



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Tamanho não é documento: Uma análise morfométrica no  
gonopódio do peixe *Phalloceros harpagos***

WILLIAM DA PONTE MENESES

Brasília-DF

2022

WILLIAM DA PONTE MENESES

**Tamanho não é documento: Uma análise morfométrica no gonopódio do peixe *Phalloceros harpagos***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito de conclusão do curso de Mestrado em Ecologia, da disciplina de Elaboração de Dissertação do Mestrado.

**Área de estudo:** Comportamento Animal

**Orientador:** Dr. Prof. Eduardo Bessa Pereira da Silva

**Banca examinadora:**

Dr. Prof. Murilo Sversut Dias

Universidade de Brasília

Dr<sup>a</sup>. Prof<sup>a</sup>. Andrea Tonolli Thomaz

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario em Bogotá na Colombia

Dr. Pedro Diniz Alves

Universidade de Brasília

Brasília-DF

2022

Dedico essa dissertação à minha família e aos meus amigos que sempre estiveram comigo me apoiando, me incentivando em toda a minha vida, logo essas pessoas fazem parte desta obra.

*“Science and everyday life cannot and should not be separated.”*

**Rosalind Franklin**

## **AGRADECIMENTOS**

São tantas pessoas que fizeram parte da minha vida e que me transformaram, que faltará espaço e palavras para descrever a minha gratidão pelos ensinamentos, oportunidades, e momentos inesquecíveis que vivi durante o meu mestrado.

Primeiramente quero agradecer a Deus por estar bem, com saúde e por ter tantas pessoas que me amam em minha volta. Durante esses dois anos que completei o meu mestrado, passamos por uma pandemia de COVID-2019 que assolou a vida de muitas pessoas no mundo inteiro. Infelizmente perdemos muitas pessoas que amamos ou todo esse difícil momento nos deixou marcas que ficarão conosco durante toda vida. Agradeço todas as pessoas, profissionais de saúde e cientistas que desenvolveram tratamentos, vacinas e ajudaram as pessoas a tratarem deste vírus e deram suporte a saúde mental das pessoas, que foi intensamente afetada nesse período de isolamento. Agradeço aos psicólogos que estiveram comigo fazendo parte do meu cuidado com a minha saúde mental.

Quero agradecer a minha família que me ama, me dá forças e sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis de minha vida. Agradeço a minha mãe Liduina Ferreira da Ponte Meneses e ao meu pai Francisco Evando Ximenes Meneses, que estiveram comigo todos os dias de minha vida me dando amor, segurança, me incentivando a estudar e me ensinando valores de honestidade e solidariedade. Quero agradecer as minhas irmãs Nyanne da Ponte Meneses e Nayara da Ponte Meneses Calixto por estarem ao meu lado, me dando apoio, me dando conselhos e por todo amor que têm por mim. Quero agradecer ao meu amigo Phelippe Calixto, marido de Nayara da Ponte Meneses Calixto, por me incentivar a estudar, me apoiar, pelas conversas e conselhos sobre a vida. Quero agradecer a minha sobrinha Laura Meneses de Brito e

sobrinho Henrique Calixto por serem crianças tão adoráveis, questionadoras e pelas brincadeiras que fazemos juntos.

Quero agradecer a toda equipe de saúde do Hospital Sarah Kubitschek e Hospital Universitário de Brasília que me ajudaram no tratamento da minha patologia de Osteogênese Imperfeita e por ter melhorado a minha qualidade de vida. Agradeço especialmente ao ortopedista do Hospital Sarah, Dr. Claudio Alberto Dorna Sartori, e ao endocrinologista do Hospital Universitário de Brasília, Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro por terem feito parte do meu tratamento desde quando era criança.

Sou muito feliz por ter muitos amigos e sou muito grato por todo amor que sinto por eles. Fico agradecido por cada pessoa que se tornou a minha amiga ou meu amigo durante esses anos, que me ensinou, conversou, se divertiu e estudou junto comigo. Agradeço aos meus amigos: Bruno César Alves da Costa, Felipe Lazio, Diego Roberto Bezerra, Maurício Vieira dos Santos, Paulo Henrique da Silva Pau Ferro, Daniele Rodrigues, Anne Takagi e tantos outros que eu poderia até escrever um livro cheio de amigos e repleto de boas memórias. Quero agradecer a minha amiga Paula Roriz, cuja amizade formamos no mestrado, mesmo nesses tempos difíceis de pandemia, no qual nos ajudamos, compartilhamos alegrias e momentos de angústia, ouvimos um ao outro, demos forças e conselhos para continuarmos estudando para terminar o mestrado sem desistir.

Agradeço aos professores do Programa da Pós-graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, que fizeram parte do meu mestrado e que estarão em minhas memórias todas as vezes que irei lecionar ou realizar uma pesquisa científica. O meu agradecimento em especial irá para o professor, amigo, e meu orientador, doutor Eduardo Bessa Pereira da Silva por me orientar, por me dar forças, principalmente nesse período de pandemia e isolamento social, no qual em muitos momentos eu não estava

me sentindo bem, por me ensinar e por ter me apresentado a uma área científica tão interessante, curiosa e até muitas vezes divertida: o Comportamento Animal. Agradeço aos colegas e discentes do Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade de Brasília que compartilharam todas suas histórias, deram apoio, compartilharam pesquisas, materias para estudo e conselhos para continuarmos a desenvolver ciência.

Agradeço as doutoras e professoras Julia Klaczko e Veronica Slobodian que foram excepcionais me apresentando o laboratório de anatomia comparada de vertebrados, de maneira que já me sentia bem-vindo e totalmente integrante àquele grupo fabuloso de pesquisadores. Elas me forneceram referencial teórico, me ensinaram sobre alometria, morfometria geométrica, fisiologia de vertebrados e principalmente o meu terror, a estatística. Sou grato pelo meu amigo Welington Coelho e pela Isabela Farias que compartilharam de seus conhecimentos de biologia, morfometria geométrica e fotografia.

Por fim quero agradecer a Universidade de Brasília e a todos os profissionais e pessoas que nela estão inseridas, trabalhando ou estudando, porque a UnB me tornou diferente, me tornou uma pessoa crítica e ativa capaz de fazer a diferença na sociedade. Quero agradecer a CAPES pela bolsa de estudos e todo investimento que recebi durante a minha pós-graduação que me permitiu estudar e desenvolver a minha pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
Fecundação interna, custos e benefícios .....	11
Órgãos penetradores e sua ocorrência entre os vertebrados .....	12
A família Poeciliidae e a espécie <i>Phalloceros harpagos</i> .....	15
Pressões seletivas que influenciam a anatomia do gonopódio e outros órgãos intromitentes .....	17
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>22</b>
Objetivos específicos .....	22
<b>Static allometry in the gonopodium of <i>Phalloceros harpagos</i> (Poeciliidae) and its geographic variation</b> .....	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>24</b>
<b>METHODS</b> .....	<b>29</b>
Model and study area .....	29
Data collection.....	30
Allometry analyses .....	32
<b>RESULTS</b> .....	<b>33</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>36</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>42</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>58</b>
Anexo I.....	58



## RESUMO

A evolução dos órgãos copulatórios ocorre de forma excepcionalmente rápida em vários grupos de animais que foram estudados. Enquanto a maioria dos peixes tem fertilização externa, os poeciliídeos desenvolveram órgãos copuladores chamados gonopódios a partir da nadadeira anal modificada. Tal órgão é excepcionalmente ornamentado em uma espécie amplamente distribuída que pertence a um gênero especioso, *Phalloceros harpagos*. Nosso estudo investigou os padrões alométricos no gonopódio em populações de *P. harpagos* pertencentes as bacias do alto Rio do Paraná e alto Rio do Tocantins. Foram feitas medidas morfométricas lineares do comprimento padrão e comprimento do gonopódio de machos adultos de *P. harpagos*. O coeficiente alométrico do gonopódio foi medido e os coeficientes separados foram comparados entre espécimes de diferentes bacias. O gonopódio de *P. harpagos* apresenta crescimento isométrico, sugerindo maior influência da seleção natural por hidrodinamismo ou seleção intrasexual para o tamanho corporal. O coeficiente alométrico do gonopódio não foi significativamente diferente entre as bacias. Fatores biogeográficos como a ligação entre as bacias do Tocantins e do Paraná em regiões de águas emendadas e a ausência de barreiras entre os trechos a montante e a jusante da Bacia do Paraná podem ter resultado nos gonopódios com coeficientes alométricos semelhantes, indicando que o isolamento reprodutivo pode não ocorrer, em menos ou completamente, em relação a esse recurso.

**Palavras-chave:** Órgão copulador; Cyprinodontiformes; Comportamento de acasalamento; Morfometria; Isolamento reprodutivo; Seleção sexual.

## ABSTRACT

The evolution of copulatory organs occurs exceptionally rapidly in several groups in which they have been studied. While most fish have external fertilization, poeciliids developed copulatory organs called gonopodia from modified anal fins. Such organ is exceptionally ornamented in a species widely distributed that belongs to a specious genus, *Phalloceros harpagos*. Our study investigated the allometric patterns of the gonopodium in populations of *P. harpagos* from upper Rio Paraná and upper Rio Tocantins basins. Linear measurements of gonopodium length and standard length were taken from adult males of *P. harpagos*. The allometric coefficient of the gonopodium was measured, and separated coefficients were compared between specimens from different basins. The gonopodium of *P. harpagos* has isometric growth, what could suggest greater influence of natural selection by hydrodynamic or intrasexual selection for body size. The allometric coefficient of the gonopodium was not found to be significantly different between the basins. Biogeographic factors such as the connection between the Tocantins and Paraná basins in amended water regions and the absence of barriers between the upstream and downstream stretches of the Paraná Basin might have resulted in gonopodia with similar allometric coefficients, indicating that reproductive isolation might not occur, at least or completely, in relation to this feature.

**Keywords:** Copulatory organ; Cyprinodontiformes; Mating behaviour; Morphometry; Reproductive isolation; Sexual selection.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **Fecundação interna, custos e benefícios**

Os animais que realizam fecundação interna possuem algumas vantagens na natureza. Uma vantagem da fecundação interna é a sobrevivência dos embriões formados nos cruzamentos entre gametas, porque no encontro dos gametas masculinos e femininos no interior do sistema reprodutivo da fêmea, o embrião estará mais protegido e será desenvolvido pelo organismo da fêmea (Thornhill, 1983; Eberhard, 1996). Outra vantagem para a fecundação interna é a economia de energia na produção de gametas (Eberhard, 1996). Na fecundação externa é necessário a presença do ambiente aquático, para ser o meio carreador dos espermatozoides até os óvulos, e para a fecundação interna isso não é necessário, porque o percurso que o gameta masculino fará até o encontro do óvulo é menor (Arnqvist, Rowe, 2005), sendo mais uma vantagem para os animais que realizam a fecundação interna. As fêmeas também usufruem de uma vantagem da fecundação interna por poderem armazenar os espermatozoides (Orr, Zuk, 2012) e realizar uma seleção críptica de parceiro (Pitcher, Rodd, Rowe, 2008). Esse tipo de seleção refere-se aos processos mediados por fêmeas que ocorrem durante ou após a cópula, que resultam no uso enviesado de espermatozoides em favor de machos preferidos ou mais compatíveis (Thornhill, 1983; Eberhard, 1996).

No entanto uma desvantagem para a fecundação interna é a necessidade do comportamento de cópula entre animais. Com essa obrigatoriedade os animais desenvolvem estratégias de competição para conseguirem cópulas. Na natureza acontece uma batalha entre machos e fêmeas com o propósito de terem domínio na fecundação interna, mais sucesso reprodutivo (Eberhard, 2009), porque a fêmea precisa ser mais criteriosa na seleção de parceiro do que o macho em decorrência do alto gasto energético para cuidado parental, e o macho tem que copular com mais fêmeas para ter

maior sucesso (Bateman, 1948), esse fundamento da seleção sexual moderna recebeu o nome de princípio de Bateman. Apesar de vir sofrendo intensas críticas recentemente (Collet *et al.*, 2014; Tang-Martinez, 2016) em princípio ele continua aceito para diversos grupos, como os peixes (Rios-Cadenas, 2005).

### **Órgãos penetradores e sua ocorrência entre os vertebrados**

Nem toda fecundação interna depende de cópula, 97% das aves, por exemplo, copulam por meio de um “beijo cloacal”, no qual as cloacas dos parceiros são justapostas e o sêmen passa do macho para a fêmea (Vizcarra *et al.*, 2022). No entanto, muitas espécies que realizam fecundação interna realizam penetração (Holub, Shackelford, 2021). A morfologia da genitália masculina dos animais que realizam fecundação interna varia consideravelmente no formato, cor e comprimento em decorrência das pressões evolutivas sofridas pelas diferentes espécies (De-Lima *et al.*, 2019). Existem hipóteses para explicar a variabilidade de formas das genitálias dos animais que realizam fecundação interna, e uma dessas hipóteses supõe que o órgão selecionado, a genitália, é usada como um atributo de competição em conflitos entre machos e fêmeas para controlar a cópula, o sucesso reprodutivo e os custos reprodutivos das fêmeas (Arnqvist, Rowe, 2005). Existe outra hipótese na qual a genitália é usada como um dispositivo de seleção sexual, um dispositivo para permitir que as fêmeas escolham seus parceiros na hora da cópula (Eberhard, 1996).

O báculo é a genitália masculina presente na maioria dos mamíferos e varia em seu comprimento e formato em cada espécie (Ramm, 2007). O báculo tem a função de ser o mecanismo de cópula entre machos com as fêmeas dos mamíferos. É chamado de báculo porque a etimologia da palavra vem do latim das palavras “bastão” ou “bengala” pela semelhança a esses formatos (Dixson, 1987; Verrell, 1992). Para muitas espécies de mamíferos, o báculo é uma estrutura óssea acima da uretra e é incapaz de retrair

(Ramm, 2007). Nos primatas o báculo tende ser maior e sua morfologia tende ser mais complexa porque as fêmeas acasalam com vários machos, logo os machos realizam competição espermática para inviabilizar os critérios de seleção das fêmeas e impedirem que as fêmeas se acasalem com vários parceiros (Dixon, 1987; Verrell, 1992).

A maioria das aves perde o pênis durante o desenvolvimento embrionário pela ação de um gene chamado *Bmp4*, no entanto, alguns grupos deixaram de expressar esse gene e manifestam o órgão (Herrera *et al.*, 2013). Nas aves, apesar de assumir formas bastante diversas e surpreendentes, os órgãos penetradores são, em geral, uma reversão da cloaca capaz de penetrar a fêmea profundamente ou de depositar o esperma na entrada do trato reprodutivo (Briskie, Montgomerie, 1997).

As espécies de lagartos e cobras da ordem Squamata possuem um par de órgãos copulatórios chamado de hemipênis (De-Lima *et al.*, 2019). O hemipênis é o órgão bilobado reprodutor masculino, que fica escondido na cauda e emerge do corpo pela cloaca, e durante o acasalamento ele é inserido na cloaca da fêmea (Mahfud, Winarto, Nisa, 2017). A relação de alometria da espécie *Tropidurus torquatus*, Wied-Neuwied, 1820, estudada por De-lima *et al.* (2019) nos demonstra a intensa variabilidade na estrutura do hemipênis deste lagarto. *Tropidurus torquatus* é uma espécie de lagarto que habita zonas tropicais da América do Sul (Rodrigues, 1987) e a relação de competição entre o sucesso de fertilização entre machos e fêmeas de lagartos é vista pela morfologia da genitália desta espécie que se modificou ao decorrer das pressões de evolução sofridas (De-Lima *et al.*, 2019). Em crocodilianos, o chamado sulco fálico deriva do epitélio da cloaca e da uretra, que se tornam reversíveis (Ziegler, Olbort, 2007). Como o nome sugere, esse órgão é mais um sulco, uma espécie de calha por onde escorre o sêmen, do que um tubo (Gredler, Seifert, Cohn, 2015). Já nos Testudines, o órgão penetrador difere intensamente tanto de Squamata quanto de Crocodylia, mas apresenta

certa convergência em relação aos mamíferos, sendo um órgão único, e não pareado como o dos Squamata; e tubular, em vez de sulcado como em Crocodylia, e erétil graças a um hidroesqueleto e fibras de colágeno (Kelly, 2004).

Dentre os anfíbios, a ocorrência de órgãos intromitentes ocorre em Gymnophiona, anfíbios fossoriais ápodes conhecidos como cecílias. Estes órgãos são também eversões da cloaca cobertas com glândulas lubrificantes (Gomes *et al.*, 2012). Contudo, existe na natureza um caso raro de fecundação interna com uma espécie de rã. A rã da espécie *Limnonecteson larvaepartus*, Iskandar, Evans & McGuire, 2014, recém-descoberta na ilha de Swlaesi, na Indonésia, apresenta fecundação interna e se diferencia das demais espécies aparentadas de anuros (Iskandar, Evans, McGuire, 2014). Nessa espécie a formação de girinos acontece nos ovidutos das fêmeas para depois serem transferidos para água para se desenvolverem. É provável que essa espécie seja ovovípara porque os girinos saem da mãe providos de vitelo e aparentemente capazes de se desenvolverem sem transferência de nutrientes da mãe, no entanto é desconhecido os mecanismos de fecundação interna (Iskandar, Evans, McGuire, 2014).

Poucas espécies de peixes têm órgãos copulatórios ou realizam fecundação interna (Vazzoler, 1996). Chondrichthyes são um grupo de peixes caracterizado pela presença de um clásser copulador, uma modificação das nadadeiras pélvicas capaz de penetrar a abertura genital da fêmea (O'Shaughnessy, Dahn, Cohn, 2015). Os peixes da família Poeciliidae são outra exceção, pois possuem um órgão intromitente, uma estrutura derivada da nadadeira anal denominado gonopódio (Lucinda, 2008). O gonopódio tem importância para garantir o sucesso reprodutivo dos machos e a perpetuação dos genes para as próximas gerações (Devigili *et al.*, 2018). Para os poeciliídeos, a fecundação interna tem benefícios como a possibilidade de variação genética da prole e um maior número de descendentes (Pitcher, Rodd, Rowe, 2008).

## **A família Poeciliidae e a espécie *Phalloceros harpagos***

As espécies de peixes da família Poeciliidae são encontradas em zonas neotropicais, distribuindo-se do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, mas também ocorrem na África (Nelson, 1994). Caracterizam-se por nadadeiras peitorais inseridas na metade superior do corpo, nadadeiras pélvicas mais próximas à cabeça, têm corpos comprimidos, pequenos, medindo de 1,4 a 20 cm de comprimento total, habitam principalmente riachos, mas também podem ocorrer em estuários e lagos (Lucinda, 2003). Há 275 espécies descritas em 27 gêneros (Fricke, Eschmeyer, Van Der Laan, 2018). São muito valorizados no aquarismo (Lucinda, 2003), mas já foram indicados como importantes no estudo da regeneração ambiental também (De-Almeida-Monaco, Suárez, Lima-Junior, 2014; Safian, Wiegertjes, Pollux, 2021).

Dentre os Poeciliidae, a subfamília Poeciliinae se distingue por possuir um gonopódio, um órgão penetrador derivado da nadadeira anal (Lucinda, 2003). Esse órgão é extremamente diversificado morfológicamente, ele é constituído por uma calha aberta que permanece constantemente rígida e guia o sêmen do macho até o gonoporo da fêmea, sua ponta é frequentemente ornamentada (Lira *et al.*, 2021).

As fêmeas de *Xiphophorus pigmeus*, Hubbs & Gordon, 1943, preferem machos maiores, que realizam cópulas por mais tempo e que possuem grandes gonopódios (Morris, Wagner Jr, Ryan, 1995). *Girardinus metallicus*, Poey, 1854, é uma espécie de peixe cubano da família dos poeciliídeos que tem dicromatismo sexual, existindo machos com a coloração preta e amarela. Foi observado que aconteciam mais cortejos com os machos pretos desta espécie, já os machos amarelados não cortejavam as fêmeas (Kolluru *et al.*, 2014). Os machos pretos eram mais escolhidos pelas fêmeas porque o caractere de ter cor preta era considerado um caráter de “status de dominância” para as fêmeas e junto a isso tinham gonopódios maiores, em contrapartida os machos amarelos

eram pouco escolhidos pelas fêmeas e por isso realizavam mais cópulas forçadas, na tentativa de burlar a seleção das fêmeas (Kolluru *et al.*, 2014). As fêmeas desta espécie escolhem machos maiores com gonopódios maiores e elas são bem agressivas com a aproximação de machos que não atendem aos seus critérios. Logo o caráter coloração preta era restrito a machos dominantes que conseguiam mais parceiras e assim tinham mais sucesso reprodutivo.

Outro fator que influencia diretamente a forma da genitália dos animais que realizam fecundação interna são os aspectos ambientais. Os animais precisam contabilizar os custos e ganhos em desenvolver um caráter de seleção sexual. Por exemplo, peixes que desenvolvem maiores comprimentos de gonopódio ficam vulneráveis aos seus predadores e tem dificuldades em nadar quando estão em riachos com correntezas mais fortes (Heinem-Kay *et al.*, 2014). É provável que a quantidade de pH na água, disponibilidade de alimentos, risco de predadores e temperatura podem influenciar na estrutura do gonopódio (Heinem-Kay *et al.*, 2014). Todavia a influência dos fatores ambientais sobre o gonopódio não é bem conhecida pela comunidade científica.

A disputa entre machos e fêmeas pelo sucesso reprodutivo favorece a competição espermática, na qual os indivíduos que tiverem genitálias maiores ou atributos que inibam a fecundação de machos competidores prevalecerá e terá maior sucesso reprodutivo (Arnqvist, 1998). Machos que tem gonopódios maiores podem realizar cópulas coercitivas mais vezes, e assim terem mais sucessos (Kolluru *et al.*, 2014). A presença de cerdas e espinhos na genitália masculina inibe que a fêmea realize mais cópulas e é uma forte arma contra a seleção críptica de parceiros (Kolluru *et al.*, 2014). No entanto, aqueles machos que têm o caráter preferido pelas fêmeas foram escolhidos por mais fêmeas e estas terão filhos com bons genes, seguindo a teoria dos bons genes e



dos filhos bonitos, logo para algumas espécies de peixes os gastos em ornamentação e cores vale a pena para conseguirem maior sucesso reprodutivo.

Em *Phalloceros harpagos*, Lucinda, 2008, o gonopódio, possui um chifre (gancho) na ponta do gonopódio, daí o nome do gênero (*Phallus* = falo; *Cerus* = chifres). No cerrado brasileiro, os peixes da família Poeciliidae se adaptaram muito bem aos habitats dos rios e lagos, e podem ser encontrados no Distrito Federal, nos parques ecológicos e/ou mananciais da região do centro-oeste brasileiro (Couto, Aquino, 2011). Para essa pesquisa o peixe barrigudinho, *Phalloceros harpagos*, foi escolhido porque é um poeciliídeo facilmente encontrado nos rios do Cerrado do Distrito Federal. Outra razão é que o gênero *Phalloceros* é o mais rico entre as espécies de Poeciliidae sul-americana e possui uma alta diversidade (Thomaz *et al.*, 2019). *Phalloceros harpagos* é um ótimo indicador ecológico e são peixes que se alimentam de ovos de insetos e pequenas plantas (De-Almeida-Monaco Suárez, Lima-Junior, 2014). Por conta do comportamento de poliandria, definido como o comportamento das fêmeas copularem com mais de um macho, junto com a presença de órgão intromitente, *Phalloceros harpagos* é uma espécie que produz muitos filhotes e a sua população é abundante sendo um ótimo objeto de estudo para analisarmos as variações morfológicas decorrentes de processos de evolução e isolamento reprodutivo.

### **Pressões seletivas que influenciam a anatomia do gonopódio e outros órgãos intromitentes**

Os órgãos intromitentes, como pênis, cláspes, falos, pedipalpos, falodeus e gonopódios, estão sob intensa pressão seletiva (Willingham, 2020). Além das pressões relacionadas à seleção natural, há fatores importantes da seleção sexual moldando esses órgãos, que evoluem mais rapidamente do que outras partes da anatomia e são fundamentais para diferenciar espécies muito similares em outros aspectos da

morfologia (Hosken *et al.*, 2019). Vamos abordar primeiro os fatores da seleção natural e, depois, aqueles possivelmente ligados à seleção sexual.

A disponibilidade de recursos também pode afetar o comprimento do gonopódio, já que esses recursos serão usados na constituição estrutural desse órgão. Dale-Broder e colaboradores (2020) demonstraram que em ambientes com carência nutricional, resulta no menor desenvolvimento do gonopódio de guppies. A presença de compostos nitrogenados na água, típica de ambientes eutrofizados, levou a um aumento no comprimento do gonopódio em *Gambusia holbrooki*, Girard, 1859 (Edwards, Guillette Jr, 2007), apesar de não ter sido observado o mesmo padrão em peixes dessa espécie expostos ao esgoto (Batty, Lim, 1999, Doyle *et al.*, 2003). Além disso, a disponibilidade de íons de cálcio, influenciada pela dureza da água e pelo seu pH, afeta processos de ossificação (Nelson, 1982), necessários para a constituição do gonopódio (Ogino, Katoh, Yamada, 2004). Portanto, mais alimentos e águas não poluídas, com dureza e pH adequados podem favorecer o desenvolvimento do gonopódio.

A genitália de muitos animais aquáticos sofre pressão das forças de arrasto durante a natação. Boa parte da anatomia e funcionamento do pênis de cetáceos (Orbach, Brennan, 2017) e de crocodilianos (Gredler, Seifert, Cohn, 2015), por exemplo, foi explicada em relação à redução do arrasto. No entanto, apesar de estar constantemente sujeito ao arrasto e de não reduzir em tamanho, o gonopódio de Poeciliidae parece não influenciar a velocidade de natação ou o arrasto (Kwan *et al.*, 2016; Booksmythe *et al.*, 2016), apesar disso já ter sido sugerido (Langerhans, Layman, DeWitt, 2005).

Outro fator que pode influenciar diretamente a forma da genitália dos animais que realizam fecundação interna é a taxa de predação. Por exemplo, peixes que desenvolvem maiores comprimentos de gonopódio ficam vulneráveis aos seus

predadores e tem dificuldades em nadar quando estão em riachos com correntezas mais fortes (Heinem-Kay *et al.*, 2014). Há evidências conflitantes sobre o comprimento do gonopódio e a taxa de predação em Poeciliidae, com artigos sugerindo que a predação não altera o comprimento do gonopódio em adultos (Lira *et al.*, 2021) outros sugerindo que a alta predação estimula a ocorrência de gonopódios maiores (Kelly, Godin, Abdallah, 2000) e estudos reportando o contrário, que a predação reduz o comprimento do gonopódio (Lagerhans, Layman, deWitt, 2005). Ainda são necessários mais estudos para demonstrar como a predação afeta o comprimento de órgãos penetradores, especialmente em espécies nas quais este órgão não muda de comprimento quando fora de uso. A influência dos fatores ambientais sobre o gonopódio não é bem conhecida pela comunidade científica.

Com relação a pressões relacionadas à seleção sexual, a disputa entre machos e fêmeas pelo sucesso reprodutivo favorece a competição espermática na qual os indivíduos que tiverem atributos que inibam a fecundação de machos competidores prevalecerão e terão maiores sucessos reprodutivos (Arnqvist, 1998), uma das formas de atingir esse sucesso competitivo contra outros machos é através de genitálias mais longas, que entreguem o sêmen mais próximo ao óvulo (Hosken *et al.*, 2019; Parker, 1984). Machos que tem gonopódios maiores podem realizar cópulas coercitivas mais vezes, e assim terem mais sucessos (Kolluru *et al.*, 2014; Taborsky, 1994). A presença de cerdas e espinhos na genitália masculina inibe que a fêmea realize mais cópulas e é uma forte arma na competição espermática, retirando sêmen de machos competidores de dentro do trato da fêmea contra a seleção críptica de parceiros (Kolluru *et al.*, 2014).

Alternativamente, aqueles machos que têm um caráter escolhido pelas fêmeas serão escolhidos por mais fêmeas e estas gerarão mais filhos para aquele macho. Logo para algumas espécies de peixes os gastos em ornamentação e cores vale a pena para

conseguirem maior sucesso reprodutivo. Há evidências que também indicam que as fêmeas selecionam machos com gonopódios maiores (Brooks, Caithness, 1995; Kahn, Mautz, Jennions, 2010; Lagerhans, Layman, deWitt, 2005), embora outros estudos contrariem essa afirmação (Gasparini, Pilastro, Evans, 2011). Assim, gonopódios maiores podem ser alvo de preferência pelas fêmeas, especialmente quando este órgão não é retrátil e permanece exposto à análise da fêmea constantemente.

A distribuição dos peixes pode gerar processos de especiação. O isolamento reprodutivo é um dos fatores que influencia na diversidade da morfologia do gonopódio dos peixes (Eberhard, 1996; Thomaz *et al.*, 2019). Os poeciliídeos se destacam por terem uma maior riqueza em número de espécies, de peixes de água doce que habitam zonas tropicais mais, e são conhecidos pela sua alta variabilidade genética, ecológica e de seleção sexual no processo de especiação (Thomaz *et al.*, 2019). A população de *Phalloceros*, por exemplo, se distribui nas bacias do Paraná, drenagens costeiras do sudeste brasileiro e afluentes das bacias do Paranaguá e Babitonga (Thomaz *et al.*, 2019), logo essa variação geográfica pode ocasionar diferentes fatores geográficos e ambientais que podem pressionar evolutivamente a estrutura do gonopódio (Jennions, Kelly, 2002 ; Kelly, Godin, Abdallah, 2000), além da mera deriva genética poder gerar estruturas diferentes em órgãos intromitentes, por exemplo em drosófila (Stefanini *et al.*, 2021). O isolamento reprodutivo por simpatria, por exemplo, limita a passagem de genes de uma população para outra de forma, que as espécies que antes faziam parte de uma, ficam impossibilitadas de cruzarem entre si, frequentemente devido à estrutura incompatível da genitália (Hrbek, Seckinger, Meyer, 2007). A especiação acontece nesses casos porque novas espécies podem ser formadas depois de estarem isoladas reprodutivamente, e pela teoria de chave e fechadura, aqueles indivíduos não podem mais cruzar porque as genitálias são incompatíveis (Hrbek, Seckinger, Meyer, 2007).

De fato, a anatomia do gonopódio do Poeciliidae, em *Phalloceros harpagos*, varia geograficamente sobremaneira (Thomaz *et al.*, 2019). Pressões seletivas para evitar a hibridização podem favorecer a evolução da anatomia de órgãos como os gonopódios.

Com os avanços dos estudos de seleção sexual, alometria e comportamento animal, muitos autores debruçaram-se sobre a compreensão da genitália masculina dos peixes (Birkhead, Møller, 1998; Devigili *et al.*, 2017; Thornhill, 1983). Essas pesquisas sobre genitália masculina são importantes para compreendermos as estratégias que estes animais adotam para conseguir o sucesso reprodutivo. Entretanto, ainda há poucos estudos sobre gonopódio para *Phalloceros harpagos*. Até o momento, estudos sobre alometria dos órgãos penetradores focaram majoritariamente nas aranhas e insetos, revelando a alometria negativa nesses animais (Eberhard, 2009). Apesar de um estudo com o hemipênis de lagartos do gênero *Anolis* (Klaczko, Stuart, 2015), existem pouquíssimos estudos sobre alometria em vertebrados. Também pouco se sabe sobre como diferentes pressões evolutivas afetam o comprimento do gonopódio, já que é claro que múltiplos fatores interagem de maneira complexa para resultar nessa característica (Lira *et al.*, 2021).

## **OBJETIVO**

Avaliar como a seleção sexual, seleção natural e o isolamento reprodutivo atuam sobre o órgão copulador (gonopódio) de machos da espécie *Phalloceros harpagos*.

### **Objetivos específicos**

- Avaliar a dinâmica de desenvolvimento do gonopódio ao longo dos comprimentos dos machos dessa espécie (crescimento isométrico, alométrico negativo ou alométrico positivo).
- Avaliar se existem variações nos padrões alométricos do comprimento do gonopódio em riachos vizinhos de diferentes bacias, entre trechos mais a montante da Bacia do Paraná e trechos a jusante da Bacia do Paraná para analisar possíveis ocorrências de isolamento reprodutivo.
- Identificar o comprimento de primeira maturação de *P. harpagos*.

**Static allometry in the gonopodium of *Phalloceros harpagos* (Poeciliidae) and its geographic variation**

**Meneses. W.**<sup>1</sup>, Slobodian. V.<sup>2,4</sup>, Klaczko. J.<sup>2,3</sup>, e Bessa. E.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil, [williammeneses11@gmail.com](mailto:williammeneses11@gmail.com).

<sup>2</sup> Laboratório de Anatomia Comparada de Vertebrados, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

<sup>3</sup> Department of Life Sciences, The Natural History Museum, London SW7 5BD, UK.

<sup>4</sup> Laboratório de Ictiologia Sistemática, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade UnB de Planaltina, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

**ABSTRACT**

The evolution of copulatory organs occurs exceptionally rapidly in several groups in which they have been studied. While most fish have external fertilization, poeciliids developed copulatory organs called gonopodia from modified anal fins. Such organ is exceptionally ornamented in a species widely distributed that belongs to a specious genus, *Phalloceros harpagos*. Our study investigated the allometric patterns of the gonopodium in populations of *P. harpagos* from upper Rio Paraná and upper Rio Tocantins basins. Linear measurements of gonopodium length and standard length were taken from adult males of *P. harpagos*. The allometric coefficient of the gonopodium was measured, and separated coefficients were compared between specimens from different basins. The gonopodium of *P. harpagos* has isometric growth, what could suggest greater influence of natural selection by hydrodynamic or intrasexual selection for body size. The allometric coefficient of the gonopodium was not found to be significantly different between the basins. Biogeographic factors such as the connection

between the Tocantins and Paraná basins in amended water regions and the absence of barriers between the upstream and downstream stretches of the Paraná Basin might have resulted in gonopodia with similar allometric coefficients, indicating that reproductive isolation might not occur, at least or completely, in relation to this feature.

**Keywords:** Copulatory organ; Cyprinodontiformes; Mating behaviour; Morphometry; Reproductive isolation; Sexual selection.

## **INTRODUCTION**

The fertilization of the female egg by male sperm can occur in two main forms, externally in the environment, or internally with male gametes deposited inside the female reproductive tract (Giese, Kanatani, 1987). Internal fertilization is often seen as an evolutionary novelty (Buckland-Nicks, Scheltema, 1995), although it may not be always as recent as we think (Rouse, Fitzhugh, 1994). It is advantageous in comparison to external fertilization, given that it preserves the fragile gametes and embryos from environmental factors such as pH and predation (Levitan, Petersen, 1995; Thornhill, 1983; Eberhard, 1996) and reduces the need for large quantities of gametes (Lehtonen, Parker, 2019). It also allows the female to select her partners more effectively, by choosing the male with whom she will copulate, and controlling the sperm from different partners within her body (Arnqvist, 1998). It also allows the female the possibility of storing sperm and embryos (Orr, Zuk, 2012). On the other hand, internal fertilization demands greater proximity between males and females, increases male intrasexual competition, elicits coercive copulations and enables the transmission of sexually transmitted diseases (Lehtonen, Jennions, Kokko, 2012). Internal fertilization has costs and benefits, but the fact that it is present in numerous groups suggests its advantageousness for several animals.



One way for males to perform internal fertilization is through copulatory organs (Willingham, 2020). Such organs may have first appeared in bilateria in the Platyhelminthes (Buckland-Nicks, Scheltema, 1995), and occur in polychaeta annelids, Nematodes (Willingham, 2020), arthropods (Dederichs *et al.*, 2019; Nielsen, 1957) and in vertebrates (Costa, Amorim, Mattos, 2016). In vertebrates the first known copulatory organ was associated with placoderms (Long *et al.*, 2015), and its currently found in all major vertebrate groups, such as birds (Briskie, Montgomerie, 1997), Crocodylians (Gredler, Seifert, Cohn, 2015), turtles (Kelly, 2004), snakes and lizards (De-Lima *et al.*, 2019), Gymnophiona amphibians (Gomes *et al.*, 2012), in some bone-fish groups (Costa, Amorim, Mattos, 2016; Langerhans, 2011) and Chondrichthyes (O'Shaughnessy, Dahn, Cohn, 2015). Poeciliinae is a subfamily of fish often endowed with a modified anal fin in males that serves as a copulatory organ called gonopodium (Lucinda, 2003). Thus, understanding the evolution and advantages of a copulatory organs in a taxonomic group of fish, in which external fertilization predominates, will allow us to assess those selective pressures that favor the presence and shape of the gonopodium.

Copulatory organs, such as the penis, clasper, phallus, pedipalps, and gonopodia, are under intense pressure from both natural and sexual selection (Willingham, 2020), resulting in a faster evolution rate (Hosken, Stockley, 2004). The shape of the intromitting organs is usually related to pressures linked to sexual selection. Sperm competition is attributed to the development of longer genitalia, which delivers the semen closer to the egg (Hosken *et al.*, 2019). Longer copulatory organs in relation to body size also allow for sneaking copulations in poeciliids (Kolluru *et al.*, 2014). Pressures against the hybridization of closely related species can lead to the evolution of a species-specific lock-and-key fitting system (Hrbek, Seckinger, Meyer, 2007), as well

as to the evolutionary divergence of the genitalia (Eberhard, 1996; Thomaz *et al.*, 2019). In dragonflies, the ornamentation of the aedeagus, the insect male genital, can injure the female genitalia, avoiding future copulations and intensifying sexual conflict (Arnqvist *et al.*, 2021). There is also evidence indicating that females select males with larger genitalia in some spiders (Brooks, Caithness, 1995; Kahn, Mautz, Jennions, 2010; Lagerhans, Layman, deWitt, 2005). Besides sexual selection, environmental characteristics and natural selection factors might affect copulatory organs. Other natural selection forces relate to the availability of food, in which males unable to eat enough have smaller organs (Dale-Broder *et al.*, 2020), chemical conditions of the environment such as pollution (Batty, Lim, 1999; Doyle *et al.*, 2003), the water flow and swimming speed (Heinem-Kay *et al.*, 2014) and predation pressure that selects for males with smaller gonopodia (Lagerhans, Layman, deWitt, 2005). Thus, the anatomy of the copulatory organs has an intense effect of natural and sexual factors, being the result of the interaction among several processes.

Poeciliinae fish have a copulatory organ derived from the anal fin called gonopodium (Lucinda, 2003). Species in this subfamily are well-studied models for understanding reproductive behavior and genital evolution (Lagerhans, 2011) because the gonopodium is extremely morphologically diverse, varying in length and ornamentation at its tip (Lira *et al.*, 2021). Among the Poeciliinae, the genus *Phalloceros* is diverse, with 22 valid species (Fricke *et al.*, 2022), and each species varies its gonopodium in size, ornamentation and structure (Thomaz *et al.*, 2019).

The species *Phalloceros harpagos*, popularly known as guaru, is well distributed in the Paraná basin, São Francisco basin and coastal areas of the South and Southeast regions of Brazil, occupying mostly headwater streams and small rivers in the Midwest, Southeast and South regions of Brazil (Lucinda, 2008). They are omnivorous, feeding

on fragments of plants, algae, detritus and aquatic insects. This species has been used as an environmental indicator for stream integrity (De-Almeida-Monaco, Suárez, Lima-Junior, 2014). In relation to reproduction mode, they are viviparous fishes, with a prolonged reproductive period, producing a large offspring, *Phalloceros* is diagnosed by a horn-like hook at the tip of the male gonopodium, as its etymology makes clear (*Phallus* = Phallus; *Kerus* = horns). Therefore, *P. harpagos*, is of special interest for the study of the evolution and geographical variations of the gonopodium because it performs internal fertilization, it is a recently discovered species, little is known on this species, in which it produces many young, we can soon observe the phenomenon of morphological variation of the male genitalia throughout the different generations of fish and in different hydrographic basins.

Since *Phalloceros harpagos* has a gonopodium that can undergo significant pressures of sexual selection, one way to analyze morphological changes is through static allometry, which compares trait size and body size in individuals at the same developmental stage (Egset *et al.*, 2012). The study of static allometry allows us to evaluate the intraspecific evolutionary forces that drive the development of a specific body part (Pélabon *et al.*, 2013). Nevertheless, static allometry has limitations once it evaluates solely one life stage, instead of performing a macroevolutionary or ontogenetic analyses of the focal trait (Egset *et al.*, 2012).

In animals with sexual dimorphism, positive allometry in a reproductive trait may indicate a preference for that trait by the opposite sex (intersexual selection), or weapon effectiveness in intrasexual combats (Thornhill, 1983). The allometric relationship is postulated by an exponential function  $y = \alpha \cdot x^\beta$ , in which  $y$  and  $x$  are the values of the trait size and the body size, respectively,  $\alpha$  is the allometric constant, and  $\beta$  is the

allometric coefficient (Egset *et al.*, 2012). According to this same author, in a logarithmic scale the exponential relationship becomes linear  $\log(y) = \log(\alpha) + \beta \times \log(x)$ , now  $\log(\alpha)$  is the intercept and  $\log(\beta)$  is the slope. The slope, when equal to 1 ( $\beta = 1$ ) indicates that the analyzed trait, in our case, the male genitalia, grows proportional to the body size (Gould, 1966), or isometrically, which indicates the absence of a selective pressure for a differential investment in the trait's size. Alternatively, the slope can be different from 1. Negative allometry ( $\beta < 1$ ) suggests that the trait grows slower than the body, with small individuals having relatively larger genitalia, while large individuals carry relatively small genitals. Finally, positive allometry ( $\beta > 1$ ) occurs when the genitalia grows in acceleration, with larger individuals having disproportional large genitalia in relation to its body (Eberhard *et al.*, 1998).

In a recent study, Rodríguez and Eberhard (2019) indicated that traits purely under intersexual selection, especially those used in body-size advertisement, tend to have highly positive allometry, while those used in direct combat tend to be in a less steep positive allometry slope; traits purely used in courtship tend to be closer to isometry; and traits purely applied in contacting the female body in a non-forceful way tend to have negative allometry. In our study we evaluated the allometric patterns of the gonopodium in adult males of *P. harpagos* under those expectations. To support that we first estimated the length of first maturation of those males, we also evaluated the existence of two maturation waves, with a group of males maturing earlier and another later. Thus, we aimed to test three hypotheses: a) there is an isometric correlation between the gonopodium and the body, indicative of intersexual selection for proportionality by the female, natural selection or pleiotropy with some other characteristic that limits differential growth b) there is a positive allometric correlation, with larger males having disproportionately larger gonopodia, indicating a positive

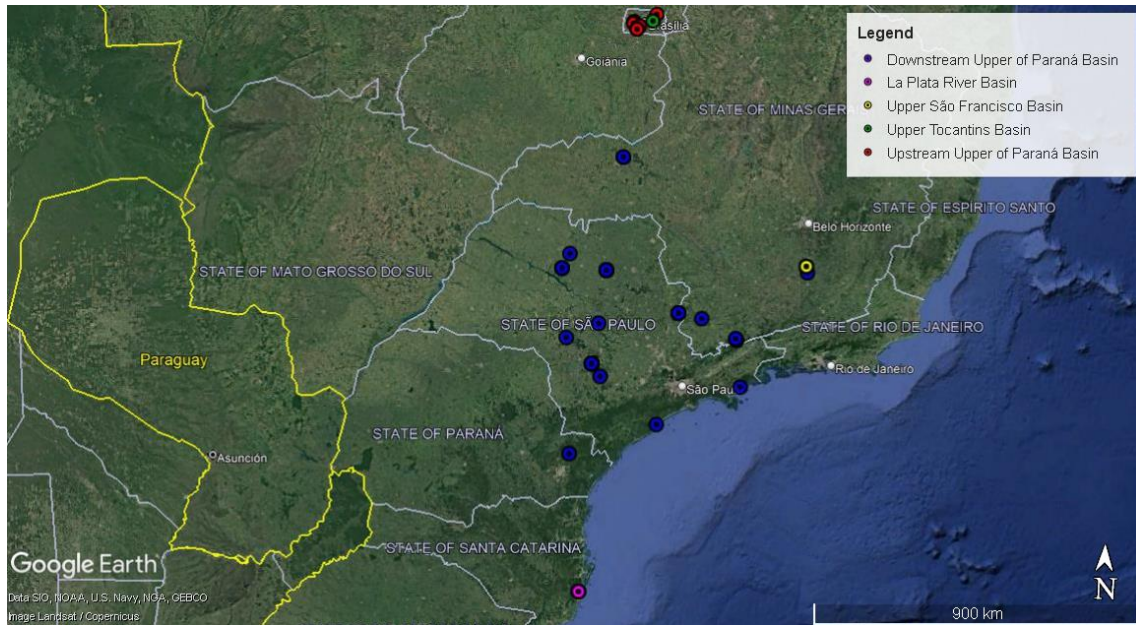
selection by larger gonopodia resulting from female preference or male intrasexual competition; c) there is a negative allometric correlation between body and gonopodium, indicating a stabilizing sexual selection for gonopodia of an average size to fit the female. In addition, we assessed if there was a variation in gonopodium allometric patterns between stretches further upstream of the Paraná Basin (Distrito Federal) and downstream stretches (São Paulo, Minas Gerais and Paraná) in order to analyze possible biogeographic divergences in gonopodium allometric patterns that could indicate reproductive isolation and divergent evolution of *P. harpagos* populations.

## **METHODS**

### **Model and study area**

We analyzed 241 mature males of *P. harpagos* belonging to the ichthyological collections of the following institutions: Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil; Laboratory of Ichthyology of UNESP-São José do Rio Preto (UNESP SJRPreto), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; and Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS (MCT), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. A complete list of specimens is provided in Supplemental Table S.1. These specimens originate from Upper Tocantins, Upper São Francisco, Downstream Upper of Paraná basin, Upstream Upper Paraná basin and La Plata River basins (Figure 1). The analyzed populations that were sampled belong to the states of Distrito Federal (Tocantins, São Francisco and Paraná basins), and the states of São Paulo (Paraná Basin), Minas Gerais (Paraná and São Francisco basins), Paraná (Paraná Basin) and Santa Catarina (La Plata Basin) (Figure 1). Males of *Phalloceros harpagos* collected in the Distrito Federal represent border areas between the upper Paraná, upper São Francisco and upper Tocantins basins, including amended

water regions (Aquino *et al.*, 2009, Carvalho, 2008; Lima, Caires, 2011; Lima, Silva, 2008). The specimens collected in Minas Gerais, São Paulo and Paraná belong to the Paraná and São Francisco basins.



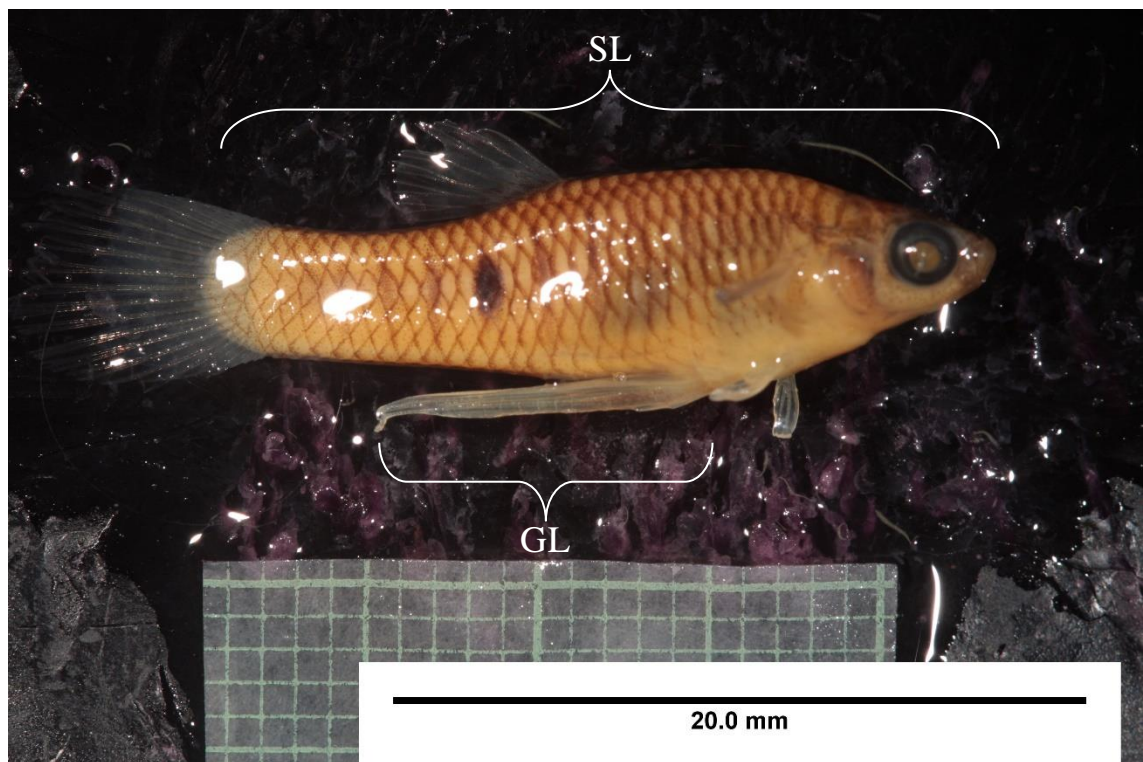
**Figure 1.** Map with the distribution of *Phalloceros harpagos* sampled in our study and the ichthyological collections they belong to.

### Data collection

We used a Canon® EOS 40D digital camera, 10 MP, digital SLR with a 100 mm lens that was mounted on a tripod and featured a light source to photograph male fish specimens (Figure 2). Next to the photographed specimen we placed a 1 mm graph paper that served as a 20 mm scale, being a template for the measurements. In the ImageJ program, version 1.8.0 (Rasband, 2016), orthogonal linear measurements of standard length (SL) and gonopodium length (GL) were plotted in the images of each individual (Figure 2). Each SL and GL measurement was repeated 10 times to test the reliability index of the analyses and thus avoid a measurement error using the intraclass coefficient (ICC), (Wolak, 2012) in the package ICC in R, version 4.2 (R. Development

Core Team, 2021). These 10 repeated measures indicated high reliability (ICC=0.99); we then used the mean value of those measures for the following statical tests.

To our knowledge, there is not yet a well-accepted estimated length of first maturation for males of *Phalloceros harpagos*. We considered as mature all males with exposed hooks and horns in the tip of the gonopodium, as suggested by Lucinda (2008). We divided the mature males in standard length categories of 1 mm (15.00 mm – 15.99 mm, for example) and evaluated the percentage of mature males per category to identify different waves of maturation since Poeciliids frequently have two male morphs, one who matures earlier and another who matures later (Kolluru *et al.*, 2014). We also plotted mature and immature males (y-axis) per standard length (x-axis) and fitted it to a binomial distribution to estimate at which length males mature.



**Figure 2.** Male *Phalloceros harpagos* from the Capetingo stream, lot number CIUnB 338, Distrito Federal. (SL) Standard Length and (GL) Gonopodium Length. The scale beneath the image is 20 mm.

## Allometry analyses

We tested whether the GL measurements showed allometric relationships with the SL measurements by estimating the allometry coefficient ( $b$ ) using the `Smatr` package of R. The log-transformed measurements were plotted in a scatter plot including a linear regression analysis, LM models, with response variable gonopodium size (GL) in the y-axis, and the predictive variable standard length (SL) in the x-axis. In this analysis, the angular coefficient (slope  $b$ ) of the regression line indicates whether the growth of the gonopodium in relation to the standard length is isometric ( $b = 1$ ), positively allometric ( $b > 1$ ) or negatively allometric ( $b < 1$ ). The inclinations of each linear regression were tested with the t-test against the null hypothesis of isometry ( $b = 1$ ) and the determination coefficient ( $R^2$ ) informs us the strength of the relationship.

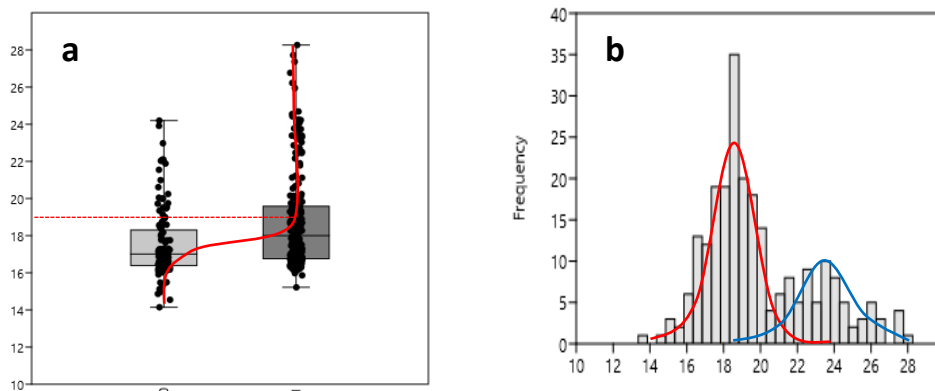
We also performed normality tests for GL and SL by the geographic categories. Upstream Paraná (Distrito Federal) and downstream Paraná (Minas Gerais, Paraná and São Paulo) were normally distributed, while the Tocantins, São Francisco and La Plata basins were not normally distributed and had smaller sample sizes, thus being excluded from our next analyzes (Table S1). We repeated the LM mentioned above for upstream and downstream Paraná basin.

Lastly, we did a Tukey test, using the `M.interaction` package of R, to compare the allometric coefficients of upstream and downstream upper Paraná Basin populations to evaluate if they differ significantly from one another and check for reproductive isolation and divergence in the allometry of the gonopodium (Carvalho, 2008; Lima, Caires, 2011; Lima, Silva, 2008). Descriptive data are presented as mean  $\pm$  standard error. Our tolerance to type I error was  $\alpha = 0.05$ .



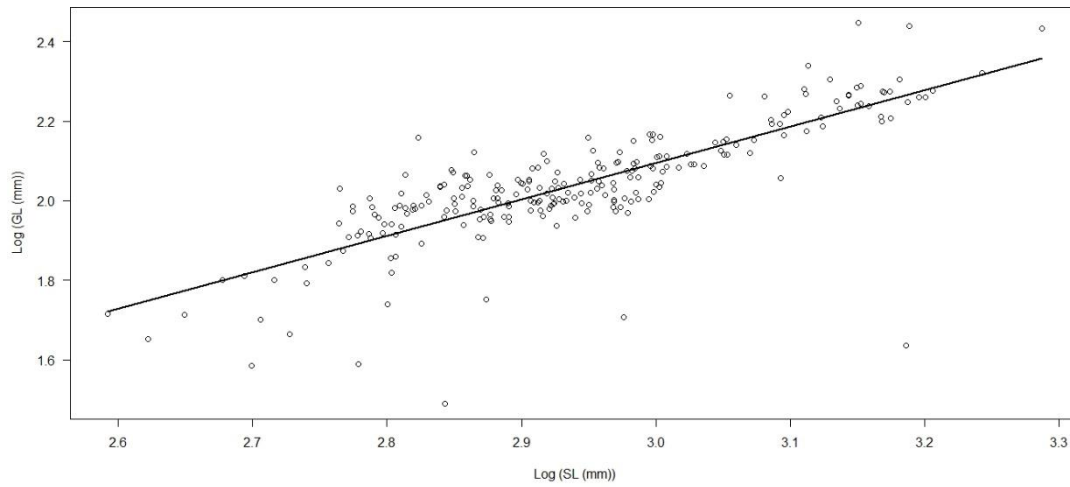
## RESULTS

Generally, *P. harpagos* males mature in average at  $18.7 \pm 0.16$  mm in standard length (Fig. 3a). Nevertheless, our data suggests this species matures in two waves, smaller males mature first around 18 mm, then, larger males mature around 23 mm (Fig 3b).



**Figure 3.** Length of first maturation for male *P. harpagos*. a) Box-plot with the median (central line), quartiles (box) and standard error (whiskers) and fitted binomial distribution (continuous red line) indicating maturation around 18.7 mm (dotted red line). b) histogram of mature individuals with 30 categories of SL indicating a bimodal distribution of mature males (red and blue lines).

Our measures for the gonopodium length of all mature *P. harpagos* indicates that this structure grows in negative allometry (Figure 4), because the allometric slope of gonopodium length was significantly smaller than 1.0 (Table 1), thus growing slower than the body.



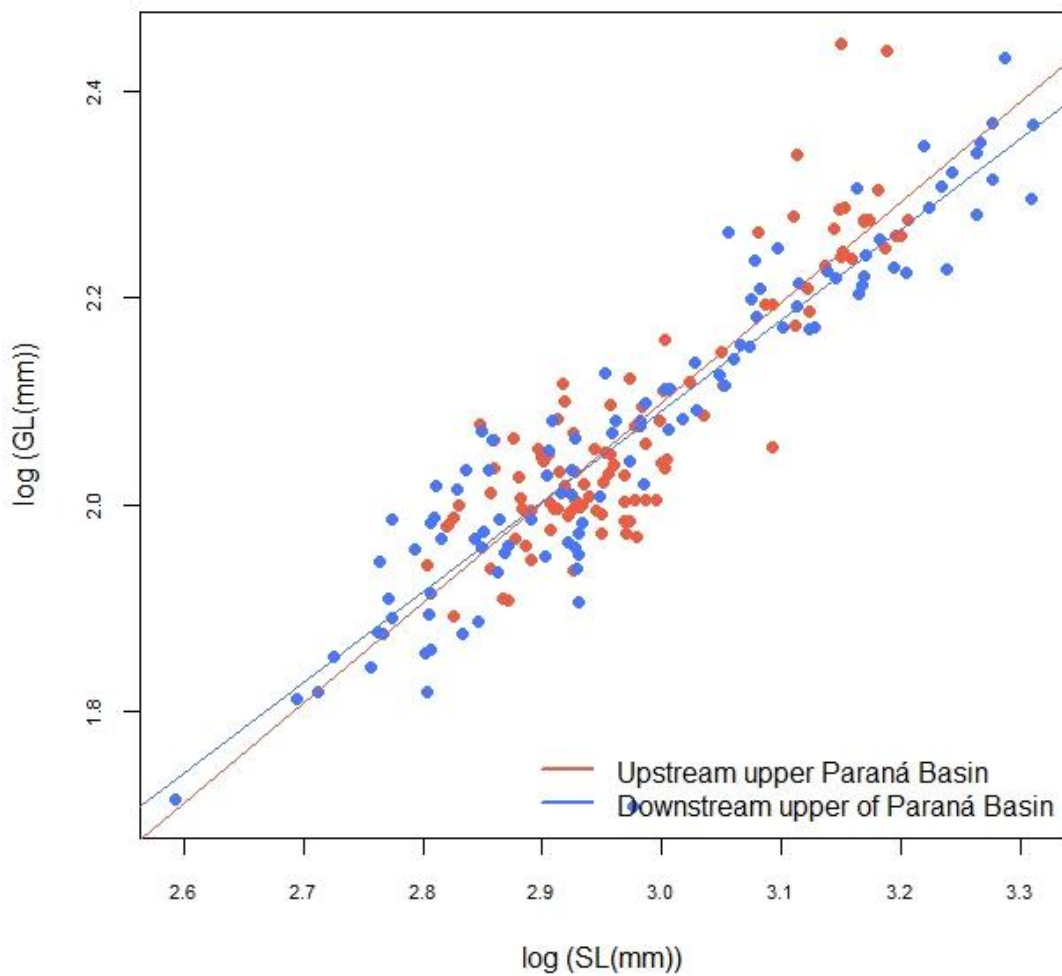
**Figure 4.** Linear regression of the log-transformed values of gonopodium length (GL) versus standard length (SL) for all the 241 specimens of *P. harpagos*.

**Table 1.** Summary of the linear regressions between SL and GL. Allometric coefficient (b) and correlation coefficient ( $R^2$ ) of the regression line derived from our measures; t-test value (t) and significance (p) of the allometric coefficient in relation to the theoretical null hypothesis of isometry ( $b = 1$ ). P-values in bold indicate statistical significance.

	<b>b</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>T</b>	<b>p</b>
<b>Mature males from all basins</b>	0.874	0.804	31.3	<b>1.065 e<sup>-5</sup></b>
<b>Upstream upper Paraná</b>	0.969	0.766	18.3	0.560
<b>Downstream upper Paraná</b>	0.877	0.854	24.8	<b>0.000729</b>

When evaluated along the upper Paraná basin (Upstream and Downstream data), the gonopodium has isometric growth in specimens from the upstream upper Paraná

basin, but presents negative allometry in the downstream upper Paraná (Figure 5, Table 1), differing from the null hypothesis ( $b = 1.0$ ). The result of the Tukey test comparing the allometric coefficient of upstream to downstream upper Paraná basin confirms the difference between gonopodium allometry along the basin (Tukey = 3.064;  $p = 0.0025$ ).



**Figure 5.** Linear regression of the log-transformed values of gonopodium length (GL) versus standard length (SL) for the fish from upstream upper Paraná Basin (—●) and downstream upper Paraná Basin (—●).

## DISCUSSION

Males of *Phalloceros harpagos* mature in two waves around 18 mm, but this maturation appears to occur in two waves, for smaller and larger morphs. According to our initial question, there is a major hypothesis that can explain the negative allometric growth of the gonopodium in *P. harpagos*. The functional allometry hypothesis (Eberhard *et al.*, 2018) predicts that courtship structures that are supposed to fit inside the female's body, such as genitals, should be under stabilizing selection for a specific size adequate to females' bodies, or at least to the most fertile females. Despite of that, a tendency to isometry is expected if forceful or sneaky interactions occur (Rodríguez, Eberhard, 2019). A significant variation was found in the gonopodium static allometry along the upper Paraná Basin, maybe helping the reproductive isolation in these populations. It is possible that a divergence process between upstream and downstream populations is under course through gonopodium allometry.

Our data points to a length of first maturation of 18.7 mm in standard length. Such measure agrees with other Poeciliids, such as *Pseudoxiphophorus bimaculatus*, *Poecilia sphenops*, *Poecilia latipinna*, *Xiphophorus maculatus* and *Heterandria formosa* (Ramírez-García *et al.*, 2018; Froese, Pauly, 2022), which matures between 67 and 36% of their maximum length. Although, to our knowledge, a length of first maturation has not been published for *P. harpagos* yet, an estimate based on Huxley's polyphasic growth model placed this species' first maturation at 26 mm was presented in a dissertation (Morais, 2018). This model considers that around first maturation the fish will reduce its investment in growth and dedicate it to weight gain (Huxley, 1924). This could be adequate for species with more straightforward sexual maturation, but due to the bimodal distribution of mature males we believe there are two male morphs in *P. harpagos*, an early-maturing, small, sneaker male and a late-maturing, large, courting

male. This process is called protandry (Abbot, 2006), being well known for many Poeciliids (Lampert *et al.*, 2010). Even a simple mendelian inheritance mechanism of protandry has been described for the genus *Xiphophorus* (Volf *et al.*, 2013).

Considering our complete dataset, the growth pattern of the gonopodium in *P. harpagos* was shown to be negatively allometric. This assumes the evolution of one gonopodium size to fit most of the females, especially the most fertile ones, as “one size fits all” (Eberhard *et al.*, 1998). It is often assumed that proportional or isometric growth is the most common for economic reasons (Voje, 2016) since no part of the body will require a differential growth control, but sexual selection for a gonopodium that can match most females will drive the allometry of this organ. Rodriguez and Eberhard (2019) predicted copulatory organs to have lower b-slopes (around 0.5), but they also suggested that copulatory organs applied in forceful or sneaky copulations should have higher slopes. *Phalloceros harpagos* probably adopt a protandric strategy (Abbot, 2006), in which males mature earlier or perform copulations with females when still immature due to intense intrasexual competition. This has been previously reported for the Poeciliid *Gambusia holbrooki*, whose immature males become sexually active before maturation, when they have reached a body large enough to access the female (Bisazza *et al.*, 1996). Although the females are tolerant of smaller males, larger males attack them, linking reproductive success more closely to whole body size than to gonopodium length (Dadda, Pilastra, Bisazza, 2005), because larger males tend to win disputes in animals in general (Andersson, 1994) and in Poeciliids (Smith, 2014). Thus, it is probable that the size of the copulatory organ evolves to fit most female genital openings, but some pressure for longer gonopodia drives its allometric slope to be closer to isometry than expected in copulatory organs exclusively used non-forcefully.

There was a significant variation in the gonopodium length along the Paraná Basin (comparing upstream and downstream samples), indicating a possible reproductive isolation between these populations. Data such as these agrees with what is expected for the rapid and divergent evolution of genitalia (Eberhard, 1985), especially in a group characterized by the sympatry of congeneric species and by the variation of male and female sexual characteristics (Thomaz *et al.*, 2019), which highlights the evolutionary processes associated with reproductive isolation in *P. harpagos* through morphological variation of the genitalia in the coastal basins. The molecular phylogeny in the study by Thomaz *et al.* (2019) indicates that the population in the Paraná Basin is monophyletic, although *P. harpagos* is polyphyletic with three lineages, one in Santa Catarina, La Plata Basin, one in São Paulo and the last for the Paraíba do Sul River Basin. Although no important biogeographic barriers have been described between the upstream and downstream populations of our samples (Brea, Zucol, 2011), there is a series of dams, waterfalls and rapids between these points (Barcha, Arid, 1975) that can serve as smaller barriers leading to reproductive isolation besides the mere distance and lack of tolerance to rivers of higher orders by *P. harpagos*. The fast evolution of the genitalia and reproductive isolation between the populations provide an explanation for the heterogeneity of the *P. harpagos* gonopodia along the sampled points of the upper Paraná Basin.

Gonopodium allometric patterns among *P. harpagos* populations are representative of the exceptionally rapid evolution of copulatory organs (Eberhard, 1985). Several hypotheses address this accelerated evolution, both in terms of natural selection and sexual selection (key-lock, sexual conflict, sexy son, post-copulation selection) (Macagno *et al.*, 2013). The key-and-lock hypothesis is directly related to the variability of male gonopodia hook shapes, morphology and orientation of female

genital papillae (Thomaz *et al.*, 2019). The genitalia also usually evolve rapidly in the context of sexual conflict, in which the male genitalia can harm the female avoiding future copulations with competitors (Reinhardt *et al.*, 2007). Although sexual conflict is common in Poeciliidae (Cummings, 2018), there is still no evidence if the ornaments on gonopodia of species such as *P. harpagos* have this harming function. There is some evidence pointing to the preference of females for longer gonopodium in *Xiphophorus nigrensis* (Smith, 2014), although body size is still more relevant in the female choice. However, mechanisms to circumvent female preference by means of forced copulations could be a more important factor in the reproductive success of *P. harpagos*. As only the tip of the gonopodium is coupled to the female during copulation (Iglesias-Carrasco *et al.*, 2019), the length of this organ is more advantageous in reaching the female than in delivering sperm deeper in the reproductive tract, as proposed for mammals (Stockley *et al.*, 2013). Knowing the predominance of forced and sneaky copulations in *P. harpagos* is a next important step to evaluate the existence of two male morphs and if these males would benefit from longer-reaching gonopodia. Our current results, with negatively allometric gonopodia with a B-slope close to 1, suggest a predominance of sneaky copulations and pre-copulation sexual selection both by the female partners and male competitors (Plath *et al.*, 2007). Other factors linked to natural selection, such as hydrodynamics and the presence of predators, can drive the evolution of the gonopodium in *P. harpagos* (Jennions, Kelly, 2002; Heinem-Kay *et al.*, 2014). These data also reinforce that, despite the emphasis given to sexual selection on the evolution of genitalia, there are several factors of natural selection in activity (House *et al.*, 2013).

Future studies on the evolution of *P. harpagos* gonopodium could focus on some aspects not met by our work. Geometric morphometrics together with ontogenetic

allometry could bring more accurate and diverse data in future studies, giving an overview of how the shape and distribution in spikes and hooks in the genitalia varies with growth and reproductive tactic. Several hypotheses about the evolution of male genitalia, such as the lock and key hypothesis (Bertin, Fairbairn, 2007), could be more precisely tested using geometric morphometry. Likewise, including the analysis of female genitalia would bring valuable new information to understand the evolution and reproductive behavior in this group (Brennan, Prum, 2015; Brennan, 2016), as was already anticipated by Thomaz *et al.* (2019). More samples from other areas could show if reproductive isolation by gonopodium morphology occur in more. Finally, behavioral studies, with live specimens kept in captivity, could bring very interesting results, such as on furtive sex versus courtship and post-copulation selection, to complement the voluminous material produced with other Poeciliidae species.

We conclude that the growth pattern of the gonopodium in *P. harpagos* happens in a negatively allometric way, probably because the gonopodium is used as a contact-courtship trait in a forceful way. The one size fits all and the functional allometry hypothesis explains this negative allometry. As copulatory organs are known to evolve rapidly, the static allometry of the gonopodium varied significantly along the upper Paraná Basin, suggesting reproductive isolation, at least from the gonopodium allometry point of view. Our study contributes to the understanding of the evolution of male genitalia in one of the few fish groups with a copulatory organ, pinpointing that several factors, including natural and sexual selection working together to shape male copulatory organs.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Francisco Langeani (curator of the Coleção ictiológica da UNESP-SJRPreto), Pedro Aquino (former curator of the Coleção ictiológica da UnB) and Roberto E. Reis (curator of the Coleção ictiológica PURS) for granting us generous access to the fish specimens. We also thank Weligton Coelho for support with image acquisition and processing. WPM received a scholarship from CAPES WPM and EB were also funded by the Programa de Educação Tutorial (Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação); VS was funded by FAPDF #00193-00000229/2021-21.

## REFERENCES

- Abbott, J. (2006). Ontogeny and population biology of a sex-limited colour polymorphism. Lund University.
- Albert, J. S., Petry, P., & Reis, R. E. (2011). Major biogeographic and phylogenetic patterns. *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes*, **1**, 21-57.
- Aquino, P.U.P., Schneider, M., Silva, M.J.M., Fonseca, C.P., Arakawa, H.B., & Cavalcanti, D.R. (2009). Ictiofauna dos córregos do Parque Nacional de Brasília, Bacia do Alto Rio Paraná, Distrito Federal, Brasil Central. *Biota Neotrop.*, 217-230.
- Andersson M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Arnqvist, G. (1998). Comparative evidence for the Evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, **393**, 784-786.
- Arnqvist, G., Grieshop, K., Hotzy, C., Rönn, J., Polak, M., & Rowe, L. (2021). Direct and indirect effects of male genital elaboration in female seed beetles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **288(1954)**, 1–7.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1068>
- Barcha, S.F., & Arid, F.M. (1975). Origem das cachoeiras da Bacia do Alto Paraná. *Revista Brasileira de Geociências*, **5(2)**, 120-135.
- Bateman, A. J. (1948). Inter-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, **2**, 349-368.
- Batty, J., & Lim, R. (1999). Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36(3)**, 301-307.

Bertin, A., & Fairbairn, D. J. (2007). The form of sexual selection on male genitalia cannot be inferred from within-population variance and allometry—a case study in *Aquarius remigis*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, **61**(4), 825-837.

Bisazza, A., Pilastro, A., Palazzi, R., & Marin, G. (1996). Sexual behaviour of immature male eastern mosquitofish: a way to measure intensity of intra-sexual selection? *Journal of Fish Biology*, **48**(4), 726-737.

Brea, M., & Zucol, A. F. (2011). The Paraná-Paraguay Basin: geology and paleoenvironments. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*, (pp 69-88). University of California Press, Los Angeles, CA.

Brennan, P. L., & Prum, R. O. (2015). Mechanisms and Evidence of Genital Coevolution: The Roles of Natural Selection, Mate Choice, and Sexual Conflict. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(7), a017749.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017749>

Brennan, P., L. (2016). Studying genital coevolution to understand intromittent organ morphology. *Integrative and comparative biology*, **56**(4), 669-681.

<https://doi.org/10.1093/icb/icw018>

Briskie, J. V., & Montgomerie, R. (1997). Sexual selection and the intromittent organ of birds. *Journal of Avian Biology*, 73-86.

Booksmythe, I., Head, M. L., Keogh, J. S., & Jennions, M. D. (2016). Fitness consequences of artificial selection on relative male genital size. *Nature communications*, **7**(1), 1-11.

Briskie, J. V., & Montgomerie, R. (1997). Sexual selection and the intromittent organ of birds. *Journal of Avian Biology*, 73-86.

- Brooks, R., & Caithness, N. (1995). Female choice in a feral guppy population: are there multiple cues? *Animal Behaviour*, **50(2)**, 301-307.
- Buckland-Nicks, J., & Scheltema, A. (1995). Was internal fertilization an innovation of early Bilateria? Evidence from sperm structure of a mollusc. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **261(1360)**, 11-18.
- Bueno, V., Venere, P., C. Zawadzki, C. H., & Margarido, V., P. (2013). Karyotypic diversification in *Hypostomus Lacépède, 1803* (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **23(1)**, 103-112.
- Carvalho, R. D. (2008). Meio Físico: V.1 - Localização da Unidade. In: Fonseca, F. O. *Águas Emendadas* (pp. 95-100). *Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente (Seduma)*: Brasília.
- Casasa, A., Zattara E.E., & Moczek A.P. (2019). Developmental regulation and evolution of nutrition-responsive growth in horned beetles. In *Integrative and Comparative Biology*, **59(5)**, E32-E32. Journals Dept, 2001 Evans Rd, Cary, NC, USA: Oxford Univ Press Inc.
- Costa, W. J., Amorim, P. F., & Mattos, J. L. O. (2016). Molecular phylogeny and evolution of internal fertilization in South American seasonal cynopoeiline killifishes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **95**, 94-99.
- Collet, J. M., Dean, R. F., Worley, K., Richardson, D. S., & Pizzari, T. (2014). The measure and significance of Bateman's principles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281(1782)**, 20132973.
- Córdoba-Aguilar A., & Cordero-Rivera A. (2008). Cryptic female choice and sexual conflict. In: Córdoba Aguilar A & Cordero-Rivera A (Eds) *Dragonflies and*

Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research, pp 189–202.

Oxford University Press, Oxford. Doi:10.1093/acprof:oso/9780199230693.001.0001

Costa, W. J., Amorim, P. F., & Mattos, J. L. O. (2016). Molecular phylogeny and evolution of internal fertilization in South American seasonal cynopoeciline killifishes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **95**, 94-99.

Couto, T. B. D. A., & Aquino, P. D. P. U. D. (2011). Structure and integrity of fish assemblages in streams associated to conservation units in Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **9(2)**, 445-454.

Costa, W. J., Amorim, P. F., & Mattos, J. L. O. (2016). Molecular phylogeny and evolution of internal fertilization in South American seasonal cynopoeciline killifishes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **95**, 94-99.

Cummings, M. E. (2018). Sexual conflict and sexually dimorphic cognition — reviewing their relationship in poeciliid fishes. *Behavioral ecology and sociobiology*, **72(4)**, 1-13.

Dadda, M., Pilastro, A., & Bisazza, A. (2005). Assédio sexual masculino e comportamento escolar feminino no peixe-mosquito oriental. *Animal Behavior*, **70 (2)**, 463-471.

Dale-Broder, E., Ghalambor, C. K., Handelsman, C. A., Ruell, E. W., Reznick, D. N., & Angeloni, L. M. (2020). Rapid evolution and plasticity of genitalia. *Journal of Evolutionary Biology*, **33(10)**, 1361-1370.

Datovo, A., Aquino, P. P. U., & Langeani, F. (2016). A new species of *Ituglanis* (Siluriformes: Trichomycteridae) from the Tocantins and Paranaíba river basins, central Brazil, with remarks on the systematics of the genus. *Zootaxa*, **4171(3)**, 439-458.

Dederichs, T. M., Müller, C. H., Sentenská, L., Lipke, E., Uhl, G., & Michalik, P. (2019). The innervation of the male copulatory organ of spiders (Araneae) – A comparative analysis. *Frontiers in zoology*, **16**(1), 1-14.

De-Almeida-Monaco, I., Suárez, Y. R., & Lima-Junior, S. E. (2014). Influence of environmental integrity on feeding, condition and reproduction of *Phalloceros harpagos*, Lucinda, 2008 in the Tarumã stream micro-basin. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **36**(2), 181-188.

De-Lima, A. K. S., Paschoaletto, I. P., De Oliveira Pinho, L., Benmamman, P., & Klaczko, J. (2019). Are hemipenial traits under sexual selection in *Tropidurus* lizards? Hemipenial development, male and female genital morphology, allometry and coevolution in *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae). In *PLoS ONE*, **14**(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219053>.

De-Oliveira, V. F., De Oliveira, A. V., Prioli, A. J., & Prioli, S. M. A. P. (2008). Obtenção de marcadores moleculares 5S rDNA para populações nativas e introduzidas de *Cichla* (Perciformes-Cichlidae), do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **30**(1), 83-90.

Devigili, A., Fitzpatrick, J. L., Gasparini, C., Ramnarine, I. W., Pilastro, A., & Evans, J. P. (2018). Possible glimpses into early speciation: the effect of ovarian fluid on sperm velocity accords with post-copulatory isolation between two guppy populations. *Journal of Evolutionary Biology*, **31**(1), 66–74. <https://doi.org/10.1111/jeb.13194>

Dixson, A. F. (1987). Observations on the evolution of the genitalia and copulatory behaviour in male primates. *Journal of Zoology*, **213**, 423–443.

Doyle, C., Barker, J., Lim, R. P., & Gray, L. E. (2003). Reproductive morphology of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in the

South Creek catchment on the Hawkesbury-Nepean River. Australian Water Association & International Water Association.

Eberhard WG. (1985) *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Eberhard. W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press.

Eberhard, W. G., Huber, B. A., Briceño, R. D., Salas, I., & Rodriguez, V. (1998). One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution*, 52(2), 415-431.

Eberhard, W. G., Huber, B. A., Briceño, R. D., Salas, I., & Rodriguez, V. (1998). One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution*, **52(2)**, 415-431.

Eberhard, W. G. (2009). Static allometry and animal genitalia. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, **63(1)**, 48-66.

Eberhard, W. G., Rodríguez, R. L., Huber, B. A., Speck, B., Miller, H., Buzatto, B. A., & Machado, G. (2018). Sexual selection and static allometry: the importance of function. *The Quarterly Review of Biology*, 93(3), 207-250.

Edwards, T. M., & Guillette Jr, L. J. (2007). Reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from nitrate-contaminated springs in Florida. *Aquatic Toxicology*, **85(1)**, 40-47.

Fricke, R., Eschmeyer, WN, & Van der Laan, R. (2018). *Catálogo de peixes: gêneros, espécies, referências*. Academia de Ciências da Califórnia, São Francisco, CA, EUA <http://researcharchive.calacademia.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

Froese, R. and Pauly, D. (2022). FishBase. World Wide Web electronic publication.

www.fishbase.org, version (02/2022).

Gasparini, C., Pilastro, A., & Evans, JP (2011). Morfologia genital masculina e sua influência nas preferências de acasalamento das fêmeas e sucesso da paternidade em guppies. *PLoS-One*, **6(7)**. e22329

Giese, A. C., & Kanatani, H. (1987). Maturation and spawning. In A. C. Giese, J. S. Pearse, & V. B. Pearse (Eds.), *Reproduction of marine invertebrates*, **9**, 251–329.

Gomes, A. D., Moreira, R. G., Navas, C. A., Antoniazzi, M. M., & Jared, C. (2012). Review of the Reproductive Biology of Caecilians (Amphibia, Gymnophiona). *South American Journal of Herpetology*, **7(3)**, 191–202. <https://doi.org/10.2994/057.007.0301>

Gredler, M. L., Seifert, A. W., & Cohn, M. J. (2015). Morphogenesis and Patterning of the Phallus and Cloaca in the American Alligator, *Alligator mississippiensis*. *Sexual Development*, **9(1)**, 53-67.

Heinem-Kay, J.L; Ryan, N; Morris, K.E; Byerley, S.L. (2014). A trade-off between natural and sexual selection underlies diversification of a sexual signal. *Behavioral Ecology*, **26**, 533-542.

Herrera, A. M., Shuster, S. G., Perriton, C. L., & Cohn, M. J. (2013). Developmental basis of phallus reduction during bird evolution. *Current Biology*, **23(12)**, 1065-1074.

Holub, A. M., & Shackelford, T. K. (2021). Fertilization through Intromission. *Organ*, **37**, 511-521.

Hosken, D. J., & Stockley, P. (2004). Sexual selection and genital evolution. *Trends in ecology & evolution*, **19(2)**, 87-93.

Hosken, D. J., Archer, C. R., House, C. M., & Wedell, N. (2019). Penis evolution across species: divergence and diversity. *Nature Reviews Urology*, **16(2)**, 98-106.



- House, C. M., Lewis, Z., Hodgson, D. J., Wedell, N., Sharma, M. D., Hunt, J., & Hosken, D. J. (2013). Sexual and Natural Selection Both Influence Male Genital Evolution. *PLoS ONE*, **8(5)**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063807>
- Hrbek, T., Seckinger, J., Meyer, A. (2007). A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43(3)**, 986–998.
- Huber, B. A. (2004). The significance of copulatory structures in spider systematics. In 'Biosemiotik–praktische Anwendung und Konsequenzen für die Einzelwissenschaften'. Ed. J Schult, 89–100.
- Huxley, J. S. (1924). Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature*, **114(2877)**, 895-896.
- Huxley, J. S. (1932). *Problems of relative growth* London: Methuen. Co. LTD.
- Iglesias-Carrasco, M., Fox, R. J., Vincent, A., Head, M. L., & Jennions, M. D. (2019). No evidence that male sexual experience increases mating success in a coercive mating system. *Animal Behaviour*, **150**, 201-208.
- Iskandar, D. T., Evans, B. J., & McGuire, J. A. (2014). A novel reproductive mode in frogs: a new species of fanged frog with internal fertilization and birth of tadpoles. *PLoS One*, **9(12)**, e115884.
- Jennions, M. D., & Kelly, C. D. (2002). Geographical variation in male genitalia in *Brachyrhaphis episcopi* (Poeciliidae): is it sexually or naturally selected?. *Oikos*, **97(1)**, 79-86.
- Kahn, A. T., Mautz, B., & Jennions, M. D. (2010). Females prefer to associate with males with longer intromittent organs in mosquitofish. *Biology Letters*, **6(1)**, 55-58.

Kelly, C. D., Godin, J. G. J., & Abdallah, G. (2000). Geographical variation in the male intromittent organ of the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology*, **78**(9), 1674-1680.

Kelly, D. (2004). A. Turtle and mammal penis designs are anatomically convergent. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **271**(5), 293-295.

Kolluru. G. R., Bertram. S.M, Chin. E. H., Dunmeyer.C.V, & Jennifer.S. (2014). Mating behavior and its morphological correlates in two color morphs of *Girardinus metallicus* (Pisces: Poeciliidae), a species previously thought not to exhibit courtship display. *Behavioural Processes*, **106**, 44–52.

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.04.007>

Kwan, L., Dobkin, A. N., Rodd, F. H., & Rowe, L. (2016). A potential cost of long genitalia in male guppies: The effects of current speed on reproductive behaviour. *Ethology*, **122**(12), 945-953.

Langerhans. R. B., Layman. C. A., & DeWitt. T. J. (2005). Male genital size reflects a tradeoff between attracting mates and avoiding predators in two live-bearing fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(21), 7618–7623. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500935102>

Lampert, K. P., Schmidt, C., Fischer, P., Volff, J. N., Hoffmann, C., Muck, J., ... & Schartl, M. (2010). Determination of onset of sexual maturation and mating behavior by melanocortin receptor 4 polymorphisms. *Current Biology*, **20**(19), 1729-1734.

Langerhans. R. B. (2011). Genital evolution. *Ecology and evolution of poeciliid fishes*, **572**, 228-240.

- Lehtonen. J., Jennions. M. D., & Kokko. H. (2012). The many costs of sex. *Trends in ecology & evolution*, **27(3)**, 172-178.
- Lehtonen. J., & Parker. G. A. (2019). Evolution of the two sexes under internal fertilization and alternative evolutionary pathways. *The American Naturalist*, **193(5)**, 702-716.
- Levitan. D. R., & Petersen. C. (1995). Sperm limitation in the sea. *Trends in Ecology & Evolution*, **10(6)**, 228-231.
- Lima J.E.F.W., & Silva E.M. (2008). Hidrografia. In: F. O. Fonseca (org.). *Águas emendadas* (pp. 63-116). Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente (Seduma): Brasília, **110**.
- Lima, F. C., & Ribeiro, A. C. (2011). Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes*. University of California Press, Berkeley, 145-164.
- Lira. J. J. P. R., Yan. Y., Levasseur. S., Kelly. C. D., & Hendry. A. P. (2021). The complex ecology of genitalia: Gonopodium length and allometry in the Trinidadian guppy. *Ecology and evolution*, **11(9)**, 4564-4576.
- Long. J. A., Mark-Kurik. E., Johanson. Z., Lee. M. S., Young. G. C., Min. Z. & Trinajstić. K. (2015). Copulation in antiarch placoderms and the origin of gnathostome internal fertilization. *Nature*, **517(7533)**, 196-199.
- Lucinda. P. H. Family Poeciliidae. (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America, 555-581.

- Lucinda, P.H.F. (2008). Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*, **6(2)**, 113-158.
- Macagno, A.L.M., Pizzo A., Parzer, H.F., Palestrini C., Rolando, A., Moczek, A.P. (2011). Shape - but Not Size - Codivergence between Male and Female Copulatory Structures in Onthophagus Beetles. *PLoS ONE*, **6(12)**. e28893.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028893>
- Mahfud, M., Winarto, A., & Nisa, C. (2017). Morfologi Hemipenis Biawak Air (*Varanus salvator bivittatus*). *Jurnal Sain Veteriner*, **35(1)**, 111.  
<https://doi.org/10.22146/jsv.29298>
- Morais, H. P. (2018). Análise de crescimento de *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) de uma microbacia neotropical. Master's degree dissertation presented at Universidade Federal do Paraná, Brazil.
- Morris, M.R; Wagner JR.W. E; Ryan. M.J. (1996). A negative correlation between trait and mate preference in *Xiphophorus pygmaeus*. *Animal Behaviour*, **52(6)**, 1193–1203.
- Nelson, J. A. (1982). Physiological observations on developing rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), exposed to low pH and varied calcium ion concentrations. *Journal of Fish Biology*, **20(3)**, 359-372.
- Nelson, J.S. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 600. 1994; 3:600.
- Nielsen, A. (1957). On the evolution of the genitalia in male insects. *Entomologiske Meddelelser*, **28**, 27-57.
- Nava-Bolaños, A., Sánchez-Guillén, R. A., Munguía-Steyer, R., & Córdoba-Aguilar, A. (2014). Isometric patterns for male genital allometry in four damselfly species. *Acta*

Ethologica, **17(1)**, 47–52. <https://doi.org/10.1007/s10211-013-0153-5>

Ogino, Y., Katoh, H., & Yamada, G. (2004). Androgen dependent development of a modified anal fin, gonopodium, as a model to understand the mechanism of secondary sexual character expression in vertebrates. *FEBS letters*, **575(1-3)**, 119-126.

Orbach, D., & Brennan, P. (2017). Copulatory Fit of Common Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Genitalia. *The FASEB Journal*, *31*, 577-21.

Orr, T. J., & Zuk, M. (2012). Sperm storage. *Current Biology*, *22(1)*, 8-10.

O'Shaughnessy, K. L., Dahn, R. D., & Cohn, M. J. (2015). Molecular development of chondrichthyan claspers and the evolution of copulatory organs. *Nature communications*, **6(1)**, 1-8.

Parker, G. A. (1984) Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 1-60.

Pélabon, C., Bolstad, G. H., Egset, C. K., Cheverud, J. M., Pavlicev, M., & Rosenqvist, G. (2013). On the relationship between ontogenetic and static allometry. *The American Naturalist*, **181(2)**, 195-212.

Pitcher, T. E., Rodd, F. H., & Rowe, L. (2008). Female choice and the relatedness of mates in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Genetica*, **134(1)**, 137-146.

Plath, M., Makowicz, A. M., Schlupp, I., & Tobler, M. (2007). Sexual harassment in live-bearing fishes (Poeciliidae): comparing courting and noncourting species. *Behavioral Ecology*, **18(4)**, 680-688.

Poy, D., Ramírez, M. J., Michalik, P., & Piacentini, L. N. (2020). Copulatory mechanics in the wolf spider *Agalenocosa piriti* reveals a hidden diversity of locking systems in Lycosidae (Araneae). *Journal of morphology*, **281(2)**, 250-257.

Prause, N., Park, J., Leung, S., & Miller, G. (2015). Women's preferences for penis size: A new research method using selection among 3D models. *PLoS ONE*, **10**(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133079>

Rasband, W.S. (2016). *ImageJ*. U.S. National Institutes of Health. Bethesda, Md. R Core Team. 2021. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>.

Ramírez-García, A., Ramírez-Herrejón, J. P., Medina-Nava, M., Hernández-Morales, R., & Domínguez-Domínguez, O. (2018). Reproductive biology of the invasive species *Pseudoxiphophorus bimaculatus* and *Poecilia sphenops* in the Teuchitlán River, México. *Journal of Applied Ichthyology*, **34**(1), 81-90.

Ramm, S. A. (2007). Sexual selection and genital evolution in mammals: A phylogenetic analysis of baculum length. *American Naturalist*, **169**(3), 360–369. <https://doi.org/10.1086/510688>.

Rasband, W.S. (2016). *ImageJ*. U.S. National Institutes of Health. Bethesda, Md. R Core Team. 2021. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>.

Reinhardt, K., Harney, E., Naylor, R., Gorb, S., & Siva-Jothy, M. T. (2007). Female-limited polymorphism in the copulatory organ of a traumatically inseminating insect. *The American Naturalist*, **170**(6), 931-935.

Ribeiro, M.C.L.B., Perdigão, V.S.J. & Ramos, H.A.C. (2008). Ictiofauna. In Fonseca, F.O. *Águas Emendadas* (pp.253-272). Seduma. Brasília, DF.

Rios-Cardenas, O. (2005). Patterns of parental investment and sexual selection in teleost fishes: do they support Bateman's principles? *Integrative and Comparative Biology*, **45(5)**, 885-894.

Rodrigues, M. T. (1987). Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, **31(3)**, 105-230

Rodríguez, R. L., & Eberhard, W. G. (2019). Why the static allometry of sexually-selected traits is so variable: the importance of function. *Integrative and Comparative Biology*, **59(5)**, 1290-1302.

Rouse, G., & Fitzhugh, K. (1994). Broadcasting fables: is external fertilization really primitive? Sex, size, and larvae in sabellid polychaetes. *Zoologica scripta*, **23(4)**, 271-312.

Schaefer, S. A. (1997). The Neotropical cascudinhos: systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **148**, 1-120.

Safian, D., Wiegertjes, G. F., & Pollux, B. J. (2021). The Fish Family Poeciliidae as a Model to Study the Evolution and Diversification of Regenerative Capacity in Vertebrates. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **9**, 167.

Smith, Chad C. (2014). Polyandry and paternity in a wild population of the swordtail *Xiphophorus nigrensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **68(3)**, 415-424.

doi:10.1007/s00265-013-1655-x

Stefanini, M. I., Gottschalk, M. S., Calvo, N. S., & Soto, I. M. (2021). Evolution of male genitalia in the *Drosophila repleta* species group (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **34(9)**, 1488-1502.

Stockley, P., Ramm, S. A., Sherborne, A. L., Thom, M. D., Paterson, S., & Hurst, J. L. (2013). Baculum morphology predicts reproductive success of male house mice under sexual selection. *BMC biology*, **11**(1), 1-6.

Taborsky, M. (1994). Sneakers, satellites, and helpers: parasitic and cooperative behavior in fish reproduction. *Advances in the Study of Behavior*, **23**(1), 100.

Thomaz, A. T., Carvalho, T. P., Malabarba, L. R., & Knowles, L. L. (2019). Geographic distributions, phenotypes, and phylogenetic relationships of Phalloceros (Cyprinodontiformes): Poeciliidae in the. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **132**, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.008>

Thornhill, R. (1983). Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist*, **122**(6), 765-788.

Tang-Martínez, Z. (2016). Rethinking Bateman's principles: challenging persistent myths of sexually reluctant females and promiscuous males. *The Journal of Sex Research*, **53**(4-5), 532-559.

Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem, **169**.

Verrell, P. A. (1992). Primate penile morphologies and social systems: further evidence for an association. *Folia Primatologica*, **59**, 114– 120.

Vizcarra, J. A., Cerón-Romero, N., Taofeek, N., & Kirby, J. (2022). Reproduction in male birds. In *Sturkie's avian physiology*. Academic Press, 967-994.

Voje, K. L. (2016). Scaling of morphological characters across trait type, sex, and environment: a meta-analysis of static allometries. *The American Naturalist*, **187**(1), 89-98.



Volff, J. N., Selz, Y., Hoffmann, C., Froschauer, A., Schultheis, C., Schmidt, C., ... & Schartl, M. (2013). Gene amplification and functional diversification of melanocortin 4 receptor at an extremely polymorphic locus controlling sexual maturation in the platyfish. *Genetics*, 195(4), 1337-1352.

Willingham, E. J. (2020). *Phallacy, Life Lessons from the Animal Penis*. Penguin. 1<sup>st</sup> ed, New York, NY.

Wolak, M. (2012). Package "ICC". Functions facilitating the estimation of the intraclass correlation coefficient. Published by the author.  
<https://github.com/matthewwolak/ICC>.

Ziegler, T., & Olbort, S. (2007). Genital structures and sex identification in crocodiles. *Crocodile Specialist Group Newsletter*, **26(3)**, 16-1

## ANEXOS

### Anexo I

**Tabela S.1.** Itens das coleções ictiológicas que foram utilizados para a pesquisa.

<b>Código de tombamento</b>	<b>Coleção Ictiológica</b>	<b>Nº</b>	<b>Localização</b>	<b>Estado</b>	<b>Bacia Hidrográfica</b>	<b>Coordenadas Latitudinais e Longitudinais</b>
<b>CIUnB 108</b>	Coleção ictiológica da UnB	13	Córrego Vicente Pires (V6)	Distrito Federal	Bacia do Alto Paraná	(-15,820694; -48,02075)
<b>CIUnB 116</b>	Coleção ictiológica da UnB	30	Córrego Cana do Reino (9)	Distrito Federal	Bacia do Alto Paraná	(-15,781; -48,013194)
<b>CIUnB 303</b>	Coleção ictiológica da UnB	41	Córrego Capetingo (FAL)	Distrito Federal	Bacia do Alto Paraná	(-15,946506; -47,937744)
<b>CIUnB 338</b>	Coleção ictiológica da UnB	42	Córrego Capetingo (foz,FAL)	Distrito Federal	Bacia do Alto Paraná	(-15,939386; -47,939436)
<b>CIUnB 442</b>	Coleção ictiológica da UnB	75	Córrego do Cocho/2	Distrito Federal	Bacia do Alto Paraná	(-15,8676619; -47,881689)
<b>CIUnB 943</b>	Coleção ictiológica da UnB	21	Rio Pípiripau (trecho 21)	Distrito Federal	Bacia do Alto Paraná	(-15,58141; -47,50549).

<b>CIUnB 1410</b>	Coleção ictiológica da UnB	92	Rio Salinas, Morro da Pedreira	Distrito Federal	Bacia do Alto Tocantins	(-15,738836; - 47,586992).
<b>DZSJRP 012294</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	27	Córrego da Cachoeira, Faz, Cachoeira	São Paulo	Bacia do Paraná	(22,00778° S, 46,70639° W)
<b>DZSJRP 012318</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	3	Riacho do São João da Boa Vista	São Paulo	Bacia do Paraná	(22,01333° S, 46,705° W)
<b>DZSJRP 012321</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	2	Sertãozinho, Faz, Cachoeira	São Paulo	Bacia do Paraná	(22,01333° S, 46,71528° W)
<b>DSJRP 014020</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	5	Rio Santo Antônio	Minas Gerais	Bacia do Paraná	(22,46667° S, 45,35333° W)
<b>DSJRP 014025</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	3	Rio Santo Antônio	Minas Gerais	Bacia do Paraná	(22,485° S, 45,35056° W)
<b>DSJRP 014042</b>	Coleção ictiológica	4	Riacho em Vicinal	Minas Gerais	Bacia do	(22,09556° S, 46,16667° W)

	da UNESP- SJRPRETO				Paraná	
<b>DSJRP</b> <b>014837</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	5	Irapua, Córrego Figueira	São Paulo	Bacia do Paraná	(21,19111°S, 49,39333° W)
<b>DSJRP</b> <b>015163</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	12	Córrego das Palmeiras, bacia do Turvo-Grande	São Paulo	Bacia do Paraná	(20,87917°S, 49,23083°W)
<b>DZSJRP</b> <b>015293</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	3	Riacho na Fazenda Posses, Serra da Bocaina	São Paulo	Bacia do Paraná	(22,64056° S, 44,57028° W)
<b>DZSJRP</b> <b>015785</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	12	Araguari, Riacho na localidade de Salto Vicinal	São Paulo	Bacia do Paraná	(18,77333° S, 48,12306° W)
<b>DZSJRP</b> <b>016170</b>	Coleção ictiológica da UNESP- SJRPRETO	3	Rio Carandaí	Minas Gerais	Bacia do Paraná	(20,95333° S, 43,77611° W)
<b>DZSJRP</b> <b>016184</b>	Coleção ictiológica da UNESP-	25	São José dos Pinhais	Paraná	Paraná	(25,06667°S , 49,05°W)

SJRPRETO						
<b>DZSJRP</b>	Coleção	14	Córrego		Bacia do	(21,19111°S,
<b>016508</b>	ictiológica		Figueira	São Paulo	Paraná	49,39333° W)
	da UNESP-					
	SJRPRETO					
<b>DZSJRP</b>	Coleção	17	Drenagem do			(22,49944°S,
<b>017753</b>	ictiológica		Rio Grande	Minas Gerais	Bacia do	45,32472° W)
	da UNESP-				Paraná	
	SJRPRETO					
<b>DZSJRP</b>	Coleção	3	Córrego Rio			(21,19111°S,
<b>018342</b>	ictiológica		Figueira, Rio	São Paulo	Bacia do	49,39333°W)
	da UNESP-		Tietê		Paraná	
	SJRPRETO					
<b>DZSJRP</b>	Coleção	18	Córrego			(22,31194° S,
<b>019201</b>	ictiológica		Cachoeira,	São Paulo	Bacia do	48,51306° W)
	da UNESP-		drenagem do		Paraná	
	SJRPRETO		Rio Tietê			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	5	Rio		São	(20,81972° S,
<b>020080</b>	ictiológica		Paraopeba,	Minas Gerais	Francisco	43,81278° W)
	da UNESP-		drenagem do			
	SJRPRETO		Rio São			
			Francisco			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	6	Córrego			(23,16639° S,
<b>020467</b>	ictiológica		Itaúna, Rio	São Paulo	Bacia do	48,62556° W)
	da UNESP-		Paranapanema		Paraná	

	SJRPRETO		(24/04/2014)			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	1	Córrego			(23,16639° S,
<b>020478</b>	ictiológica		Itaúna, Rio	São Paulo	Bacia do	48,62556° W)
	da UNESP-		Paranapanema		Paraná	
	SJRPRETO		(25/09/2014)			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	16	Córrego			(23,16139° S,
<b>020489</b>	ictiológica		Itaúna, área	São Paulo	Bacia do	48,63194° W)
	da UNESP-		fechada, Rio		Paraná	
	SJRPRETO		Paranapanema			
			(24/04/2014)			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	4	Córrego			(23,16139° S,
<b>020502</b>	ictiológica		Itaúna, área	São Paulo	Bacia do	48,63194° W)
	da UNESP-		fechada, Rio		Paraná	
	SJRPRETO		Paranapanema			
			(25/09/2014)			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	1	Rio do			(0,0° N, 0,0° W)
<b>020739</b>	ictiológica		Engenho,	São Paulo	Bacia do	
	da UNESP-		Iguapé,		Paraná	
	SJRPRETO		Estação			
			Ecológica			
			Juréia-Itatins			
<b>DZSJRP</b>	Coleção	3	Rio		São	(20,820278° S,
<b>020972</b>	ictiológica		Paraopeba	Minas Gerais	Francisco	43,812778° W)
	da UNESP-					
	SJRPRETO					

<b>DZSJRP</b>	Coleção	12	Córrego da			(23,43328° S,
<b>020767</b>	ictiológica		Esperança,	São Paulo	Bacia do	48,41669° W)
	da UNESP- SJRPRETO		Rio Guareí		Paraná	
<b>DZJRP</b>	Coleção	1	Córrego da			(23,42611° S,
<b>022785</b>	ictiológica		Esperança,	São Paulo	Bacia do	48,42028° W)
	da UNESP- SJRPRETO		Rio Guareí		Paraná	
<b>MCP</b>	Coleção	10	Drenagem da			
<b>28755</b>	ictiológica		Lagoa do	Santa Catarina	Bacia do Rio	(27,9925° S,
	PUCRS		Ribeirão		da Prata	48.67722° W)