes ações do ambiente (Moore, 2003): 1) pode agir como filtro, essencialmente discriminando quais processos de desenvolvimento serão estabelecidos e quais não são possíveis em determinado organismo; 2) pode fornecer sinais para o desenvolvimento, percebidos pelos organismos e incorporados nos processos de multiplicação ou diferenciação celular e tecidual; 3) o próprio ambiente pode ser modificado pelos organismos em desenvolvimento que interagem neste ambiente; e 4) o ambiente também representa as interações mecânicas e químicas entre células e tecidos do próprio organismo, então fatores como pressões osmóticas ou motores moleculares podem interagir e possibilitar diferentes padrões de desenvolvimento. A responsividade dos sistemas em desenvolvimento aos sinais ambientais também depende da janela ontogenética em que ocorre a perturbação ou contato com o sinal ambiental, e é possível que respostas mais acentuadas aos sinais ambientais ocorram em janelas do desenvolvimento mais sensíveis ao parâmetro em questão (Fawcett & Frankenhuis, 2015).

O efeito do ambiente no estabelecimento do fenótipo e as respostas plásticas derivadas podem ser ilustrados graficamente por Normas de Reação, um termo proposto por Woltereck (1909) e definido como a representação dos fenótipos que podem ser produzidos por um mesmo genótipo quando esse é exposto a diferentes ambientes; de maneira mais contextualizada com o atual panorama integrado, seria a representação gráfica da responsividade dos sistemas de desenvolvimento a fatores ambientais (Stearns, 1989; Schlichting & Pigliucci, 1998). Geralmente, as normas de reação são

construídas a partir das respostas plásticas de uma característica fenotípica específica com relação a um sinal ambiental único, por exemplo, a relação entre tamanho corpóreo e temperatura (Stearns & Hoekstra, 2000). Normas de reação com pouca inclinação podem refletir processos de canalização (linha ‘a’ da Figura 3), a partir dos quais as possibilidades de variação teriam sido restringidas por propriedades do desenvolvimento e os fenótipos são similares independente da condição ambiental. Por outro lado, normas de reação representadas por retas com inclinações acentuadas sugerem que o ambiente afeta significativamente o estabelecimento do fenótipo (linha ‘b’ da Figura 3). As normas de reação auxiliam na identificação das respostas plásticas, as quais estariam associadas a normas de reação com inclinações diferentes de zero (Schlichting & Pigliucci, 1998; Stearns & Hoekstra, 2000; West-Eberhard, 2003). Adicionalmente, genótipos também podem diferir na magnitude das respostas plásticas, ou expressar diferentes fenótipos apenas em condições ambientais específicas (Sultan, 2007; Lofeu & Kohlsdorf, 2015).

Figura 3 Normas de Reação hipotéticas. (a) Norma de reação não-plástica. (b) Norma de reação plástica. Adaptado de Schlichting & Pigliucci (1998).

Outra questão importante a ser discutida sobre os sinais ambientais é que apesar das representações gráficas normalmente avaliarem a relação entre um sinal ambiental isolado e a resposta plástica em um traço fenotípico específico, os processos de

desenvolvimento que ocorrem ao longo do estabelecimento são altamente integrados (Forsman, 2015). Componentes do fenótipo morfológico, fisiológico, funcional e comportamental são indissociáveis, e os ambientes nos quais esses organismos estão inseridos são complexos e integram simultaneamente diferentes sinais; portanto, estudos de Plasticidade que congregam diferentes sinais ambientais e diferentes aspectos responsivos do fenótipo são fundamentais para a compreensão dos processos envolvidos nas respostas plásticas (Stillwell *et al.*, 2007; Bonini-Campos *et al.*, 2019).

Consequências Evolutivas da Plasticidade Fenotípica

Os conceitos e processos sintetizados por Baldwin (Baldwin, 1896), Waddington (Waddington, 1942) e Schmalhausen (Schmalhausen, 1949) foram integrados por West-Eberhard em seu livro seminal (2003), que integra as ferramentas, os exemplos e o arcabouço conceitual existentes para discutir as possíveis influências da Plasticidade Fenotípica no processo evolutivo (Pigliucci & Muller, 2010). A literatura vigente reconhece quatro passos fundamentais para ocorrência de mudanças evolutivas: 1) Uma novidade afeta um (no caso de mutação) ou vários (no caso de mudanças ambientais) indivíduo(s) em uma população; 2) Devido à Plasticidade inerente dos sistemas de desenvolvimento, são observadas acomodações fenotípicas à nova condição, e novos fenótipos são revelados; 3) A propagação da novidade fenotípica pode ser rápida (se estiver relacionada com fatores ambientais) ou lenta (se estiver relacionada com uma imposição genética); e 4) Se a novidade fenotípica for favorável, será fixada por Seleção Natural, estabilizando seu aparecimento por meio da alteração da arquitetura genética, em processo denominado acomodação genética (West-Eberhard, 2003; Pigliucci & Muller, 2010) (Figura 5).

Figura 4 Relação entre conceitos e processos relacionados ao surgimento e estabelecimento de variantes fenotípicas ao longo do processo evolutivo. Adaptado de Laland et al. (2015).

A Plasticidade Fenotípica pode afetar significativamente as trajetórias das mudanças evolutivas pelo incremento de novas variantes fenotípicas de maneira rápida e representativa (Pfennig *et al.*, 2010; Hendry, 2016), mas também envolve custos que devem ser considerados (Murren *et al.*, 2015). Por ser intrínseca aos sistemas em desenvolvimento, a Plasticidade Fenotípica é uma característica também passível de Seleção (DeWitt, Sih, & Wilson, 1998; Nijhout, 2003; West-Eberhard, 2003). Durante processos de assimilação genética, a Seleção sucessivamente fixa uma trajetória de desenvolvimento específica (Nishikawa & Kinjo, 2018), reforçando sua expressão ou declinando as trajetórias de desenvolvimento subjacentes aos fenótipos alternativos (Schneider & Meyer, 2016). Esses mecanismos estão associados com a canalização das vias de desenvolvimento passíveis de serem percorridas pelos indivíduos ao longo da sua ontogenia. Também existe a possibilidade das trajetórias evolutivas propiciarem a manutenção do potencial plástico de determinadas características, principalmente em situações nas quais os organismos experimentam flutuações ambientais frequentes e condições de desenvolvimento instáveis (DeWitt *et al.*, 1998; West-Eberhard, 2003).

Uma das situações na qual o papel da Plasticidade Fenotípica pode ser destacado seria ilustrada por mudanças extremas das condições ambientais (Sultan, 2007; Lande, 2009; Chevin, Lande, & Mace, 2010; Schneider & Meyer, 2016). Um fator ambiental que apresenta um alto índice de variação e que pode afetar significativamente o estabelecimento dos fenótipos e as pressões de Seleção impostas é a temperatura (Kingsolver & Huey, 1998; Valladares *et al.*, 2014; Bonamour *et al.*, 2019). Dentre as consequências evolutivas da Plasticidade Fenotípica em relação a mudanças do componente térmico das condições ambientais experimentadas ao longo da ontogenia podemos citar a influência da flutuação da temperatura em populações de *Drosophilla* (Manenti *et al.*, 2016) e a divergência fenotípica em peixes de água doce decorrente de mudanças climáticas (Kavanagh *et al.*, 2010).

As diferentes trajetórias de desenvolvimento subjacentes aos fenótipos estabelecidos por respostas plásticas podem ser caracterizadas por meio dos padrões de expressão gênica e suas divergências (Schneider & Meyer, 2016). Investigar a expressão gênica diferencial entre fenótipos revelados e seus papéis específicos nas vias de desenvolvimento e, conseqüentemente, no estabelecimento das respostas fenotípicas, pode auxiliar no entendimento das consequências da Plasticidade Fenotípica para as trajetórias evolutivas (Schlichting & Smith, 2002), ilustradas nos modelos de *plasticity-first* ou diversificação guiada por Plasticidade (Young, 2013; Levis & Pfennig, 2016) e no potencial de respostas plásticas não-adaptativas (Ghalambor *et al.*, 2015). A expressão de diferentes genes relacionados com as respostas plásticas dos organismos foi estudada em diferentes sistemas biológicos e para diferentes sinais ambientais, como diferenças nos níveis de expressão gênica em resposta à temperatura (Dayan, Crawford, & Oleksiak, 2015) e à dieta (Schneider *et al.*, 2014) em peixes, e também em *Drosophilla* (Chen, Nolte, & Schlotterer, 2015), e respostas a diferentes sinais ambientais decorrentes da sazonalidade em borboletas (Oostra *et al.*, 2018).

Dentre os genes descritos na literatura como associados à Plasticidade dos sistemas de desenvolvimento e origem de novas variantes fenotípicas estão as Proteínas Morfogenéticas Ósseas, ou *Bone Morphogenetic Proteins*. Essas proteínas estão envolvidas na formação de fenótipos bastante específicos, desde as carapaças das tartarugas e as asas dos morcegos até exemplos bastante conhecidos na Biologia Evolutiva e que guardam relação com o ambiente, como a mandíbula de peixes ciclídeos e o bico dos tentilhões de Darwin, ambos relacionados com a dieta (Young &

Badyaev, 2007). É plausível propor que os processos de evolução dessas estruturas esteja relacionado com mecanismos de acomodação genética descritos anteriormente, dado que as respostas plásticas foram estabilizadas nas populações atuais desses sistemas e apresentam um significado adaptativo (Pigliucci & Muller, 2010).

Considerando a importância de novas variantes fenotípicas para o processo evolutivo, como descrito anteriormente, o endereçamento da origem dessa variação representa uma importante linha de investigação na elucidação das trajetórias evolutivas. Nesse sentido, estudos que avaliam os efeitos do ambiente no estabelecimento do fenótipo dessas variantes contribuem para o arcabouço conceitual da área, acrescentando explicações para origem da variação fenotípica. Adicionalmente, contribuem para o entendimento das trajetórias evolutivas dos grupos, pois esses fenótipos expressos estão sujeitos aos mecanismos e processos evolutivos.

1.2 Glossário

Acomodação Fenotípica: ajuste entre aspectos variáveis do fenótipo e imposições novas ou incomuns (internas ou externas) durante o desenvolvimento, com valor adaptativo e sem alterações genéticas (West-Eberhard, 2005).

Acomodação Genética: processo pelo qual os fenótipos inicialmente induzidos pelo meio ambiente são selecionados, resultando em variações hereditárias que influenciam a expressão desses fenótipos (West-Eberhard, 2005).

Assimilação Genética: processo pelo qual um fenótipo cujo desenvolvimento foi desencadeado por um estímulo ambiental passa ser expresso mesmo que não haja mais a influência do ambiente (West-Eberhard, 2003; Nishikawa & Kinjo, 2018).

Ambiente: o que está ao redor do traço ou do indivíduo. O ambiente pode ser interno ao indivíduo, como os produtos gênicos, células e tecidos, ou externo, como fatores bióticos e abióticos (West-Eberhard, 2003).

Aptidão: parâmetro referente à sobrevivência e reprodução de indivíduos em uma população que quantifica sua contribuição genética para as próximas gerações (West-Eberhard, 2003).

Canalização: amortecimento da sensibilidade do desenvolvimento de características fenotípicas a perturbações genéticas e ambientais (Müller, 2007).

Desenvolvimento: conjunto de mudanças biológicas associadas com morfogênese, crescimento e diferenciação durante o ciclo de vida dos organismos, que revela padrões fenotípicos individuais (Gilbert & Epel, 2009).

Evolvabilidade: potencial de produzir variação fenotípica herdável (Muller, 2007). Para a genética quantitativa, é o potencial de produzir respostas alinhadas aos vetores de seleção (Pavlicev, Cheverud, & Wagner, 2011).

Fenótipo: todas as características que constituem os organismos e foram estabelecidas durante o desenvolvimento, incluindo a morfologia, a fisiologia e o comportamento (Do grego *phainein*, que significa mostrar, e *typos*, que significa tipo).

Flexibilidade: termo utilizado como sinônimo de Plasticidade Fenotípica; note que, para alguns autores como Stearns (1989), as respostas irreversíveis ao ambiente representam a Plasticidade e as respostas reversíveis representam a Flexibilidade.

Heterocronia: dissociação do tempo relativo dos eventos de desenvolvimento entre a ontogenia de um ancestral e seus descendentes (Raff, 1996) ou mudança evolutiva no tempo dos eventos de desenvolvimento (Muller, 2007). Quando aplicada no contexto de Plasticidade Fenotípica, compara ontogênias de diferentes indivíduos da mesma espécie expostos a diferentes condições ambientais (Schmidt & Starck, 2010).

Mapa Genótipo-Fenótipo (G-F): caracterização matemática da correspondência de uma série de genótipos a um conjunto de fenótipos (Muller, 2007).

Normas de reação: descrição dos fenótipos que podem ser produzidos por um mesmo genótipo quando exposto a diferentes ambientes (Woltreck, 1909) ou a representação gráfica da responsividade dos sistemas de desenvolvimento a fatores ambientais (Stearns & Hoekstra, 2000).

Ontogenia: trajetória individual de um organismo desde a fertilização até a morte (Do grego *ontos*, que significa ser, e *geneia* que significa modo de produção).

Plasticidade Fenotípica: propriedade intrínseca dos sistemas de desenvolvimento de produzirem formas fenotípicas alternativas que podem diferir quanto à morfologia, fisiologia ou comportamento em resposta a diferentes condições ambientais (West-Eberhard, 2005). Alguns autores sinonimizam com Responsividade.

Variação Genética Críptica: variação genética que normalmente tem pouco ou nenhum efeito na variação fenotípica, exceto em condições ambientais novas ou estressantes (Levis & Pfennig, 2016).

2 Introdução

A incorporação da Plasticidade Fenotípica no estudo de processos evolutivos promove uma perspectiva integrada para a investigação das interações gene-ambiente, no denominado problema *nature-nurture* (Pigliucci, 2001). A Plasticidade Fenotípica é atualmente um dos fenômenos biológicos mais estudados na literatura da Biologia Evolutiva, com corpo de conhecimento avançando constantemente acerca dos fundamentos genéticos/moleculares envolvidos, o papel do ambiente no qual os organismos estão inseridos, e a dinâmica dos mecanismos evolutivos (Pigliucci & Muller, 2010). Como discutido na ‘Contextualização Teórica’ da presente dissertação, a Plasticidade Fenotípica é uma propriedade emergente intrínseca do fenótipo em desenvolvimento que congrega respostas a sinais ambientais durante o estabelecimento do fenótipo morfológico, fisiológico e comportamental. Essa propriedade vem sendo amplamente estudada em diferentes níveis de organização e sistemas biológicos, sendo investigadas também as diferentes combinações de fatores ambientais que influenciam as respostas plásticas (West-Eberhard, 2003; Bonini-Campos et al., 2019).

A influência do ambiente no estabelecimento do fenótipo é bastante evidente em alguns organismos, como peixes, nos quais a ontogenia não é um processo estável e depende consideravelmente das condições ambientais (Koumoundouros *et al.*, 2001). As respostas plásticas dos peixes a diferentes sinais ambientais foi intensamente investigada nos estudos de Plasticidade Fenotípica em ectotermos (Dimitriadi *et al.*, 2018; Georga e Koumoundouros, 2010), e existem registros para teleósteos de diversos tipos de respostas plásticas ambientalmente induzidas durante estágios ontogenéticos iniciais (Georgakopoulou *et al.*, 2006). Diversas situações resultam em alterações fenotípicas relacionadas com desafios ambientais de diferentes naturezas, principalmente relacionados à alimentação e à locomoção (Dimitriadi *et al.*, 2018).

Ambientes aquáticos podem congregam grande variabilidade em parâmetros bióticos e abióticos (Langerhans *et al.*, 2003). Dentre os fatores bióticos que podem influenciar o estabelecimento do fenótipo em peixes, menciona-se a disponibilidade e dureza de presas, a presença de predadores, e a competição intra- e inter-específica por recursos. Os fatores abióticos, por sua vez, congregam parâmetros como salinidade, pH, temperatura, luminosidade e fluxo de água. Trabalhos investigando a Plasticidade Fenotípica em peixes abrangem um amplo espectro desses sinais ambientais. Alguns estudos relacionam a dieta com o formato do corpo (Wimberger, 1992) e a maxila

faríngea (Witte, Barel, & Hoogerhoud, 1990; Gunter *et al.*, 2013), outros relacionam o formato do crânio com estresses mecânicos durante o desenvolvimento (Hu & Albertson, 2017), o formato do corpo com o fluxo de água (Keeley, Parkinson, & Taylor, 2007), e a quantidade e o diâmetro das fibras musculares com a temperatura (Johnston, 2006). Também existem estudos que integram mais de um sinal ambiental, como temperatura e luminosidade (Kwain, 1975), temperatura, salinidade e concentração de oxigênio (Schmidt & Starck, 2010), além de combinar diferentes sinais ambientais e avaliar mais de um aspecto do fenótipo, como variáveis morfológicas e comportamentais (Bonini-Campos *et al.*, 2019)

Um dos fatores abióticos com efeito significativo sobre o estabelecimento do fenótipo na ontogenia reside no regime térmico de desenvolvimento (Blaxter, 1992). Mudanças na temperatura ambiental podem afetar diretamente funções biológicas em populações naturais, e parâmetros fenotípicos de animais ectotermos frequentemente apresentam forte associação com a temperatura do ambiente de desenvolvimento (Dammerman, Steibel, & Scribner, 2016). Estudos prévios sugerem que, dentro de uma zona de tolerância, a temperatura afeta o estabelecimento do fenótipo dos peixes de maneira acentuada e em diferentes níveis de organização (Blaxter, 1992). A influência da temperatura no estabelecimento do fenótipo em peixes foi descrita para diversas variáveis morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Georga & Koumoundouros, 2010; Dimitriadi *et al.*, 2018), com destaque para o desempenho de natação (Koumoundouros *et al.*, 2009), o formato do corpo (Georgakopoulou *et al.*, 2007; Dammerman *et al.*, 2016), a determinação sexual (Chalde *et al.*, 2011), as taxas de crescimento e diferenciação (Koumoundouros *et al.*, 2001; Loizides *et al.*, 2014), os aspectos da história de vida (Jonsson & Jonsson, 2014; Shama, 2017), o desenvolvimento da musculatura (Johnston, 2006), o sistema cardiovascular (Dimitriadi *et al.*, 2018), a capacidade de tolerância térmica (Schaefer & Ryan, 2006), a diapausa (Podrabsky, Garrett, & Kohl, 2010), o desenvolvimento de nadadeiras (Chalde *et al.*, 2011) e o número de caracteres merísticos (Lindsey & Harrington, 1972; Harrington & Crossman, 1976; Georgakopoulou *et al.*, 2007; Sfakianakis *et al.*, 2011; Corral & Aguirre, 2019). Os genes envolvidos em algumas dessas respostas plásticas já foram identificados, com descrição de seus níveis diferenciais de expressão segundo as condições de desenvolvimento (McClelland *et al.*, 2006; Hu & Albertson, 2017; Politis *et al.*, 2017).

Os efeitos da temperatura do ambiente de desenvolvimento podem diferir quantitativamente conforme o estágio da ontogenia (Grünbaum *et al.*, 2007; Georga & Koumoundouros, 2010; Podrabsky *et al.*, 2010), e podem ter consequências duradouras que afetam diversos aspectos do fenótipo (Jonsson & Jonsson, 2014; Loizides *et al.*, 2014). Tais efeitos de diferentes regimes térmicos parecem mais pronunciados durante o estágio larval (Kamler, 2012), no qual diferenças na temperatura podem desencadear considerável variação (Martell, Kieffer, & Trippel, 2005), que se manifesta com diferentes magnitudes e em diversos níveis do fenótipo expresso (Green & Fisher, 2004). Em peixes, a Plasticidade Fenotípica morfológica resultante de diferentes sinais ambientais também é frequentemente atribuída ao efeito diferencial de regimes térmicos nas taxas de crescimento relativo e diferenciação de estruturas durante a ontogenia, reconhecido como uma Plasticidade alométrica induzida pela temperatura (Koumoundouros *et al.*, 2001). Diversos estudos se dedicaram a caracterizar os efeitos da temperatura nas taxas de crescimento e diferenciação durante o desenvolvimento de peixes ósseos, com destaque para os trabalhos com peixes marinhos desenvolvidos por Koumoundouros *et al.* (2009b); Chalde *et al.* (2011); Dolomatov, Zukow, & Brudnicki (2013); Jonsson & Jonsson (2014).

Além da influência da temperatura sobre parâmetros morfológicos, variações nos regimes térmicos dos sistemas de desenvolvimento também podem produzir diferenças temporais entre sequências de condriificação - formação da cartilagem - e ossificação (Cubbage & Mabee, 1996a; Mabee, Olmstead, & Cubbage, 2000; Georgakopoulou *et al.*, 2010; Sfakianakis *et al.*, 2011). A indissociável relação entre forma e função durante a ontogenia e os desafios ambientais experimentados por larvas da maioria de espécies de peixes é refletida em um padrão básico das sequências ontogenéticas (Koumoundouros *et al.*, 2001; Hu & Albertson, 2017). Entretanto, essas sequências, assim como outros aspectos fenotípicos dos peixes, não são estáveis (Koumoundouros *et al.*, 2001).

A Plasticidade Fenotípica no desenvolvimento de estruturas ósseas é um tópico que atrai bastante interesse, especialmente devido à investigação dos mecanismos envolvidos na responsividade de estruturas rígidas (West-Eberhard, 2003). A lei de Wolff se refere à maleabilidade dos ossos submetidos a diferentes regimes de uso ou estresse durante o desenvolvimento (Wolff, 2010). Nessas condições, as respostas plásticas das variantes morfológicas podem ser tão acentuadas a ponto de serem

confundidas com variação genética, como exemplificado pela mudança no estabelecimento do fenótipo morfológico do crânio das hienas devido a diferenças na dieta durante o desenvolvimento (Holekamp & Smale, 1998). Também já foi descrito em peixes ósseos esse potencial de maleabilidade das estruturas ósseas durante o desenvolvimento (Suniaga *et al.*, 2018). Na ontogenia dos peixes, as primeiras estruturas do esqueleto começam a aparecer antes da eclosão, e estão majoritariamente associadas à alimentação e à locomoção. Essas estruturas que compõem o esqueleto congregam ossos dérmicos, formados por ossificação intramembranosa, e ossos endocondrais, que possuem precursores cartilagosos (Riera-Heredia *et al.*, 2018). Durante o desenvolvimento, a temperatura é um dos fatores que exerce maior influência no estabelecimento do fenótipo morfológico, tanto no que diz respeito ao tempo de ossificação, quanto às sequências (Blaxter, 1992; Hall, 2005). As diferenças nos padrões temporais e de sequências de ossificação decorrentes da temperatura do ambiente de desenvolvimento têm sido investigadas em relação ao tempo de ossificação das diferentes estruturas (Sfakianakis *et al.*, 2004), aos genes envolvidos nesse processo (Riera-Heredia *et al.*, 2018), às possíveis trajetórias ontogenéticas alternativas (Cubbage & Mabee, 1996b), e à quantidade de variação nas trajetórias (Mabee *et al.*, 2000). Adicionalmente, peixes que se desenvolvem em temperaturas mais elevadas costumam apresentar valores elevados de variação intraespecífica (Mabee *et al.*, 2000; Cloutier *et al.*, 2010), sugerindo possíveis efeitos da temperatura na magnitude da variação fenotípica.

A demanda energética devido à natação, que pode diferir segundo a intensidade do fluxo de água, também contribui para a diferenciação morfológica, influenciando diversos aspectos do desenvolvimento (Peres-Neto & Magnan, 2004). Alguns estudos relatam associações entre o fluxo de água nas condições de desenvolvimento e as normas de reação e integração fenotípica (Peres-Neto & Magnan, 2004), o número de vértebras (Corral & Aguirre, 2019), o tamanho (Grünbaum *et al.*, 2007) e formato do corpo (Fischer-Rousseau, Chu, & Cloutier, 2010), o formato da nadadeira caudal (Imre, McLaughlin, & Noakes, 2002; Langerhans, Chapman, & DeWitt, 2007), e o tempo de condrificação e ossificação das estruturas (Cloutier *et al.*, 2010; Fiaz *et al.*, 2012). Algumas dessas investigações foram realizadas em populações naturais (Franssen, Stewart, & Schaefer, 2013), inclusive utilizando espécies que ocorrem no Brasil (Sidlauskas, Chernoff, & Machado-Allison, 2006; Barros, Louvise, & Caramaschi,

2019). Também existem comparações entre diferentes espécies quanto à diferenciação fenotípica em resposta ao fluxo de água (Langerhans, 2008), e diferenças entre as médias da quantidade de vértebras e do formato do corpo foram relatadas entre condições experimentais que combinaram fluxo de água e temperatura em peixes *Astyanax mexicanus* (Corral & Aguirre, 2019).

Os exemplos descritos evidenciam a contribuição de estudos que utilizam peixes como sistema biológico para elucidar questões relacionadas à Plasticidade Fenotípica induzida pela temperatura. A ontogenia dos Characiformes, em particular, é um tópico de fomenta o interesse da comunidade científica, dado que este tipo de estudo também pode contribuir para hipóteses de relações filogenéticas no grupo que permanecem incertas (Oliveira *et al.*, 2011; Mirande, 2018). Além da contribuição para a Sistemática e a Taxonomia, entender a influência do ambiente durante o desenvolvimento de peixes Characiformes também abrange o interesse comercial, pois muitas espécies, como a piranha, o dourado e o lambari, são comercializadas por psicultura, e informações ontogenéticas podem contribuir para o manejo adequado e consequente melhoria da qualidade e rendimento da produção (Adamov *et al.*, 2017).

A família Characidae é a mais diversa dentro da ordem dos Characiformes, e também a família com maior número de espécies dentre as que ocupam a região Neotropical, com aproximadamente 1211 espécies válidas (Fricke, Eschmeyer, & Van der Laan, 2020). Os peixes dessa família são amplamente distribuídos entre o sul dos Estados Unidos e a Argentina, compreendendo um amplo gradiente térmico e sendo especialmente diversos nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Prata (Dagosta & de Pinna, 2018). Os Characidae possuem nadadeira adiposa, nadadeira anal evidente e nadadeira caudal bifurcada (Gery, 1977); algumas espécies são comercializadas para aquarismo e popularmente conhecidas como Tetras. A ontogenia de algumas espécies da família Characidae já foi bem descrita (Nogueira, Godinho, & Godinho, 2014) e os eventos de condrificação e ossificação (Mattox, Britz, & Toledo-Piza, 2014) está disponível, inclusive com a osteologia dos peixes miniaturizados (Toledo-Piza, Mattox, & Britz, 2014).

Dentre a família Characidae, o gênero *Astyanax* Baird and Girard (1854) apresenta a combinação dos estados de caráter mais frequentes para a maioria dos caracteres. Consequentemente, esse gênero foi considerado por Eigenmann (1917) como uma condição “menos derivada” dentro da família que, embora reconhecendo que

estados de caráter menos frequentes poderiam ter se originado independentemente em diferentes espécies dentro do mesmo gênero, e definiu *Astyanax* como representante da morfologia geral da família Characidae (Mirande, 2010). Os peixes do gênero *Astyanax* são popularmente conhecidos como Lambaris, sendo distribuídos ao longo de oito bacias hidrográficas brasileiras (Ingenito & Duboc, 2014; De Lucena & Soares, 2016). Os lambaris ocupam desde ambientes lênticos, como lagoas e represas, até ambientes lóticos, como rios e riachos; forrageiam em todos os níveis tróficos e apresentam oportunismo alimentar, explorando recursos tanto de origem autóctone quanto alóctone (Costa-Pereira *et al.*, 2016; Zanata *et al.*, 2017). Adicionalmente, esse organismo vem sendo frequentemente utilizado em estudos experimentais em laboratório, devido ao pequeno porte, fácil manejo, desenvolvimento rápido e longo período de reprodução (Stevanato, 2016). A literatura vigente congrega descrições da osteologia (Ruiz-C. & Román-Valencia, 2006) e ontogenia (morfologia externa, ver Stevanato & Ostrensky, 2018) de *Astyanax*. Os padrões de ossificação do crânio e vias do desenvolvimento também foram detalhadamente descritos, devido ao enorme interesse pelos representantes de caverna de *Astyanax mexicanus* (Filippi 1853), uma espécie que congrega populações com representantes bastante característicos dos ambientes cavernícolas que são utilizadas em diversos estudos populacionais inferindo acerca dos processos evolutivos envolvidos na diferenciação das formas troglóbias (de caverna) em comparação com representantes epígeos (Valdéz-Moreno & Contreras-Balderas, 2003; Menuet *et al.*, 2007; Jeffery, 2009b; Krishnan & Rohner, 2017).

Considerando o arcabouço teórico atual e os exemplos apresentados que investigam o efeito da temperatura no estabelecimento do fenótipo em peixes, o presente trabalho objetivou testar a hipótese de que existem associações entre a temperatura do ambiente de desenvolvimento e a magnitude de respostas plásticas em peixes *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875). A partir dessa hipótese central, foram estabelecidas as seguintes predições derivadas: 1) A temperatura do ambiente de desenvolvimento afeta a magnitude das respostas plásticas associadas ao fluxo de água, com consequente diferença na variação morfológica em torno da média entre os regimes térmicos avaliados; 2) Existem diferenças nas trajetórias ontogenéticas percorridas pelos indivíduos que experimentam diferentes regimes térmicos, e a temperatura pode potencializar as variações nas sequências de ossificação resultantes de respostas plásticas ao fluxo de água diferencial e; 3) Os níveis de expressão gênica dos genes

associados com o desenvolvimento das estruturas ósseas variam segundo as condições de desenvolvimento e a janela ontogenética.

3 Material e Métodos

A abordagem utilizada nesse trabalho visou abranger diferentes níveis de organização biológica, com o objetivo de visualizar um panorama amplo e integrado dos processos de desenvolvimento para responder às questões levantadas. A primeira etapa consistiu na realização de um estudo comparativo da variação morfológica do fenótipo adulto de *Astyanax lacustris* por meio de morfometria linear. O objetivo central dessa análise consistiu em avaliar a variação morfológica intraespecífica em populações naturais. A segunda etapa do trabalho avaliou os efeitos da temperatura na magnitude das respostas plásticas de desenvolvimento ao longo da ontogenia em larvas de *Astyanax lacustris* mantidas em condições controladas no laboratório, testando associações entre as condições de desenvolvimento e os fenótipos revelados, que foram avaliados quanto à morfologia externa, à ossificação e à expressão gênica (Figura 5).

Figura 5 Esquema dos métodos aplicados nesse trabalho com o objetivo de responder perguntas específicas em diferentes níveis de organização. O asterisco (*) indica etapas que requerem estudos subsequentes.

3.1 Avaliação das variáveis morfológicas

A variação intraespecífica das variáveis morfológicas em populações naturais foi avaliada a partir da coleta de medidas lineares obtidas dos exemplares adultos disponíveis em coleções ictiológicas.

3.1.1 Padronização dos Métodos de Mensuração

Com o objetivo de padronizar o método de obtenção de medidas lineares e inferir a taxa de erro inerente ao processo, foram realizadas três medições de cada uma das estruturas morfológicas de interesse em sete espécimes fixados utilizando paquímetro digital (Mitutoyo Inc. $\pm 0,01$ mm). Esse procedimento objetivou verificar a calibração do instrumento de medida e avaliar a consistência entre medidas realizadas pela mesma pesquisadora. A partir dessa análise preliminar, foram selecionadas 10 medidas morfológicas (Figura 6) cuja taxa de erro média foi inferior a 5%: Altura do Pedúnculo Caudal (ALP, erro=1,797), Comprimento do Corpo (SL, erro=1,200), Comprimento da Nadadeira Peitoral (PTL, erro=3,997), Comprimento da Nadadeira Pélvica (PVL, erro=4,902), Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica (PVD, erro=3,387), Altura máxima do Corpo (ALC, erro=1,244), Largura da Cabeça (HW, erro=2,801), Largura máxima do Corpo (MBW, erro=4,559), Largura da Boca (MW, erro=2,482), Distância entre os Olhos (ID, erro=3,712) e 4 medidas cuja taxa de erro média foi inferior a 10%: Comprimento da Nadadeira Adiposa (ADL, erro=6,553), Altura da Nadadeira Adiposa (ADH, erro=8,676), Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal (VAD, erro=6,578) e Largura do Pedúnculo Caudal (CPW, erro=8,156).

3.1.2 Coleta de dados

As medidas foram obtidas em espécimes provenientes de diferentes lotes disponíveis na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da USP São Paulo (MZUSP). O número amostral foi estabelecido de acordo com a disponibilidade de exemplares na coleção segundo a área de coleta. No total foram analisados 210 espécimes de 26 lotes (Anexo D), coletados em diferentes Regiões Hidrográficas Brasileiras, abrangendo áreas que congregam um amplo gradiente térmico ao longo do território brasileiro.

Foram obtidas 14 medidas lineares (ALP; SL; PTL; PVL; PVD; ALC; HW; MBW; MW; ID; ADL; ADH; VAD; CPW; Figura 6) utilizando paquímetro digital.

Figura 6 Medidas Lineares obtidas com auxílio de um paquímetro digital dos espécimes adultos de *Astyanax lacustris* depositados em Coleções Ictiológicas. Vista Lateral (a): ALP - Altura do Pedúnculo Caudal; SL - Comprimento do Corpo; PVL - Comprimento da Nadadeira Pélvica; PVD - Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica; ALC - Altura máxima do Corpo; ADL - Comprimento da Nadadeira Adiposa; ADH - Altura da Nadadeira Adiposa; VAD - Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal. Vista Dorsal (b): HW - Largura da Cabeça; MBW - Largura máxima do Corpo; MW - Largura da Boca; ID - Distância entre os Olhos; PTL - Comprimento da Nadadeira Peitoral; CPW - Largura do Pedúnculo Caudal.

3.1.3 Análise dos dados

Os dados de populações naturais foram analisados por meio de uma Análise de Componentes Principais (PCA), com o objetivo de identificar a contribuição das variáveis morfológicas para a variação intraespecífica observada dentre os espécimes amostrados. Os dados foram inicialmente testados quanto à homogeneidade e

normalidade. As medidas foram logaritmizadas, e foi realizada uma correção alométrica a partir de regressões lineares entre cada uma das variáveis e o tamanho do corpo dos espécimes. Os resíduos das regressões foram utilizados na Análise de Componentes Principais (PCA), implementada utilizando os pacotes *vegan* e *psych* no programa R® versão 3.4.3 no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio® versão 1.0.153 (Anexo A).

3.2 Manipulação das Condições de Desenvolvimento em Laboratório

A etapa experimental desse trabalho consistiu na manipulação em laboratório para estabelecimento de diferentes condições de desenvolvimento, realizada no biotério do *Laboratório de Evolução e Biologia Integrativa* (LEBI-USP) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP). A duração total da manutenção dos peixes no laboratório foi de 61 dias, e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Protocolo n° 2018.5.310.59.6).

3.2.1 Aclimação e Manutenção

Foram utilizadas 1200 larvas com 12 dias pós-eclosão (DPE) da espécie *Astyanax lacustris*, adquiridas junto ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBio, em Pirassununga, Estado de São Paulo. As larvas foram amostradas randomicamente a partir de 600 mil ovos resultantes do cruzamento de 64 fêmeas e 128 machos (taxa de eclosão de aproximadamente 70%). As larvas foram transportadas para o biotério no período da manhã, em um saco plástico específico para o transporte de peixes, com dois terços de oxigênio e dentro de uma caixa térmica. Em seguida, foram submetidas a um período de 5 dias de aclimação, na mesma água da piscicultura, a 23°C e com aeração constante.

Após o período de aclimação, os indivíduos foram distribuídos em aquários medindo 40x16x30 cm, com volume de água de 6L. Os peixes foram divididos em quatro aquários para cada condição de desenvolvimento (quaduplicatas). O estudo foi realizado utilizando quatro condições que diferiram quanto à combinação de regimes térmicos [temperatura *Alta* (26°C) e *Baixa* (20°C)] e fluxo de água (*com fluxo de água* e

sem fluxo de água), resultando nos seguintes ambientes de desenvolvimento: 1) aquário com Temperatura Alta (26°C) Sem Fluxo de água; 2) aquário com Temperatura Alta (26°C) Com Fluxo de água; 3) aquário com Temperatura Baixa (20°C) Sem Fluxo de água; e 4) aquário com Temperatura Baixa (20°C) Com Fluxo de água.

Os 16 aquários (condições de desenvolvimento em quadriplicata) foram acoplados a um sistema com aeração constante e filtro mecânico (manta acrílica), químico (carvão ativado) e biológico (cerâmica para fixação de colônias de bactérias) com vazão de 1000 L/h. O fluxo interno dos aquários foi mantido com bombas de 200 L/h conectadas a um sistema regulado por *timer*, desligado durante a noite e alternado durante o dia, no qual intercalaram entre permanecer ligadas por uma hora e então desligadas na uma hora subsequente, totalizando 6 horas de fluxo diárias.

O controle da temperatura foi realizado utilizando termostatos Atman AT-200 regulados a 28°C, fixados nos tanques de filtragem de água para as condições de desenvolvimento com temperatura alta; o ar condicionado da sala foi mantido a 18°C para as condições de desenvolvimento com temperatura baixa. A temperatura de cada um dos aquários foi confirmada semanalmente ao longo do experimento, as médias e flutuações foram registradas (Tabela 1).

Tabela 1 Registro da Média e Desvio Padrão da temperatura dos aquários para cada uma das Condições de Desenvolvimento.

	Médias da Temperatura nas Condições de Desenvolvimento			
	Temperatura Alta Sem Fluxo	Temperatura Alta Com Fluxo	Temperatura Baixa Sem Fluxo	Temperatura Baixa Com Fluxo
Aquário 1	25,34 [$\pm 0,86$]	25,99 [$\pm 1,88$]	20,90 [$\pm 1,34$]	20,54 [$\pm 0,92$]
Aquário 2	25,14 [$\pm 2,16$]	26,30 [$\pm 1,70$]	20,64 [$\pm 0,79$]	20,88 [$\pm 0,67$]
Aquário 3	26,74 [$\pm 1,36$]	26,46 [$\pm 0,96$]	21,40 [$\pm 0,82$]	21,56 [$\pm 0,61$]
Aquário 4	24,93 [$\pm 2,17$]	27,23 [$\pm 0,39$]	20,94 [$\pm 1,40$]	21,82 [$\pm 0,75$]

A água utilizada para iniciar do sistema foi retirada do lago eutrófico Monte Alegre (Silvia, 1999) localizado no *campus* da USP em Ribeirão Preto (21°11'S 47°43'W), coletada com auxílio de galões de 6 litros e transportada para o bióterio com autorização da Prefeitura do *campus*. Diariamente, a água do sistema era completada utilizando água encanada, após processo de decantação por pelo menos dois dias e condicionada na proporção adequada de Prime Seachem®, para neutralizar a amônia,

auxiliar na remoção do nitrato, nitrito, cloro, cloramina e metais pesados da água de reposição do sistema.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia, no início e no final da manhã e da tarde, com ração comercial farelada para lambari contendo 44% de proteína bruta.

3.2.2 Coleta, Fixação e Preservação

Foram amostrados seis espécimes por aquário (24 por ambiente de desenvolvimento, 96 no total) em intervalos de três dias entre as coletas (Tabela 2). Os seis peixes de um mesmo aquário eram retirados individualmente com auxílio de uma rede e colocados em um aquário de triagem. Os peixes foram eutanasiados utilizando sobredose de solução anestésica de lidocaína (1g/L de água). Dos seis peixes coletados, dois foram fixados em RNA later e congelados em freezer -20 para análises moleculares e quatro foram fixados em formol tamponado 4% para análises morfológicas e osteológicas. Após 24 horas, os espécimes fixados em formol tamponado foram transferidos para uma solução de água destilada e álcool para desidratação, e depois de 48 horas foram armazenados em etanol 70%.

Tabela 2 Relação do número de espécimes amostrados. DPE: Dia Pós-Eclosão.

Amostragem dos espécimes					
Amostra	DPE	Data	Morfologia	Molecular	
1	21	17/01/2019	4 espécimes x 4 aquários x 4 condições de desenvolvimento	64	32
2	24	20/01/2019		64	32
3	27	23/01/2019		64	32
4	30	26/01/2019		64	32
5	33	29/01/2019		64	32
6	36	01/02/2019		64	32
7	39	04/02/2019		64	32
8	42	07/02/2019		64	32
9	45	10/02/2019		64	32
10	48	13/02/2019		64	32
11	51	16/02/2019		64	32
12	54	19/02/2019		64	32
13+	57-72	22/02/2019 a 09/03/2019		96	-
Total:				864	384

Os espécimes foram fotografados em vista lateral, mediante posicionamento em placa de petri com auxílio de um pincel e registro com escala em sistema de captura de

imagem digital por estéreo-microscópio multifoco LEICA acoplado a um computador com Software LAS X *Life Science* (FFCLRP/USP).

3.3 Morfologia Externa

3.3.1 Obtenção e processamento dos dados

Os registros fotográficos dos espécimes foram analisados utilizando o software ImageJ® versão 1.54a. Foram obtidas medidas lineares do Comprimento do Corpo (SL), da Altura do Corpo (ALC) e da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) dos 864 espécimes amostrados (Figura 7).

Figura 7 Registro fotográfico e medidas lineares obtidas (SL: Comprimento do Corpo, ALC: Altura do Corpo e ALP: Altura do Pedúnculo).

3.3.2 Análise dos dados

Com o intuito de comparar as médias e a quantidade de variação resultantes de diferentes condições de desenvolvimento, foram utilizadas três abordagens complementares: 1) Análise de variância (ANOVA) para testar se os grupos diferem quando à média e regressões lineares das variáveis de interesse em relação ao tamanho do corpo para comparação dos resíduos; 2) Regressões por SMA (*Standardized Major Axis*) para investigar as relações alométricas entre o tamanho corpóreo e as demais

variáveis morfológicas, considerando a condição de desenvolvimento como co-variável;

3) Coeficiente de Variação e Homogeneidade das Variâncias para comparar a quantidade de variação nos fenótipos revelados em diferentes condições de desenvolvimento. As taxas de crescimento nas diferentes condições de desenvolvimento também foram calculadas $[(((\text{Tamanho Final}/\text{Tamanho Inicial})^{1/\text{Intervalo}})-1)\times 100]$, uma abordagem complementada pela construção de gráficos das Normas de Reação para a Altura do corpo (ALC) e a Altura do Pedúnculo (ALP) em relação às condições de desenvolvimento.

Comparação entre as médias

Os dados foram inicialmente testados quanto à normalidade e homogeneidade. Para comparação entre grupos, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) para a Altura do Corpo (ALC) e para a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) entre todos os estágios e posteriormente nas diferentes janelas ontogenéticas. Com o objetivo de testar diferenças entre cada uma das condições de desenvolvimento, foram realizados, para cada um dos recortes de interesse, pós-testes de Tukey. Para comparação entre o tamanho relativo das estruturas em diferentes estágios do desenvolvimento, as medidas lineares foram inicialmente logaritimizadas, e os resíduos de uma regressão linear simples de cada uma das medidas lineares pelo comprimento do corpo foram retidos. A média dos resíduos foi então calculada para cada condição de desenvolvimento nos estágios de interesse.

Alometria

A influência do ambiente na alometria foi avaliada por meio de regressões por SMA (*Standardized Major Axis*) que relacionaram as variáveis de interesse e o tamanho corpóreo ao longo da ontogenia, utilizando as condições de desenvolvimento como co-variável. Inicialmente, foram realizadas regressões para Altura do corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) utilizando todos os espécimes amostrados em cada condição de desenvolvimento, totalizando 864 espécimes. A seguir, os dados obtidos a partir dos espécimes foram divididos em grupos conforme as janelas ontogenéticas de

interesse, e as mesmas análises foram realizadas (grupos: 21 a 30 DPE = 256 espécimes, 33 a 42 DPE = 256 espécimes, 45 a 72 DPE = 352 espécimes).

Coefficiente de Variação e Homogeneidade das Variâncias

Com o objetivo de comparar a quantidade de variação nos fenótipos revelados nas diferentes condições de desenvolvimento, coeficientes de variação (CV) foram calculados para cada condição de temperatura e de fluxo de água, e para as interações entre temperatura e fluxo. Os coeficientes de variação nesses recortes foram calculados também segundo três janelas ontogenéticas diferentes: 21 a 30 DPE, 33 a 42 DPE e 45 a 72 DPE. O coeficiente de variação foi calculado a partir da média e do desvio padrão dos grupos de interesse. A homogeneidade das variâncias entre as diferentes condições de desenvolvimento e entre temperaturas foi avaliada utilizando o teste de Levene para o Comprimento do Corpo (SL), Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo (ALP), separadamente para cada estágio ontogenético considerado.

3.4 Análise Osteológica

A variação fenotípica ao longo da ontogenia entre indivíduos provenientes de diferentes ambientes de desenvolvimento foi avaliada por meio da implementação de uma Análise de Sequências Ontogenéticas (OSA; Colbert & Rowe, 2008). Nessa análise, algoritmos de parcimônia são utilizados para mapear padrões de desenvolvimento que capturam a variabilidade dentro de uma amostra. Esse método se beneficia das ferramentas elaboradas na sistemática filogenética e as aplica em uma escala ontogenética. Dentre suas vantagens, destaca-se a possibilidade de acessar a variação fenotípica utilizando uma perspectiva mais ampla do que a observada nos métodos convencionais de análise de sequências ontogenéticas, permitindo a identificação de padrões de variação com diversas possibilidades de aplicação, inclusive em comparações intraespecíficas e interespecíficas e na caracterização de padrões morfológicos de grandes grupos (Morris, 2013; Griffin & Nesbitt, 2016a,b; Griffin, 2018). Existem relatos da aplicação de OSA para caracterização da variação das trajetórias ontogenéticas em peixes (De Jong *et al.*, 2009), e o presente estudo é inovador ao aplicá-la na avaliação de Plasticidade Fenotípica revelada em condições

laboratoriais. Os resultados da OSA são apresentados sob a forma de diagramas de redes de reticulação que descrevem as sequências mais parcimoniosas, e podem ser usados para comparação de variação de sequências intraespecíficas segundo as condições de desenvolvimento (Morris, 2013).

3.4.1 Diafanização

Os espécimes foram diafanizados seguindo um protocolo adaptado de Taylor e Van Dyke (1985) e Westerfield (2007), que cora as estruturas cartilaginosas em azul utilizando o corante Alcian Blue, as estruturas ósseas em vermelho com o corante Alizarina, e digere por enzimas os tecidos musculares e adiposos (Anexo B).

3.4.2 Obtenção e processamento dos dados

Os espécimes diafanizados foram fotografados novamente e, a partir das imagens, os caracteres de interesse foram mapeados. Foram construídas matrizes de dados individuais pontuados para os caracteres osteológicos de interesse para cada uma das condições de desenvolvimento. Nessas matrizes, o estado imaturo de cada caráter foi codificado como 0, e os estados derivados foram codificados como 1, 2 ou 3, sendo os estados derivados aqueles representados por estruturas presentes em estágios mais tardios do desenvolvimento e os estados imaturos correspondendo à ausência dessas estruturas em estágios iniciais do desenvolvimento. Em cada espécime, portanto, foi registrada para cada estrutura a sua ausência (0), a presença de cartilagem (1), a presença de cartilagem com início de ossificação (2), ou a presença de estruturas ósseas (3).

A análise osteológica baseada em OSA foi implementada apenas em complexos ósseos do pós-crânio. Os caracteres osteológicos foram identificados utilizando trabalhos anteriores que descreveram a ossificação em peixes, focando principalmente em grupos filogeneticamente próximos (Bemvenuti, 2005; Serra & Langeani, 2006; Mattox *et al.*, 2014). Os complexos ósseos analisados no presente estudo (Figura 8) congregam o *Aparelho de Weber*, composto pelos Processos laterais (aw), Arcos neurais das vértebras 3 e 4 (an34), Centros vertebrais 1, 2, 3 e 4 (cv14) e Supraneural 3 (sn3); *estruturas pós-Aparelho de Weber*, como os Centros Vertebrais (cwpw), Arcos

hemaís (ahpw), Arcos neurais (anpw), Parapófises (parp), Supraneurais (snw) e Intramusculares (intra); **cintura peitoral**, composta pela Cintura peitoral (Escápula e Coracóide; cpt), Cleitro (cle), Raios da nadadeira peitoral (rpt) e Radiais da nadadeira peitoral (rdpt); **nadadeira caudal**, composta pelos hipurais (hip1, hip2, hip3, hip4, hip5 e hip6), Centro ural e pré-ural 1 (cpu1), Arcos hemaís das pu2/pu3 (ahpu23), Arcos neurais pu2/pu3 (anpu23), Epurais 1 e 2 (ep), Paripurais (PP), Raios principais (rc), Raios procorrentes dorsais (rpcd) e Raios procorrentes ventrais (rpcv); **nadadeira dorsal**, composta pelos Raios (rd), Radiais próximo-mediais (rpd), Radiais distais (rdd) e Peça terminal (ptmd); **nadadeira anal**, composta pelos Raios (ra), Radiais próximo-mediais (rpa) e Radiais distais (rda); **cintura pélvica**, composta pelos Raios (rpl), Radiais (rdpl) e Osso pélvico (cpl).

Figura 8 Estruturas ósseas utilizadas para a construção das matrizes de condْرِificação e ossificação da

Análise das Sequências Ontogenéticas (OSA). Aparelho de Weber [Processos laterais (aw), Arcos neurais das vértebras 3 e 4 (an34), Centros vertebrais 1, 2, 3 e 4 (cv14) e Supraneural 3 (sn3)]; Pós-Aparelho de Weber [Centros Vertebrais (cvpw), Arcos hemais (ahpw), Arcos neurais (anpw), Parapófises (parp), Supraneurais (snw) e Intramusculares (intra)]; Cintura peitoral [Escápula e Coracóide (cpt), Cleitro (cle), Raios da nadadeira peitoral (rpt) e Radiais da nadadeira peitoral (rdpt)]; Nadadeira caudal [hipurais (hip1, hip2, hip3, hip4, hip5 e hip6), Centro ural e pré-ural 1 (cpu1), Arcos hemais das pu2/pu3 (ahpu23), Arcos neurais pu2/pu3 (anpu23), Epurais 1 e 2 (ep), Paripural (PP), Raios principais (rc), Raios procorrentes dorsais (rpcd) e Raios procorrentes ventrais (rpcv)]; Nadadeira dorsal [Raios (rd), Radiais próximo-mediais (rpd), Radiais distais (rdd) e Peça terminal (ptmd)]; Nadadeira anal [Raios (ra), Radiais próximo-mediais (rpa) e Radiais distais (rda)]; Cintura pélvica [Raios (rpl), Radiais (rdpl) e Osso pélvico (cpl)].

3.4.3 Análise dos dados

Indivíduos que apresentaram todos os estados de caráter idênticos foram agrupados em um único semaforonte, a partir das matrizes construídas para cada uma das condições de desenvolvimento (Anexo G), utilizando o programa PAUP (Versão 4.0a167). Os semaforontes representam um conjunto específico e único de estados de caráter. O termo foi proposto por Hennig (1950) e, no caso da OSA, consiste em um indivíduo ou grupo de indivíduos que representam um momento específico da trajetória ontogenética.

Foram obtidas as sequências de desenvolvimento mais parcimoniosas de cada uma das condições de desenvolvimento utilizando algoritmos de parcimônia filogenética no programa TNT (*Tree Analysis Using New Technology*, versão 1.5, Willi Hennig Society Edition; ver Goloboff, Farris, & Nixon, 2016). Especificamente, todos os caracteres foram codificados como irreversíveis, e o grupo externo foi definido como o semaforonte hipotético com todos os caracteres no estado mais imaturo (Estado de Caráter = 0). Foi realizada uma Busca Heurística utilizando a opção *Tree Bisection Reconnection* (TBR), e apenas as árvores de comprimento mínimo foram retidas. Em seguida, foi realizada uma nova Busca Heurística apenas com as árvores retidas, para identificar o número de Árvores Mais Parcimoniosas (*Most Parsimonious Trees*, MPT) e o número de passos (*score*), como detalhado no Anexo C. As árvores resultantes traçam a trajetória de cada um dos semaforontes de uma condição totalmente imatura, ou o estágio mais inicial do desenvolvimento, até a condição osteológica observada no indivíduo amostrado (árvores normais). As árvores mais parcimoniosas retidas refletem as múltiplas sequências de desenvolvimento que podem ser postuladas com base nos dados fornecidos.

As mesmas análises foram aplicadas posteriormente para a obtenção das árvores reversas de cada uma das condições de desenvolvimento, nas quais o grupo externo foi definido como o semaforonte hipotético com todos os caracteres no estado mais maduro de desenvolvimento (Estado de Caráter = 3). Nessa etapa, as árvores resultantes traçam a trajetória de cada um dos semaforontes de uma condição totalmente madura, ou o estágio mais tardio do desenvolvimento, até a condição osteológica observada no indivíduo amostrado.

As sequências parcimoniosas determinadas para as condições que partem do semaforonte imaturo e do semaforonte maduro foram graficamente integradas em um

mapa de reticulação. O mapa foi calibrado pela *pontuação de maturidade*, que na OSA representa a soma de todas as pontuações do estado dos caracteres para cada indivíduo e, no caso do presente trabalho, foi realizada a partir dos *Dias Pós-Eclosão* (DPE) porque a idade exata dos indivíduos era uma informação conhecida.

Os mapas de reticulação para cada uma das condições de desenvolvimento foram comparados quanto ao número de trajetórias ontogenéticas possíveis, padrão das sequências de ossificação, e quantidade de variação fenotípica ao longo da ontogenia relacionada aos diferentes estágios. Um dos indicadores de variação utilizado foi a presença de politomias nas árvores consenso, avaliadas quanto à ocorrência, número de táxons terminais abrangidos, e posição quanto à janela ontogenética compreendida, uma vez que a presença de politomias indica grande variação das sequências ontogenéticas possíveis (Griffin, 2018)

Além da OSA, o surgimento de cada uma das estruturas cartilaginosas e ósseas foi mapeado ao longo de uma escala temporal para cada uma das condições de desenvolvimento, sendo integrado graficamente com intuito de comparação (Cloutier *et al.*, 2010; Mattox *et al.*, 2014).

3.5 Expressão Gênica

Os níveis de expressão dos genes BMP4 (Proteína morfogenética óssea 4) e CX43 (Conexina 43) foram avaliados em três janelas ontogenéticas (21, 33 e 48 dias pós-eclosão) em cada uma das Condições de Desenvolvimento (Temperatura Alta Com Fluxo, Temperatura Alta Sem Fluxo, Temperatura Baixa Com Fluxo, e Temperatura Baixa Sem Fluxo), por meio de PCR em Tempo Real (qPCR).

3.5.1 Obtenção dos dados

Extração do RNA

Espécimes nos estágios de 21, 33 e 48 dias pós-eclosão foram preservados em RNA later e mantidos em Freezer -20°C. As estruturas ósseas correspondentes à nadadeira caudal e ao Pós-Crânio foram dissecadas e mantidas em Trizol (TRI Reagent® *RNA Isolation Reagent* Sigma Aldrich) por 24 horas no Freezer -20°C. Uma

vez que cada ambiente de desenvolvimento foi estruturado em quadriplicata (4 aquários por condição), foram obtidas 48 amostras de cada estrutura de interesse (Pós-crânio e Nadadeira Caudal), totalizando 96 amostras. Para cada estrutura (Pós-crânio e Nadadeira Caudal), em cada condição de desenvolvimento e para cada estágio, foram realizados dois *pools*, cada um composto por amostras provenientes de dois (2) espécimes, devido à quantidade de tecido existente. Portanto, a análise de expressão gênica compreendeu 2 pontos por condição de desenvolvimento para cada estrutura em cada estágio ontogenético.

Após o período de 24 horas, as amostras foram retiradas do Freezer, mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos, e acrescidas de 200 µl de clorofórmio por amostra; as amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 4°C e 10.300 RPMs. Após a centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi removida com auxílio de uma micropipeta e transferida para um novo tubo Eppendorf® de 1,5 ml. Foram adicionados 500 µl de Isoprpanol a 8°C nas amostras e, após 10 minutos de repouso, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C e 10.300 RPMs. O solvente foi suavemente desprezado dos tubos, restando apenas um concentrado esbranquiçado no fundo contendo o RNA. Acrescentou-se então 1 ml a 8°C de Etanol 75% e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4°C e 8.200 RPMs. Após a última centrifugação, o etanol foi suavemente descartado, e os tubos foram mantidos virados para baixo em papel absorvente por 30 minutos, sendo posteriormente completados com 35 µl de água ultrapura e mantidos por 24 horas a 4°C.

Quantificação do RNA, Tratamento com DNase e Síntese do cDNA

O RNA extraído na etapa anterior foi quantificado por meio de um Espectrofotômetro (NanoVue Plus® Biochrom). Após a calibração do equipamento, 1 µl de cada amostra foi analisado e a quantidade de RNA presente nas amostras foi registrada. Foram obtidas alíquotas de 7 µl de cada uma das amostras (Anexo I). A seguir, o material foi tratado para remoção do DNA remanescente utilizando o Kit DNase I da Invitrogen®. Por fim, foi realizada a síntese de cDNA a partir das alíquotas de RNA (Transcrição Reversa), utilizando o Kit SuperScript® III da Invitrogen®.

PCR em Tempo Real (qPCR)

Para acessar os níveis de expressão do BMP4 e do CX43 em cada uma das condições de desenvolvimento, as amostras foram submetidas a uma reação de PCR em tempo real em triplicata técnica, utilizando como controle (*Housekeeping*) o gene endógeno GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os equipamentos utilizados foram o AriaMx® da Agilent Technologies® e o Applied Biosystems® 7500. Nessa etapa foram processadas apenas as amostras referentes ao pós-crânio.

3.5.2 Análise dos dados

A análise da expressão gênica em amostras provenientes das diferentes condições de desenvolvimento foi realizada a partir do método Delta-Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Primeiramente, os valores de Ct (Threshold Cycle) obtidos na reação qPCR foram exportados para uma planilha do Excel; esses valores representam o número de ciclos da reação de PCR no qual a amostra cruzou a linha estipulada como Limite (*Threshold*) no gráfico de amplificação. Os poços que não amplificaram, ou seja, que não cruzaram a linha estipulada como Limite, foram considerados como ruído e retirados da análise. As médias do Ct dos genes de interesse e do controle endógeno foram calculadas para cada uma das condições de desenvolvimento nos três estágios avaliados (21, 33 e 45 DPE). O Delta Ct (ΔCt) para cada amostra foi calculado a partir da subtração da média do gene de interesse pela média do gene controle (*Housekeeping*). A seguir, o Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) foi calculado, assumindo a média dos valores de Ct obtidos para a Temperatura Baixa como referência, e subtraindo cada uma das médias das condições de desenvolvimento pela média da condição de referência. Por fim, os valores foram transformados pela função $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para estimativa dos níveis de expressão gênica. Esses valores de expressão para cada uma das condições de desenvolvimento foram plotados em um gráfico de linhas para comparação da expressão gênica entre os estágios ontogenéticos.

4 Resultados

4.1 Avaliação das variáveis morfológicas

A Análise de Componentes Principais (PCA), realizada com o intuito de identificar quais estruturas morfológicas variam conjuntamente na variação intraespecífica observada, reteve quatro componentes principais que apresentaram autovalores (*eigenvalues*) superiores a 1. O primeiro componente principal (PC1) agrupou as variáveis Largura da Cabeça (HW), Distância entre os olhos (ID) e Largura do Corpo (MBW), explicando 35,3% da variação (Figura 9; Tabela 3). O segundo componente principal (PC2) agrupou Altura do Corpo (ALC) e Comprimento da Nadadeira Peitoral (PTL), com variação em uma direção, e Largura do Pedúnculo Caudal (CPW), variando na direção oposta, explicando 13,8% da variação observada (Figura 9; Tabela 3; Anexo D). O terceiro componente principal (PC3) agrupou as variáveis Altura do Corpo (ALC), Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica (PVD) e Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal (VAD), com variação em uma direção e Largura da Nadadeira Adiposa (ADH) e Comprimento da Nadadeira Pélvica (PVL), variando na direção oposta, explicando 8,8% da variação observada (Figura 9; Tabela 3). O quarto componente principal (PC4) agrupou as variáveis Altura do Pedúnculo Caudal (ALP), Largura do Pedúnculo Caudal (CPW), Altura do Corpo (ALC) e Altura da nadadeira adiposa (ADH), com variação em uma direção, e Comprimento da Nadadeira Peitoral (PTL), Comprimento da Nadadeira Pélvica (PVL), Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica (PVD) e Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal (VAD), variando na direção oposta, explicando 7,75% da variação observada (Figura 9; Tabela 3).

Tabela 3 Resultado da Análise de Componentes Principais (PCA) com os pesos (*loadings*) de cada uma das variáveis testadas.

	PC1	PC2	PC3	PC4
	(35,32%)	(13,86%)	(8,80%)	(7,75%)
ALC	-0,176	0,431	-0,442	0,228
ALP	-0,179	0,223	-0,116	0,661
ADL	-0,236	0,292	0,207	0,072
ADH	-0,248	0,066	0,441	0,306
PTL	-0,260	0,401	0,189	-0,279
PVL	-0,243	0,272	0,411	-0,374
PVD	-0,251	-0,197	-0,374	-0,286
VAD	-0,226	0,337	-0,389	-0,266
HW	-0,380	-0,225	-0,005	-0,082
ID	-0,367	-0,175	-0,138	0,064
MBW	-0,346	-0,259	-0,086	-0,016
CPW	-0,307	-0,279	0,177	0,174
MW	-0,295	-0,249	0,004	0,012

Figura 9 Gráficos resultantes da Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando medidas lineares obtidas em espécimes adultos depositados em coleções ictiológicas.

4.2 Condições de Desenvolvimento: Morfologia Externa

Os fenótipos morfológicos dos peixes oriundos de diferentes ambientes de desenvolvimento diferiram quanto ao tamanho corpóreo ao longo da ontogenia (i.e. Dias Pós-Eclosão, DPE; Tabela 4; Anexo E). Os peixes que se desenvolveram na condição ‘Temperatura Alta Com Fluxo de água’ apresentaram as taxas mais altas de crescimento, com incremento de 3,42% do tamanho ao dia, e atingiram comprimento médio do corpo de 15,80 mm no estágio 48 DPE. Peixes que se desenvolveram nas condições ‘Temperatura Alta Sem Fluxo’ apresentaram taxa de crescimento intermediária (2,81% ao dia), e aqueles que se desenvolveram em temperaturas frias apresentaram as menores taxas de crescimento (1,54 % ao dia Com Fluxo de água e 1,29% Sem Fluxo de água).

Tabela 4 Média e Desvio Padrão do Comprimento do Corpo (mm) para cada Condição de Desenvolvimento em peixes amostrados entre os estágios de 21 e 72 dias pós-eclosão (DPE).

DPE	Comprimento do Corpo (mm)			
	T. Alta Sem Fluxo	T. Alta Com Fluxo	T. Baixa Sem Fluxo	T. Baixa Com Fluxo
21	6,81 ± 0,43	6,99 ± 0,46	6,50 ± 0,36	6,77 ± 0,36
24	7,16 ± 0,46	7,51 ± 0,43	6,88 ± 0,43	7,12 ± 0,38
27	7,22 ± 0,74	7,48 ± 0,84	6,96 ± 0,61	6,92 ± 0,57
30	7,38 ± 1,08	7,83 ± 0,83	6,81 ± 0,60	7,24 ± 0,62
33	8,28 ± 1,26	9,08 ± 1,09	8,19 ± 0,45	8,67 ± 0,47
36	10,10 ± 1,13	11,50 ± 0,68	8,40 ± 0,50	8,97 ± 0,56
39	10,99 ± 1,30	12,24 ± 1,03	8,62 ± 0,48	9,10 ± 0,74
42	12,26 ± 1,43	13,69 ± 0,96	8,89 ± 0,39	9,75 ± 0,86
45	12,34 ± 1,92	14,33 ± 2,13	8,46 ± 0,62	9,42 ± 0,77
48	14,08 ± 2,89	15,80 ± 2,13	8,80 ± 0,69	10,10 ± 1,48
51	16,65 ± 3,66	18,76 ± 2,58	9,37 ± 0,66	10,60 ± 1,24
54	16,97 ± 3,47	21,19 ± 3,54	9,93 ± 0,47	11,22 ± 1,31
57	16,50 ± 1,72	-	10,62 ± 0,73	12,54 ± 1,97
60	18,39 ± 1,45	-	12,13 ± 0,57	12,84 ± 1,36
63	22,03 ± 0,95	-	13,12 ± 0,90	14,53 ± 1,64
66	-	-	14,77 ± 0,77	-
69	-	-	16,14 ± 0,49	-
72	-	-	20,45 ± 1,13	-

As condições de desenvolvimento também afetaram as taxas de diferenciação: fenótipos juvenis se estabeleceram antes nos peixes que se desenvolveram nas condições de Temperatura Alta, enquanto os peixes que se desenvolveram nas condições de Temperatura Baixa demoraram mais tempo para pigmentar e apresentar as proporções correspondentes ao fenótipo juvenil (Figura 10).

Figura 10 Registro Fotográfico de espécimes nos estágios 21, 33 e 45 Dias pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento: Amarelo - Temperatura Alta Sem Fluxo; Laranja - Temperatura Alta Com Fluxo; Verde - Temperatura Baixa Sem Fluxo; e Azul - Temperatura Baixa Com Fluxo.

A Altura do Corpo (ALC) e a Altura do Pedúnculo (ALP) diferiram entre os peixes que se desenvolveram em diferentes condições de Temperatura e de Fluxo de água, mas não foi identificado um efeito significativo da interação entre Fluxo e Temperatura na diferença entre as médias dos ambientes de desenvolvimento (Tabela 5).

Tabela 5 Resultados (*p-value*) das Análises de Variância (ANOVAs) para a Altura do Corpo e a Altura do Pedúnculo, nos dias 21, 33 e 42 pós-eclosão (DPE), em relação ao fluxo de água e à temperatura nas Condições de Desenvolvimento. Os valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.

	Altura do Corpo			Altura do Pedúnculo		
	21 DPE	33 DPE	42 DPE	21 DPE	33 DPE	42 DPE
Fluxo	0,036	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Temperatura	0,007	0,005	<0,001	0,029	<0,001	<0,001
Fluxo:Temperatura	0,245	0,184	0,285	0,281	0,048	0,352

Nos estágios iniciais, como representado pelos espécimes com 21 DPE, os peixes provenientes da condição Temperatura Alta Com Fluxo apresentaram maior altura relativa do corpo e do pedúnculo em comparação com os peixes das demais condições (Tabela 6, Figura 11). Ao final do desenvolvimento, os peixes mantidos nas condições de desenvolvimento sem fluxo de água apresentaram corpos relativamente mais altos em comparação aos peixes mantidos nas condições ambientais com fluxo de água (Tabela 6, Figura 11). Os peixes que se desenvolveram na Temperatura Alta apresentaram maior altura do pedúnculo caudal na condição Sem Fluxo de água em comparação aos peixes provenientes da condição Com Fluxo, enquanto na Temperatura Baixa os peixes que se desenvolveram na condição Com Fluxo de água apresentaram pedúnculos maiores (Tabela 6, Figura 11).

Tabela 6 Médias dos resíduos das regressões entre as variáveis de interesse e o tamanho do corpo, ambos logaritimizados, para 21, 33 e 42 dias pós-eclosão (DPE).

	Altura do Corpo			Altura do Pedúnculo		
	21 DPE	33 DPE	42 DPE	21 DPE	33 DPE	42 DPE
Temperatura Alta Sem Fluxo	-0,0080	0,0091	0,0034	-0,0198	-0,0012	0,0034
Temperatura Alta Com Fluxo	0,0187	0,0218	0,0002	0,0303	0,0432	0,0015
Temperatura Baixa Sem Fluxo	0,0018	-0,0131	-0,0017	-0,0103	-0,0327	-0,0115
Temperatura Baixa Com Fluxo	-0,0125	-0,0178	-0,0019	-0,0002	-0,0094	0,0065

Figura 11 Gráficos comparando os resíduos das regressões alométricas da Altura do Corpo (ALC) e da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em três estágios do desenvolvimento: 21, 33 e 42 Dias pós-eclosão (DPE), para cada uma das condições de desenvolvimento: Laranja – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo - Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

Dentre os indivíduos amostrados com 21 DPE, apenas os peixes que se desenvolveram na Temperatura Alta Com Fluxo de água diferiram quanto à Altura do Corpo (ALC) em relação aos demais espécimes (Temperatura Baixa Com e Sem Fluxo; Tabela 7; Figura 12a). Nesse estágio, a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) diferiu entre os peixes que se desenvolveram na Temperatura Alta Com e Sem Fluxo, e entre os peixes da Temperatura Alta Com Fluxo e da Temperatura Baixa sem Fluxo (Tabela 7; Figura 12b). Essas diferenças acentuaram-se no estágio 33 DPE: a Altura do Corpo (ALC) diferiu nos peixes da Temperatura Alta Com e Sem Fluxo e aqueles da Temperatura Baixa (Com e Sem Fluxo; Tabela 7; Figura 12c), o mesmo sendo observado quanto à Altura do Pedúnculo Caudal (ALP; Tabela 7; Figura 12d). Nos

animais amostrados em 48 DPE, todas as condições de desenvolvimento revelaram fenótipos morfológicos que diferiram entre si, tanto quanto à Altura do Corpo (Figura 12e), quanto à Altura do Pedúnculo Caudal (Figura 12f); os únicos indivíduos que não diferiram significativamente quanto à Altura do Corpo nesse estágio foram aqueles que se desenvolveram nas condições de Temperatura Baixa Com e Sem Fluxo de água (Tabela 7).

Tabela 7 Resultados (*p-value*) dos Pós-testes de Tukey para a Altura do Corpo e a Altura do Pedúnculo, nos Dias 21, 33 e 42 pós-eclosão (DPE), em relação ao Fluxo de água e à Temperatura das Condições de Desenvolvimento. Os valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.

		Altura do Corpo					Altura do pedúnculo		
Condição de Desenvolvimento		Temp. Alta Sem Fluxo	Temp. Alta Com Fluxo	Temp. Baixa Sem Fluxo	Temp. Baixa Com Fluxo	Temp. Alta Sem Fluxo	Temp. Alta Com Fluxo	Temp. Baixa Sem Fluxo	Temp. Baixa Com Fluxo
21 DPE	Temp. Alta Sem Fluxo	-	0,099	0,664	0,967	-	0,008	0,851	0,773
	Temp. Alta Com Fluxo	-	-	0,005	0,033	-	-	<0,001	0,099
	Temp. Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,902	-	-	-	0,299
	Temp. Baixa Com Fluxo	-	-	-	-	-	-	-	-
33 DPE	Temp. Alta Sem Fluxo	-	0,013	0,674	0,999	-	<0,001	0,522	0,731
	Temp. Alta Com Fluxo	-	-	<0,001	0,018	-	-	<0,001	<0,001
	Temp. Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,596	-	-	-	0,087
	Temp. Baixa Com Fluxo	-	-	-	-	-	-	-	-
42 DPE	Temp. Alta Sem Fluxo	-	0,002	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001
	Temp. Alta Com Fluxo	-	-	<0,001	<0,001	-	-	<0,001	<0,011
	Temp. Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,137	-	-	-	0,018
	Temp. Baixa Com Fluxo	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 12 Box-plots da Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) dos espécimes com 21, 33 e 42 Dias pós-eclosão (DPE). As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho - Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo - Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul - Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde - Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

Quanto ao crescimento alométrico dos indivíduos amostrados nesse estudo, foi identificada a forte correlação esperada entre Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) com o tamanho corpóreo, inferido a partir do Comprimento do Corpo (SL; Tabela 8). Em todas as condições de desenvolvimento, os indivíduos que apresentaram maior Altura do Corpo e Altura do Pedúnculo Caudal também apresentaram maior tamanho corpóreo.

Tabela 8 Resultados das Regressões por SMA para a Altura do Corpo (ALC) e a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com as Condições de Desenvolvimento. Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes; CI - Intervalo de Confiança; Lim. Inf. – Limite Inferior; Lim. Sup. – Limite Superior; β – Inclinação da reta (*slope*); α – Elevação da reta (*elevation*).

Altura do Corpo				
	r^2	p	β	C.I. (95%)
	0,985	<0,0001	0,421	0,418-0,425
	Inclinação (β)	Elevação (α)	Lim. Inf.	Lim. Sup.
Temp. Alta Sem Fluxo	0,427	-0,981	-1,037	-0,926
Temp. Alta Com Fluxo	0,412	-0,994	-1,052	-0,934
Temp. Baixa Sem Fluxo	0,413	-1,052	-1,094	-1,011
Temp. Baixa Com Fluxo	0,420	-1,043	-1,085	-0,999
Altura do Pedúnculo				
	r^2	p	β	C.I. (95%)
	0,966	<0,0001	0,132	0,130-0,134
	Inclinação (β)	Elevação (α)	Lim. Inf.	Lim. Sup.
Temp. Alta Sem Fluxo	0,129	-0,355	-0,393	-0,316
Temp. Alta Com Fluxo	0,130	-0,314	-0,348	-0,280
Temp. Baixa Sem Fluxo	0,131	-0,379	-0,422	-0,336
Temp. Baixa Com Fluxo	0,139	-0,437	-0,486	-0,388

Considerando todos os estágios amostrados, a Altura do Corpo (ALC) diferiu alometricamente ao longo do desenvolvimento nos peixes que se desenvolveram nas condições de Temperatura Alta Com e Sem Fluxo, padrão também observado nos indivíduos provenientes das condições Sem Fluxo de água com Temperatura Alta e Baixa (Tabela 9; Figura 13).

Tabela 9 Comparação entre grupos (*p-value*) das regressões por SMA (*Standardized Major Axis*) para Altura do Corpo (ALC) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com a Condição de Desenvolvimento. Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.

	Alta Sem Fluxo	Alta Com Fluxo	Baixa Sem Fluxo	Baixa Com Fluxo
Alta Sem Fluxo	-	0,015	0,038	0,816
Alta Com Fluxo	-	-	0,999	0,683
Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,795
Baixa Com Fluxo	-	-	-	-

Figura 13 Regressão linear por SMA da Altura do Corpo (ALC) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) para todos os indivíduos amostrados. As cores correspondem às condições de desenvolvimento.

Considerando todos os estágios de desenvolvimento, a alometria da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) diferiu apenas entre os indivíduos que se desenvolveram na Temperatura Baixa Com Fluxo e todas as demais condições (Tabela 10; Figura 14).

Tabela 10 Comparação entre grupos (*p-value*) das regressões por SMA (*Standardized Major Axis*) para a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com a Condição de Desenvolvimento. Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.

	Alta Sem Fluxo	Alta Com Fluxo	Baixa Sem Fluxo	Baixa Com Fluxo
Alta Sem Fluxo	-	0,997	0,991	0,004
Alta Com Fluxo	-	-	0,999	0,008
Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,075
Baixa Com Fluxo	-	-	-	-

Figura 14 Regressão linear por SMA da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) para todos os indivíduos amostrados. As cores correspondem às condições de desenvolvimento.

Quando os espécimes amostrados foram categorizados em diferentes janelas ontogenéticas (21 a 23 DPE, 33 a 42 DPE, e acima de 45 DPE), as relações alométricas da Altura do Corpo e da Altura do Pedúnculo em relação ao tamanho do corpo permaneceram detectáveis em todas as janelas ontogenéticas consideradas (Tabela 11).

Tabela 11 Resultados das Regressões por SMA para a Altura do Corpo (ALC) e a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) para amostras obtidas nos Dias 21 a 30, 33 a 42 e acima de 45 pós-eclosão (DPE). Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes; β – Inclinação da reta (*slope*); α – Elevação da reta (*elevation*).

DPE	Altura do Corpo (ALC)				Altura do Pedúnculo (ALP)			
	r^2	p	α	β	r^2	p	α	β
21-30	0,784	<0,001	-0,919	0,403	0,522	<0,001	-0,445	0,142
33-42	0,952	<0,001	-1,146	0,425	0,916	<0,001	-0,521	0,146
Acima de 45	0,979	<0,001	-0,886	0,412	0,953	<0,001	-0,279	0,126

Na primeira janela ontogenética avaliada, representada por espécimes com idade entre 21 e 33 DPE, não foi possível identificar diferenças alométricas estatisticamente significantes entre os peixes provenientes das diferentes condições de desenvolvimento (Tabela 12; Figura 15a). A partir da segunda janela ontogenética, representada por espécimes amostrados entre 33 e 42 DPE, os peixes que se desenvolveram na Temperatura Alta Com e Sem Fluxo diferiram significativamente quanto à alometria da Altura do Pedúnculo daqueles indivíduos que se desenvolveram na Temperatura Baixa Com e Sem Fluxo (Tabela 12; Figura 15b). Na terceira janela ontogenética avaliada, representada por indivíduos amostrados após 45 DPE, apenas os peixes que se desenvolveram na Temperatura Alta Com e Sem fluxo diferiram entre si quanto à alometria da Altura do Corpo (Tabela 12; Figura 15c).

Tabela 12 Comparação entre grupos (*p-value*) nas regressões por SMA (*Standardized Major Axis*) para Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) de acordo com a Condição de Desenvolvimento, nos grupos 21 a 30, 33 a 42, e acima de 45 dias pós-eclosão (DPE). Valores em negrito indicam diferenças estatisticamente significantes.

		Altura do Corpo (ALC)				Altura do pedúnculo (ALP)			
Condição de Desenvolvimento		Temp. Alta Sem Fluxo	Temp. Alta Com Fluxo	Temp. Baixa Sem Fluxo	Temp. Baixa Com Fluxo	Temp. Alta Sem Fluxo	Temp. Alta Com Fluxo	Temp. Baixa Sem Fluxo	Temp. Baixa Com Fluxo
21-30 DPE	Temp. Alta Sem Fluxo	-	1,000	0,995	0,972	-	0,709	1,000	0,912
	Temp. Alta Com Fluxo	-	-	0,996	0,973	-	-	0,876	0,247
	Temp. Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,839	-	-	-	0,943
	Temp. Baixa Com Fluxo	-	-	-	-	-	-	-	-
33-42 DPE	Temp. Alta Sem Fluxo	-	0,999	0,383	0,999	-	0,894	<0,001	<0,001
	Temp. Alta Com Fluxo	-	-	0,559	1,000	-	-	<0,001	<0,001
	Temp. Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,722	-	-	-	0,716
	Temp. Baixa Com Fluxo	-	-	-	-	-	-	-	-
Acima de 45 DPE	Temp. Alta Sem Fluxo	-	0,034	0,846	0,995	-	0,999	0,999	0,686
	Temp. Alta Com Fluxo	-	-	0,176	0,125	-	-	1,000	0,871
	Temp. Baixa Sem Fluxo	-	-	-	0,998	-	-	-	0,849
	Temp. Baixa Com Fluxo	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 15 Regressões lineares por SMA da Altura do Corpo (ALC) e da Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Comprimento do Corpo (SL) para todos os espécimes amostrados, agrupados nas janelas ontogenéticas de 21 a 30, 33 a 42 e acima de 45 Dias pós-eclosão (DPE). As cores correspondem às condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

Quanto à diferença entre as médias em relação ao estágio de desenvolvimento, observou-se que nos estágios finais a diferença entre o comprimento do corpo dos espécimes parece ser maior, principalmente nas condições de Temperatura Alta (Figura 16).

Figura 16 Comprimento médio do Corpo (SL) em milímetros (mm) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, agrupado de acordo com a Temperatura. As cores correspondem às condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

O padrão observado para o Comprimento do Corpo (SL) se sobrepôs aos padrões observados para a Altura do Corpo (ALC) e Altura do Pedúnculo Caudal (ALP), nos quais as diferenças entre as médias parecem acentuadas nos estágios finais, principalmente para os peixes que se desenvolveram na Temperatura Alta (Figura 17).

Figura 17 Altura do Corpo (mm) e Altura do Pedúnculo Caudal (mm) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, agrupados de acordo com a Temperatura. As cores correspondem às condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

A condição de Fluxo de água também acentuou a diferença entre as médias do Comprimento do Corpo (SL) nos peixes que se desenvolveram nas diferentes condições ambientais, principalmente nos estágios finais avaliados. A diferença entre o tamanho corpóreo dos peixes da condição com Temperatura Alta e Baixa na presença de Fluxo de água foi maior do que a diferença na ausência de Fluxo de água (Figura 18).

Figura 18 Comprimento médio do Corpo (SL) em milímetros (mm) em relação ao Dia pós-eclosão (DPE) em cada uma das Condições de Desenvolvimento, com valores agrupados de acordo com o Fluxo de Água. As cores indicam as condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

Além da diferença nas médias entre as condições de desenvolvimento, estas também diferiram em relação à quantidade de variação intraespecífica dos fenótipos revelados dentro da mesma condição de desenvolvimento. Os indivíduos que se desenvolveram nas condições de Temperatura Alta apresentaram maior variação entre si quando comparados aos espécimes provenientes das condições com Temperatura Baixa (Figura 19).

Figura 19 Comprimento do Corpo (mm) em relação ao Dia pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com valores agrupados segundo a Temperatura e o Fluxo de Água. As cores indicam as condições de desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo de água; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo de água; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo de água; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

A análise dos Coeficientes de Variação (CV) sugeriu que o comprimento do corpo (SL) dos espécimes amostrados apresentou maior variação (38,91) nas condições de desenvolvimento com Temperatura Alta, em contraste com a menor variação (26,56) observada entre indivíduos que se desenvolveram nas condições com Temperatura Baixa, inferindo-se efeito significativo da temperatura na variação (Figuras 20 e 21). Essas análises também sugeriram que a variação nas condições Sem Fluxo de água (37,05) foi maior do que a observada nas condições Com Fluxo de água (36,88), inferindo-se efeito do Fluxo de água na variação presente (Figuras 20 e 21). Adicionalmente, a quantidade de variação diferiu entre as condições de desenvolvimento, sendo maior entre os peixes que se desenvolveram na Temperatura

Alta Com Fluxo (39,19), seguida do valor calculado nos peixes que se desenvolveram na Temperatura Baixa Sem Fluxo (38,59), e com uma inversão da relação entre a variação e o Fluxo nas condições de Temperatura Baixa, na qual os espécimes que se desenvolveram na Temperatura Baixa Sem Fluxo apresentaram maior variação do tamanho corpóreo (28,47) quando comparados aos peixes que se desenvolveram na condição de Temperatura Baixa Com Fluxo (24,32), o que sugere um efeito da interação entre Temperatura e Fluxo de água nos processos de estabelecimento do fenótipo durante a ontogenia (Figuras 20 e 21).

Figura 20 Coeficientes de Variação (CV) do Comprimento do Corpo (SL) de espécimes amostrados nas diferentes Condições de Desenvolvimento e comparações entre as Condições de Desenvolvimento. As cores correspondem às condições de desenvolvimento, as setas indicam as comparações, e as letras correspondem às etapas do desenvolvimento: (a) Todos os estágios; (b) 21 a 30 Dias pós-eclosão (DPE); (c) 33 a 42 DPE; (d) Acima de 45 DPE.

Figura 21 Comprimento médio do Corpo (SL) em relação ao Dia pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com barras indicando o Desvio Padrão. As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo.

Os resultados do Coeficiente de Variação para a Altura do Corpo (ALC) nas diferentes condições de desenvolvimento apresentou um padrão similar ao observado na variação do tamanho do corpo. Especificamente, os peixes que se desenvolveram em Temperatura Alta apresentaram maior variação na Altura do Corpo (49,30) em relação aos peixes que se desenvolveram em Temperatura Baixa (36,10). Os peixes que se desenvolveram nas condições de desenvolvimento Sem Fluxo de água apresentaram maior variação (49,33 na Temperatura Alta e 38,52 na Temperatura Baixa) em relação aos peixes das condições Com Fluxo de água (48,61 na Temperatura Alta e 34,09 na Temperatura Baixa) (Figuras 22 e 23).

Altura do Corpo (ALC)			
Sem Fluxo	Temperatura Alta		
	Temperatura Alta Sem Fluxo (a) 49,33 (b) 14,48 (c) 23,34 (d) 25,55	← (a) 49,18 → ← (b) 13,64 → (c) 24,69 (d) 42,56	Temperatura Baixa Sem Fluxo (a) 38,52 (b) 10,82 (c) 9,65 (d) 31,31
Com Fluxo	Temperatura Alta	Coefficiente de Variação	Temperatura Baixa
	Temperatura Alta Com Fluxo (a) 48,61 (b) 13,93 (c) 19,64 (d) 21,06	↑ (a) 49,30 ↓ ↑ (b) 15,59 ↓ (c) 23,69 (d) 24,95	↑ (a) 36,10 ↓ ↑ (b) 11,41 ↓ (c) 11,75 (d) 27,87
Com Fluxo	Temperatura Alta		
	Temperatura Alta Com Fluxo (a) 48,61 (b) 13,93 (c) 19,64 (d) 21,06	← (a) 49,89 → ← (b) 15,04 → (c) 27,20 (d) 37,83	Temperatura Baixa Com Fluxo (a) 34,09 (b) 11,21 (c) 11,64 (d) 33,32

Figura 22 Coeficientes de Variação (CV) da Altura do Corpo (SL) dos espécimes das diferentes Condições de Desenvolvimento e comparações entre Condições de Desenvolvimento. As cores correspondem às condições de desenvolvimento, as setas indicam as comparações, e as letras correspondem às etapas do desenvolvimento: (a) Todos os estágios; (b) 21 a 30 Dias pós-eclosão (DPE); (c) 33 a 42 DPE; (d) Acima de 45 DPE.

Figura 23 Altura média do Corpo (ALC) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com barras indicando o Desvio Padrão. As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo.

A variação na Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) apresentou o mesmo padrão observado para a variação do Comprimento do Corpo (SL) e da Altura do Corpo (ALC). Em relação à temperatura, os peixes que se desenvolveram nas condições de desenvolvimento com Temperatura Alta apresentaram maior variação na Altura do Pedúnculo em relação aos peixes que se desenvolveram em Temperaturas Baixas. Um efeito do fluxo de água também foi observado, e os peixes que se desenvolveram nas condições de desenvolvimento Sem Fluxo apresentaram maior variação na Altura do Pedúnculo Caudal do que aqueles que se desenvolveram nas condições Com Fluxo. Em relação à interação entre temperatura e fluxo de água, os peixes que se desenvolveram na condição com Temperatura Alta Sem Fluxo de água apresentaram maior variação na Altura do Pedúnculo Caudal, seguidos daqueles provenientes da Temperatura Alta Com Fluxo, Temperatura Baixa Sem Fluxo e, com menor variação, indivíduos oriundos da condição de Temperatura Baixa Com Fluxo (Figuras 24 e 25).

Altura do Pedúnculo (ALP)

	Temperatura Alta		Temperatura Baixa
Sem Fluxo	Temperatura Alta Sem Fluxo (a)50,43 (b)17,86 (c)25,50 (d)25,03	$\longleftrightarrow$ (a)50,87 $\longleftrightarrow$ (b)16,89 (c)28,10 (d)44,07	Temperatura Baixa Sem Fluxo (a)41,48 (b)14,02 (c)14,61 (d)31,77
	$\updownarrow$ (a)50,92 $\updownarrow$ (b)17,24 (c)25,05 (d)26,01	Coefficiente de Variação	$\updownarrow$ (a)39,18 $\updownarrow$ (b)14,76 (c)17,15 (d)28,40
Com Fluxo	Temperatura Alta Com Fluxo (a)50,20 (b)13,43 (c)18,44 (d)22,69	$\longleftrightarrow$ (a)52,10 $\longleftrightarrow$ (b)16,23 (c)28,89 (d)38,43	Temperatura Baixa Com Fluxo (a)36,57 (b)14,47 (c)16,43 (d)23,33

Figura 24 Coeficientes de Variação (CV) da Altura do Pedúnculo (ALP) de espécimes amostrados em diferentes Condições de Desenvolvimento e comparações entre Condições de Desenvolvimento. As cores correspondem às condições de desenvolvimento, as setas indicam as comparações, e as letras correspondem às etapas do desenvolvimento: (a) Todos os estágios; (b) 21 a 30 Dias pós-eclosão (DPE); (c) 33 a 42 DPE; (d) Acima de 45 DPE.

Figura 25 Altura média do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE) para cada uma das Condições de Desenvolvimento, com barras indicando o Desvio Padrão. As cores correspondem às Condições de Desenvolvimento: Vermelho – Temperatura Alta Com Fluxo; Amarelo – Temperatura Alta Sem Fluxo; Azul – Temperatura Baixa Com Fluxo; Verde – Temperatura Baixa Sem Fluxo.

Em todas as condições de desenvolvimento e para todas as estruturas avaliadas, a quantidade de variação observada foi menor no conjunto de indivíduos amostrados na primeira janela ontogenética (21 a 30 DPE, indicada pela letra ‘b’) do que aquela observada no conjunto de indivíduos da segunda (33 a 42 DPE, indicada pela letra ‘c’) e da terceira janela ontogenética (Acima de 45 DPE, indicada pela letra ‘d’) (Figuras 20, 22 e 24).

Além da diferença nos Coeficientes de Variação (CVs) observada entre as condições de desenvolvimento, os conjuntos também diferiram quanto à homogeneidade das variâncias conforme os dias pós-eclosão (DPE) em todas as variáveis avaliadas (Tabela 13). Nos estágios iniciais do desenvolvimento (21 a 24 dias pós-eclosão), as variâncias entre os grupos testados não diferiram entre as condições de desenvolvimento (Temperatura:Fluxo) ou apenas entre temperaturas. A partir de 27 dias pós-eclosão, a variância no Pedúnculo Caudal (ALP) entre os grupos começou a diferir entre condições de desenvolvimento (Temperatura:Fluxo) e apenas entre temperaturas. Nos estágios subsequentes, foi possível identificar diferenças na variância da Altura do Corpo (ALC) entre temperaturas (30 DPE) e entre condições de desenvolvimento (39 DPE). Ao final do período de manutenção dos animais em condições experimentais (51 DPE), as variâncias diferiram em todas as estruturas avaliadas, tanto entre as condições

de desenvolvimento quanto entre temperaturas (Tabela 13). Também foi observada uma descontinuidade nas variâncias observadas em diferentes estágios de desenvolvimento para o Pedúnculo Caudal (ALP).

Tabela 13 Resultado (*p-value*) dos testes de homogeneidade das variâncias (Levene) para cada grupo ('amostra', correspondente aos Dias pós-eclosão [DPE]) por condição de desenvolvimento e por temperatura. Valores em negrito representam diferenças estatisticamente significantes.

Amostra (DPE)	Por Condição de Desenvolvimento			Por Temperatura		
	SL	ALC	ALP	SL	ALC	ALP
21	0,475	0,893	0,075	0,179	0,991	0,575
24	0,870	0,720	0,398	0,733	0,780	0,491
27	0,773	0,401	0,032	0,324	0,200	0,026
30	0,309	0,313	0,117	0,145	0,022	0,020
33	0,113	0,064	0,577	0,001	0,003	0,028
36	0,029	0,172	0,150	0,005	0,013	<0,001
39	0,016	0,022	0,249	0,003	0,006	0,064
42	0,009	0,014	0,173	0,004	0,005	0,322
45	0,015	0,005	0,033	0,002	0,002	0,017
48	0,013	<0,001	0,012	0,004	<0,001	0,002
51	0,005	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Por fim, as normas de reação construídas a partir dos dados de morfologia externa dos espécimes amostrados em diferentes condições ambientais de desenvolvimento ilustraram diferenças entre os fenótipos morfológicos revelados por indução ambiental. Ao final do desenvolvimento, os peixes mantidos em condições de desenvolvimento com Fluxo de água estabeleceram fenótipos caracterizados por menores Alturas do Corpo (ALC) quando comparados as peixes que se desenvolveram em ambientes Sem Fluxo de água, uma responsividade acentuada em condições com Temperatura Baixa (Figura 26). A Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) apresentou um padrão distinto em relação à Temperatura: peixes que se desenvolveram na presença de Fluxo de água na Temperatura Alta apresentaram pedúnculos mais altos em comparação àqueles que se desenvolveram na mesma temperatura mas na ausência de Fluxo de água, enquanto os peixes oriundos de Temperaturas Baixas apresentaram padrão inverso (Figura 27).

Figura 26 Normas de reação para a Altura do Corpo (ALC) em relação ao Fluxo de água na condição de desenvolvimento. As cores indicam a condição de desenvolvimento: Vermelho e Amarelo - Temperatura Alta; Azul e Verde – Temperatura Baixa.

Figura 27 Normas de reação para a Altura do Pedúnculo Caudal (ALP) em relação ao Fluxo de água na condição de desenvolvimento. As cores indicam a condição de desenvolvimento: Vermelho e Amarelo - Temperatura Alta; Azul e Verde – Temperatura Baixa.

4.3 Condições de Desenvolvimento: Análises Osteológicas

Análises osteológicas identificaram diferenças no tempo e ordem de ossificação entre peixes que se desenvolveram em diferentes condições ambientais (Anexo F). A presente seção descreve os resultados obtidos a partir dessas análises.

4.3.1 Tempo de desenvolvimento das estruturas osteológicas

Nos peixes provenientes da Temperatura Alta, o tempo para condrificação e ossificação das estruturas avaliadas foi menor do observado nas condições de Temperatura Baixa, e o Fluxo de água acentuou essa diferença. Especificamente, peixes provenientes da Temperatura Alta Com Fluxo apresentaram as taxas mais rápidas no desenvolvimento das estruturas osteológicas. Os padrões e sequência de ossificação também diferiram entre grupos e entre complexos ósseos (Figuras 28 a 32; Anexo F).

Dentre as estruturas avaliadas na cintura peitoral, o primeiro elemento a condrificar e ossificar foi o Cleitro (cle), completamente ossificado no estágio 21 DPE. A cintura peitoral (cpt), que congrega a escápula e o coracóide, começou a condrificar logo em seguida, e ossificou por volta de 30 DPE nos peixes da Temperatura Alta Com Fluxo e 36 DPE nos peixes mantidos na condição de Temperatura Alta Sem Fluxo. Já nos peixes que se desenvolveram na Temperatura Baixa, a cintura peitoral não ossificou antes dos 72 DPE. Os raios da nadadeira peitoral (rpt) surgiram por volta de 33 DPE na Temperatura Alta e 65 DPE na Temperatura Baixa, sendo que nos peixes da condição Com Fluxo essas estruturas ossificaram mais cedo do que naqueles mantidos na condição Sem Fluxo. Os distais da nadadeira peitoral (rdpt) ossificaram por volta de 48 DPE na Temperatura Alta e não ossificaram antes de 72 DPE na Temperatura Baixa (Figura 28).

Figura 28 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas da cintura peitoral: cle – Cleitro; rpt – Raios da nadadeira peitoral; cpt - Cintura peitoral (Escápula e Coracóide); rdpt – Distais da nadadeira peitoral. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.

As primeiras estruturas a ossificarem na nadadeira caudal foram os raios principais (rc) e o centro ural e pré ural (cpu1). Os arcos neurais dos centros pré-urais 2 e 3 (anpu23) ossificaram com aproximadamente 25 DPE na Temperatura Alta e 33 DPE na Temperatura Baixa. Os arcos hemais dos centros pré-urais 2 e 3 (ahpu23) ossificaram com aproximadamente 25 DPE na Temperatura Alta Com Fluxo e 33 DPE na Temperatura Alta Sem Fluxo, e na Temperatura Baixa não ossificaram antes de 72 DPE. Os hipurais (hip 1-6), epurais (ep) e paripurais (pp) ossificaram por volta de 50 DPE na Temperatura Alta e não ossificaram até 72 DPE na Temperatura Baixa. Os raios pró-corrente ventrais (rpcv) ossificaram com 25 DPE na Temperatura Alta e 30 DPE na Temperatura Baixa. Nos peixes que se desenvolveram na condição com Temperatura Alta Com Fluxo, os raios pró-corrente dorsais (rpcd) ossificaram 10 dias antes do observado em peixes da condição com Temperatura Alta Sem Fluxo, enquanto a diferença na temperatura baixa foi de aproximadamente 3 dias. Os intramusculares ossificaram 30 dias antes na Temperatura Alta quando comparados aos indivíduos mantidos nas condições de Temperatura Baixa (Figura 29).

Figura 29 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas da nadadeira caudal e Intramusculares: hip1, hip2, hip3, hip4, hip5 e hip6 – Hipurais; cpu1 - Centro ural e pré-ural 1; ahpu23 - Arcos hemais das pu2/pu3; anpu23 - Arcos neurais pu2/pu3; ep - Epurais 1 e 2; pp – Paripural; rc - Raios principais da nadadeira caudal; rpcd - Raios procorrentes dorsais; rpcv - Raios procorrentes ventrais; intra – Intramusculares. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.

As nadadeiras dorsal e anal apresentaram padrões de condrificação e ossificação semelhantes. Os primeiros elementos a ossificarem em ambas estruturas foram os raios (rd e ra), tanto nas condições com Temperatura Alta quanto naquelas com Temperatura Baixa (Figura 30). Esses processos foram subsequentemente observados nos raios próximo-mediais (rpd e rpa), que ossificaram anteriormente na condição Com Fluxo em peixes da Temperatura Alta e não ossificaram antes de 72 DPE na condição Sem Fluxo da Temperatura Baixa. Os raios distais (rdd e rda) condrificaram mais cedo nas condições Com Fluxo, tanto em peixes mantidos na Temperatura Alta quanto aqueles provenientes de Temperatura Baixa, e ossificaram apenas nos peixes da condição com Temperatura Alta Com Fluxo. A peça terminal da nadadeira dorsal (ptmd) condrificou 20 dias mais cedo nos peixes de condições com Temperatura Alta quando comparados com aqueles das condições com Temperatura Baixa (Figura 30).

Figura 30 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas das nadadeiras dorsal e anal: rd - Raios da nadadeira dorsal; rpd - Radiais próximo –mediais da nadadeira dorsal; rdd - Radiais distais da nadadeira dorsal; ptmd - Peça terminal; ra – Raios da nadadeira anal; rpa - Radiais próximo-mediais da nadadeira anal; rda - Radiais distais da nadadeira anal. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.

Em peixes com 21 Dias pós-eclosão, a maior parte das estruturas do Aparelho de Weber e Centros vertebrais avaliadas já estavam ossificadas nos indivíduos de condições com Temperatura Alta, padrão também observado nos Centros vertebrais 1, 2, 3 e 4 (cv14), Centros vertebrais pós aparelho de Weber (cvpw), e Arcos neurais (anpw) e hemais (ahpw). Nesse estágio, o Supraneural 3 (sn3), os supraneurais pós aparelho de Weber (snw) e as Parapófises (parp) estavam condricificados nessas condições de desenvolvimento. Ao contrário do padrão observado nas nadadeiras, no Complexo de Weber a maioria das estruturas ossificou mais cedo nos peixes que se desenvolveram na condição Sem Fluxo de água dentro da Temperatura Alta, enquanto na Temperatura Baixa o padrão foi inverso. Os arcos neurais do aparelho de Weber (an34) ossificaram por volta de 25 DPE nos peixes da Temperatura Alta e 36 DPE nos peixes da Temperatura Baixa. O supraneural 3 (sn3) ossificou por volta de 33 DPE na condição com Temperatura Alta Sem Fluxo, 50 DPE na Temperatura Alta Com Fluxo, 63 DPE na Temperatura Baixa Com Fluxo, e não ossificou antes de 72 DPE na Temperatura Baixa Sem Fluxo. Os paripurais (parp) ossificaram 30 dias antes nas condições de desenvolvimento com Temperatura Alta em relação aos animais mantidos em condições com Temperatura Baixa. Os supraneurais pós aparelho de Weber (snw) ossificaram com 50 DPE nas condições com Temperatura Alta, e não ossificaram antes dos 72 DPE na Temperatura Baixa (Figura 31).

Figura 31 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas do Aparelho de Weber, Centros Vertebrais e Supraneurais: cv14 – Centros vertebrais 1, 2, 3 e 4; an34 – Arcos neurais das vértebras 3 e 4; aw - Processos laterais; sn3 - Supraneural 3; cvpw - Centros vertebrais pós aparelho de Weber; anpw – Arcos neurais; ahpw – Arcos hemais; parp – Parapófises; snw – Supraneurais. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.

A cintura pélvica foi a última das estruturas avaliadas do pós-crânio a iniciar o processo de ossificação. Nos peixes que se desenvolveram nas condições com Temperatura Alta, os raios da nadadeira pélvica (rpl) ossificaram em aproximadamente 30 DPE, enquanto nos peixes da condição com Temperatura Baixa Com Fluxo os raios ossificaram com 40 Dias pós-eclosão (DPE) e para a Temperatura Baixa Sem Fluxo o processo ocorreu com 63 DPE. O osso pélvico (cpl) ossificou por volta de 30 DPE nos espécimes das condições com Temperatura Alta, já para os espécimes da Temperatura Baixa o osso pélvico começou a condricificar com 36 DPE na condição Com Fluxo de água e 45 DPE na condição Sem Fluxo, e a ossificação ocorreu por volta de 65 DPE. Os distais da nadadeira pélvica (rdpl) ossificaram em 50 DPE nas condições com Temperatura Alta e não ossificaram antes de 72 DPE nas condições com Temperatura Baixa (Figura 32).

Figura 32 Condrificação e ossificação das estruturas ósseas da cintura pélvica: rpl – Raios da nadadeira pélvica; cpl – Osso pélvico; rdpl – Radiais da nadadeira pélvica. As cores das barras indicam os processos de condrificação (em azul) e ossificação (em rosa). As barras claras representam as condições Sem Fluxo de água e as barras escuras representam as condições Com Fluxo de água.

4.3.2 Variação das Sequências Ontogenéticas

As condições ambientais no estabelecimento do fenótipo ao longo da ontogenia influenciaram a quantidade de trajetórias ontogenéticas possíveis em diferentes janelas do desenvolvimento. Os peixes que se desenvolveram na condição com Temperatura Alta Sem Fluxo de água (Figura 33; Anexo H) e com Temperatura Alta Com Fluxo de água (Figura 34; Anexo H) apresentaram maior variação das sequências ontogenéticas em comparação com peixes mantidos nas condições com Temperatura Baixa Sem Fluxo (Figura 35; Anexo H) e com Temperatura Baixa Com Fluxo (Figura 36; Anexo H). Especificamente, as topologias das árvores consenso, normais e reversas, obtidas para as condições com Temperatura Alta apresentaram maior número de politomias, que resgatam a variação entre as árvores retidas na busca Heurística (Anexo H).

Quanto ao número de possíveis trajetórias, inferido a partir das diferentes topologias das árvores mais parcimoniosas, a condição com Temperatura Alta Sem Fluxo reteve 64 árvores com o menor número de passos (*best score*) correspondendo a 171 para as normais e 13829 árvores com o menor número de passos correspondendo a 176 para as reversas. Na condição com Temperatura Alta Com Fluxo, foram retidas 5182 árvores com o menor número de passos correspondendo a 146 para as normais, e 300 árvores com o menor número de passos igual a 162 para as reversas. Na condição com Temperatura Baixa Sem Fluxo de água, foram retidas 4253 árvores com menor número de passos igual a 176 para as normais e 12307 árvores com menor número de passos correspondendo a 174 para as reversas. Na condição com Temperatura Baixa Com Fluxo de água, foram retidas 2808 árvores com menor número de passos igual a 163 para as normais e 1792 árvores com menor número de passos igual a 163 para as reversas. Os estágios iniciais do desenvolvimento (21 a 33 DPE) apresentaram menor variação quando comparados aos estágios finais (após 33 DPE) em todas as condições de desenvolvimento (Figuras 33 a 36; Anexo H).

HJ

- 1.2.4.02.4
- 1.2.4.02.3
 - 1.2.4.01.4
 - 1.2.4.01.2
 - 1.2.4.02.1
 - 1.2.4.02.2
 - 1.2.4.03.1
 - 1.2.4.03.4
 - 1.2.4.03.3
 - 1.2.4.03.2
 - 1.2.4.12.4
 - 1.2.4.12.3
 - 1.2.4.11.4
 - 1.2.4.11.2
 - 1.2.4.11.1
 - 1.2.4.10.4
 - 1.2.4.10.3
 - 1.2.4.09.4
 - 1.2.4.09.2
 - 1.2.4.09.1
 - 1.2.4.08.4
 - 1.2.4.08.2
 - 1.2.4.08.1
 - 1.2.4.07.4
 - 1.2.4.07.3
 - 1.2.4.07.2
 - 1.2.4.07.1
 - 1.2.4.06.4
 - 1.2.4.06.3
 - 1.2.4.06.1
 - 1.2.4.05.2
 - 1.2.4.05.1
 - 1.2.4.04.4
 - 1.2.4.05.4
 - 1.2.4.05.3
 - 1.2.4.04.3
 - 1.2.4.04.2
 - 1.2.4.04.1
 - 1.2.4.03.4
 - 1.2.4.03.3
 - 1.2.4.03.2
 - 1.2.4.03.1
 - 1.2.4.01.4
 - 1.2.4.01.2
 - 1.2.4.02.2
 - 1.2.4.02.3
 - 1.2.4.02.4

HM

- 1.2.4.11.3
 - 1.2.4.12.4
 - 1.2.4.12.3
 - 1.2.4.11.4
 - 1.2.4.11.2
 - 1.2.4.11.1
 - 1.2.4.10.4
 - 1.2.4.10.3
 - 1.2.4.10.1
 - 1.2.4.09.4
 - 1.2.4.09.2
 - 1.2.4.09.1
 - 1.2.4.08.4
 - 1.2.4.08.2
 - 1.2.4.08.1
 - 1.2.4.07.4
 - 1.2.4.07.3
 - 1.2.4.07.2
 - 1.2.4.07.1
 - 1.2.4.06.4
 - 1.2.4.06.3
 - 1.2.4.06.1
 - 1.2.4.05.2
 - 1.2.4.05.1
 - 1.2.4.04.4
 - 1.2.4.05.4
 - 1.2.4.05.3
 - 1.2.4.04.3
 - 1.2.4.04.2
 - 1.2.4.04.1
 - 1.2.4.03.4
 - 1.2.4.03.3
 - 1.2.4.03.2
 - 1.2.4.03.1
 - 1.2.4.01.4
 - 1.2.4.01.2
 - 1.2.4.02.2
 - 1.2.4.02.3
 - 1.2.4.02.4

HJ

- HM
 - 1.2.4.11.3
 - 1.2.4.08.2
 - 1.2.4.07.2

Figura 34 Árvores normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Alta Com Fluxo de água.

Figura 35 Árvores consenso normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Baixa Sem Fluxo de água.

Figura 36 Árvores consenso normal (a) e reversa (b) para a condição de desenvolvimento com Temperatura Baixa Com Fluxo de água.

Além da quantidade de variação nas sequências de desenvolvimento reveladas por Plasticidade, também foram observadas diferenças entre a ordem de ossificação das estruturas avaliadas e o padrão de ossificação em diferentes janelas ontogenéticas. Esses padrões foram acessados a partir das redes de reticulação obtidas utilizando árvores das condições de desenvolvimento com Temperatura Alta Com Fluxo (Figura 37), Temperatura Baixa Com Fluxo (Figura 38), Temperatura Alta Sem Fluxo (Figura 39) e Temperatura Baixa Sem Fluxo (Figura 40). As sequências ontogenéticas do desenvolvimento das estruturas ósseas foram acessadas a partir do mapeamento das mudanças de estados de caráter que, nesse caso, representam a condrificação ou ossificação de uma estrutura osteológica específica. Os traços indicam eventos de condrificação e ossificação das estruturas, os números e cores indicam os estágios de desenvolvimento e o número dos espécimes, e os espécimes hipotéticos estão sinalizados pela cor cinza.

As primeiras estruturas do pós-crânio que condrificaram e ossificaram em todas as condições de desenvolvimento foram os centros vertebrais e os arcos hemais e neurais, seguidos por algumas estruturas das nadadeiras peitoral e caudal, cleitro e hipurais, nessa ordem. Em comum, todas essas estruturas guardam relação com a locomoção desses peixes. Subsequentemente, os eventos de condrificação e ossificação se estabeleceram nas estruturas do aparelho de Weber e da nadadeira caudal, passando pelas nadadeiras dorsal e anal, e terminando nas nadadeiras peitoral e pélvica. Foram observadas variações dessas sequências específicas entre cada condição de desenvolvimento.

Figura 37 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Alta Com Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.

Figura 38 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Baixa Com Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.

Figura 39 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Alta Sem Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.

Figura 40 Rede de reticulação das trajetórias ontogenéticas mapeadas a partir de uma das topologias possíveis para peixes mantidos na condição com Temperatura Baixa Sem Fluxo de água. As linhas indicam mudanças no estado de caráter, os números representam o estágio e o espécime, e os hipotéticos estão representados pela letra H.

4.4 Expressão Gênica

Análises preliminares da expressão de BMP4 em peixes provenientes de diferentes condições de desenvolvimento sugeriram que os sinais ambientais de temperatura e fluxo de água afetaram os níveis de expressão gênica da proteína morfogenética óssea 4 que está associada à ossificação. Especificamente, os níveis de expressão diferiram em cada uma das condições de desenvolvimento nos estágios investigados (Figura 41, Tabela 14).

Figura 41 Gráfico da amplificação do gene de interesse BMP4 e do endógeno controle GAPDH em indivíduos mantidos em diferentes condições de desenvolvimento. *Threshold*=1,495.

Os níveis de expressão do gene CX43 (Conexina 43), relacionado à ossificação e ao estresse mecânico, também diferiram entre peixes oriundos de diferentes condições de desenvolvimento nos estágios analisados (Figura 42, Tabela 14).

Figura 42 Gráfico da amplificação do gene de interesse CX43 e do endógeno controle GAPDH para as condições de desenvolvimento. *Threshold=1,495*.

Tabela 14 Médias dos Cts (*Threshold Cycles*) para cada uma das condições de desenvolvimento para os genes BMP4, CX43 e GAPDH em peixes com 21, 33 e 48 dias pós-eclosão (DPE). Os traços representam valores que foram eliminados da análise preliminar em decorrência da não amplificação.

Condições de Desenvolvimento	21 DPE			33 DPE			48 DPE		
	BMP4	CX43	GAPDH	BMP4	CX43	GAPDH	BMP4	CX43	GAPDH
Temperatura Alta Sem Fluxo	26,41	24,91	-	24,60	27,42	20,89	22,35	25,65	23,69
Temperatura Alta Com Fluxo	27,91	24,94	-	23,25	24,76	-	-	-	-
Temperatura Baixa Sem Fluxo	24,79	23,44	-	26,59	-	24,02	22,81	22,74	-
Temperatura Baixa Com Fluxo	25,81	-	-	25,13	-	-	18,08	24,96	-

Os níveis de expressão de BMP4 diferiram entre estágios e entre condições de desenvolvimento: peixes mantidos na condição com Temperatura Alta Com Fluxo de água apresentaram o menor nível de expressão de BMP4 com 21 DPE e o maior nível de expressão com 33 DPE (Tabela 15, Figura 43); peixes provenientes da condição com Temperatura Alta Sem Fluxo de água apresentaram um padrão de expressão gênica

similar aos anteriores, porém menos acentuado, seguido dos peixes da condição com Temperatura Baixa Com Fluxo de água. Já os peixes que se desenvolveram na Temperatura Baixa Sem fluxo de água apresentaram níveis mais altos de expressão de BMP4 com 21 DPE, e esses níveis diminuíram nos indivíduos com 33 DPE (Tabela 15, Figura 43).

Tabela 15 Níveis de expressão gênica de BMP4 para cada uma das condições de desenvolvimento com 21 e 33 Dias Pós-Eclosão (DPE) calculados a partir do método Delta-Delta Ct.

Condições de Desenvolvimento	21 DPE			33 DPE		
	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Temperatura Alta Sem Fluxo	3,34	1,11	0,46	1,53	-1,26	2,40
Temperatura Alta Com Fluxo	4,84	2,61	0,16	0,18	-2,61	6,11
Temperatura Baixa Sem Fluxo	1,73	-0,51	1,42	3,52	0,73	0,60
Temperatura Baixa Com Fluxo	2,74	0,51	0,70	2,06	-0,73	1,66

Figura 43 Comparação dos níveis de expressão de BMP4, obtidos a partir do método Delta-Delta Ct, para cada condição de desenvolvimento em indivíduos nos estágios 21 e 33 Dias pós-eclosão (DPE).

5 Discussão

Nesse trabalho, indivíduos de *Astyanax lacustris* foram submetidos a diferentes condições ambientais de desenvolvimento com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura e do fluxo de água no estabelecimento do fenótipo durante a ontogenia. Os fenótipos morfológicos, osteológicos e a expressão gênica foram comparados entre os grupos amostrados em diferentes estágios ontogenéticos, permitindo inferir respostas plásticas aos sinais ambientais manipulados em laboratório e avaliar a quantidade de variação fenotípica revelada em diferentes condições de desenvolvimento. Os resultados obtidos indicam uma associação entre a quantidade de variação fenotípica revelada e os sinais de temperatura e fluxo de água no ambiente de desenvolvimento, sugerindo interações entre os diferentes componentes ambientais que podem promover diferenças na magnitude das respostas plásticas. Os resultados obtidos tornam evidente que a temperatura do ambiente de desenvolvimento afeta a magnitude das respostas plásticas do fenótipo morfológico desencadeadas por diferenças no fluxo de água, influenciando também as trajetórias ontogenéticas percorridas e potencializando variações nas sequências de ossificação. Adicionalmente, os níveis de expressão gênica de genes associados com o desenvolvimento das estruturas ósseas variaram conforme as condições de desenvolvimento e segundo a janela ontogenética. Os resultados desse trabalho corroboram o potencial do ambiente de desenvolvimento em influenciar a distribuição e a magnitude da variação fenotípica dentro de uma população, como discutido por Sears (2014).

A morfologia externa de indivíduos adultos de *Astyanax lacustris* provenientes de populações naturais congrega estruturas que variam conjuntamente em uma mesma direção. As variáveis morfológicas que mais contribuem para a variação intraespecífica observada referem-se à altura e largura do corpo e do pedúnculo caudal, à largura da cabeça, e ao comprimento da nadadeira peitoral. Para avaliar se parte dessa variação reflete respostas plásticas decorrentes da condição ambiental experimentada durante o desenvolvimento, larvas dessa espécie com 12 dias pós-eclosão foram submetidas a diferentes condições de desenvolvimento que integraram sinais de temperatura e fluxo de água. Como resultado, observamos que a temperatura durante o desenvolvimento influenciou taxas de crescimento e diferenciação dos indivíduos, corroborando estudos anteriores que relataram taxas mais rápidas em peixes que se desenvolvem em temperaturas mais altas (Koumoundouros *et al.*, 2001, 2009; Chalde *et al.*, 2011;

Dolomatov *et al.*, 2013; Jonsson & Jonsson, 2014). O fluxo de água nas condições de desenvolvimento também afetou as taxas de crescimento e diferenciação, e peixes que se desenvolveram nas condições ambientais com fluxo de água apresentaram taxas mais rápidas de crescimento do que aqueles provenientes de ambientes sem fluxo de água. Tal diferença provavelmente relaciona-se com demandas energéticas de natação e maleabilidade das estruturas ósseas (Peres-Neto & Magnan, 2004; Suniaga *et al.*, 2018). As normas de reação da altura do corpo e altura do pedúnculo em relação ao fluxo de água do ambiente de desenvolvimento também foram influenciadas pela temperatura, e os resultados do presente trabalho apontam um efeito cumulativo resultante do conjunto de diferentes sinais ambientais ao longo do estabelecimento do fenótipo (ver Bonini-Campos *et al.*, 2019).

Assim como demonstrado por Peres-Neto (2004) e Fischer-Rousseau (2010), no presente trabalho os peixes que se desenvolveram em ambiente com fluxo de água apresentaram uma menor altura relativa do corpo ao final do período de manutenção em laboratório, quando comparados com os peixes das condições sem fluxo de água. Esses padrões morfológicos revelados por plasticidade corroboram com o que foi descrito para *Salvelinus*, nesse grupo os indivíduos que se desenvolveram em ambientes com fluxo de água apresentaram menor altura relativa do corpo quando comparados aos peixes que se desenvolveram em ambientes sem fluxo de água (Peres-Neto & Magnan, 2004) e também para *Oncorhynchus*, nesses peixes o fluxo de água do ambiente de desenvolvimento afetou significativamente os fenótipos morfológicos revelados, com destaque para os padrões associados às janelas ontogenéticas (Fischer-Rousseau *et al.*, 2010). Também foram observadas diferenças na altura do pedúnculo caudal em relação ao fluxo de água - em temperaturas altas os peixes que se desenvolveram na presença de fluxo apresentaram pedúnculos relativamente mais baixos em comparação com os peixes que se desenvolveram na ausência de fluxo de água, assim como observado por Peres-Neto (2004), enquanto na temperatura baixa as respostas plásticas apresentaram padrão inverso. Essa diferença no padrão dos fenótipos revelados relacionada ao regime térmico do ambiente de desenvolvimento pode indicar uma influência da temperatura sobre as respostas plásticas desencadeadas por outros fatores ambientais durante o estabelecimento do fenótipo.

Além do efeito da temperatura e do fluxo de água nas taxas de crescimento e diferenciação, peixes mantidos em diferentes condições de desenvolvimento diferiram

nas magnitudes de variação existente nos fenótipos morfológicos revelados, um padrão sugerido por Mabee (2000) e Cloutier (2010), sendo a quantidade de variação morfológica incrementada em condições de desenvolvimento com temperatura alta. A partir da análise dos coeficientes de variação, o presente trabalho demonstrou que há maior variação no fenótipo morfológico revelado em temperaturas altas, sendo a temperatura um possível potencializador dos efeitos das respostas plásticas. Adicionalmente, os peixes que se desenvolveram em condições com presença de fluxo de água, tanto em temperaturas altas quanto em temperaturas baixas, apresentaram menor coeficiente de variação quando comparados aos peixes que se desenvolveram em condições sem fluxo de água, indicando que a presença de um sinal ambiental perturbador, como o fluxo de água, pode não apenas direcionar as respostas plásticas, mas também influenciar a quantidade de variação dentro de uma população, produzindo formas mais parecidas entre si quando comparadas aos fenótipos estabelecidos em condições de desenvolvimento sem a presença desse sinal ambiental.

A quantidade de variação também diferiu ao longo das janelas de desenvolvimento, um padrão relatado por Grünbaum (2007), Georga (2010) e Podrabsky (2010), que sugeriram que algumas janelas ontogenéticas seriam mais sensíveis que outras, de forma que o efeito dos sinais ambientais poderia diferir quantitativamente conforme o estágio. Essa ideia pode ser exemplificada levando em consideração o efeito que as condições ambientais de desenvolvimento exerceram no crescimento alométrico dos peixes estudados. Tanto a altura do corpo quanto a altura do pedúnculo caudal apresentaram uma alometria positiva em relação ao tamanho do corpo, mas as inclinações das retas de alometria diferiram entre grupos em determinados estágios. Em algumas janelas ontogenéticas, como entre 33 e 42 DPE, observou-se maior diferença entre as relações alométricas dos fenótipos revelados pelas condições ambientais, enquanto no início do desenvolvimento, aqui representado pelo período entre 21 e 33 DPE, as retas de alometria não diferiram entre si. O mesmo foi observado para a homogeneidade das variâncias: o comprimento do corpo, a altura do corpo e a altura do pedúnculo caudal diferiram na quantidade de variação morfológica dentro de uma condição de desenvolvimento em comparação com as outras, principalmente nos estágios finais do desenvolvimento.

As condições de desenvolvimento também influenciaram as trajetórias ontogenéticas e os tempos de condrificação e ossificação, corroborando as ideias

propostas por Sfakianakis (2004), Cloutier (2010) e Fiaz (2012). Especificamente, peixes que se desenvolveram na condição com Temperatura Alta Com Fluxo de água apresentaram os menores tempos de ossificação para a maioria das estruturas das nadadeiras peitoral, anal, dorsal, caudal e pélvica, enquanto os peixes que se desenvolveram na condição com Temperatura Baixa Sem Fluxo de água apresentaram os maiores tempos de ossificação. Assim como observado por Sfakianakis (2011) em peixes do gênero *Pagellus*, os indivíduos que se desenvolveram em temperaturas mais altas apresentaram menores tempos de condrição e ossificação. Adicionalmente, os resultados desse trabalho corroboram com trabalhos anteriores que descrevem mudanças significativas no tempo absoluto de condrição e ossificação dos elementos ósseos do pós-crânio relacionadas ao fluxo de água do ambiente de desenvolvimento. Os elementos ósseos condriaram e ossificaram mais cedo nos indivíduos que se desenvolveram em ambientes com presença de fluxo de água, assim como descrito em *Salvelinus* (Cloutier *et al.*, 2010) e em *Danio rerio* (Fiaz *et al.*, 2012).

Os peixes que se desenvolveram em diferentes ambientes de desenvolvimento também diferiram nos níveis de expressão de genes relacionados com processos de ossificação e resposta ao estresse mecânico durante o desenvolvimento, um resultado que pode ter forte relação com a variação do fenótipo morfológico e das sequências de ossificação observadas nos peixes da espécie *Astyanax lacustris*, como sugerido em outras espécies de peixes (McClelland *et al.*, 2006; Hu & Albertson, 2017; Politis *et al.*, 2017). Os resultados do presente trabalho corroboram o que vem sendo discutido atualmente na literatura acerca do efeito da temperatura e do fluxo de água no estabelecimento do fenótipo em peixes de água doce, corroborando que ambos influenciam o fenótipo morfológico, as sequências de ossificação e a expressão gênica ao longo da ontogenia. Nossos resultados também acrescentam à discussão o efeito das condições ambientais na quantidade de variação revelada. É fundamental reconhecer que estas variantes plásticas estariam sujeitas a processos de Seleção em populações naturais, e que esses processos integram a combinação de diferentes sinais ambientais ao longo do estabelecimento do fenótipo com seu efeito nas médias fenotípicas ao longo de várias gerações. Essa complexidade das interações, direções e magnitudes das respostas plásticas são de suma importância na compreensão do papel do ambiente como indutor de variação e a alocação dos processos de desenvolvimento e da

Plasticidade Fenotípica no processo evolutivo (West-Eberhard, 2003; Pfennig *et al.*, 2010; Lofeu & Kohlsdorf, 2015; Hendry, 2016).

A avaliação dos efeitos do ambiente no estabelecimento do fenótipo pode nos ajudar na compreensão de hipóteses evolutivas concebidas dentro das ideias de *plasticity-first*, respostas plásticas não adaptativas e trajetórias evolutivas guiadas por Seleção Natural (Schlichting & Smith, 2002; Young, 2013; Ghalambor *et al.*, 2015; Levis & Pfennig, 2016). Posicionar o ambiente não apenas como seletor da variação expressa, mas também como indutor de variantes fenotípicas reveladas no desenvolvimento é imprescindível para o entendimento amplo e integrado dos mecanismos e processos evolutivos (West-Eberhard, 2003; Lofeu & Kohlsdorf, 2015). O presente trabalho corrobora a influência do ambiente no surgimento de variantes fenotípicas em *Astyanax lacustris*, e coloca em foco as diferentes possibilidades intrínsecas do desenvolvimento e suas relações com os sinais ambientais, contribuindo para ampliar e fundamentar empiricamente o arcabouço conceitual na fronteira entre a Biologia do Desenvolvimento, a Ecologia e a Evolução.

6 Literatura Citada

- Adamov NS de M, Nascimento NF do, Maciel ECS, et al. 2017.** Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* **48**: 741–750.
- Atkin OK, Loveys BR, Atkinson LJ, et al. 2006.** Phenotypic plasticity and growth temperature: Understanding interspecific variability. *Journal of Experimental Botany* **57**: 267–281.
- Baldwin JM. 1896.** A new factor in evolution. *The american naturalist* **30**: 441–451.
- Barros TF de, Louvise J & Caramaschi ÉP. 2019.** Flow gradient drives morphological divergence in an Amazon pelagic stream fish. *Hydrobiologia* **833**: 217–229.
- Bemvenuti M de A. 2005.** Osteologia comparada entre as espécies de peixes-rei *Odontesthes Evermann & Kendall* (Osteichthyes, Atherinopsidae) do sistema lagunar Patos-Mirim, no extremo sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **22**: 293–305.
- Van Bergen E, Osbaldeston D, Kodandaramaiah U, et al. 2017.** Conserved patterns of integrated developmental plasticity in a group of polyphenic tropical butterflies. *BMC Evolutionary Biology* **17**: 1–13.
- Blaxter JHS. 1992.** The Effect of Temperature on Larval Fishes. *Netherlands Journal of Zoology*.
- Bonamour S, Chevin LM, Charmantier A, et al. 2019.** Phenotypic plasticity in response to climate change: The importance of cue variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **374**.
- Bonini-Campos B, Lofeu L, Brandt R, et al. 2019.** Different developmental environments reveal multitrait plastic responses in South American Anostomidae fish. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **332**: 238–244.
- Bradshaw AD. 1965.** Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. *Advances in Genetics* **13**: 115–155.

Burggren W & Dubansky B. 2018. *Development and Environment*.

Chalde T, Fernández DA, Cussac VE, et al. 2011. The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* - Morphological indicators of development. *Neotropical Ichthyology* **9**: 747–756.

Chen J, Nolte V & Schlotterer C. 2015. Temperature-related reaction norms of gene expression: Regulatory architecture and functional implications. *Molecular Biology and Evolution* **32**: 2393–2402.

Chevin LM, Lande R & Mace GM. 2010. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: Towards a predictive theory. *PLoS Biology* **8**.

Cloutier R, Caron A, Grünbaum T, et al. 2010. Effect of water velocity on the timing of skeletogenesis in the arctic Charr, *Salvelinus alpinus* (Salmoniformes: Teleostei): An empirical case of developmental plasticity. *International Journal of Zoology* **2010**.

Colbert MW & Rowe T. 2008. Ontogenetic sequence analysis: Using parsimony to characterize developmental sequences and sequence polymorphism. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **310**: 398–416.

Corral WDR & Aguirre WE. 2019. Effects of temperature and water turbulence on vertebral number and body shape in *Astyanax mexicanus* (Teleostei: Characidae). *PloS one* **14**.

Costa-Pereira R, Araújo MS, Paiva F, et al. 2016. Functional morphology of the tetra fish *Astyanax lacustris* differs between divergent habitats in the Pantanal wetlands. *Journal of Fish Biology* **89**: 1450–1458.

Cubbage CC & Mabee PM. 1996a. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). *Journal of Morphology* **229**: 121–160.

Cubbage CC & Mabee PM. 1996b. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). *Journal of Morphology* **229**: 121–160.

Dagosta FCP & de Pinna MCC. 2018. A history of the biogeography of Amazonian fishes. *Neotropical Ichthyology* **16**.

Dammerman KJ, Steibel JP & Scribner KT. 2016. Increases in the mean and variability of thermal regimes result in differential phenotypic responses among genotypes during early ontogenetic stages of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Evolutionary Applications* **9**: 1258–1270.

Dayan DI, Crawford DL & Oleksiak MF. 2015. Phenotypic plasticity in gene expression contributes to divergence of locally adapted populations of *Fundulus heteroclitus*. *Molecular Ecology* **24**: 3345–3359.

Dewitt TJ & Scheiner SM. 2004. *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*. Oxford University Press.

DeWitt TJ, Sih A & Wilson DS. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 77–81.

Dimitriadi A, Beis D, Arvanitidis C, et al. 2018. Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy. *Scientific Reports* **8**: 1–10.

Dolomatov S, Zukow W & Brudnicki R. 2013. Role of temperature in regulation of the life cycle of temperate fish. *Russian Journal of Marine Biology* **39**: 81–91.

Fábregas-Tejeda A & Vergara-Silva F. 2018. The emerging structure of the Extended Evolutionary Synthesis: where does Evo-Devo fit in? *Theory in Biosciences* **137**: 169–184.

Fawcett TW & Frankenhuis WE. 2015. Adaptive explanations for sensitive windows in development. *Frontiers in Zoology* **12**: 1–14.

Fiaz AW, Léon-Kloosterziel KM, Gort G, et al. 2012. Swim-training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*danio rerio*). *PLoS ONE* **7**: 1–13.

Fischer-Rousseau L, Chu KP & Cloutier R. 2010. Developmental plasticity in fish exposed to a water velocity gradient: A complex response. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **314**: 67–85.

Forsman A. 2015. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity* **115**: 276–284.

Franssen NR, Stewart LK & Schaefer JF. 2013. Morphological divergence and flow-induced phenotypic plasticity in a native fish from anthropogenically altered stream habitats. *Ecology and Evolution* **3**: 4648–4657.

Freeman S & Herron JC. 2007. *Evolutionary analysis*. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.

Fricke R, Eschmeyer WN & Van der Laan R. 2020. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES.

Georga I & Koumoundouros G. 2010. Thermally induced plasticity of body shape in adult zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Morphology* **271**: 1319–1327.

Georgakopoulou E, Katharios P, Divanach P, et al. 2010. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **308**: 13–19.

Georgakopoulou E, Sfakianakis DG, Kouttouki S, et al. 2007. The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass. *Journal of Fish Biology* **70**: 278–291.

Gery J. 1977. Characoids of the world.

Ghalambor CK, Hoke KL, Ruell EW, et al. 2015. Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature* **525**: 372–375.

Gilbert SF. 2001. Ecological developmental biology: Developmental biology meets the real world. *Developmental Biology* **233**: 1–12.

Gilbert SF & Epel D. 2009. *Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution*.

Goloboff PA, Farris J & Nixon K. 2016. TNT: with a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics* **32**: 221–238.

Gomez-Mestre I & Buchholz DR. 2006. Developmental plasticity mirrors differences among taxa in spadefoot toads linking plasticity and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19021–19026.

Green BS & Fisher R. 2004. Temperature influences swimming speed, growth and

larval duration in coral reef fish larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **299**: 115–132.

Griffin CT. 2018. Developmental patterns and variation among early theropods. *Journal of Anatomy* **232**: 604–640.

Griffin CT & Nesbitt SJ. 2016a. The femoral ontogeny and long bone histology of the Middle Triassic (?late Anisian) dinosauriform *Asilisaurus kongwe* and implications for the growth of early dinosaurs. *Journal of Vertebrate Paleontology* **36**.

Griffin CT & Nesbitt SJ. 2016b. Anomalously high variation in postnatal development is ancestral for dinosaurs but lost in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 14757–14762.

Grünbaum T, Cloutier R, Mabee PM, et al. 2007. Early developmental plasticity and integrative responses in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): effects of water velocity on body size and shape. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **308**: 396–408.

Gunter HM, Fan S, Xiong F, et al. 2013. Shaping development through mechanical strain: The transcriptional basis of diet-induced phenotypic plasticity in a cichlid fish. *Molecular Ecology* **22**: 4516–4531.

Hall BK. 2005. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*. Elsevier.

Harrington RW & Crossman RA. 1976. Temperature-induced meristic variation among three homozygous genotypes (clones) of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus*. *Canadian Journal of Zoology* **54**: 1143–1155.

Hendry AP. 2016. Key questions on the role of phenotypic plasticity in eco-evolutionary dynamics. *Journal of Heredity* **107**: 25–41.

Holekamp KE & Smale L. 1998. Behavioral Development in the Spotted Hyena. *BioScience* **48**: 997–1005.

Hu Y & Albertson RC. 2017. Baby fish working out: an epigenetic source of adaptive variation in the cichlid jaw. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**: 20171018.

Imre I, McLaughlin RL & Noakes DLG. 2002. Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow. *Journal of Fish Biology* **61**: 1171–1181.

Ingenito LFS & Duboc LF. 2014. A new species of *Astyanax* (ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **12**: 281–290.

Jeffery WR. 2009a. *Evolution and Development*. Elsevier Inc.

Jeffery WR. 2009b. Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish . *Annual Review of Genetics* **43**: 25–47.

Johnston IA. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2249–2264.

De Jong IML, Colbert MW, Witte F, et al. 2009. Polymorphism in developmental timing: Intraspecific heterochrony in a Lake Victoria cichlid. *Evolution and Development* **11**: 625–635.

Jonsson B & Jonsson N. 2014. Early environment influences later performance in fishes. *Journal of Fish Biology* **85**: 151–188.

Kamler E. 2012. *Early life history of fish: an energetics approach*. Springer Science & Business Media.

Kavanagh KD, Haugen TO, Gregersen F, et al. 2010. Contemporary temperature-driven divergence in a Nordic freshwater fish under conditions commonly thought to hinder adaptation. *BMC Evolutionary Biology* **10**.

Keeley ER, Parkinson EA & Taylor EB. 2007. The origins of ecotypic variation of rainbow trout: a test of environmental vs. genetically based differences in morphology. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 725–736.

Kingsolver JG & Huey RB. 1998. Evolutionary analyses of morphological and physiological plasticity in thermally variable environments. *American Zoologist* **38**: 545–560.

Kirschner MW & Gerhart JC. 2010. Facilitated variation. In: *Evolution: the extended synthesis*. MIT Press Cambridge, MA, 253–280.

Klingenberg CP. 2019. Phenotypic plasticity, developmental instability, and robustness: The concepts and how they are connected. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**: 1–15.

Koumoundouros G, Ashton C, Sfakianakis DG, et al. 2009. Thermally induced phenotypic plasticity of swimming performance in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Journal of Fish Biology* **74**: 1309–1322.

Koumoundouros G, Divanach P, Anezaki L, et al. 2001. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology* **139**: 817–830.

Krishnan J & Rohner N. 2017. Cavefish and the basis for eye loss. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**.

Kwain W hwa. 1975. Embryonic Development, Early Growth, and Meristic Variation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Exposed to Combinations of Light Intensity and Temperature . *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **32**: 397–402.

Laland K, Uller T, Feldman M, et al. 2014. Does evolutionary theory need a rethink? *Nature News* **514**: 161.

Laland KN, Uller T, Feldman MW, et al. 2015. The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**: 20151019.

Lande R. 2009. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 1435–1446.

Langerhans RB. 2008. Predictability of phenotypic differentiation across flow regimes in fishes. *Integrative and Comparative Biology* **48**: 750–768.

Langerhans RB, Chapman LJ & DeWitt TJ. 2007. Complex phenotype–environment associations revealed in an East African cyprinid. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 1171–1181.

Langerhans RB, Layman CA, Langerhans AK, et al. 2003. Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. : 689–698.

Levis NA & Pfennig DW. 2016. Evaluating ‘Plasticity-First’ Evolution in Nature: Key

Criteria and Empirical Approaches. *Trends in Ecology and Evolution* **31**: 563–574.

Lindsey C & Harrington R. 1972. Extreme vertebral variation induced by temperature in a homozygous clone of the self-fertilizing cyprinodontid fish *Rivulus marmoratus*. *Canadian Journal of Zoology* **50**: 1–12.

Lofeu L & Kohlsdorf T. 2015. Mais que seleção. *Genética na Escola* **10**: 11–19.

Loizides M, Georgakopoulou E, Christou M, et al. 2014. Thermally-induced phenotypic plasticity in gilthead seabream *Sparus aurata* L. (Perciformes, Sparidae). *Aquaculture* **432**: 383–388.

Love AC & Raff RA. 2003. Knowing your ancestors: Themes in the history of evo-devo. *Evolution and Development* **5**: 327–330.

De Lucena CAS & Soares HG. 2016. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* ‘caudal peduncle spot’ subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa* **4072**: 101–125.

Mabee PM, Olmstead KL & Cubbage CC. 2000. An experimental study of intraspecific variation, developmental timing, and heterochrony in fishes. *Evolution* **54**: 2091–2106.

Manenti T, Sørensen JG, Moghadam NN, et al. 2016. Few genetic and environmental correlations between life history and stress resistance traits affect adaptation to fluctuating thermal regimes. *Heredity* **117**: 149–154.

Marques-Souza H, Scheneider I, Kohlsdorf T, et al. 2012. Evo-Devo verde-amarela: biologia evolutiva do desenvolvimento ganha espaço no Brasil. *Ciência Hoje, São Paulo* **298**: 39–42.

Martell DJ, Kieffer JD & Trippel EA. 2005. Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. *Journal of Fish Biology* **66**: 1558–1575.

Mattox GMT, Britz R & Toledo-Piza M. 2014. Skeletal development and ossification sequence of the characiform *Salminus brasiliensis* (Ostariophysi: Characidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **25**: 103–158.

- McClelland GB, Craig PM, Dhekney K, et al. 2006.** Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Physiology* **577**: 739–751.
- Menuet A, Alunni A, Joly JS, et al. 2007.** Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: Multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* **134**: 845–855.
- Mirande JM. 2010.** Phylogeny of the family characidae (teleostei: Characiformes): From characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* **8**: 385–568.
- Mirande JM. 2018.** Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics* **35**: 282–300.
- Moczek AP. 2015.** Re-evaluating the environment in developmental evolution. *Frontiers in Ecology and Evolution* **3**: 7.
- Moore SW. 2003.** Scrambled eggs: Mechanical forces as ecological factors in early development. *Evolution and Development* **5**: 61–66.
- Morris ZS. 2013.** Skeletal ontogeny of *Monodelphis domestica* (Mammalia: Didelphidae): quantifying variation, variability, and technique bias in ossification sequence reconstruction.
- Müller GB. 2007.** Evo–devo: extending the evolutionary synthesis. *Nature reviews genetics* **8**: 943–949.
- Murren CJ, Auld JR, Callahan H, et al. 2015.** Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: Limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity* **115**: 293–301.
- Nijhout HF. 1999.** Control Mechanisms of Polyphenic Development in Insects. *BioScience* **49**: 181–192.
- Nijhout HF. 2003.** Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution and Development* **5**: 9–18.
- Nishikawa K & Kinjo AR. 2018.** Mechanism of evolution by genetic assimilation. *Biophysical Reviews* **10**: 667–676.

Nogueira LB, Godinho AL & Godinho HP. 2014. Early development and allometric growth in hatchery-reared characin *Brycon orbignyanus*. *Aquaculture Research* **45**: 1004–1011.

Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, et al. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 1–25.

Oostra V, Saastamoinen M, Zwaan BJ, et al. 2018. Strong phenotypic plasticity limits potential for evolutionary responses to climate change. *Nature Communications* **9**.

Parsons KJ, McWhinnie K, Pilakouta N, et al. 2019. Does phenotypic plasticity initiate developmental bias? *Evolution & development* **22**: 56–70.

Pavlicev M, Cheverud JM & Wagner GP. 2011. Evolution of adaptive phenotypic variation patterns by direct selection for evolvability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 1903–1912.

Peres-Neto PR & Magnan P. 2004. The influence of swimming demand on phenotypic plasticity and morphological integration: A comparison of two polymorphic charr species. *Oecologia* **140**: 36–45.

Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, et al. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **25**: 459–467.

Pigliucci M. 2001. *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. The Johns Hopkins University Press.

Pigliucci M & Muller G. 2010. *Evolution—the extended synthesis*.

Podrabsky JE, Garrett IDF & Kohl ZF. 2010. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* **213**: 3280–3288.

Politis SN, Mazurais D, Servili A, et al. 2017. Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS ONE*

12: 1–23.

Psujek S & Beer RD. 2008. Developmental bias in evolution: Evolutionary accessibility of phenotypes in a model evo-devo system. *Evolution and Development* **10**: 375–390.

Riera-Heredia N, Martins R, Mateus AP, et al. 2018. Temperature responsiveness of gilthead sea bream bone; an in vitro and in vivo approach. *Scientific Reports* **8**: 1–14.

Ruiz-C. RI & Román-Valencia C. 2006. Osteología de *Astyanax aurocaudatus* Eigenmann, 1913 (Pisces, Characidae), con notas sobre la validez de *Carlastyanax* Géry, 1972. *Animal Biodiversity and Conservation* **29**: 49–64.

Sanger TJ & Rajakumar R. 2019. How a growing organismal perspective is adding new depth to integrative studies of morphological evolution. *Biological Reviews* **94**: 184–198.

Schaefer J & Ryan A. 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* **69**: 722–734.

Schlichting CD & Pigliucci M. 1993. Control of Phenotypic Plasticity Via Regulatory Genes. *The American Naturalist* **142**: 366–370.

Schlichting CD & Pigliucci M. 1998. *Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective*. Sinauer Associates Incorporated.

Schlichting CD & Smith H. 2002. Phenotypic plasticity: Linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology* **16**: 189–211.

Schmalhausen II. 1949. Factors of evolution: the theory of stabilizing selection.

Schmidt K & Starck JM. 2010. Developmental plasticity, modularity, and heterochrony during the phylotypic stage of the zebra fish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **314**: 166–178.

Schneider RF, Li Y, Meyer A, et al. 2014. Regulatory gene networks that shape the development of adaptive phenotypic plasticity in a cichlid fish. *Molecular ecology* **23**: 4511–4526.

Schneider RF & Meyer A. 2016. How plasticity, genetic assimilation and cryptic

genetic variation may contribute to adaptive radiations. *Molecular Ecology* **26**: 330–350.

Sears KE. 2014. Quantifying the impact of development on phenotypic variation and evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **322**: 643–653.

Serra JP & Langeani F. 2006. Redescrção e osteologia de *Bryconamericus exodon* Eigenmann, 1907 (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Biota Neotropica* **6**.

Sfakianakis DG, Koumoundouros G, Divanach P, et al. 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* **232**: 407–424.

Sfakianakis DG, Leris I, Laggis A, et al. 2011. The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Environmental Biology of Fishes* **92**: 197–205.

Shama LNS. 2017. The mean and variance of climate change in the oceans: Hidden evolutionary potential under stochastic environmental variability in marine sticklebacks. *Scientific Reports* **7**: 1–14.

Shine R, Elphick MJ & Harlow PS. 1997. The Influence of Natural Incubation Environments on the Phenotypic Traits of Hatchling Lizards. *Ecology* **78**: 2559–2568.

Sidlauskas B, Chernoff B & Machado-Allison A. 2006. Geographic and environmental variation in *Bryconops* sp. cf. *melanurus* (Ostariophysi: Characidae) from the Brazilian Pantanal. *Ichthyological Research* **53**: 24–33.

Simon MN. 2010. Plasticidade fenotípica em relação à temperatura de larvas de *Rhinella* (Anura: Bufonidae) da caatinga e da floresta Atlântica.

Simon MN, Ribeiro PL & Navas CA. 2015. Upper thermal tolerance plasticity in tropical amphibian species from contrasting habitats: Implications for warming impact prediction. *Journal of Thermal Biology* **48**: 36–44.

Stearns SC. 1989. The Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity. *BioScience* **39**: 436–445.

- Stearns SC & Hoekstra RF. 2000.** *Evolution, an introduction*. Oxford University Press.
- Stevanato DJ. 2016.** Ontogenia larval e pós-larval de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) em laboratório.
- Stevanato DJ & Ostrensky A. 2018.** Ontogenetic development of tetra *astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* **16**: 1–10.
- Stillwell RC, Wallin WG, Hitchcock LJ, et al. 2007.** Phenotypic plasticity in a complex world: Interactive effects of food and temperature on fitness components of a seed beetle. *Oecologia* **153**: 309–321.
- Sultan SE. 2007.** Development in context: the timely emergence of eco-devo. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 575–582.
- Sultan SE. 2015.** *Organism & Environment: Ecological Development, Niche Construction, and Adaptation*. Oxford University Press.
- Suniaga S, Rolvien T, Vom Scheidt A, et al. 2018.** Increased mechanical loading through controlled swimming exercise induces bone formation and mineralization in adult zebrafish. *Scientific Reports* **8**: 1–13.
- Taborsky B. 2017.** *Developmental Plasticity: Preparing for Life in a Complex World*. Elsevier Ltd.
- Taylor WR & Van Dyke GC. 1985.** Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* **9**: 107–109. *International Journal of Aquatic Biology (2015)* **3**: 290–300.
- Toledo-Piza M, Mattox GMT & Britz R. 2014.** *Priocharax nanus*, a new miniature characid from the Rio Negro, Amazon basin (Ostariophysi: Characiformes), with an updated list of miniature Neotropical freshwater fishes. *Neotropical Ichthyology* **12**: 229–246.
- Uller T, Moczek AP, Watson RA, et al. 2018.** Developmental bias and evolution: A regulatory network perspective. *Genetics* **209**: 949–966.
- Valdéz-Moreno ME & Contreras-Balderas S. 2003.** Skull osteology of the characid

fish *Astyanax mexicanus* (Teleostei: Characidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* **116**.

Valladares F, Matesanz S, Guilhaumon F, et al. 2014. The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters* **17**: 1351–1364.

Waddington C. 1942. Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature Publishing Group*.

Watkins TB & Vraspir J. 2006. Both incubation temperature and posthatching temperature affect swimming performance and morphology of wood frog tadpoles (*Rana sylvatica*). *Physiological and Biochemical Zoology* **79**: 140–149.

West-Eberhard MJ. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual review of Ecology and Systematics* **20**: 249–278.

West-Eberhard MJ. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.

West-Eberhard MJ. 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Systematics and the Origin of Species: On Ernst Mayr's 100th Anniversary* **102**: 69–89.

Wimberger PH. 1992. Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **45**: 197–218.

Witte F, Barel CDN & Hoogerhoud RJC. 1990. Phenotypic Plasticity of Anatomical Structures and its Ecomorphological Significance. *Netherlands Journal of Zoology* **40**: 278–298.

Wolff J. 2010. The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. *Clinical orthopaedics and related research* **468**: 1056–1065.

Young RL. 2013. Linking conceptual mechanisms and transcriptomic evidence of plasticity-driven diversification. *Molecular Ecology* **22**: 4363–4365.

Young RL & Badyaev A V. 2007. Evolution of ontogeny: Linking epigenetic

remodeling and genetic adaptation in skeletal structures. *Integrative and Comparative Biology* **47**: 234–244.

Zanata AM, Lima FCT, Di Dario F, et al. 2017. A new remarkable and Critically Endangered species of *Astyanax* Baird & Girard (Characiformes: Characidae) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil, with a discussion on durophagy in the Characiformes. *Zootaxa* **4232**: 491–510.

7 Anexos

7.1 Anexo A - Scripts R

Compartilhado por todas as análises – Pacote: *utils*

```
setwd("C:/Users/...")
dados <- read.csv("Nome_do_Arquivo.csv", sep=";")
```

Análise Diagnóstica (Normalidade e Homogeneidade) – Pacote: *car*

```
shapiro.test(Variável_de_interesse)
leveneTest(Variável_de_interesse ~ Condição_de_Desenvolvimento, data=dados)
```

Médias e Desvios Padrão – Pacote: *stats*

```
aggregate(Variável~ Amostra*Condição_de_Desenvolvimento, dados, mean)
aggregate(Variável~ Amostra*Condição_de_Desenvolvimento, dados, sd)
```

Logaritmo, Regressões Lineares e Extração dos resíduos (Correção Alométrica) – Pacote: *stats*

```
log10(dados[,colunas_das_variáveis_de_interesse])
Regressão <- lm(dados$Variável_de_interesse ~ dados$Tamanho_do_corpo)
Resíduos <- Regressão$residuals
```

Análise dos Componentes Principais (PCA) – Pacotes: *vegan* e *psych*

```
prcomp(dados, scale=TRUE)
```

Regressões por SMA (*Standard Major Axis*) – Pacotes: *smatr* e *multcomp*

```
SMA <- sma (Variável_de_interesse ~ Tamanho_do_corpo * Condição_de_Desenvolvimento,
data=dados, 'multcompmethod = 'adjusted', multcomp = TRUE)
summary(SMA)
multcompmatrix(SMA)
slope.test(Variável_de_interesse, Tamanho_do_corpo, test.value = 1, data=NULL, method =
"SMA", alpha = 0.05, V = matrix(0,2,2), intercept = TRUE, robust=FALSE)
elev.com(Variável_de_interesse, Tamanho_do_corpo, Condição_de_Desenvolvimento, data =
NULL, method = "SMA", alpha = 0.05, robust=FALSE, V = array(0, c(2, 2, length(unique(COND)))),
group.names = sort(unique(COND)))
```

Coeficientes de Variação (CV) - Pacote: *stats*

```
Amostra <- subset(dados, Condição_de_Desenvolvimento=="Condição_de_interesse")  
sd(Amostra$Variável_de_interesse, na.rm=TRUE)/ mean(Amostra$Variável_de_interesse,  
na.rm=TRUE)*100
```

7.2 Anexo B - Protocolo de Diafanização

Adaptado de Taylor e Van Dyke (1985) e Westerfield (2007).

Fixação

Formol 10% Tamponado	24 horas
(10 ml formol; 90 ml água destilada; 0,65 g NaHPO_4 ; 0,4 g NaH_2PO_4)	
Álcool 50/50	24 horas
(50 ml álcool absoluto; 50 ml água destilada)	
Álcool 70/30	24 horas
(70 ml álcool absoluto; 30 ml água destilada)	
Álcool Absoluto	24 horas
(100 ml álcool absoluto)	

Preparação

Xilol	24 horas
(Apenas para espécimes maiores de 10 mm)	

Coloração das Cartilagens

Alcian Blue	24 horas
(30 ml ácido acético CH_3COOH ; 70 ml álcool absoluto; 0,02 g Alcian Blue)	
Bórax 25/75	2 horas
(25 ml solução saturada de Bórax e água destilada; 75 ml álcool absoluto)	
Bórax 50/50	2 horas
(50 ml solução saturada de Bórax e água destilada; 50 ml álcool absoluto)	
Bórax 75/25	2 horas
(75 ml solução saturada de Bórax e água destilada; 25 ml álcool absoluto)	
Bórax 100	2 horas
(100 ml solução saturada de Bórax e água destilada)	

Remoção da Pigmentação

Peróxido de Hidrogênio – Exposição à Luz UV

24 horas

(10 ml peróxido de hidrogênio H₂O₂; 90 ml água destilada; 0,45 g KOH)

Remoção de Tecidos

Tripsina

1 a 20 horas

(35 ml solução saturada de Bórax e água destilada; 65 g água destilada; 1g Tripsina)

Durante essa etapa manter a 35°C. Observar a cada 15 minutos até os espécimes estarem 60% translúcidos.

Coloração dos Ossos

Alizarina

24 horas

(100 ml água destilada; 0,045 g hidróxido de potássio KOH; 0,015 g Alizarina)

Lavar em água destilada e remover olhos e escamas.

Desidratação

Hidróxido do Potássio

24 horas

(90 ml de água destilada; 1,8 g hidróxido do potássio KOH)

Glicerina 40/60

12 horas

(40 ml de glicerina; 60 ml de água destilada; 0,3 g KOH)

Glicerina 70/30

12 horas

(70 ml de glicerina; 30 ml de água destilada; 0,15 g KOH)

Preservação

Glicerina

(100 ml de glicerina; 0,01 g Timol)

7.3 Anexo C - Protocolo das Análises de Sequências Ontogenéticas (OSA)

1 - Construção das Matrizes – Programa: Excel

Construir as matrizes para cada uma das condições de desenvolvimento a partir dos registros fotográficos dos espécimes diafanizados. Estado de caráter *zero* (0) para ausência da estrutura, *um* (1) para estrutura cartilaginosa presente, *dois* (2) para estrutura em processo de ossificação (presença de osso e remanescente de cartilagem) e *três* (3) para estrutura ossificada. Nos espécimes diafanizados as estruturas cartilaginosas apresentam a coloração azul e as estruturas ósseas a coloração avermelhada.

2 – Exportar as Matrizes – Programa: Mesquite

Executar as matrizes de caracteres de interesse no Mesquite (*File – New – N° Táxons = 98 – N° Caráteres = 38 – Standard categorical data – List os caracteres – Colar os nomes dos caracteres – Colar os Taxons e os Characters states a partir do excel*).

Salvar como *Simplified Nexus* (*File – Export – nome_do_arquivo.nex*).

3 – Eliminar táxons redundantes – Programa: Paup

Abrir a matriz de interesse no PAUP (Versão 4.0a167) (*File – Open*)

Eliminar táxons redundantes que representam um mesmo semaforonte (*Data – Merge identical/Similar taxa*).

Salvar matrizes sem redundantes (*File – Export data – NEXUS – nome_do_arquivo.nex*)

4 – Ordenar estados de caráter – Programa: TNT

Abrir a matriz de interesse no TNT

Definir número de árvores a serem retidas (Enter command: hold 500.000)

Ordenar os estados de caráter (*Data – Character Settings – CHARS – Invert – OK – Step-Matrix – of costs – Edit – 10000 (1-0; 2-1; 3-2; 3-1; 3-0; 2-0) – Apply – OK*)

5 – Definir grupo externo – Programa: TNT

Definir HJ como grupo externo (*Data – Outgroup Taxon – HJ - OK*)

6 – Rodar a Busca Heurística – Programa: TNT

Rodar a busca heurística utilizando *Tree Bisection Reconnection* (TBR) e 500 réplicas. (Analyse – Traditional Search – Wagner random seed: 0 – repls: 200 – TBR – Collapse trees after the search – Search)

5 – Realizar uma segunda busca a partir das árvores retidas – Programa: TNT

Fazer a busca novamente, porém a partir das árvores retidas (Analyse – Traditional Search – Trees from RAM)

6 – Procurar apenas as MPTs com o melhor Score – Programa: TNT

Enter command: best

7 – Visualizar as sinapomorfias e autapomorfias – Programa: TNT

Optimize – synapomorphies – Map Synapomorphies

8– Obter o Consenso Reduzido e Salvar árvores retidas – Programa: TNT

Obter a árvore Consenso Reduzido (Trees – Consensus)

Salvar todas as árvores (Data - Export Data – Nexus)

9 – Repetir passos 4 a 8 para as matrizes reversas – Programa: TNT

Apagar árvores retidas (Trees – Tree Buffer – Clear)

Alterar:

Ordenar os estados de carácter (Data – Character Settings – CHARS – Invert – OK – Step-Matrix – of costs – Edit – 10000 (0-1; 1-2; 2-3; 1-3; 0-3; 0-2) – Apply – OK)

Definir HM como grupo externo (Data – Outgroup Taxon – HM – OK)

7.4 Anexo D - Dados das Coleções Ictiológicas

Medidas lineares referentes aos espécimes adultos provenientes de coleções ictiológicas. Vista Lateral (a): ALP - Altura do Pedúnculo Caudal; SL - Comprimento do Corpo; PVL - Comprimento da Nadadeira Pélvica; PVD - Distância entre as Nadadeiras Peitoral e Pélvica; ALC - Altura máxima do Corpo; ADL - Comprimento da Nadadeira Adiposa; ADH - Altura da Nadadeira Adiposa; VAD - Distância entre as Nadadeiras Pélvica e Anal. Vista Dorsal (b): HW - Largura da Cabeça; MBW - Largura máxima do Corpo; MW - Largura da Boca; ID - Distância entre os Olhos; PTL - Comprimento da Nadadeira Peitoral; CPW - Largura do Pedúnculo Caudal.

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
54736	1	35,80	14,20	4,46	1,61	0,88	8,21	6,46	6,49	4,66	5,58	3,86	4,95	1,72	2,65
55262	2	32,28	14,19	4,23	3,01	1,28	7,44	6,00	5,85	4,34	5,82	3,87	4,63	1,86	3,27
54739	3	29,91	11,98	3,71	2,50	1,37	6,64	4,34	4,50	4,15	4,69	3,44	4,58	2,12	2,69
	4	25,79	9,73	3,04	2,06	1,29	5,15	4,70	4,17	3,43	4,33	3,40	3,87	1,46	2,40
	5	35,15	13,13	3,84	2,38	1,33	7,71	6,13	5,15	4,76	5,31	3,46	4,66	1,76	2,99
58840	6	71,86	26,52	8,77	4,70	1,82	13,19	9,96	10,23	10,35	8,90	7,10	9,42	2,34	6,33
	7	56,23	22,08	6,75	3,52	1,93	11,68	10,37	9,42	7,60	8,37	5,61	8,38	2,98	4,45
54734	8	54,15	24,88	6,71	3,91	2,07	11,11	9,16	8,32	7,92	7,93	5,26	6,60	1,90	3,91
	9	48,74	21,84	6,24	3,24	1,55	10,34	7,20	8,64	5,73	7,00	4,74	5,95	1,82	3,47
54733	10	36,08	15,68	4,34	3,09	1,22	8,61	6,90	6,19	4,07	5,80	3,94	4,93	1,79	2,88
	11	40,43	18,57	4,78	2,88	1,98	9,30	7,53	6,61	5,91	6,71	4,77	5,63	1,93	3,52
	12	31,96	14,03	3,89	2,97	1,26	7,47	6,06	5,56	4,27	5,17	3,66	4,51	1,33	2,74
	13	35,30	14,00	4,29	2,82	1,36	8,51	6,79	5,74	4,42	5,77	3,78	4,65	1,71	2,58
	14	40,72	18,41	5,36	3,43	1,39	9,57	7,47	7,21	5,89	6,52	4,45	5,60	1,81	3,20
	15	31,01	12,90	4,09	2,48	1,17	6,64	5,27	4,76	4,25	4,74	3,34	4,05	1,29	2,43
	16	37,65	16,76	4,78	3,33	1,56	9,01	7,24	6,34	5,69	6,21	4,12	4,92	1,60	2,84
	17	34,09	14,59	4,47	2,87	1,37	8,08	6,51	5,18	5,22	5,70	3,98	4,22	1,50	2,82
	18	32,81	13,77	3,77	2,61	1,28	7,23	6,12	5,29	4,40	5,08	3,57	4,28	1,42	2,69
88343	19	50,88	23,08	6,08	4,32	1,85	12,24	9,99	9,47	8,87	9,23	6,33	7,53	2,66	4,43

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
88343	20	36,30	15,56	4,32	2,84	1,23	7,99	6,03	6,03	5,12	6,02	4,29	4,90	1,54	2,81
79306	21	45,56	20,59	4,88	4,37	1,52	11,76	9,21	8,79	8,47	7,88	5,26	6,37	2,10	3,86
	22	46,74	19,57	5,52	3,45	1,36	9,28	8,66	8,86	7,80	6,84	5,16	6,34	1,37	3,28
	23	41,00	16,65	4,67	2,93	1,07	8,85	6,94	7,40	6,52	6,16	4,48	5,20	1,77	3,26
	24	55,92	23,67	8,04	4,39	1,68	12,01	10,33	9,74	9,14	8,21	6,10	7,07	2,07	4,06
54731	25	33,75	13,79	4,14	3,07	1,06	8,93	6,85	5,71	5,76	5,37	3,71	4,42	1,52	2,84
	26	44,69	20,51	6,21	3,93	1,82	11,08	8,42	8,73	7,21	7,21	5,22	6,52	1,86	3,88
	27	27,76	11,24	3,29	2,11	1,17	6,15	5,35	4,12	4,15	4,47	2,91	3,75	1,24	2,07
	28	51,65	21,07	6,08	3,23	1,53	10,31	8,15	6,96	7,45	7,02	4,76	6,58	2,10	3,87
	29	34,35	14,23	4,39	3,16	1,16	8,06	6,04	5,71	5,75	5,38	3,93	4,58	1,92	2,76
	30	37,14	14,69	4,82	2,92	1,30	8,08	5,30	5,79	5,84	5,46	3,73	4,42	1,54	2,64
	31	38,18	16,21	4,77	2,95	1,47	9,01	6,76	6,79	5,85	6,07	4,20	5,15	1,68	3,18
	32	43,99	18,41	5,75	3,13	1,56	9,79	7,46	7,21	6,22	6,30	4,37	5,50	1,52	3,32
54731	33	43,48	17,58	4,85	3,30	1,61	10,01	8,07	7,10	6,91	6,15	4,33	5,42	1,87	3,36
	34	46,30	19,01	5,80	3,21	1,19	11,05	8,54	7,63	6,52	6,96	5,06	6,17	2,25	3,67
	35	32,56	13,02	3,68	2,71	1,39	7,64	6,46	5,97	4,72	4,87	3,38	3,86	1,55	3,00
	36	36,67	14,70	4,48	3,35	1,31	9,16	6,52	5,08	5,87	5,85	3,78	4,87	1,72	3,00
	37	36,52	15,31	4,52	2,81	1,42	8,67	6,16	5,93	4,68	5,71	3,71	4,97	1,82	2,70
	38	32,81	14,41	3,91	2,39	1,47	8,49	6,08	5,72	5,26	5,19	3,55	4,34	1,60	2,96
	39	44,50	18,40	5,50	4,48	1,56	10,46	7,74	7,08	6,89	6,82	4,54	6,02	1,59	3,55
	40	38,10	16,98	4,80	3,22	1,31	8,92	7,33	6,98	6,80	5,97	4,10	5,56	1,85	3,38

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
54731	41	47,42	20,16	6,17	3,26	1,82	10,31	6,25	9,00	6,67	7,20	4,89	7,03	2,01	3,69
	42	33,48	13,91	4,20	2,58	1,25	8,16	6,52	5,31	4,80	5,29	3,59	4,61	1,56	2,86
	43	41,90	16,41	5,36	3,24	1,31	9,68	7,37	7,09	6,70	6,52	4,43	5,86	1,94	3,39
	44	45,75	19,83	5,00	3,30	1,32	9,90	8,06	6,25	6,10	6,70	4,57	6,40	2,08	3,44
88439	45	55,08	22,73	6,78	4,00	1,87	12,01	9,34	8,24	7,02	7,48	5,65	6,19	1,98	3,90
16917	46	65,42	31,42	9,15	5,39	2,30	14,70	12,03	10,54	12,03	11,13	7,45	9,38	3,10	5,77
	47	63,50	28,73	8,35	5,38	2,22	14,62	11,47	10,72	10,93	10,34	7,58	8,84	2,87	4,82
	48	49,06	22,67	6,17	4,80	1,73	11,98	9,16	7,99	7,77	7,96	5,43	6,36	2,11	4,08
	49	63,95	29,49	8,21	5,33	1,95	13,69	9,76	10,38	9,46	9,71	6,76	8,37	3,14	5,15
	50	60,68	24,13	6,95	4,30	1,80	13,83	11,05	9,55	8,66	9,13	6,46	7,63	3,11	5,10
	51	49,77	23,03	6,68	4,37	1,96	11,55	9,21	8,02	7,41	8,23	5,84	6,82	2,18	4,07
84296	52	65,47	26,42	7,92	4,42	2,36	12,84	10,09	11,71	10,52	9,39	6,22	9,37	3,46	4,57
	53	52,95	23,28	7,40	4,09	2,31	11,72	9,85	8,27	6,88	8,34	5,84	7,50	2,52	4,31
	54	60,20	25,03	7,20	4,81	2,19	14,81	12,57	10,18	9,29	9,74	6,33	8,64	2,97	4,62
	55	49,10	21,50	6,67	3,71	1,70	11,68	10,48	8,84	7,85	8,03	5,33	6,76	2,63	3,77
	56	55,17	21,02	6,78	3,67	1,73	11,69	9,83	7,82	5,41	7,69	5,60	7,34	2,54	3,58
	57	54,72	21,94	6,77	3,92	1,74	11,79	9,34	8,94	7,31	8,30	5,88	7,61	2,79	4,19
	58	46,65	18,57	4,42	3,46	1,24	10,70	9,16	8,69	6,85	7,21	4,96	6,45	2,83	3,43
	59	46,89	18,03	6,18	3,81	1,78	10,13	8,16	7,41	7,04	7,08	5,05	6,29	2,38	3,68
88453	60	99,77	43,16	12,27	4,84	2,80	21,39	16,46	20,15	16,75	14,20	9,37	13,36	4,79	7,11
	61	49,43	20,43	5,43	3,73	1,79	11,16	8,67	7,47	5,71	7,60	4,91	5,43	2,00	4,09

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
88453	62	39,03	17,08	5,28	3,38	1,91	9,73	6,99	6,20	4,91	6,33	4,30	5,13	1,91	3,49
	63	31,79	12,99	4,03	2,58	1,86	7,07	5,19	4,90	3,76	4,95	3,50	3,57	1,42	2,55
	64	34,07	14,55	4,33	2,81	1,56	8,10	6,23	5,35	4,17	5,44	3,58	3,96	1,73	2,66
	65	61,29	27,86	7,73	4,43	2,28	13,45	10,69	8,57	7,17	8,77	6,12	6,78	2,47	4,59
84408	66	62,72	30,35	7,83	5,55	2,56	15,44	11,94	13,54	12,01	10,05	6,92	10,15	3,12	5,13
	67	74,45	37,29	9,29	5,10	1,82	15,84	12,98	13,48	11,75	10,39	7,31	9,68	3,73	5,88
	68	68,30	33,02	8,68	5,29	2,28	14,94	11,53	13,07	10,88	10,50	6,67	9,86	3,66	5,39
84658	69	70,64	28,77	8,62	5,25	2,76	13,89	12,77	11,75	11,32	10,53	6,87	9,82	3,71	5,28
	70	67,79	25,88	8,09	5,58	2,47	14,25	13,45	12,10	9,40	9,39	6,85	9,11	2,90	5,04
	71	73,85	30,58	8,46	4,71	3,11	15,57	12,30	13,59	12,94	10,94	7,62	10,65	3,74	5,25
	72	67,27	27,82	7,84	5,33	2,15	14,71	11,85	11,72	9,42	9,77	6,15	9,60	3,34	4,51
	73	34,92	14,62	4,62	2,97	1,63	8,22	6,07	6,45	5,00	5,60	3,81	4,92	1,85	2,60
	74	84,90	33,36	10,83	6,32	3,43	16,81	14,36	13,20	13,50	11,40	7,90	11,55	4,53	5,33
	75	29,94	11,83	3,30	2,53	1,40	6,60	5,02	5,62	4,28	4,94	3,48	3,78	1,39	2,68
	76	82,24	34,72	11,48	5,93	3,28	19,98	15,55	16,31	14,13	12,56	8,38	12,79	4,53	5,78
54732	77	39,54	16,31	5,23	3,13	2,37	9,61	6,57	7,25	6,55	6,62	4,29	5,94	1,98	3,22
	78	37,04	15,35	4,79	3,37	1,72	8,50	6,98	6,06	5,52	5,98	4,15	4,95	1,92	3,09
	79	61,01	26,67	8,41	4,51	2,23	14,18	11,12	9,68	8,82	8,74	6,40	8,61	3,30	3,98
	80	46,02	19,52	5,90	3,33	1,80	10,28	8,10	6,96	5,75	7,03	4,85	6,39	2,53	3,31
	81	34,81	15,32	4,81	3,05	1,30	8,25	6,26	5,38	4,81	5,62	3,90	4,65	1,82	2,54
	82	42,81	19,61	6,45	3,27	1,45	9,74	7,86	7,61	5,77	6,80	4,60	5,99	2,43	3,13

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
54732	83	41,25	16,67	5,42	3,18	1,27	9,57	8,20	5,47	5,61	6,42	4,51	5,73	1,90	2,50
	84	37,32	15,63	5,24	2,73	1,38	8,37	7,41	5,84	5,40	5,48	3,79	4,94	1,79	2,43
	85	31,30	12,87	4,15	3,22	1,03	7,06	5,11	4,82	4,36	4,91	3,38	4,40	1,66	2,58
	86	42,28	18,12	5,08	2,88	1,39	9,65	7,27	7,56	5,31	6,67	4,66	6,02	2,09	3,63
	87	35,80	15,75	4,79	2,68	1,71	8,58	7,61	5,62	4,57	5,68	4,02	4,62	1,74	2,82
	88	44,86	21,11	5,97	3,33	1,21	9,84	7,78	7,55	7,87	6,87	4,97	6,29	2,81	3,68
	89	39,36	17,00	5,23	3,25	1,61	8,98	7,32	6,65	5,82	6,73	4,55	5,80	2,05	3,34
	90	27,40	10,87	3,66	2,46	0,77	6,06	4,81	5,55	3,88	4,05	2,96	2,98	1,23	2,00
	91	32,47	13,90	3,94	2,76	0,82	6,81	5,62	5,81	4,36	5,18	3,40	4,89	1,58	2,57
	92	32,49	14,33	4,41	2,52	1,20	7,18	6,02	5,19	4,47	4,96	3,74	4,42	1,59	2,80
	93	34,71	15,18	4,78	2,67	1,33	7,86	6,54	5,47	5,25	5,23	3,63	4,81	1,90	2,46
	94	32,94	12,82	4,49	3,05	1,17	7,04	5,72	5,76	4,61	4,30	3,48	4,05	1,82	2,51
53907	95	61,69	27,54	8,28	4,36	1,94	14,03	11,15	10,90	9,39	9,03	6,63	9,05	2,99	5,04
	96	61,90	30,34	8,36	4,72	2,48	14,13	10,93	9,24	9,87	8,92	6,14	8,08	2,57	4,47
	97	58,65	28,59	8,28	4,63	2,19	13,48	10,60	10,33	9,41	8,37	6,34	7,46	2,68	4,56
53896	98	38,58	14,76	4,76	2,82	1,25	9,02	7,02	6,83	5,16	6,02	4,46	5,07	1,66	2,93
	99	44,81	18,88	5,81	3,15	1,52	9,59	6,20	7,65	6,78	6,21	4,56	5,17	1,87	3,38
	100	45,04	17,87	5,17	3,54	1,50	10,33	7,76	6,77	7,51	6,54	4,47	5,56	2,38	3,23
	101	40,71	17,96	4,96	3,04	1,50	9,40	7,27	6,46	6,58	5,97	4,28	5,37	1,88	3,09
	102	44,52	18,81	5,83	4,54	2,11	11,01	8,52	6,68	6,57	6,43	4,67	5,29	2,19	3,52
	103	37,52	15,71	4,56	2,76	1,32	8,68	6,85	6,02	4,87	5,87	3,99	4,99	1,74	3,00

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
53896	104	41,33	16,99	5,36	3,28	1,78	10,28	8,00	6,78	5,74	6,19	4,43	5,42	1,84	3,21
	105	44,04	19,55	5,53	3,24	1,48	10,09	7,78	7,41	6,29	6,54	4,55	5,57	1,95	3,09
	106	47,16	21,00	6,48	4,09	1,30	9,87	8,32	7,59	7,07	7,07	4,98	6,20	2,23	3,64
	107	45,30	18,36	5,21	3,17	1,43	9,92	7,53	6,97	5,44	6,25	4,43	5,31	2,22	3,37
	108	39,82	16,82	5,32	3,15	1,25	8,79	6,54	5,95	5,33	5,53	4,00	4,86	1,63	3,10
	109	45,76	19,14	5,81	4,01	1,47	10,34	7,79	6,64	6,74	6,44	4,44	5,44	2,08	3,41
	110	38,64	16,07	4,67	3,26	1,39	9,44	7,74	6,93	6,03	6,20	4,22	5,49	1,87	3,01
	111	36,17	13,58	4,58	2,42	0,99	8,36	6,96	5,91	5,38	5,39	3,37	4,46	1,90	2,48
	112	40,34	17,63	5,04	3,14	1,31	9,05	7,16	6,42	5,87	6,29	4,48	5,89	1,84	3,06
	113	42,30	17,70	5,37	3,57	1,68	9,77	7,66	6,16	5,81	6,14	4,31	5,35	1,76	3,12
	114	40,79	16,74	4,61	2,93	1,20	9,37	6,85	6,00	5,68	5,76	3,78	4,82	1,95	3,10
	115	38,84	15,34	4,84	3,37	1,15	9,11	6,74	6,48	5,93	5,93	4,36	5,31	2,02	3,35
	116	35,46	13,58	4,56	2,84	1,37	9,18	7,19	6,07	4,48	5,72	3,98	5,15	2,03	2,78
	117	43,77	18,69	5,49	3,14	1,21	10,05	7,52	6,94	6,45	6,50	4,62	5,57	1,86	3,01
53899	118	56,63	26,36	7,65	3,01	1,08	12,30	10,02	9,50	7,82	7,77	5,51	7,49	3,11	4,06
	119	49,87	22,86	6,67	3,93	1,58	12,13	8,92	7,11	7,95	7,27	4,75	6,82	2,53	3,50
	120	46,00	21,00	5,51	3,49	1,99	11,60	9,43	7,44	7,12	6,98	4,90	6,72	2,56	3,08
	121	43,87	20,06	6,07	4,06	1,83	12,06	10,07	6,84	7,66	6,82	5,14	6,81	2,34	3,32
	122	49,20	23,91	6,47	4,20	1,94	11,58	9,75	7,54	8,89	7,20	5,35	7,33	2,59	3,87
	123	54,54	24,59	6,75	4,23	2,43	12,86	10,56	7,87	7,67	7,07	5,10	7,05	2,58	3,73
	124	42,46	18,65	5,21	4,04	1,88	10,46	7,60	6,73	6,55	6,84	4,60	6,07	2,27	3,80

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
53899	125	41,90	19,14	5,56	3,13	1,75	9,17	7,22	6,10	6,23	6,21	4,66	5,76	1,88	3,02
	126	48,08	20,77	5,79	3,67	1,24	10,83	8,39	6,95	6,68	6,69	4,66	5,71	2,39	3,61
	127	45,65	20,88	5,88	3,45	1,62	10,82	7,93	6,67	6,61	6,67	4,95	5,90	2,26	3,97
	128	46,46	22,24	6,44	3,60	1,78	11,87	9,00	6,59	7,59	7,26	5,14	6,81	2,56	3,86
53900	129	48,86	23,25	5,76	4,04	1,71	11,57	9,46	8,06	8,86	7,22	5,26	6,80	2,05	3,46
	130	62,42	29,03	7,50	5,51	2,41	14,37	10,66	9,03	9,85	8,69	6,04	8,08	2,52	3,86
	131	45,41	20,87	6,13	3,53	1,66	11,25	9,06	7,41	8,16	6,79	4,84	6,24	1,95	3,92
	132	59,56	27,72	7,28	4,55	2,08	12,92	9,91	9,29	10,14	7,86	5,72	7,53	2,37	3,96
	133	55,11	24,92	6,80	4,37	2,38	12,29	10,00	8,79	8,67	7,65	5,56	7,18	2,71	3,84
	134	59,85	28,53	7,69	4,66	2,28	13,38	10,33	8,66	10,09	8,05	5,82	7,49	2,86	4,09
	135	54,22	25,91	6,75	3,89	1,86	11,96	9,90	7,83	8,66	7,53	5,46	7,00	2,37	3,86
	136	47,05	21,42	5,83	3,68	1,25	10,65	8,04	6,63	7,44	6,55	4,90	5,81	1,80	3,24
	137	55,94	26,54	7,02	4,84	2,19	11,73	9,03	9,12	9,34	7,22	5,67	6,79	2,16	3,66
	138	46,84	21,17	5,44	4,34	1,88	10,87	8,13	8,18	7,50	6,79	4,82	5,53	1,68	3,82
	139	45,86	20,82	6,00	3,86	1,75	10,86	8,28	6,78	8,68	6,70	4,79	5,81	1,78	3,49
	140	45,01	20,99	5,36	3,51	1,34	9,58	7,08	6,84	6,79	6,24	4,39	5,58	1,76	2,74
	141	46,12	21,93	5,84	4,26	1,60	11,32	8,56	8,38	9,42	7,11	5,43	6,48	1,83	3,30
	142	39,78	18,71	4,62	3,46	0,84	9,78	7,18	6,72	7,41	6,28	4,57	5,73	1,56	3,10
	143	56,89	27,96	7,57	4,55	1,56	13,46	10,20	10,61	12,70	8,64	6,07	8,65	3,45	4,16
	144	48,49	23,40	6,71	3,89	1,72	11,44	8,66	8,51	8,65	6,91	5,34	6,59	2,15	2,82
	145	41,47	19,35	4,90	2,93	1,52	9,76	7,46	6,59	7,55	5,89	4,26	5,41	1,75	2,99

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
53900	146	54,58	24,65	6,11	4,18	1,42	11,61	8,52	9,45	8,73	7,30	5,06	6,08	2,04	3,58
	147	34,73	15,37	4,21	2,65	1,00	7,62	5,59	5,08	5,75	4,87	3,64	4,08	1,41	2,63
	148	52,27	23,29	6,38	4,03	1,98	11,24	9,27	7,98	9,36	7,64	5,07	7,27	2,12	3,49
	149	47,69	21,53	6,23	4,01	1,44	10,74	9,02	7,24	7,33	6,55	4,70	5,55	1,72	3,39
53904	150	30,19	12,64	3,63	2,67	1,15	7,06	5,26	4,52	4,62	4,20	2,81	3,76	1,03	2,27
	151	28,21	12,35	3,57	2,32	1,00	6,54	5,13	4,02	4,09	4,18	2,82	3,51	1,10	1,98
	152	34,14	15,02	4,04	2,30	0,86	8,06	6,07	5,28	5,41	4,94	3,57	3,92	1,25	2,54
	153	35,55	17,11	4,54	3,02	1,16	9,22	7,20	5,62	5,53	5,61	3,89	4,54	1,14	2,72
	154	32,32	14,28	4,12	2,46	1,19	7,59	5,63	5,65	4,72	4,80	3,29	3,74	1,10	2,28
	155	35,66	15,28	4,26	3,34	1,22	9,03	6,22	5,12	5,45	4,95	3,40	4,06	1,13	2,64
	156	39,34	17,33	4,92	3,39	1,41	9,68	6,52	5,14	5,69	5,45	3,95	4,53	1,52	2,83
	157	30,37	13,77	3,46	2,41	0,95	7,26	5,33	4,23	4,52	4,33	3,08	3,63	1,05	2,55
	158	35,21	16,84	4,10	3,15	1,43	8,43	6,57	5,25	5,54	5,43	3,88	3,95	1,39	2,67
	159	30,86	12,47	3,75	2,63	1,08	6,60	4,95	4,34	3,74	4,36	2,94	3,60	0,99	2,21
	160	42,53	17,70	5,07	3,10	1,58	9,34	6,74	5,79	5,82	5,61	3,78	4,67	1,35	2,51
17315	161	37,73	17,84	4,65	3,21	0,90	9,05	6,98	6,22	6,49	5,27	3,75	4,52	0,98	2,59
	162	56,46	23,26	6,77	4,09	2,18	12,70	11,27	8,93	7,99	7,88	5,21	6,91	2,09	4,32
	163	72,17	30,62	9,05	5,46	2,40	16,31	13,10	10,76	11,50	10,73	6,28	9,35	3,13	4,97
110233	164	56,40	23,72	7,14	4,37	2,11	12,68	11,44	8,08	8,61	7,86	5,18	6,60	2,22	4,08
	165	31,98	12,79	3,67	3,41	1,45	6,49	6,01	4,42	4,53	4,30	2,97	4,13	1,30	1,90
	166	48,48	20,83	5,65	4,18	2,02	10,98	8,86	8,00	7,55	7,04	4,88	6,28	2,02	3,62

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
110233	167	66,32	27,28	7,21	5,31	2,49	13,78	11,82	11,84	11,04	9,72	7,05	9,09	2,67	5,16
	168	47,88	20,40	5,61	3,70	1,47	11,06	8,44	7,82	6,67	6,79	4,72	5,73	1,52	3,80
	169	65,47	27,47	7,64	4,62	1,98	14,14	11,21	11,70	10,68	8,84	6,03	9,12	2,76	4,58
	170	48,74	21,48	5,78	4,06	1,19	10,68	9,06	8,15	8,40	7,20	4,70	5,77	1,82	3,51
	171	58,16	24,81	6,70	4,71	1,71	12,99	10,48	9,66	8,77	8,41	5,52	7,71	2,69	4,00
115440	172	86,93	39,89	10,71	6,23	3,11	17,31	14,12	16,32	15,51	10,56	7,46	11,03	3,40	5,01
	173	75,73	32,83	9,15	5,10	2,51	15,86	12,49	13,10	12,17	10,17	6,42	9,85	3,73	4,58
	174	65,09	28,91	7,83	4,60	2,36	14,23	11,94	11,02	10,58	8,85	5,80	7,78	2,48	3,75
	175	66,22	32,41	8,56	5,00	2,46	16,13	12,55	11,44	12,09	9,99	6,50	9,58	3,31	4,81
	176	51,50	21,66	6,80	4,30	1,94	12,07	9,88	8,45	8,76	7,17	5,16	6,29	1,88	3,58
85859	177	79,84	36,45	10,00	6,02	2,88	17,64	15,73	12,64	11,87	11,29	7,39	10,38	3,51	5,31
99347	178	86,28	36,98	10,00	6,56	3,13	19,28	14,94	14,83	14,13	12,63	9,46	11,69	3,88	6,23
	179	74,40	30,00	9,17	4,95	2,44	14,74	11,42	12,64	12,22	9,91	7,15	9,27	3,06	4,61
	180	58,03	21,97	7,04	4,61	2,03	13,83	11,65	10,07	9,01	8,05	5,50	7,62	2,33	4,14
	181	49,61	22,21	6,10	4,15	1,53	10,69	8,56	8,51	7,39	7,61	5,11	6,81	2,42	4,28
51341	182	58,62	27,94	7,79	5,00	1,96	12,56	9,87	9,68	9,74	8,25	5,57	7,30	2,55	4,50
	183	60,45	29,39	8,03	4,61	2,22	13,07	9,81	10,77	9,26	8,78	5,80	8,02	2,56	4,47
73195	184	47,34	20,00	5,74	4,10	2,13	10,79	8,85	8,27	7,11	6,98	4,30	6,02	1,99	3,82
	185	43,67	17,30	5,41	3,41	1,35	8,99	7,24	7,32	5,78	6,21	4,04	5,27	1,80	3,16
82416	186	90,49	38,78	12,20	7,11	2,70	21,66	18,17	14,12	14,55	13,88	8,45	13,04	4,04	5,69
	187	103,88	36,68	12,63	8,28	3,60	22,46	20,48	15,37	16,24	13,99	10,50	13,66	4,83	7,06

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação.

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
82425	188	51,45	22,18	6,55	3,99	2,52	13,46	10,10	9,90	10,07	8,11	5,65	8,00	2,38	4,05
	189	73,26	30,90	8,04	5,36	3,06	14,79	11,17	12,03	10,59	10,07	6,80	10,42	3,15	4,89
	190	60,19	23,04	7,36	4,92	2,60	14,60	12,37	9,09	8,51	8,41	5,67	7,36	2,38	4,25
	191	65,07	28,22	7,80	4,72	2,05	13,78	10,72	10,69	9,23	8,56	5,92	8,41	2,46	4,60
	192	74,35	35,46	9,57	4,93	2,77	15,86	12,45	12,82	11,91	10,29	6,96	10,30	2,92	5,05
	193	59,83	25,03	7,60	4,07	2,07	14,14	11,37	9,09	9,01	8,10	5,15	7,35	2,56	3,73
	194	53,23	20,20	6,00	3,89	1,71	11,75	9,48	8,35	7,05	6,82	4,75	6,40	2,03	3,89
	195	45,64	18,18	5,64	3,42	1,50	10,79	8,92	7,46	6,53	6,33	4,14	5,50	1,88	3,02
	196	43,61	18,21	5,90	3,00	1,59	9,80	7,55	7,33	6,69	6,06	4,14	5,35	1,71	3,42
	197	49,77	21,52	5,70	3,69	1,85	11,17	8,10	8,43	7,96	6,67	4,56	6,18	1,94	3,84
99730	198	90,63	42,37	11,96	7,19	3,14	19,60	11,72	15,72	14,18	12,96	8,68	12,15	4,05	6,30
	199	72,00	31,98	9,32	4,25	2,36	17,59	14,37	11,91	11,61	9,72	6,38	8,71	3,04	4,52
	200	64,25	28,97	8,65	4,82	1,75	15,96	12,61	11,07	10,22	9,31	6,22	8,54	2,46	4,19
	201	87,41	38,33	11,48	5,24	2,52	18,45	14,57	14,84	14,21	12,16	8,34	12,08	3,48	5,85
	202	80,73	33,68	9,91	6,02	2,09	18,40	14,41	13,33	14,93	11,08	7,22	10,46	3,64	5,25
	203	69,32	32,84	9,05	5,33	2,67	16,47	13,53	10,93	11,72	9,28	6,70	9,21	3,03	4,72
	204	65,56	31,83	8,26	5,29	2,36	15,06	12,15	10,27	10,44	8,80	6,36	7,93	2,36	4,76
	205	53,78	24,08	6,73	4,27	2,25	13,15	10,61	8,64	8,11	6,89	4,94	6,40	1,87	3,80
	206	60,76	29,37	8,18	4,32	2,02	14,16	10,70	9,80	9,47	8,03	6,19	7,22	2,18	4,23
	207	66,85	30,71	9,50	4,80	1,90	15,95	13,12	10,22	11,35	8,89	6,10	8,04	2,59	4,65
	208	58,73	28,21	8,08	4,00	1,93	14,37	11,45	9,32	9,07	8,25	5,52	7,14	2,32	4,05

Tabela 16 Medidas lineares, em milímetros (mm), dos espécimes de Coleções Ictiológicas. Continuação

LOTE	Nº	SL	MBH	CPD	ADL	ADH	PTL	PVL	PVD	VAD	HW	ID	MBW	CPW	MW
99730	209	69,77	37,27	9,55	5,71	2,65	17,09	12,69	12,31	11,32	10,06	7,2	9,26	2,74	5,29
	210	66,71	29,72	8,73	4,72	2,31	15,11	11,60	10,36	10,89	9,20	6,38	8,22	2,37	4,78

7.5 Anexo E - Dados da Morfologia Externa

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Comprimento do corpo (mm)							
		Quente sem fluxo				Quente com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
21	1	6,38	7,14	6,33	7,22	6,56	6,40	7,35	7,15
21	2	6,44	6,57	6,87	7,16	6,39	6,83	7,01	7,31
21	3	6,41	6,83	7,05	6,03	7,40	6,19	6,92	7,46
21	4	7,01	6,72	7,19	7,65	6,60	7,36	7,12	7,78
24	1	6,09	7,45	6,82	6,85	8,40	7,26	7,21	8,15
24	2	7,04	7,63	7,42	7,07	7,40	7,71	7,35	8,21
24	3	6,75	7,39	7,36	7,54	7,13	6,97	7,22	7,41
24	4	6,54	7,74	7,74	7,19	7,15	7,34	7,35	7,93
27	1	6,32	6,68	8,13	7,96	6,95	7,37	6,79	8,56
27	2	6,57	7,13	7,66	7,48	7,54	7,29	7,08	9,15
27	3	6,09	6,91	8,10	7,96	6,91	7,18	6,45	9,19
27	4	6,33	6,63	7,24	8,27	7,15	6,73	7,08	8,18
30	1	6,30	6,73	6,75	9,24	7,27	6,40	7,26	9,38
30	2	6,05	6,65	7,48	9,40	7,77	7,37	7,38	9,34
30	3	6,84	7,06	7,20	8,69	7,69	7,61	7,34	9,05
30	4	6,25	7,11	7,49	8,80	7,26	7,57	8,05	8,47
33	1	7,33	7,34	8,33	9,92	8,71	8,44	8,08	11,40
33	2	7,18	7,35	7,84	10,67	8,77	8,46	8,76	10,98
33	3	7,66	7,67	7,89	10,10	8,09	9,01	8,23	10,67
33	4	7,10	7,87	7,67	10,56	8,33	8,39	8,74	10,17
36	1	8,44	9,74	9,60	11,44	10,96	11,12	10,99	12,16
36	2	9,24	10,04	10,13	12,28	11,64	11,48	11,64	12,24
36	3	8,89	10,66	9,23	11,93	10,89	11,74	11,10	13,16
36	4	8,80	9,84	10,24	11,16	11,00	10,66	10,94	12,30
39	1	10,18	10,72	10,61	12,52	11,61	12,23	12,31	14,16
39	2	8,97	11,16	9,95	12,95	11,35	11,81	11,31	13,78
39	3	9,62	12,06	11,07	12,76	11,60	11,55	11,52	13,84
39	4	9,21	11,01	10,21	12,81	11,52	12,51	11,18	13,58
42	1	9,92	12,42	12,64	14,72	13,57	13,51	12,65	15,67
42	2	11,22	12,66	11,78	14,07	13,64	12,78	12,28	15,13
42	3	9,97	12,28	11,68	14,10	14,15	13,39	12,66	14,82
42	4	10,66	12,49	11,74	13,77	13,36	13,36	13,35	14,64

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Comprimento do corpo (mm)							
		Quente sem fluxo				Quente com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
45	1	9,89	12,53	11,72	15,71	12,77	13,55	12,22	18,21
45	2	10,71	12,26	11,53	15,65	13,82	13,35	12,77	18,50
45	3	10,50	12,51	10,35	14,89	12,94	14,54	12,90	16,47
45	4	10,31	12,15	12,09	14,58	12,58	13,91	13,06	17,64
48	1	11,02	13,73	12,63	17,23	14,51	15,76	14,02	18,61
48	2	10,68	13,39	13,00	19,17	14,08	15,52	13,36	19,26
48	3	10,99	14,14	12,81	18,41	14,82	16,00	14,13	18,74
48	4	11,39	14,15	13,33	19,28	14,98	16,30	13,23	19,55
51	1	13,11	17,41	13,82	21,84	17,81	21,13	15,14	23,44
51	2	13,55	15,65	13,71	23,80	16,69	18,60	16,61	21,66
51	3	13,63	16,88	14,48	21,13	16,98	18,06	15,99	22,31
51	4	13,57	17,10	14,24	22,40	18,10	20,10	16,07	21,45
54	1	14,24	18,37	14,93	22,63	20,71	21,00	16,93	24,56
54	2	13,61	18,35	14,66	21,07	20,19	21,42	18,27	25,18
54	3	13,82	17,94	14,89	25,49	20,18	-	17,53	26,24
54	4	14,61	19,08	15,45	21,95	19,02	-	17,36	28,12
54	5	14,29	-	15,02	-	-	-	-	-
54	6	14,22	-	14,75	-	-	-	-	-
57	1	17,01	20,69	15,80	-	-	-	21,39	-
57	2	15,96	-	15,27	-	-	-	19,01	-
57	3	14,73	-	16,59	-	-	-	-	-
57	4	15,83	-	16,63	-	-	-	-	-
60	1	17,81	-	19,89	-	-	-	-	-
60	2	16,62	-	20,26	-	-	-	-	-
60	3	17,09	-	18,78	-	-	-	-	-
60	4	17,00	-	19,68	-	-	-	-	-
63	1	21,14	-	23,27	-	-	-	-	-
63	2	21,46	-	22,24	-	-	-	-	-

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Comprimento do corpo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
21	1	7,20	6,65	5,59	6,31	7,05	7,09	6,64	6,54
21	2	6,63	6,46	6,69	6,50	6,96	6,72	6,20	6,25
21	3	6,74	6,52	6,16	6,48	6,56	7,24	7,10	6,29
21	4	6,82	6,22	6,23	6,84	6,67	7,46	6,81	6,77
24	1	6,98	7,08	6,10	6,59	6,97	7,44	7,72	6,27
24	2	6,73	6,65	7,03	7,09	6,74	7,30	6,97	6,79
24	3	7,81	7,18	6,93	6,85	7,25	7,09	7,02	7,35
24	4	-	7,37	6,27	6,56	6,84	7,76	7,10	7,38
27	1	6,71	6,01	7,20	7,16	6,58	7,41	6,10	7,44
27	2	6,70	6,30	7,32	7,49	6,93	7,48	6,26	7,00
27	3	6,39	6,62	7,57	7,49	6,16	7,45	6,31	7,76
27	4	6,78	6,03	7,62	8,00	6,27	7,41	6,81	7,32
30	1	7,00	6,22	6,24	7,86	6,69	7,91	6,66	7,98
30	2	6,87	6,70	6,66	7,33	6,30	7,38	6,82	7,66
30	3	6,63	6,55	6,17	7,53	6,61	7,39	6,62	7,92
30	4	6,63	6,40	6,13	8,04	7,25	7,55	6,69	8,36
33	1	8,52	7,82	8,40	8,34	8,08	9,48	8,72	9,22
33	2	8,40	7,81	7,98	8,05	8,01	9,24	8,71	8,25
33	3	9,10	8,19	7,80	8,48	8,28	8,37	8,51	8,87
33	4	8,65	7,21	7,82	8,49	8,19	9,35	8,49	8,97
36	1	9,16	8,01	8,26	9,14	8,07	9,59	8,54	8,77
36	2	8,60	7,81	8,02	8,72	8,34	9,92	8,88	9,19
36	3	8,55	7,77	8,14	9,18	8,12	9,59	9,29	9,15
36	4	8,97	8,05	8,05	8,04	8,58	9,41	9,44	8,61
39	1	9,02	8,52	8,95	8,40	8,62	10,02	8,77	9,29
39	2	9,24	8,47	8,08	8,67	7,73	10,66	9,43	8,98
39	3	9,65	8,50	8,68	8,08	9,32	9,68	9,18	8,24
39	4	8,95	8,27	7,75	8,66	8,20	9,78	8,90	8,79
42	1	9,19	8,29	8,72	9,22	8,93	10,20	9,94	9,56
42	2	9,18	9,03	8,57	9,08	8,54	11,75	9,40	9,03
42	3	9,84	8,77	8,40	8,84	8,89	10,82	9,97	9,95
42	4	9,20	8,67	8,48	8,71	9,11	10,96	9,54	9,43
45	1	9,49	7,57	8,05	8,56	8,38	10,10	9,33	9,82
45	2	8,76	8,05	7,88	9,48	8,75	10,69	8,66	9,76

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Comprimento do corpo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
45	3	9,21	7,95	8,25	8,55	8,26	10,30	9,89	9,64
45	4	8,68	7,54	8,29	9,05	8,12	10,05	9,44	9,59
48	1	8,88	7,95	8,17	9,51	8,15	11,74	9,72	10,73
48	2	9,81	7,97	8,37	9,29	8,26	13,18	8,86	10,48
48	3	9,83	8,30	8,09	9,72	8,79	11,90	9,70	10,51
48	4	9,04	8,05	8,78	9,04	8,75	11,62	8,83	10,39
51	1	9,65	8,86	9,52	9,03	9,23	-	10,91	11,94
51	2	9,57	8,97	8,29	10,13	8,98	-	11,34	11,71
51	3	8,65	8,77	9,72	9,97	8,93	-	10,72	12,05
51	4	10,44	8,66	9,26	10,40	8,94	-	10,79	11,68
54	1	9,87	9,10	10,13	10,68	9,60	-	11,83	12,98
54	2	9,93	9,44	10,02	10,32	9,74	-	11,78	12,55
54	3	10,06	9,47	9,92	9,87	9,33	-	10,66	11,96
54	4	10,23	9,02	10,17	10,57	9,85	-	11,70	12,66
57	1	11,29	10,15	10,06	11,11	10,89	-	16,01	12,56
57	2	11,74	10,18	10,05	10,32	10,23	-	14,00	12,53
57	3	11,70	10,95	10,99	9,40	10,97	-	14,84	12,92
57	4	11,06	10,79	10,80	9,26	9,71	-	-	13,22
60	1	11,95	12,16	12,59	13,02	11,66	-	-	14,35
60	2	12,65	12,44	12,17	11,20	11,33	-	-	14,00
60	3	-	-	12,32	11,11	11,33	-	-	14,35
60	4	-	-	12,24	11,69	12,13	-	-	13,60
63	1	-	-	14,71	12,37	13,76	-	-	15,42
63	2	-	-	13,96	12,78	12,40	-	-	15,76
63	3	-	-	13,18	12,11	13,99	-	-	16,23
63	4	-	-	13,49	12,36	12,32	-	-	16,37
66	1	-	-	14,81	14,65	15,56	-	-	-
66	2	-	-	15,45	15,74	-	-	-	-
66	3	-	-	-	14,43	-	-	-	-
66	4	-	-	-	13,56	-	-	-	-
69	1	-	-	-	15,77	-	-	-	-
69	2	-	-	-	15,68	-	-	-	-

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Comprimento do corpo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
69	3	-	-	-	16,65	-	-	-	-
69	4	-	-	-	16,47	-	-	-	-
72	1	-	-	-	19,75	-	-	-	-
72	2	-	-	-	19,35	-	-	-	-
72	3	-	-	-	20,82				
72	4	-	-	-	21,87				

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do corpo (mm)							
		Quente sem fluxo				Quente com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
21	1	1,46	1,89	1,72	1,88	1,57	1,74	1,99	2,05
21	2	1,59	1,77	1,86	1,73	1,78	1,84	2,08	1,86
21	3	1,46	1,87	2,00	1,61	1,94	1,94	1,85	2,23
21	4	1,73	1,73	1,90	2,13	1,65	2,12	1,89	2,30
24	1	1,45	2,04	1,96	1,92	2,37	2,05	2,32	2,40
24	2	1,63	2,16	2,15	1,80	2,10	2,20	2,01	2,44
24	3	1,66	2,04	2,20	2,13	2,02	1,87	2,04	1,87
24	4	1,61	2,09	2,01	2,13	2,05	1,96	2,11	2,14
27	1	1,67	1,82	2,15	2,48	1,96	1,99	1,91	2,53
27	2	1,72	2,01	2,15	2,06	1,93	2,11	2,02	2,69
27	3	1,75	1,85	2,40	2,30	2,18	1,99	1,91	2,66
27	4	1,74	1,70	2,22	2,30	2,02	1,97	1,98	2,33
30	1	1,75	1,90	1,91	2,67	2,04	1,75	2,27	2,76
30	2	1,66	1,90	2,13	2,65	2,20	2,21	2,24	2,85
30	3	1,82	1,95	2,19	2,50	2,14	1,95	2,25	2,77
30	4	1,77	1,87	2,12	2,57	2,17	2,41	2,52	2,60
33	1	2,06	2,19	2,34	3,14	2,76	2,41	2,59	3,87
33	2	2,08	2,31	2,75	3,27	2,60	2,57	2,51	3,87
33	3	2,14	2,23	2,50	2,94	2,24	3,06	2,64	3,91
33	4	2,16	2,27	2,40	3,25	2,91	2,70	2,81	3,43
36	1	2,98	3,06	2,78	3,71	3,51	3,50	3,40	4,18
36	2	2,90	3,06	3,15	3,91	3,52	3,73	3,46	4,36
36	3	2,62	3,15	2,74	3,88	3,46	3,84	3,53	4,48
36	4	2,34	3,29	3,20	3,50	3,45	3,37	3,67	3,98
39	1	3,10	3,60	3,04	4,22	3,35	3,79	4,02	4,73
39	2	2,86	3,67	2,97	4,00	3,64	3,77	3,72	4,87
39	3	2,79	3,60	3,43	4,33	3,89	3,63	3,62	4,97
39	4	2,75	3,67	3,07	4,23	3,72	3,95	3,64	4,74
42	1	2,79	4,16	4,06	5,19	4,36	4,75	4,20	5,33
42	2	3,56	4,09	3,82	4,92	4,46	4,38	4,11	5,57
42	3	3,10	4,20	3,86	4,84	4,74	4,57	4,08	5,47
42	4	3,57	4,16	4,37	4,76	4,74	4,35	4,59	5,06

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do corpo (mm)							
		Quente sem fluxo				Quente com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
45	1	3,08	4,44	4,00	5,49	4,48	4,66	4,11	6,82
45	2	3,48	4,12	4,05	5,31	5,00	4,81	4,28	7,10
45	3	3,30	4,25	3,86	5,00	4,56	5,33	4,54	5,99
45	4	3,44	4,12	4,12	5,09	4,36	4,85	4,08	6,49
48	1	3,80	4,92	4,47	6,20	5,21	6,02	5,14	6,93
48	2	3,55	5,07	4,35	6,83	5,29	5,83	4,73	7,42
48	3	3,74	5,46	4,50	6,40	5,47	6,37	4,72	6,97
48	4	3,64	5,11	4,78	7,20	5,32	6,37	4,71	6,92
51	1	4,39	6,75	5,01	8,46	6,64	7,43	5,49	8,70
51	2	4,77	5,75	5,09	8,72	5,85	7,07	6,35	8,40
51	3	4,78	6,57	5,22	8,26	6,40	6,71	6,10	8,44
51	4	4,52	6,26	4,91	8,45	6,54	6,94	5,87	8,07
54	1	4,86	6,60	5,36	8,73	7,34	7,54	6,36	8,51
54	2	4,85	7,13	4,96	7,80	7,48	7,54	6,97	9,01
54	3	5,00	6,85	5,23	9,30	7,35	-	6,50	9,47
54	4	5,58	7,33	5,80	8,38	7,11	-	6,68	9,38
54	5	5,27	-	5,46	-	-	-	-	-
54	6	4,92	-	5,33	-	-	-	-	-
57	1	6,21	7,48	5,93	-	-	-	7,33	-
57	2	5,57	-	5,77	-	-	-	6,57	-
57	3	5,76	-	6,30	-	-	-	-	-
57	4	6,21	-	6,24	-	-	-	-	-
60	1	6,82	-	7,54	-	-	-	-	-
60	2	6,90	-	7,33	-	-	-	-	-
60	3	6,44	-	6,99	-	-	-	-	-
60	4	6,02	-	7,46	-	-	-	-	-
63	1	7,86	-	7,53	-	-	-	-	-
63	2	7,86	-	7,54	-	-	-	-	-

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do corpo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
21	1	2,00	1,90	1,58	1,54	1,75	1,99	1,87	1,61
21	2	1,72	1,71	1,46	1,48	1,61	1,84	1,53	1,39
21	3	1,76	1,86	1,42	1,72	1,61	2,04	1,87	1,55
21	4	1,84	1,62	1,60	1,90	1,58	2,03	1,87	1,70
24	1	1,87	1,66	1,45	1,80	1,87	2,07	2,12	1,61
24	2	1,67	1,76	1,85	1,74	1,94	2,21	1,80	1,69
24	3	2,26	1,90	1,64	1,76	2,06	1,89	1,88	1,80
24	4	-	2,00	1,64	1,62	1,87	2,26	1,80	1,92
27	1	1,80	1,63	2,01	2,01	1,79	2,17	1,72	2,11
27	2	1,76	1,72	2,04	1,87	1,90	2,13	1,96	1,96
27	3	-	1,72	1,94	2,16	1,60	2,13	1,84	2,25
27	4	1,87	1,57	2,02	2,21	1,72	2,13	1,84	2,06
30	1	1,85	1,56	1,63	1,97	1,64	2,26	1,88	2,13
30	2	2,08	1,85	1,66	1,97	1,63	1,91	2,04	2,13
30	3	1,80	1,68	1,53	2,12	1,74	2,19	1,96	2,05
30	4	1,88	1,72	1,66	2,03	1,78	2,23	2,12	2,19
33	1	2,44	2,23	2,44	2,46	2,17	2,95	2,45	2,61
33	2	2,39	2,06	2,35	2,35	2,02	2,81	2,36	2,21
33	3	2,68	2,06	2,35	2,40	2,29	2,85	2,61	2,70
33	4	2,53	1,87	2,45	2,52	2,39	2,67	2,56	2,65
36	1	2,65	2,19	2,47	2,58	2,40	2,67	2,61	2,61
36	2	2,39	2,11	2,16	2,43	2,23	2,81	2,50	2,76
36	3	2,39	2,19	2,18	2,77	2,25	2,67	2,85	2,75
36	4	2,62	2,14	2,16	2,54	2,30	2,86	2,89	2,74
39	1	2,77	2,33	2,47	2,41	2,44	3,04	2,69	2,58
39	2	2,67	2,37	2,13	2,67	2,34	3,41	2,64	2,63
39	3	2,80	2,36	2,46	2,40	2,58	2,85	2,55	2,28
39	4	2,80	2,07	2,19	2,57	2,35	3,13	2,64	2,65
42	1	2,75	2,33	2,70	2,64	2,57	3,23	2,96	3,06
42	2	2,80	2,61	2,48	2,80	2,59	3,52	2,90	2,81
42	3	3,03	2,23	2,70	2,46	2,57	3,39	2,88	3,02
42	4	2,82	2,51	2,63	2,25	2,62	3,32	2,69	3,10
45	1	2,72	2,29	2,44	2,31	2,42	3,21	3,03	3,00

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do corpo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
45	2	2,57	2,08	2,46	2,52	2,49	3,21	2,79	3,10
45	3	2,85	2,33	2,41	2,65	2,42	3,27	3,16	2,85
45	4	2,82	2,19	2,45	2,52	2,43	3,19	2,98	3,38
48	1	2,84	2,42	2,51	2,53	2,48	3,81	3,20	3,55
48	2	3,14	2,61	2,66	2,74	2,56	4,66	2,95	3,28
48	3	2,87	2,50	2,67	2,81	2,78	4,05	3,10	3,29
48	4	2,87	2,49	2,79	2,64	2,68	4,04	2,98	3,26
51	1	3,07	2,74	3,15	3,03	2,90	-	3,68	3,68
51	2	3,19	2,91	2,49	3,06	2,83	-	3,62	3,93
51	3	2,82	2,86	2,86	3,11	2,82	-	3,62	3,79
51	4	3,20	2,64	3,10	3,28	2,87	-	3,74	3,75
54	1	3,19	2,99	3,43	3,43	3,19	-	3,98	4,48
54	2	3,19	2,97	3,27	3,40	3,45	-	4,17	4,21
54	3	3,25	2,84	3,37	3,24	3,25	-	3,62	4,04
54	4	3,31	2,83	3,28	3,25	3,19	-	3,80	4,03
57	1	3,74	3,35	3,35	3,32	3,49	-	5,88	4,35
57	2	3,84	3,31	3,39	3,38	3,25	-	4,58	4,35
57	3	3,68	3,64	3,59	3,42	3,31	-	5,25	4,51
57	4	3,55	3,64	3,51	3,49	3,40	-	-	4,44
60	1	3,84	4,14	4,05	4,30	3,69	-	-	4,87
60	2	4,50	4,00	3,89	3,55	3,69	-	-	4,67
60	3	-	3,78	3,94	3,92	4,07	-	-	4,92
60	4	-	-	3,95	3,78	3,83	-	-	4,49
63	1	-	-	5,04	4,46	4,49	-	-	5,62
63	2	-	-	4,79	4,23	4,31	-	-	5,56
63	3	-	-	4,62	3,96	4,49	-	-	5,55
63	4	-	-	4,74	4,02	4,26	-	-	5,80
66	1	-	-	4,90	4,81	5,58	-	-	-
66	2	-	-	5,35	5,21	-	-	-	-
66	3	-	-	-	4,57	-	-	-	-
66	4	-	-	-	4,76	-	-	-	-
69	1	-	-	-	5,32	-	-	-	-
69	2	-	-	-	5,39	-	-	-	-

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do corpo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
69	3	-	-	-	6,00	-	-	-	-
69	4	-	-	-	5,75	-	-	-	-
72	1	-	-	-	6,92	-	-	-	-
72	2	-	-	-	7,00	-	-	-	-
72	3	-	-	-	7,57				
72	4	-	-	-	7,98				

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do Pedúnculo (mm)							
		Quente sem fluxo				Quente com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
21	1	0,44	0,48	0,46	0,45	0,43	0,53	0,60	0,57
21	2	0,39	0,43	0,52	0,49	0,51	0,53	0,62	0,53
21	3	0,42	0,51	0,58	0,39	0,63	0,59	0,51	0,60
21	4	0,48	0,45	0,49	0,60	0,53	0,52	0,58	0,61
24	1	0,39	0,65	0,60	0,53	0,81	0,64	0,69	0,62
24	2	0,50	0,64	0,68	0,47	0,66	0,67	0,63	0,60
24	3	0,49	0,59	0,67	0,58	0,56	0,62	0,67	0,48
24	4	0,40	0,56	0,61	0,57	0,62	0,64	0,65	0,62
27	1	0,52	0,56	0,78	0,67	0,60	0,69	0,65	0,72
27	2	0,49	0,66	0,72	0,61	0,69	0,67	0,61	0,79
27	3	0,46	0,59	0,75	0,68	0,56	0,62	0,65	0,84
27	4	0,48	0,46	0,59	0,69	0,60	0,62	0,67	0,74
30	1	0,47	0,58	0,56	0,67	0,66	0,51	0,67	0,72
30	2	0,48	0,51	0,60	0,73	0,74	0,63	0,76	0,75
30	3	0,52	0,62	0,67	0,71	0,62	0,60	0,67	0,82
30	4	0,44	0,58	0,60	0,69	0,60	0,74	0,73	0,67
33	1	0,54	0,61	0,66	0,82	0,84	0,82	0,76	1,21
33	2	0,56	0,61	0,76	0,95	0,87	0,80	0,82	1,06
33	3	0,57	0,67	0,71	0,83	0,76	0,80	0,85	1,16
33	4	0,56	0,67	0,68	0,79	0,83	0,80	0,87	1,00
36	1	0,75	0,83	0,90	1,14	1,04	1,08	1,18	1,30
36	2	0,84	0,96	0,94	1,07	1,15	1,14	1,26	1,30
36	3	0,78	0,94	0,94	1,18	1,19	1,30	1,18	1,39
36	4	0,75	0,99	0,90	0,98	1,11	1,14	1,25	1,25
39	1	0,95	1,09	1,04	1,25	1,14	1,20	1,42	1,41
39	2	0,76	1,08	0,97	1,19	1,20	1,15	1,26	1,53
39	3	0,86	1,20	0,99	1,27	1,24	1,27	1,25	1,52
39	4	0,79	1,18	1,02	1,26	1,24	1,22	1,34	1,51
42	1	0,88	1,34	1,34	1,51	1,32	1,48	1,29	1,64
42	2	1,12	1,38	1,20	1,42	1,45	1,44	1,29	1,54
42	3	0,94	1,24	1,16	1,29	1,41	1,50	1,43	1,56
42	4	1,14	1,20	1,32	1,45	1,45	1,50	1,38	1,53

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do Pedúnculo (mm)							
		Quente sem fluxo				Quente com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
45	1	1,00	1,13	1,19	1,54	1,31	1,50	1,36	1,94
45	2	1,09	1,25	1,26	1,20	1,51	1,53	1,33	2,00
45	3	1,13	1,37	1,29	1,53	1,43	1,72	1,39	1,61
45	4	0,97	1,35	1,36	1,59	1,36	1,59	1,25	1,95
48	1	1,06	1,54	1,41	1,74	1,65	1,79	1,50	2,21
48	2	1,13	1,57	1,35	2,00	1,59	1,78	1,41	2,13
48	3	1,19	1,54	1,35	2,11	1,89	1,84	1,50	2,08
48	4	1,07	1,68	1,55	2,00	1,71	1,84	1,47	2,10
51	1	1,41	2,04	1,53	2,28	2,15	2,45	1,65	2,57
51	2	1,60	1,62	1,67	2,48	1,87	2,18	2,01	2,32
51	3	1,47	1,92	1,63	2,31	1,81	2,12	1,99	2,66
51	4	1,41	1,83	1,62	2,66	2,04	2,13	1,89	2,46
54	1	1,44	2,04	1,82	2,37	2,15	2,53	1,95	2,68
54	2	1,48	2,01	1,54	2,25	2,35	2,53	2,08	2,80
54	3	1,44	2,06	1,36	2,72	2,37	-	1,94	3,09
54	4	1,53	2,39	1,69	2,42	2,30	-	2,16	3,19
54	5	1,69	-	1,58	-	1,31	-	-	-
54	6	1,52	-	1,67	-	-	-	-	-
57	1	1,78	2,38	1,66	-	-	-	2,40	-
57	2	1,65	-	1,60	-	-	-	2,31	-
57	3	1,42	-	1,80	-	-	-	-	-
57	4	1,71	-	2,08	-	-	-	-	-
60	1	1,95	-	2,27	-	-	-	-	-
60	2	1,92	-	2,17	-	-	-	-	-
60	3	1,40	-	1,98	-	-	-	-	-
60	4	1,67	-	2,16	-	-	-	-	-
63	1	2,31	-	2,69	-	-	-	-	-
63	2	2,54	-	2,39	-	-	-	-	-

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do Pedúnculo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
21	1	0,51	0,50	0,50	0,39	0,49	0,69	0,63	0,39
21	2	0,48	0,52	0,42	0,31	0,48	0,59	0,45	0,33
21	3	0,48	0,51	0,40	0,39	0,44	0,59	0,52	0,37
21	4	0,50	0,43	0,49	0,43	0,46	0,54	0,56	0,43
24	1	0,50	0,54	0,49	0,49	0,50	0,66	0,59	0,42
24	2	0,47	0,51	0,55	0,48	0,52	0,64	0,58	0,43
24	3	0,69	0,51	0,49	0,44	0,54	0,57	0,56	0,49
24	4	-	0,55	0,42	0,41	0,58	0,61	0,52	0,52
27	1	0,56	0,55	0,67	0,52	0,53	0,70	0,54	0,59
27	2	0,51	0,59	0,64	0,54	0,57	0,70	0,57	0,54
27	3	-	0,53	0,62	0,61	0,49	0,65	0,60	0,62
27	4	0,60	0,45	0,61	0,59	0,55	0,64	0,59	0,53
30	1	0,58	0,48	0,47	0,51	0,54	0,66	0,59	0,56
30	2	0,59	0,54	0,45	0,48	0,45	0,58	0,61	0,54
30	3	0,52	0,48	0,42	0,49	0,56	0,62	0,47	0,54
30	4	0,51	0,51	0,44	0,56	0,50	0,68	0,53	0,57
33	1	0,61	0,63	0,64	0,57	0,72	0,87	0,69	0,68
33	2	0,73	0,70	0,66	0,54	0,68	0,94	0,69	0,58
33	3	0,81	0,66	0,63	0,56	0,68	0,73	0,79	0,68
33	4	0,71	0,48	0,67	0,54	0,72	0,83	0,67	0,68
36	1	0,76	0,57	0,70	0,69	0,68	0,84	0,72	0,69
36	2	0,75	0,61	0,64	0,65	0,66	0,88	0,86	0,71
36	3	0,76	0,66	0,69	0,64	0,58	0,87	0,82	0,70
36	4	0,72	0,64	0,59	0,62	0,72	0,96	0,86	0,76
39	1	0,88	0,70	0,75	0,60	0,73	0,92	0,88	0,79
39	2	0,88	0,72	0,68	0,75	0,66	0,98	0,93	0,75
39	3	0,88	0,67	0,68	0,63	0,81	0,89	0,77	0,58
39	4	0,87	0,67	0,62	0,64	0,71	0,99	0,79	0,82
42	1	0,89	0,70	0,90	0,74	0,89	1,08	0,92	0,85
42	2	0,87	0,80	0,72	0,68	0,77	1,19	0,90	0,79
42	3	1,01	0,71	0,77	0,65	0,84	1,15	0,88	0,90
42	4	0,82	0,79	0,77	0,60	0,77	1,15	0,84	0,78
45	1	0,91	0,64	0,83	0,59	0,81	1,04	0,86	0,91

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do Pedúnculo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
45	2	0,82	0,62	0,80	0,69	0,83	1,07	0,78	0,82
45	3	0,83	0,64	0,69	0,68	0,73	1,07	0,98	0,83
45	4	0,83	0,63	0,76	0,64	0,75	1,02	0,96	0,91
48	1	0,93	0,72	0,82	0,71	0,76	1,11	0,97	0,98
48	2	1,02	0,68	0,80	0,76	0,75	1,39	0,94	0,91
48	3	0,98	0,76	0,83	0,84	0,88	1,32	1,02	0,78
48	4	1,02	0,70	0,74	0,72	0,88	1,31	0,90	1,00
51	1	0,93	0,86	0,87	0,76	1,10	-	1,08	0,98
51	2	0,96	0,88	0,86	0,84	1,02	-	1,19	1,14
51	3	0,90	0,88	1,02	0,89	0,86	-	1,16	1,17
51	4	0,94	0,82	1,01	0,87	0,94	-	1,13	1,08
54	1	1,07	0,96	1,18	1,00	0,92	-	1,27	1,39
54	2	0,94	0,96	1,08	0,96	1,17	-	1,29	1,24
54	3	1,04	0,98	0,99	0,82	1,01	-	1,11	1,19
54	4	1,10	0,96	1,12	0,82	1,10	-	1,29	1,29
57	1	1,15	0,98	1,06	0,99	1,18	-	1,84	1,23
57	2	1,15	1,02	1,00	0,93	1,14	-	1,39	1,16
57	3	1,13	1,06	1,07	0,96	1,10	-	1,70	1,22
57	4	1,10	1,14	1,16	1,04	0,99	-	-	1,24
60	1	1,29	1,23	1,37	1,24	1,19	-	-	1,54
60	2	1,29	1,29	1,25	0,98	1,25	-	-	1,55
60	3	-	-	1,33	1,19	1,23	-	-	1,53
60	4	-	-	1,39	1,07	1,29	-	-	1,46
63	1	-	-	1,61	1,25	1,41	-	-	1,61
63	2	-	-	1,43	1,22	1,54	-	-	1,66
63	3	-	-	1,46	1,07	1,49	-	-	1,72
63	4	-	-	1,52	1,21	1,36	-	-	1,74
66	1	-	-	1,63	1,25	1,81	-	-	-
66	2	-	-	1,85	1,56	-	-	-	-
66	3	-	-	-	1,38	-	-	-	-
66	4	-	-	-	1,38	-	-	-	-
69	1	-	-	-	1,64	-	-	-	-
69	2	-	-	-	1,61	-	-	-	-

Tabela 17 Dados da morfometria linear dos espécimes das Condições de Desenvolvimento. Continuação.

Dias pós-eclosão	Espécime	Condições de Desenvolvimento – Altura do Pedúnculo (mm)							
		Frio sem fluxo				Frio com fluxo			
		Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3	Aquário 4
69	3	-	-	-	1,71	-	-	-	-
69	4	-	-	-	1,69	-	-	-	-
72	1	-	-	-	1,99	-	-	-	-
72	2	-	-	-	2,19	-	-	-	-
72	3	-	-	-	2,13				
72	4	-	-	-	2,28				

7.6 Anexo F – Aparecimento das estruturas cartilaginosas e ósseas

Tabela 18 Aparecimento das estruturas em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE).

| Estrutura | Primeiro sinal de
Condriificação | | | | Primeiro sinal de
Ossificação | | | | Primeira Estrutura
completamente Ossificada | | | |
|-----------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Temperatura Alta Sem Fluxo | Temperatura Alta Com Fluxo | Temperatura Baixa Sem Fluxo | Temperatura Baixa Com Fluxo | Temperatura Alta Sem Fluxo | Temperatura Alta Com Fluxo | Temperatura Baixa Sem Fluxo | Temperatura Baixa Com Fluxo | Temperatura Alta Sem Fluxo | Temperatura Alta Com Fluxo | Temperatura Baixa Sem Fluxo | Temperatura Baixa Com Fluxo |
| cle | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| rc | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| hip1 | 21 | 21 | 21 | 21 | 24 | 27 | 33 | 30 | 51 | 51 | - | - |
| hip2 | 21 | 21 | 21 | 21 | 33 | 27 | 36 | 30 | 51 | 51 | - | - |
| pp | 21 | 21 | 21 | 21 | 27 | 21 | 27 | 30 | 51 | 51 | - | - |
| cvpw | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| ra | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| cv14 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| rd | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| anpw | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| hip3 | 21 | 21 | 21 | 21 | 36 | 27 | 39 | 30 | 51 | 51 | - | - |
| ahpu23 | 21 | 21 | 21 | 21 | 27 | 21 | 27 | 24 | 51 | 33 | - | - |
| ahpw | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 27 | 24 | 21 | 21 | 27 | 24 |
| an34 | 21 | 21 | 21 | 21 | 24 | 21 | 27 | 24 | 24 | 27 | 45 | 36 |
| rpa | 21 | 21 | 21 | 21 | 30 | 30 | 48 | 30 | 39 | 39 | 72 | 51 |
| rpcv | 24 | 27 | 33 | 39 | 24 | 27 | 33 | 39 | 27 | 27 | 33 | 39 |
| hip4 | 21 | 21 | 21 | 21 | 33 | 27 | 39 | 30 | 51 | 51 | - | - |
| hip5 | 21 | 21 | 21 | 21 | 33 | 27 | 39 | 30 | 51 | 51 | - | - |
| anpu23 | 21 | 21 | 21 | 21 | 27 | 21 | 27 | 24 | 27 | 27 | 39 | 39 |
| cpu1 | 24 | 21 | 27 | 24 | 24 | 21 | 27 | 24 | 24 | 21 | 33 | 30 |
| rpd | 21 | 21 | 21 | 21 | 30 | 30 | 48 | 30 | 39 | 30 | 72 | 51 |
| aw | 24 | 21 | | 24 | 24 | 21 | 27 | 24 | 24 | 33 | 39 | 33 |
| hip6 | 21 | 24 | 24 | 30 | 36 | 27 | 39 | 30 | 45 | 51 | - | - |
| parp | 21 | 21 | 27 | 30 | 27 | 27 | 45 | 42 | 30 | 36 | 60 | 51 |
| sn3 | 21 | 21 | | 24 | 36 | 30 | 45 | 30 | 36 | 48 | 72 | 60 |
| ep | 21 | 21 | 30 | 30 | 27 | 27 | 45 | 39 | 27 | 48 | - | - |

Tabela 18 Aparecimento das estruturas em relação ao Dia Pós-eclosão (DPE). Continuação.

| Estrutura | Primeiro sinal de
Condrificação | | | | Primeiro sinal de
Ossificação | | | | Primeira Estrutura
completamente Ossificada | | | |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Temperatura Alta Sem Fluxo | Temperatura Alta Com Fluxo | Temperatura Baixa Sem Fluxo | Temperatura Baixa Com Fluxo | Temperatura Alta Sem Fluxo | Temperatura Alta Com Fluxo | Temperatura Baixa Sem Fluxo | Temperatura Baixa Com Fluxo | Temperatura Alta Sem Fluxo | Temperatura Alta Com Fluxo | Temperatura Baixa Sem Fluxo | Temperatura Baixa Com Fluxo |
| rdd | 21 | 21 | 27 | 24 | 54 | 30 | - | - | - | 39 | - | - |
| rpcd | 36 | 27 | 33 | 30 | 36 | 27 | 33 | 30 | 39 | 27 | 33 | 30 |
| rda | 21 | 21 | 27 | 24 | 54 | 30 | - | - | - | 54 | - | - |
| rpt | 36 | 30 | 39 | 30 | 36 | 36 | 60 | 51 | 39 | 39 | 69 | 63 |
| snw | 21 | 21 | 30 | 30 | 45 | 36 | 57 | 60 | 51 | 51 | - | - |
| rpl | 33 | 22 | 48 | 42 | 33 | 33 | 48 | 42 | 33 | 33 | 60 | 45 |
| intra | 36 | 33 | 60 | 57 | 36 | 33 | 60 | 57 | 39 | 36 | 60 | 60 |
| cpl | 33 | 33 | 48 | 42 | 33 | 33 | 60 | 51 | 33 | 36 | 69 | 60 |
| cpt | 21 | 21 | 21 | 21 | 42 | 33 | 63 | 60 | 45 | 33 | 72 | - |
| rdpt | 39 | 39 | 69 | - | 48 | 48 | - | - | 48 | 51 | - | - |
| ptmd | 24 | 30 | 51 | 48 | 54 | - | - | - | - | - | - | - |
| rdpl | 39 | 33 | 66 | 48 | 39 | 51 | 72 | - | 48 | 51 | - | - |

1.1.4.07.3 332223333223232233232112131213321011

1.1.4.07.4 3322233333223323223333212121313231012
1.1.4.08.1 33222333332233232233231322131313022111
1.1.4.08.2 33222333332233232233231322121313021111
1.1.4.08.3 3322233333223323223323222213131302111
1.1.4.08.4 33222333332233232233232323131313022111
1.1.4.09.1 33222333332233232233332322131323032111
1.1.4.09.2 33222333332233232233333223131323033111
1.1.4.09.3 3322233333223323223323222213131?0?211?
1.1.4.09.4 33222333332233232233332322131313022111
1.1.4.10.1 3322233333223333223333223213132?3?331?
1.1.4.10.2 33222333332233332233332332131323333313
1.1.4.10.3 33222333332233232233332332131323333111
1.1.4.10.4 33222333332233332233332332131323333113
1.1.4.11.2 33222333332233332233332333131323333111
1.1.4.11.3 3322233333233333223333233313133?3?331?
1.1.4.11.4 333333333333333333333333131323333213
1.1.4.12.1 33222333332233332233332332131323333123
1.1.4.12.3 33333333333333333333333333131333333323
1.1.4.12.4 332223333322333322333323223232?3?332?
HM 333

;

End;

4 redundant taxa deleted

Kept	Deleted
5 1.1.4.01.4	4 1.1.4.01.3
15 1.1.4.04.2	14 1.1.4.04.1
41 1.1.4.10.4	42 1.1.4.11.1
	47 1.1.4.12.2

2.1.4.09.3 33112333331233131123131211131110001000

[illegible]

```

;      10 redundant taxa deleted
End;
```

Kept	Deleted
2 2.1.4.02.1	5 2.1.4.02.4
13 2.1.4.04.4	10 2.1.4.04.1
16 2.1.4.05.3	20 2.1.4.06.3
42 2.1.4.12.1	43 2.1.4.12.2
47 2.1.4.13.2	48 2.1.4.13.3
54 2.1.4.15.1	56 2.1.4.15.3
60 2.1.4.16.3	58 2.1.4.16.1
67 2.1.4.18.2	66 2.1.4.18.1
	68 2.1.4.18.3
	69 2.1.4.18.4

cle rc hip1 hip2 pp cvpw ra cv14 rd anpw hip3 ahpu23 ahpw an34 rpa rpcv hip4 hip5 anpu23
cpu1 rpd aw hip6 parp sn3 ep rdd rped rda rpt snw rpl intra cpl cpt rdpt ptmd rdpl ;

Matrix

[illegible]

[illegible]

End;

9 redundant taxa deleted

Kept	Deleted
4 2.2.4.02.3	2 2.2.4.02.1
	3 2.2.4.02.2
	8 2.2.4.03.3
7 2.2.4.03.2	6 2.2.4.03.1
37 2.2.4.10.4	49 2.2.4.13.4
45 2.2.4.12.4	48 2.2.4.13.3
46 2.2.4.13.1	47 2.2.4.13.2
50 2.2.4.14.1	56 2.2.4.15.3
57 2.2.4.15.4	55 2.2.4.15.2

7.8 Anexo H - Árvores Consenso com Sinapomorfias mapeadas

7.8.1 Temperatura Alta Sem Fluxo (Imaturo como grupo externo)

Best score: 171

7.8.2 Temperatura Alta Sem Fluxo (Maduro como grupo externo)

Best score: 176

7.8.3 Temperatura Alta Com Fluxo (Imaturo como grupo externo)

Best score: 146

7.8.4 Temperatura Alta Com Fluxo (Maduro como grupo externo)

Best score: 162

7.8.5 Temperatura Baixa Sem Fluxo (Imaturo como grupo externo)

7.8.6 Temperatura Baixa Sem Fluxo (Maduro como grupo externo)

Best score: 174

7.8.7 Temperatura Baixa Com Fluxo (Imaturo como grupo externo)

Best score: 163

7.8.8 Temperatura Baixa Com Fluxo (Maduro como grupo externo)

Best score: 163

7.9 Anexo I - Extração de RNA e qPCR

Tabela 19 Quantificação do RNA e preparação das alíquotas.

Condição de Desenvolvimento	Amostra (DPE)	Aquário	Pós-Crânio			Nadadeira Caudal		
			ng/μl	μl amostra	μl água	ng/μl	μl amostra	μl água
1.1
(Temperatura Alta Sem Fluxo)	1	1	358	5.59	1.41	222	9.01	0
	1	2	453	4.42	2.58	521	3.84	3.16
	1	3	491	4.07	2.93	89	22.47	0
	1	4	493	4.06	2.94	343	5.83	1.17
	5	1	210	9.52	0	66	30.30	0
	5	2	425	4.71	2.29	122	16.39	0
	5	3	1000	2.00	5.00	318	6.29	0.71
	5	4	233	8.58	0	347	5.76	1.24
	10	1	2612	0.77	6.23	397	5.04	1.96
	10	2	3735	0.54	6.46	117	17.09	0
	10	3	554	3.61	3.39	146	13.70	0
	10	4	1718	1.16	5.84	270	7.41	0
	1	1	102	19.61	0	573	3.49	3.51
	1	2	251	7.97	0	104	19.23	0
1.2
(Temperatura Alta Com Fluxo)	1	3	300	6.67	0.33	150	13.33	0
	1	4	218	9.17	0	39	51.28	0
	5	1	250	8.00	0	142	14.08	0
	5	2	865	2.31	4.69	1212	1.65	5.35
	5	3	562	3.56	3.44	458	4.37	2.63
	5	4	809	2.47	4.53	114	17.54	0
	10	1	2307	0.87	6.13	174	11.49	0
	10	2	2495	0.80	6.20	407	4.91	2.09
	10	3	3437	0.58	6.42	185	10.81	0
	10	4	1216	1.64	5.36	228	8.77	0
	1	1	167	11.98	0	234	8.55	0
	1	2	361	5.54	1.46	34	58.82	0
	1	3	305	6.56	0.44	241	8.30	0
	1	4	199	10.05	0	170	11.76	0
2.1
(Temperatura Baixa Sem Fluxo)	5	1	334	5.99	1.01	104	19.23	0
	5	2	337	5.93	1.07	911	2.20	4.80
	5	3	344	5.81	1.19	601	3.33	3.67
	5	4	202	9.90	0	74	27.03	0
	10	1	416	4.81	2.19	129	15.50	0
	10	2	1019	1.96	5.04	131	15.27	0
	10	3	228	8.77	0	320	6.25	0.75
	10	4	620	3.23	3.77	58	34.48	0

Tabela 19 Quantificação do RNA e preparação das alíquotas. Continuação.

Condição de Desenvolvimento	Amostra (DPE)	Aquário	Pós-Crânio			Nadadeira Caudal		
			ng/ μ l	μ l amostra	μ l água	ng/ μ l	μ l amostra	μ l água
2.2
(Temperatura Baixa Com Fluxo)	1	1	259	7.72	0	70	28.57	0
	1	2	351	5.70	1.30	94	21.28	0
	1	3	142	14.08	0	110	18.18	0
	1	4	190	10.53	0	62	32.26	0
	5	1	270	7.41	0	9	222.22	0
	5	2	718	2.79	4.21	195	10.26	0
	5	3	828	2.42	4.58	86	23.26	0
	5	4	242	8.26	0	96	20.83	0
	10	1	215	9.30	0	184	10.87	0
	10	2	1880	1.06	5.94	184	10.87	0
	10	3	2574	0.78	6.22	215	9.30	0
	10	4	581	3.44	3.56	104	19.23	0