

**Lígia Haselmann Apostólico**

**Seleção sexual pós-copulatória em uma espécie de lula (Mollusca:  
Cephalopoda) com dimorfismo intrasexual masculino e dois sítios  
de fertilização**

**Post-copulatory sexual selection in a squid (Mollusca:  
Cephalopoda) with male intrasexual dimorphism and two  
fertilization sites**

**São Paulo**

**2023**

**Lígia Haselmann Apostólico**

**Seleção sexual pós-copulatória em uma espécie de lula (Mollusca:  
Cephalopoda) com dimorfismo intrasexual masculino e dois sítios  
de fertilização**

**Post-copulatory sexual selection in a squid (Mollusca:  
Cephalopoda) with male intrasexual dimorphism and two  
fertilization sites**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de Título de Doutora em  
Ciências, na Área de Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo  
Amoroso Rodriguez Marian

**São Paulo**

**2023**

## RESUMO

A seleção sexual exerce forte influência sobre o sucesso reprodutivo dos machos e não se limita à competição pela monopolização de parceiras do sexo oposto. Em espécies em que a fêmea copula com vários machos durante seu período reprodutivo, a disputa pela paternidade da prole pode ocorrer mesmo após a cópula, através dos mecanismos de competição espermática e escolha críptica da fêmea. Evidências oriundas de inúmeros táxons têm demonstrado que, não raramente, a seleção sexual pós-copulatória também influencia a evolução de diversas adaptações – comportamentais, morfológicas e fisiológicas – nos machos, relacionadas a tentativas de maximização do sucesso de seus gametas sobre aqueles de seus rivais. Comportamentos de guarda da fêmea, transferência de fluidos seminais responsáveis por reduzir a receptividade da fêmea e implante de plugues seminais são exemplos clássicos dessas adaptações, relacionadas a tentativas de minimização da competição espermática enfrentada por eles. Em contrapartida, os machos também podem maximizar as chances de sucesso de seus gametas ao otimizarem, por exemplo, a produção de espermatozoides mais numerosos ou qualitativamente superiores (em termos de viabilidade, velocidade) quando sob forte competição intrasexual. Lulas da família Loliginidae exibem comportamentos sexuais complexos e fenômenos como poligamia, competição espermática e paternidade múltipla são recorrentes no grupo. Além disso, machos de diferentes tamanhos, dentro da mesma espécie, podem adotar comportamentos distintos (i.e., táticas alternativas de reprodução) para obtenção de parceiras e fertilizações. Machos maiores, denominados ‘consorts’, exibem comportamentos agonísticos e de guarda da fêmea, protegendo-a do assédio de outros machos ‘consorts’ até o final da postura de ovos. Eles efetuam cópulas na posição ‘paralela’, posicionando-se abaixo da fêmea, e depositam seus espermatóforos no interior de sua cavidade do manto, próximo à saída do oviduto. Machos de menor tamanho, denominados ‘sneakers’, não adotam comportamentos agressivos ou de guarda e efetuam cópulas de forma furtiva, em geral sem intervenção dos machos ‘consorts’. Eles se posicionam à frente da fêmea e copulam na posição ‘frontal’; seus espermatóforos aderem-se à membrana peribucal, próximo ao receptáculo seminal da fêmea – uma estrutura de fundo cego, responsável pelo armazenamento de espermatozoides por períodos prolongados. Estudos prévios sugerem que a adoção de táticas alternativas por loliginídeos deveria resultar em taxas de sucesso reprodutivo desiguais entre machos que adotam posições de cópula distintas, dadas as diferenças espaciais entre os dois sítios de fertilização (membranas oviducais, mais interno; membrana peribucal, mais externo) utilizadas por eles. No entanto,

estudos empíricos voltados a responder esta questão são inexistentes na literatura do grupo. Nesse contexto, utilizando o loliginídeo *Doryteuthis pleii* (Blainville, 1823) como modelo, a presente Tese de Doutorado teve como um de seus objetivos principais comparar o sucesso reprodutivo obtido por machos de fenótipos alternativos quando seus gametas, localizados em sítios espacialmente distintos no interior da fêmea, competem pela fertilização do mesmo conjunto de ovócitos. Através da adoção de manipulações experimentais em cativeiro e genotipagem de embriões por meio do uso de marcadores microssatélites, o presente trabalho evidenciou que, como esperado, machos que transferem gametas ao sítio mais interno da fêmea tipicamente monopolizam a paternidade da prole (paternidade: > 92%) quando em competição direta com gametas armazenados no sítio mais externo, provavelmente devido ao acesso privilegiado de seus espermatozoides sobre os ovócitos recém-liberados do oviduto. No entanto, mesmo em tais cenários, machos ‘sneakers’ ainda podem ser responsáveis por fertilizar uma parcela considerável dos ovócitos remanescentes da fêmea (paternidade: 0.7 –8 %). Combinados com dados provenientes da genotipagem de espermatozoides armazenados no receptáculo seminal de fêmeas capturadas do ambiente natural (número mínimo de machos:  $3.0 \pm 1.37$ ), os resultados enfatizam a importância do receptáculo seminal. Tal estrutura parece fundamental não somente na dinâmica de fertilização em loliginídeos, suprimento de gametas e aumento da variabilidade genética da prole, mas também na continuidade da tática furtiva de ‘sneakers’ ao longo das gerações. Com a manutenção de seus espermatozoides viáveis por períodos prolongados no interior do órgão de armazenamento, machos ‘sneakers’ podem garantir um sucesso reprodutivo cumulativo maior, mesmo investindo relativamente menos recursos por fêmea (i.e., fracionando seus gametas em um maior número de cópulas). Além disso, o armazenamento de gametas por longos períodos também pode conferir intensa competição espermática entre machos que adotam cópulas frontais. Como uma possível adaptação à tal competição, sugeriu-se previamente que machos ‘sneakers’ de *D. pleii* pudessem transferir plugues seminais às fêmeas, capazes de obstruir a abertura do receptáculo seminal e impedi-las de usar a reserva de gametas previamente estocados. Comparações quanto à participação de machos ‘sneakers’ prévios (i.e., que copularam previamente e cujos gametas encontravam-se armazenados) quando na presença ou ausência de espermatângios implantados internamente ao órgão revelaram uma possível atuação de tais estruturas como plugues seminais na espécie de estudo (taxa de paternidade de machos desconhecidos, presença de plugues:  $0.9 \pm 0.8$  %; ausência de plugues:  $28.1 \pm 40.9$  %;  $p = 0.134$ ; número de machos desconhecidos presentes na desova, presença de plugues:  $0.7 \pm 0.6$ ; ausência de plugues:  $2.2 \pm 1.6$ ;  $p = 0.216$ ). No entanto, dado o conflito de interesse

entre machos e fêmeas promovido pelo implante de tais estruturas, não é inconcebível especular que, mesmo sendo produto da intensa competição espermática entre machos ‘sneakers’, a eficiência dos plugues seminais também esteja sob controle das fêmeas. Por fim, através da aplicação de técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, investigações quanto à morfologia dos hectocótilos – estrutura responsável pela transferência de espermátóforos para a fêmea durante a cópula – revelaram a existência de dois tipos de células secretoras exclusivos ao braço ventral esquerdo do macho. Especula-se que ambos sejam fundamentais para o processo de transferência dos espermátóforos, por meio da formação de uma secreção viscosa que auxilie a captação de tais estruturas pelo hectocótilo durante o momento da cópula. Em conjunto, os sete capítulos desta Tese de Doutorado trazem importantes contribuições ao campo da seleção sexual pós-copulatória, destacando o papel dos ambientes de fertilização como componente fundamental para o entendimento da dinâmica de fertilização, sucesso reprodutivo e manutenção do dimorfismo intrasexual masculino.

**PALAVRAS-CHAVE:** competição espermática, contexto de fertilização, táticas alternativas de reprodução, sucesso reprodutivo, armazenamento de espermatozoides

## ABSTRACT

Sexual selection inflicts a major influence on males' reproductive success, and it is not limited to a simple competition for female monopolization. When females mate with several partners during their reproductive season, the dispute over offspring paternity can persist even after mating, through mechanisms of sperm competition and cryptic female choice. Evidence from innumerable taxa has also demonstrated how, not uncommonly, post-copulatory sexual selection shapes the evolution of male adaptations – in terms of behavior, morphology, or physiology – in ways to maximize the success of their sperm over those of rival males. Mate guarding behavior, transferring seminal fluids capable of reducing female receptivity, and mating plugs, for instance, are classical examples of such adaptations, often related to males' attempts to minimize sperm competition. Under fierce male-male competition for oocyte fertilization, males may also maximize their chances of success by optimizing sperm production, in terms of sperm quantity or even quality (e.g., viability, velocity attributes). Loliginidae squids exhibit highly complex mating behaviors; polygamy, sperm competition, and multiple paternity are common phenomena in this family. Moreover, different-sized males often display opposite behaviors (i.e., alternative reproductive tactics) to acquire female partners and ultimately oocyte fertilization. Larger males, known as 'consorts', display agonistic behaviors and mate-guarding to protect their female partners from the harassment of other 'consorts'. They place themselves under the female and mate in the so-called 'male-parallel' position, placing their spermatophores inside the female's mantle cavity, near the oviduct opening. In contrast, smaller males, known as 'sneakers', do not engage in aggressive behaviors nor protect their partners; instead, they mate surreptitiously with females guarded by 'consorts'. They place themselves in front of the female and mate in the so-called 'head-to-head' position, attaching their ejaculates at the female's buccal membrane, near the seminal receptacle – a sac-like structure responsible for long-term sperm storage. Previous studies on loliginids have commonly suggested that males using different mating positions should have highly unequal reproductive success, given the spatial differences between the fertilization site (oviducal membranes, more internal; buccal membrane, more external) used by each male phenotype. Empirical evidence supporting such predictions was, however, still lacking. Using the loliginid *Doryteuthis pleii* (Blainville, 1823) as a model, the primary goal of this Thesis aimed at understanding the reproductive success of each male phenotype when their gametes, located at spatially distinct fertilization sites, compete over the same set of oocytes. By conducting mating trials in captivity and genotyping a large set of the resulting embryos using

microsatellite markers, the present outcomes have revealed that, as expected, males whose sperm is located more internally typically monopolize offspring fertilization (paternity rate: > 92%) when competing with sperm stored in the more external site, probably due to the privileged access of their sperm to non-fertilized oocytes freshly released from the oviduct opening. However, even in such scenarios, ‘sneaker’ males might also sire a considerable share of the remaining oocytes (paternity rate: 0.7 –8 %). Combining such outcomes with our data on the genetic variability of stored sperm from wild females (minimum number of males:  $3.0 \pm 1.37$ ), the present results highlight the importance of the seminal receptacle in loliginids. By providing additional sperm for females, the storage organ does not only play a fundamental role in the fertilization dynamics and genetic variability of females’ offspring but also in the maintenance of the ‘sneaker’ tactic along different generations. By providing long-term sperm storage, the seminal receptacle allows ‘sneakers’ to gain a cumulative reproductive success, even allocating fewer ejaculates per female (i.e., by investing less sperm per female, they can mate with a higher number of females). Long-term sperm storage may also promote intense sperm competition between ‘sneaker’ males. In agreement with such an idea, a previous study on *D. pleii* has suggested that ‘sneakers’ could transfer putative mating plugs to the female seminal receptacle, capable of physically obstructing its narrow opening and, consequently, preventing her from using her sperm reserve. By comparing the paternity rates obtained by unknown ‘sneakers’ (i.e., whose sperm had been stored before female capture) when in the presence or absence of spermatangia attached inside the seminal receptacle, the present outcomes indeed revealed a possible function of these structures as effective mating plugs (paternity rates of unknown males, with mating plugs:  $0.9 \pm 0.8$  %; without mating plugs:  $28.1 \pm 40.9$  %;  $p = 0.134$ ; number of unknown sires, with mating plugs:  $0.7 \pm 0.6$ ; without mating plugs:  $2.2 \pm 1.6$ ;  $p = 0.216$ ). Nevertheless, while mating plugs may have arisen as an adaptation to the intense sperm competition faced by ‘sneakers’, it is not inconceivable to speculate that females might also influence their efficiency, given the conflict of interests between sexes imposed by these structures. And finally, by applying both light and transmission electron microscopy techniques, we focused on the morphology of the hectocotylus, responsible for transferring spermatophores to the female during mating and therefore an important structure to cephalopod reproduction. Our analyses revealed the existence of two secretory cell types, exclusively found in the left ventral arm of males. We speculate that both cell types act together to produce a viscous secretion that helps gripping the spermatophores during mating. Combined, the seven chapters of the present Thesis provide important contributions to post-copulatory sexual selection, highlighting the

fundamental role of the fertilization environment when studying the fertilization dynamics, males' reproductive success, and evolution and maintenance of male intrasexual dimorphism in species with alternative reproductive tactics.

**KEYWORDS:** sperm competition, fertilization context, alternative reproductive tactics, reproductive success, sperm storage



# INTRODUÇÃO

## 1. SELEÇÃO SEXUAL

A seleção sexual é uma força evolutiva potente, responsável pela manutenção de características comportamentais, morfológicas e fisiológicas distintas entre indivíduos dos dois sexos (Andersson, 1994). A formulação desse conceito, realizada por Charles Darwin (Darwin, 1871), decorreu a partir de suas reflexões a respeito das possíveis razões pelas quais os machos, de forma geral, exibiam características fenotípicas muito mais conspícuas do que aquelas presentes nas fêmeas (Birkhead & Møller, 1998). Sob a óptica do conceito de seleção natural, tais atributos exagerados deveriam ser custosos, em termos de produção e manutenção, para o indivíduo. Por outro lado, se tais características estivessem relacionadas à elevação de aptidão e sobrevivência do animal, elas não deveriam estar limitadas aos machos, mas presentes em ambos os sexos (Shuster & Wade, 2003).

Tais indagações levaram Darwin a propor que algum tipo de seleção deveria operar de forma desigual em machos e fêmeas, resultando nas diferenças fenotípicas observadas entre eles. Assim, de forma análoga à seleção natural, traços fenotípicos exagerados deveriam estar relacionados à elevação da aptidão de determinado indivíduo – neste caso, no entanto, de sua aptidão na competição intrasexual pelo acesso a parceiros do sexo oposto –, resultando não na sobrevivência desigual entre competidores, mas sim no sucesso reprodutivo desigual entre eles (Andersson, 1994; Shuster & Wade, 2003). Como consequência, características conspícuas, relacionadas à promoção do sucesso reprodutivo de um indivíduo – em detrimento àquele de seus competidores –, deveriam ser favorecidas pelas pressões de seleção sexual, mesmo quando custosas em termos de viabilidade e sobrevivência (Andersson, 1994; Shuster & Wade, 2003).

De acordo com o conceito proposto por Darwin, esta forma de seleção poderia ocorrer através de dois tipos de mecanismos (Darwin, 1871). O primeiro deles, denominado de ‘intersexual’, ocorreria por meio da preferência, geralmente efetuada pela fêmea, por características fenotípicas exibidas por seus potenciais parceiros. De acordo com tal mecanismo, as fêmeas seriam responsáveis por escolher, de forma criteriosa, machos com atributos qualitativos mais atrativos – exemplificados pela exibição de comportamentos de

cortejo ou pelo porte de caracteres sexuais secundários conspícuos, tais como ornamentos ou armamentos. O segundo mecanismo, denominado de ‘intrassexual’, ocorreria, por sua vez, através da competição direta entre indivíduos, geralmente entre machos, pela monopolização de parceiras do sexo oposto. Tal mecanismo estaria relacionado, por exemplo, à disputa física pela obtenção de parceiras, por meio da exibição de comportamentos agonísticos ou combates entre machos rivais (Andersson, 1994; Birkhead & Møller, 1998; Shuster & Wade, 2003).

A ideia de que a competição entre machos estaria limitada à disputa pelo acesso e monopolização de fêmeas – e que, conseqüentemente, seu sucesso reprodutivo estaria atrelado ao número de cópulas realizadas – permaneceu intacta durante quase um século após a formalização do conceito de seleção sexual (Bateman, 1948; Arnqvist & Nilsson, 2000; Birkhead, 2010). Apesar de a escolha da fêmea, como mencionada acima, ser reconhecida como um mecanismo importante nesse processo, seu papel foi majoritariamente negligenciado na seleção sexual por muito tempo (Birkhead & Møller, 1993b; Birkhead, 2010). Acreditava-se que as fêmeas seriam majoritariamente monogâmicas e que seu sucesso reprodutivo seria mensurado apenas pela qualidade de sua prole – o que, por sua vez, seria indiferente ao número de cópulas efetuadas por elas (Bateman, 1948; Arnqvist & Nilsson, 2000).

Somente a partir da década de 1970, com o reconhecimento de que fêmeas de muitas espécies efetuam cópulas múltiplas (i.e., com mais de um macho) durante o período reprodutivo – fenômeno denominado poliandria –, a imprecisão quanto a essa concepção prévia a respeito do sucesso reprodutivo das fêmeas começou a ser revelada (Birkhead & Møller, 1998; Simmons, 2005). Tal constatação foi intrigante, em um primeiro momento, dado que a execução de cópulas múltiplas sempre esteve atrelada a custos elevados às fêmeas. Isso porque, além da maior demanda de tempo e energia e maior exposição da fêmea a predadores, doenças sexualmente transmissíveis e parasitas, sabe-se que a execução de cópulas múltiplas em determinadas espécies pode estar associada a efeitos deletérios à mobilidade, longevidade ou mesmo fertilidade da fêmea (Kvarnemo & Simmons, 2013). Dados os efeitos negativos da poliandria, assumiu-se então que um de seus principais benefícios estaria relacionado à minimização dos custos associados a tentativas de rejeição de cópulas compulsórias. Em outras palavras, mesmo que custosa à fêmea, a execução de cópulas múltiplas seria mais vantajosa, em termos energéticos, do que resistir ao assédio constante dos machos (Hosken & Stockley, 2003).

No entanto, evidências relacionadas à poliandria ilustraram que inúmeras vezes tal prática não está somente relacionada à submissão da fêmea a cópulas forçadas com vários machos, mas sim a uma ação ativa da mesma (Birkhead & Møller, 1998; Hosken & Stockley, 2003). Isso porque, na realidade, a prática de cópulas múltiplas está associada a diversos benefícios diretos à fêmea, exemplificados pelo aumento de sua fecundidade, reabastecimento de seu estoque de espermatozoides, provisionamento de cuidado parental e proteção em territórios e até mesmo ganho de nutrientes contidos no esperma, espermatóforos ou presentes nupciais – além da redução do assédio de outros machos e infanticídio (e.g., Birkhead & Pizzari, 2002; Kvarnemo & Simmons, 2013). Além disso, a poliandria permite também ganhos indiretos à progênie, relacionados ao aumento da viabilidade da prole, de sua diversidade genética e resistência a parasitas e patógenos, além da redução de incompatibilidade genética entre a fêmea e seus potenciais parceiros (e.g., Arnqvist & Nilsson, 2000; Jennions & Petrie, 2000; Hosken & Stockley, 2003; Simmons, 2005).

A principal consequência atrelada à ubiquidade da poliandria nos animais está relacionada à constatação de que a competição entre os machos não estaria restrita às adaptações que lhes possibilitem acasalar com o maior número de parceiras – conforme postulado logo após a formulação do conceito de seleção sexual durante o século XIX. De fato, tal disputa poderia ocorrer mesmo após a cópula, através de dois mecanismos de seleção sexual pós-copulatória, conhecidos como ‘escolha críptica da fêmea’ e ‘competição espermática’ (Birkhead & Pizzari, 2002; Birkhead, 2010; Kvarnemo & Simmons, 2013). Como consequência, o sucesso reprodutivo dos machos não estaria subordinado somente ao número de cópulas efetuadas, mas também ao controle da fêmea e, por fim, ao número de fertilizações obtidas (Birkhead & Møller, 1998; Birkhead, 2010; Kvarnemo & Simmons, 2013; Firman, 2020).

### **1.1. MECANISMOS DE SELEÇÃO SEXUAL PÓS-COPULATÓRIA**

A constatação de que o conceito de seleção sexual abrange um processo contínuo, que pode persistir mesmo após a cópula, trouxe consequências drásticas a esse campo de estudo (Birkhead & Møller, 1998; Birkhead & Pizzari, 2002). Dentre elas, destaca-se a percepção de que a escolha criteriosa da fêmea (i.e., ‘mecanismo intersexual’), cuja importância foi negligenciada por muito tempo, poderia ser efetuada mesmo após a ocorrência da cópula ou

liberação dos gametas (Simmons, 2005). Tal fenômeno poderia ocorrer, por exemplo, em circunstâncias nas quais a fêmea é impedida de exercer escolha pré-copulatória – como em casos em que cópulas coercivas são impostas à fêmea – ou em espécies com fertilização externa (Birkhead, 2010). Adicionalmente, mesmo em cenários em que a execução de cópulas múltiplas ocorre por ação da própria fêmea, esta poderia deter o poder de escolha sobre o esperma de quais machos seria armazenado ou mesmo utilizado para fertilizar seus ovócitos (Birkhead & Pizzari, 2002; Andersson & Simmons, 2006).

A participação da fêmea nos processos pós-copulatórios, controlando a fertilização de seus ovócitos e regendo o sucesso reprodutivo dos machos, é denominada de ‘escolha críptica da fêmea’ (Thornhill & Alcock, 1983). Mecanismos de escolha críptica já foram descritos para animais com fertilização interna e externa e podem ser exemplificados pelo controle da fêmea quanto ao momento de ovulação ou fecundação de seus ovócitos, pelo transporte diferencial de espermatozoides de diferentes machos dentro de seu trato reprodutivo ou até mesmo através da manipulação ou expulsão de esperma de parceiros indesejados (Birkhead & Møller, 1993b; Eberhard, 1996). Além disso, a própria interação entre seus fluidos ovarianos e espermatozoides de diferentes machos também pode ser responsável por enviesar a paternidade de sua prole em direção a um macho de sua preferência (Gasparini *et al.* 2020), conforme mecanismos descritos em maiores detalhes no item 1.2 abaixo.

O reconhecimento quanto à existência da poliandria, associada à existência de órgãos especializados no armazenamento de espermatozoides nas fêmeas, evidenciou que, de forma similar à escolha da fêmea, a disputa entre machos (ou seja, o mecanismo ‘intrassexual’) também poderia persistir após a execução da cópula, através de um processo denominado de ‘competição espermática’. Tal fenômeno – o qual não está restrito apenas a espécies com fertilização interna e que apresentem órgãos de estoque de esperma na fêmea (Parker, 1998) – engloba a competição, não entre dois ou mais indivíduos entre si, mas sim entre seus espermatozoides, pela fertilização de um determinado conjunto de ovócitos (Parker, 1970).

Desde sua definição na década de 1970, a competição espermática tem sido um dos focos majoritários das pesquisas no âmbito da seleção sexual (Andersson & Simmons, 2006). Inúmeros estudos, principalmente aqueles que envolvem manipulações de animais em laboratório, sob condições controladas, visam a verificar o resultado de tal competição entre machos rivais – i.e., quais gametas são priorizados na fertilização dos ovócitos da fêmea – ao sujeitarem uma fêmea experimental a cópulas sequenciais com dois machos. Em tais casos, é

comum que o resultado da competição pós-copulatória seja expresso através da proporção da prole fertilizada pelo segundo (i.e., último) macho que copula com a fêmea, parâmetro comumente conhecido como  $P_2$  (Birkhead & Møller, 1998; Simmons, 2014).

Diversos fatores podem influenciar o padrão de utilização de espermatozoides pela fêmea e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo de machos competidores. A participação da fêmea e a interação entre gametas masculinos e femininos, mencionados acima, podem contribuir potencialmente para o sucesso diferencial entre machos (Birkhead & Møller, 1993b; Firman, 2020). Além disso, em inúmeras espécies, a ordem de execução de cópulas sequenciais é um fator importante na determinação da taxa de paternidade de machos em competição. Em muitos casos, o último macho que copula com a fêmea antes da liberação de seus ovócitos garante a fertilização de uma maior proporção de descendentes, fenômeno conhecido como ‘precedência do último macho’ (Simmons, 2014). Em espécies com fertilização interna, tal precedência pode estar relacionada, por exemplo, à perda passiva de gametas provenientes de cópulas mais anteriores ou mesmo ao posicionamento relativo dos gametas de diferentes machos no interior do trato reprodutivo da fêmea (Birkhead, 1998). Quando não ocorre mistura de gametas no órgão de armazenamento da fêmea e esses permanecem estratificados em seu interior – ou seja, gametas de cópulas mais recentes ocupam regiões mais próximas à saída do órgão –, a precedência do último macho pode ser resultado de um mecanismo popularmente conhecido como ‘último a entrar, primeiro a sair’ (do inglês, ‘last in, first out’) (Birkhead, 1998).

Além disso, uma grande diversidade de adaptações exibidas pelos machos também pode influenciar os resultados da competição espermática (revisado em Wigby & Chapman, 2004; Simmons, 2014). Os machos podem maximizar seu sucesso reprodutivo, em detrimento a machos competidores, por meio de adaptações (comportamentais, morfológicas ou fisiológicas) que reduzem a chance de ocorrência de competição espermática. A minimização de tal disputa pode ocorrer, por exemplo, através da remoção de espermatozoides transferidos previamente por machos rivais (Birkhead & Pizzari, 2002; Wigby & Chapman, 2004) ou mesmo através do impedimento de acesso à fêmea ou a seu trato reprodutor por novos indivíduos (Simmons, 2014). Os machos podem dificultar a aproximação de seus rivais por meio de comportamentos de guarda da fêmea ou prolongamento do tempo de cópula (Simmons, 2014) ou mesmo através da transferência de substâncias (presentes em seu fluido seminal) capazes de reduzir a receptividade ou atratividade da fêmea para novas cópulas

(Avila *et al.* 2011; Ramm, 2020). Em muitas espécies, os fluidos espermáticos podem até mesmo se aglutinar quando em contato com a abertura genital da fêmea, formando os denominados “plugues seminais” (do inglês, ‘mating plugs’). Em decorrência da implantação de tais plugues, o trato reprodutivo da fêmea pode permanecer bloqueado, de forma temporária ou permanente, impedindo-a de copular novamente ou mesmo de utilizar sua reserva gamética já armazenada internamente, proveniente de cópulas prévias (Avila *et al.* 2011).

Além de mecanismos relacionados à redução da competição espermática, os machos podem também exibir adaptações que otimizem a eficiência de seus gametas em relação àqueles de seus rivais quando há competição direta pela fertilização dos ovócitos (Wigby & Chapman, 2004; Andersson & Simmons, 2006; Simmons, 2014). Uma possível estratégia associada ao engajamento em competição espermática está relacionada à maior alocação de recursos para reprodução, exemplificada pelo maior tamanho relativo do testículo e pela elevada produção espermática em espécies nas quais os indivíduos enfrentam altos níveis de competição pós-copulatória (revisado em Simmons & Fitzpatrick, 2012; Lüpold *et al.* 2020). Assim, os machos podem aumentar seu sucesso reprodutivo ao transferirem, por exemplo, maior quantidade de espermatozoides por cópula quando há maior chance de competição, como já evidenciado para diversos táxons (Wedell *et al.* 2002; delBarco-Trillo, 2011; Kelly & Jennions, 2011).

A transferência de um volume maior de gametas à fêmea pode ser vantajosa quando o sucesso reprodutivo de determinado indivíduo é proporcional à quantidade relativa de seus espermatozoides competindo pela fecundação dos ovócitos<sup>1</sup>, ou mesmo quando espermatozoides mais numerosos são capazes de deslocar aqueles armazenados previamente por machos rivais (Parker, 1982, 1993; Wedell *et al.* 2002). Tal importância numérica dos espermatozoides foi enfatizada inicialmente em modelos teóricos de competição espermática, os quais prediziam que, sob maior risco<sup>2</sup> de competição, o indivíduo deveria maximizar a produção, em termos de quantidade, de seus gametas (Parker, 1982). Ainda segundo esses modelos, haveria um conflito (do inglês, ‘trade-off’) quanto ao investimento em diferentes atributos dos espermatozoides. Assim, considerando a quantidade limitada de energia alocada

---

<sup>1</sup> Fenômeno conhecido como ‘efeito loteria’ (do inglês, ‘raffle principle’), i.e., quando a probabilidade de fertilização é diretamente proporcional ao número de espermatozoides transferidos pelo macho (Parker, 1982).

<sup>2</sup> Corresponde à probabilidade de a fêmea copular com mais de um macho durante o período reprodutivo (Parker, 1998).

à produção espermática, ao priorizar o número de gametas, o tamanho do espermatozoide deveria ser, em contrapartida, reduzido (Parker, 1982, 1993).

Curiosamente, evidências contrastantes têm sido encontradas em diferentes espécies quanto à relação entre o investimento quantitativo em espermatozoides e os níveis de competição espermática enfrentados pelos machos. Isso porque, enquanto em inúmeras espécies constata-se uma relação direta entre o risco de competição e o número de espermatozoides transferidos (delBarco-Trillo, 2011; Kelly & Jennions, 2011), investigações recentes têm evidenciado que, não raramente, o número de gametas inseminados na fêmea não é suficiente para explicar o sucesso reprodutivo diferencial entre machos (Snook, 2005; Pizzari & Parker, 2009; Simmons & Fitzpatrick, 2012; Fitzpatrick & Lüpold, 2014). Atributos qualitativos, tais como velocidade, viabilidade e longevidade, também podem aumentar a eficiência de fertilização dos espermatozoides sob competição espermática (e.g., Snook, 2005; Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Magris, 2021). Além disso, substâncias presentes nos fluidos seminais também podem influenciar a qualidade dos produtos ejaculatórios de determinado macho e, conseqüentemente, sua performance quando em competição espermática (e.g., Poiani, 2006; Ramm, 2020).

Um dos atributos qualitativos que se destaca na literatura diz respeito ao tamanho dos espermatozoides (Lüpold *et al.* 2020). Apesar de modelos teóricos clássicos sugerirem que o comprimento dos gametas deveria evoluir de forma independente às pressões de competição espermática (Parker, 1993), observa-se que, em diversos táxons, o tamanho dos espermatozoides pode, de fato, estar relacionado ao nível de competição enfrentada pelos machos (revisado em Lüpold *et al.* 2020). Espermatozoides mais alongados podem, por exemplo, ser mais resistentes à remoção e diluição, mais eficientes no bloqueio da entrada do órgão de armazenamento de esperma da fêmea ou ainda no deslocamento e substituição de gametas previamente inseminados por machos rivais (Pizzari & Parker, 2009; Immler *et al.* 2011). Adicionalmente, o tamanho dos espermatozoides pode estar associado à quantidade de reservas energéticas disponíveis ao gameta (Tourmente *et al.* 2013), as quais, conseqüentemente, podem ser destinadas a outros atributos qualitativos que podem influenciar o sucesso reprodutivo de determinado macho quando em competição espermática. Maiores reservas de ATP podem ser alocadas, por exemplo, à propulsão dos flagelos, conferindo maior velocidade de natação ao gameta (e.g., Gomendio & Roldan, 2008; Tourmente *et al.* 2013). Além disso, maiores provisões de energia podem ser direcionadas à manutenção de sua

viabilidade por períodos mais extensos, conferindo assim maior longevidade aos gametas (e.g., Rowe *et al.* 2013).

## 1.2. CONTEXTOS DE FERTILIZAÇÃO

O reconhecimento quanto à importância dos mecanismos de seleção sexual pós-copulatória no contexto evolutivo permitiu, ao longo das últimas décadas, muitos avanços na compreensão de como eles estão, em muitos casos, diretamente associados à evolução de adaptações morfológicas e fisiológicas nos produtos ejaculatórios dos machos, particularmente nos atributos dos espermatozoides (Pizzari & Parker, 2009; Simmons & Fitzpatrick, 2012; Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Lüpold *et al.* 2020). No entanto, um aspecto que tem recebido ênfase ao longo dos últimos anos refere-se às particularidades dos diferentes contextos de fertilização aos quais os espermatozoides de diferentes espécies – ou até mesmo de diferentes indivíduos dentro da mesma espécie (ver item 2.2 abaixo) – estão sujeitos, e como tais singularidades também podem influenciar a evolução fenotípica dos gametas masculinos (Simmons & Fitzpatrick, 2012; Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Taborsky *et al.* 2018; Fitzpatrick *et al.* 2020). As condições locais do ambiente onde ocorre a fecundação dos ovócitos, a morfologia do trato reprodutor ou do órgão de armazenamento de espermatozoides no interior da fêmea e o intervalo temporal entre a inseminação e a fertilização, por exemplo, podem exercer pressões seletivas, concomitantemente à seleção sexual pós-copulatória, capazes de moldar a evolução dos produtos ejaculatórios (Snook, 2005; Fitzpatrick, 2020; Fitzpatrick *et al.* 2020).

Em geral, tanto o ambiente físico onde gametas femininos e masculinos interagem quanto o intervalo entre inseminação e fecundação são contrastantes entre animais com fertilização externa e interna (Fitzpatrick, 2020). Dessa forma, é possível que os gametas masculinos estejam sujeitos a forças seletivas divergentes, particulares a cada caso (Gomendio & Roldan, 2008; Rowe *et al.* 2013; Fitzpatrick, 2020). Em animais com fertilização externa, a liberação dos gametas de ambos os sexos normalmente ocorre de forma sincronizada e, brevemente após sua difusão no ambiente, a fecundação dos ovócitos é iniciada. Nessas circunstâncias, um dos atributos dos espermatozoides que parece lhes conferir maior vantagem na competição espermática corresponde ao número de gametas liberados (revisado em Fitzpatrick, 2020). Isso porque, com a liberação de um grande número



de gametas pelo indivíduo, as chances de colisão de seus espermatozoides com os ovócitos da fêmea elevam-se, em concordância com o cenário de ‘efeito loteria’ descrito acima (Parker, 1982, 1993).

Além da quantidade de espermatozoides liberados, o tamanho dos gametas também pode ser um atributo importante em espécies com fertilização externa (Ball & Parker, 1996; Fitzpatrick, 2020). Isso porque, como já descrito acima, o tamanho dos espermatozoides pode estar diretamente relacionado a sua velocidade de natação (Fitzpatrick, 2020). De acordo com essa lógica, espermatozoides de maiores tamanho, muitas vezes portadores de flagelos mais alongados, deveriam proporcionar maior mobilidade ao gameta – e, portanto, maior competitividade durante o deslocamento em direção aos ovócitos (modelo de ‘fertilização continuada’, Ball & Parker, 1996). Dado o intervalo tipicamente curto entre liberação dos gametas no ambiente e o momento da fertilização, espermatozoides mais velozes poderiam, deste modo, colidir com os gametas femininos mais rapidamente, garantindo assim maior sucesso reprodutivo ao macho (Parker, 1993; Ball & Parker, 1996).

Dada a grande diversidade quanto a certos aspectos reprodutivos em espécies com fertilização interna, tais como a variabilidade no hiato temporal entre cópula e fertilização e a existência de órgãos de armazenamento de espermatozoides, estima-se que diferentes atributos dos espermatozoides possam conferir maior vantagem a determinado indivíduo na competição espermática, dependendo da biologia da espécie (Gomendio & Roldan, 2008; Immler *et al.* 2011). Em espécies de grande tamanho corporal, por exemplo, especula-se que os machos devam transferir maior número de gametas por cópula, dadas as altas taxas de mortalidade e diluição de espermatozoides no ambiente inóspito do trato reprodutor da fêmea (Immler *et al.* 2011; Lüpold & Fitzpatrick, 2015). Em outras espécies, em contrapartida, espermatozoides maiores podem ser competitivamente superiores na fertilização de ovócitos (Gomendio & Roldan, 2008; Tourmente *et al.* 2013). Em muitas espécies de mamíferos, nas quais o intervalo temporal entre cópula e fertilização é relativamente curto (Birkhead & Møller, 1993a), espermatozoides maiores, cuja energia destina-se à maior propulsão dos flagelos e velocidade de natação, podem ter maior sucesso na fecundação dos ovócitos (Gomendio & Roldan, 2008; Tourmente *et al.* 2013). Já em inúmeras espécies de artrópodes e aves, por outro lado, nas quais há uma separação temporal extensa ou incerta entre os dois processos (Birkhead & Møller, 1993a; Rowe *et al.* 2013), espermatozoides maiores, cuja energia é alocada na conferência de maior longevidade, podem ser capazes de permanecer

viáveis por períodos prolongados no interior da fêmea, conferindo maior vantagem ao indivíduo na competição espermática (e.g., Rowe *et al.* 2013).

Em espécies com fertilização interna, diversos estudos sugerem também que a própria estrutura do local de armazenamento de espermatozoides no interior da fêmea possa influenciar a evolução fenotípica dos gametas masculinos (e.g., Dybas & Dybas, 1981; Briskie *et al.* 1997; Fitzpatrick *et al.* 2020). Em besouros do gênero *Bambara*, por exemplo, a morfologia dos espermatozoides parece intimamente relacionada às dimensões da própria espermateca da fêmea, indicando uma estreita coevolução entre ambas as estruturas (Dybas & Dybas, 1981). De forma semelhante, comparações entre diferentes espécies de aves Passeriformes evidenciaram que o tamanho dos gametas masculinos é diretamente proporcional à extensão dos túbulos de armazenamento no sistema reprodutor feminino (Briskie *et al.* 1997). Nesse último caso, tal afinidade parece permitir que os gametas consigam preencher completamente o espaço do órgão, podendo tanto prevenir a entrada de novos espermatozoides quanto dificultar sua remoção por potenciais competidores (Briskie *et al.* 1997). Dado que a existência de um órgão de armazenamento de espermatozoides permite uma sobreposição de gametas de sucessivos machos por longos períodos e assim a ocorrência de altas taxas de competição espermática e escolha críptica da fêmea (Birkhead & Møller, 1993a; Orr & Zuk, 2014), tais resultados evidenciam como as pressões de seleção sexual pós-copulatória, em associação com a própria morfologia do trato reprodutor da fêmea, podem influenciar a morfologia dos espermatozoides e juntos serem importantes determinantes no sucesso reprodutivo de machos rivais (Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Lüpold & Pitnick, 2018; Fitzpatrick *et al.* 2020).

Quando a fertilização é interna, o trato reprodutor da fêmea constitui o ambiente onde ocorre não somente a competição entre gametas de machos rivais, mas também o local onde os gametas precisam percorrer e sobreviver até o momento da fertilização (Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Firman, 2020). Neste contexto, estudos recentes têm evidenciado que as interações entre os gametas masculinos e o próprio ambiente físico do sistema reprodutor da fêmea também podem ser responsáveis por modular o comportamento e fisiologia de espermatozoides (Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Lüpold & Pitnick, 2018; Firman, 2020). Adicionalmente, compostos químicos presentes nos fluidos ovarianos ou até mesmo produzidos pelos ovócitos da fêmea, tanto em espécies com fertilização interna quanto externa, podem mediar mudanças na performance dos espermatozoides, como sua velocidade

de natação e mobilidade (Gasparini *et al.* 2020). Na espécie de peixe *Poecilia reticulata*, por exemplo, os fluidos ovarianos das fêmeas intensificam a velocidade de natação de espermatozoides de machos geneticamente distantes, proporcionando-lhes vantagem na competição espermática e fertilização de seus ovócitos quando comparado a machos geneticamente próximos (Gasparini & Pilastro, 2011). Mesmo em espécies com fertilização externa, os fluidos ovarianos, responsáveis pela formação de uma matriz extracelular externamente aos ovócitos, também podem ser responsáveis por influenciar, de forma diferencial, a velocidade de natação, trajetória ou mesmo longevidade de espermatozoides de machos rivais (e.g., Alonzo *et al.* 2016; Poli *et al.* 2019). Interações entre os gametas masculinos e os compostos liberados pelas fêmeas sugerem um papel importante de escolha críptica, no qual as fêmeas seriam capazes de exercer influência no desempenho dos gametas de diferentes machos e, conseqüentemente, sobre seu sucesso reprodutivo (Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Poli *et al.* 2019; Gasparini *et al.* 2020).

Adicionalmente à possibilidade de influência dos fluidos ovarianos da fêmea, a performance dos espermatozoides também pode ser regulada, de forma positiva ou negativa, por meio de sua interação com gametas ou fluidos seminais liberados por machos rivais (den Boer *et al.* 2010; Locatello *et al.* 2013). Em himenópteros, por exemplo, o fluido seminal liberado por um macho exerce efeito deletério sobre os gametas de machos rivais, reduzindo sua viabilidade e sobrevivência (den Boer *et al.* 2010). Em contraste, na espécie de peixe *Salvelinus alpinus*, a mobilidade dos espermatozoides torna-se significativamente maior quando na presença de fluidos seminais de machos rivais do que quando em seu próprio esperma (Rudolfson *et al.* 2015). Tais resultados, somados àqueles descritos nos parágrafos anteriores, ilustram a dificuldade ao se definir qualquer predição sobre quais atributos qualitativos dos espermatozoides devem influenciar ou determinar o sucesso reprodutivo diferencial entre machos. A fertilização dos ovócitos da fêmea pelos gametas de determinado indivíduo não depende apenas de suas características intrínsecas, mas também de sua habilidade de interação com compostos produzidos pela fêmea ou por seus ovócitos, com seu trato reprodutor ou mesmo com gametas de machos rivais. Estima-se que a incorporação dos diferentes aspectos relacionados ao contexto local onde os gametas competem acarretará em importantes contribuições ao campo da seleção sexual pós-copulatória e ao conhecimento sobre os fatores determinantes do sucesso reprodutivo dos machos (Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Lüpold & Pitnick, 2018; Fitzpatrick *et al.* 2020; Gasparini *et al.* 2020).

## 2. TÁTICAS ALTERNATIVAS DE REPRODUÇÃO

Em espécies nas quais machos e fêmeas copulam com diversos parceiros ao longo de seu período reprodutivo, a competição intrasexual pode ocorrer de forma intensa e é comum que exista uma disparidade quanto ao sucesso reprodutivo de diferentes indivíduos (Shuster & Wade, 2003). No caso dos machos, por exemplo, enquanto alguns indivíduos são bem sucedidos em disputas físicas e na monopolização de territórios e fêmeas, outros, em contrapartida, obtêm pouco ou nenhum êxito. Nesse cenário, ao invés de disputarem fisicamente pela aquisição de parceiras com indivíduos de qualidade superior e não conquistarem qualquer sucesso, machos em desvantagem em relação à forte competição com potenciais rivais podem adotar comportamentos distintos (e muitas vezes furtivos) – comumente conhecidos como ‘táticas alternativas de reprodução’ – que os permitam atingir sucesso na competição reprodutiva (revisado em Oliveira *et al.* 2008). Como consequência, tanto machos que empregam comportamentos territoriais quanto aqueles que expressam comportamentos furtivos podem prosperar na aquisição de parceiras e na geração de descendentes, resultando na manutenção, ao longo das gerações, de machos com comportamentos divergentes e descontínuos dentro da mesma população (Gross, 1996).

Tal diversidade fenotípica dentro de uma mesma espécie, já descrita para diversos táxons de invertebrados e vertebrados, pode envolver não somente discontinuidades comportamentais, mas também dimorfismo intrasexual quanto a traços morfológicos, fisiológicos e de ciclo de vida entre os indivíduos (Oliveira *et al.* 2008). De forma geral, machos maiores (conhecidos como territoriais, parentais ou ‘consorts’) dispõem de estruturas energeticamente custosas e elaboradas para combates físicos e monopolização de parceiras e adotam táticas dominantes, enquanto machos menores (chamados de parasitas, oportunistas ou ‘sneakers’) são desprovidos de armamentos e ornamentos e adotam estratégias furtivas para acessar as fêmeas (Gross, 1996; Oliveira *et al.* 2008).

A expressão de fenótipos alternativos pode ser resultante de genótipos polimórficos ou de polifenismos (Oliveira *et al.* 2008). No segundo caso, todos os machos da população são capazes de desenvolver ambos os fenótipos e a expressão do dimorfismo masculino é controlada por uma estratégia condicional (revisado em Gross, 1996; Tomkins & Hazel, 2007). Neste caso, a expressão fenotípica depende de o indivíduo atingir ou não um limiar (do inglês, ‘threshold’) geneticamente determinado, fenômeno este que depende da interação entre seu genótipo e características intrínsecas do próprio animal (e.g., idade, tamanho

corporal, condição nutricional) e ambientais (e.g., densidade populacional, proporção de machos) (Tomkins & Hazel, 2007). Assim, machos que atingem determinado limiar crítico (e.g., de tamanho corporal) desenvolvem armamentos ou ornamentos utilizados para monopolização de fêmeas e combates com machos rivais e, conseqüentemente, beneficiam-se da adoção de táticas dominantes; já aqueles que não atingem tal limiar não desenvolvem estruturas custosas e, ao contrário dos anteriores, adotam comportamentos furtivos para acessar as fêmeas (Gross, 1996; Tomkins & Hazel, 2007).

Em diversas espécies de artrópodes, a expressão de táticas alternativas de reprodução está relacionada à condição nutricional do indivíduo durante o estágio larval e é irreversível, ou seja, não varia ao longo da vida adulta do macho (e.g., Smallegange, 2011). Em ácaros, por exemplo, a expressão do morfotipo dominante ('fighter') depende do estado nutricional do indivíduo durante um período crítico ao longo de seu desenvolvimento. Animais em melhor condição nutricional durante os últimos instares larvais detêm energia necessária para maior crescimento, suficiente para ultrapassar o limiar de tamanho necessário para desenvolver estruturas utilizadas no combate físico com rivais e, conseqüentemente, para a adoção do morfotipo dominante. Machos submetidos a condições nutricionais de menor qualidade, em contrapartida, têm menor crescimento, não desenvolvem armamentos e, conseqüentemente, adotam táticas furtivas para acessar as fêmeas ('scramblers') (Smallegange, 2011).

A expressão de táticas alternativas de reprodução também pode ocorrer de forma plástica ao longo da vida do animal, ao invés de ser irreversível (Oliveira *et al.* 2008). Neste caso, os indivíduos podem, por exemplo, alternar de um comportamento para outro múltiplas vezes ao longo da vida, de acordo com as condições ambientais enfrentadas momentaneamente (e.g., presença de machos competidores) (e.g., Taborsky, 1994). Além disso, tal alternância entre táticas pode ocorrer uma única vez na vida, ao longo do desenvolvimento ontogenético do próprio indivíduo (e.g., Bleeker *et al.* 2017). Neste caso, essa mudança ocorre de forma sequencial, podendo estar relacionada, por exemplo, à idade e/ou tamanho do indivíduo. Machos mais jovens e de menor tamanho beneficiam-se da expressão de comportamentos furtivos, enquanto que, conforme continuam a crescer ao longo da vida, posteriormente alternam para a adoção de táticas dominantes quando maiores e mais velhos (Oliveira *et al.* 2008).

## 2.1. COMPETIÇÃO ESPERMÁTICA

Os modelos teóricos de competição espermática estimam que os machos devam possuir uma quantidade de energia limitada para investirem em reprodução, dados os demais gastos energéticos necessários para crescimento somático e manutenção de seu metabolismo. Como consequência, estima-se que deva existir um ‘trade-off’ entre a alocação de recursos energéticos para atributos reprodutivos relacionados à competição pré- e pós-copulatória (revisado em Parker, 1998; Parker *et al.* 2013). Maiores investimentos em traços pré-copulatórios (e.g., tamanho corporal, armamentos, ornamentos, comportamento de guarda da fêmea) tipicamente aumentam as chances de aquisição e monopolização de parceiras através da competição intrasexual, enquanto que maiores investimentos em atributos pós-copulatórios (e.g., tamanho relativo do testículo, produção espermática) podem aumentar, em contrapartida, a competitividade do macho na competição espermática (Parker *et al.* 2013; Simmons *et al.* 2017). De acordo com essa lógica, destinar maior energia a atributos pós-copulatórios pode aumentar os ganhos obtidos por cópula, mas, por outro lado, deverá reduzir o número de cópulas efetuadas por determinado indivíduo (Wedell *et al.* 2002).

Nesse contexto, estima-se que o investimento total em reprodução e a cada cópula deva estar relacionado à magnitude de competição espermática enfrentada por determinado indivíduo, ou seja, ao número de machos disputando por determinado conjunto de ovócitos (Wedell *et al.* 2002; Simmons *et al.* 2017; Magris, 2021). Sob maior risco de competição espermática, estima-se que os machos devam aumentar proporcionalmente a alocação de recursos para produtos ejaculatórios por fêmea, reduzindo, conseqüentemente, sua busca por novas parceiras, por exemplo (Parker, 1998; Parker *et al.* 2013). Curiosamente, no entanto, o comportamento individual quanto ao fracionamento de recursos para diferentes atributos reprodutivos não é necessariamente o mesmo para todos os machos na população. Em espécies nas quais os machos adotam táticas alternativas de reprodução, a disputa pós-copulatória pode ser assimétrica, com machos dimórficos enfrentando níveis desiguais de competição (Parker, 1990; Parker *et al.* 2013). Isso porque machos dominantes, os quais tipicamente possuem características sexuais secundárias conspícuas e custosas, conseguem prevenir o acesso de seus adversários a parceiras sob sua guarda e, conseqüentemente, enfrentam menor risco de competição espermática (Parker, 1990). Machos oportunistas, por sua vez, não apresentam armamentos e adotam comportamentos subordinados na competição intrasexual pré-copulatória, sendo incapazes de impedir o acesso de outros machos a suas

parceiras. Como resultado, machos oportunistas estão sujeitos a maiores riscos de competição espermática (Parker, 1990).

Associada à ideia de ‘trade-off’ entre investimento pré- e pós-copulatório apresentada acima, tal assimetria nas pressões de competição espermática enfrentada por machos dimórficos pode resultar em divergências quanto à alocação de recursos para produtos ejaculatórios e armamentos (Parker *et al.* 2013; Simmons *et al.* 2017). Assim, enquanto machos territoriais tipicamente beneficiam-se ao destinar seus recursos à competição pré-copulatória, espera-se que machos oportunistas, por sua vez, invistam relativamente mais em atributos relacionados à competição pós-copulatória (Kustra & Alonzo, 2020). De fato, em inúmeros táxons, machos subordinados caracterizam-se tanto por maiores tamanhos relativos do testículo quanto pela transferência de maior número de gametas durante a cópula (revisado em Kustra & Alonzo, 2020).

Além de influenciarem a produção e transferência de gametas de forma desigual, pressões assimétricas de competição espermática entre machos que adotam táticas alternativas de reprodução também podem ser responsáveis pela evolução de espermatozoides qualitativamente diferentes entre indivíduos da mesma espécie (e.g., Taborsky *et al.* 2018; Kustra & Alonzo, 2020). Machos oportunistas podem investir em espermatozoides de maior qualidade, em termos de performance ou competitividade (e.g., mobilidade, Miller *et al.* 2019; longevidade, Ota *et al.* 2010; proporção de espermatozoides móveis, Locatello *et al.* 2007), como uma forma de sobrepujar sua desvantagem comportamental. No peixe *Lepomis macrochirus*, por exemplo, espermatozoides de machos ‘sneakers’ contêm maiores reservas energéticas e atingem maiores velocidades do que gametas de machos parentais (Burness *et al.* 2004). Desse modo, mesmo liberando menores volumes de espermatozoides no ambiente do que machos parentais, a velocidade de natação superior dos gametas de machos ‘sneakers’ parece conferir-lhes maior competitividade ao longo do percurso em direção aos ovócitos. Como resultado, quando em competição direta pelo mesmo conjunto de ovócitos, machos subordinados detêm maior sucesso reprodutivo do que machos parentais (Burness *et al.* 2004).

## 2.2. CONTEXTOS DE FERTILIZAÇÃO VS. TÁTICAS ALTERNATIVAS DE REPRODUÇÃO

Em espécies nas quais os machos adotam táticas alternativas de reprodução, não é incomum que machos dominantes e oportunistas apresentem diferenças temporais e espaciais nos processos de inseminação e fecundação (Locatello *et al.* 2007; Taborsky *et al.* 2018; Miller *et al.* 2019; Kustra & Alonzo, 2020). Em geral, machos territoriais mantêm as fêmeas sob sua guarda durante o período reprodutivo, o que lhes confere acesso privilegiado sobre o local e momento da fertilização. Machos oportunistas, por sua vez, precisam expelir seus espermatozoides a maiores distâncias de uma parceira potencial ou a intervalos mais extensos da liberação dos ovócitos pela fêmea (Locatello *et al.* 2007; Poli *et al.* 2018; Miller *et al.* 2019). Nesse contexto, gametas de machos que adotam diferentes táticas podem estar sujeitos a pressões seletivas divergentes, resultando em uma variação intraespecífica quanto à morfologia e fisiologia dos espermatozoides e influenciando também o sucesso reprodutivo relativo de cada macho (Locatello *et al.* 2007; Poli *et al.* 2018; Taborsky *et al.* 2018).

Na espécie de peixe *Xiphophorus nigrensis*, por exemplo, a fertilização é interna e os gametas masculinos podem permanecer armazenados no interior da fêmea por meses (Smith & Ryan, 2010). Machos ‘sneakers’, os quais têm poucas oportunidades de copular com as fêmeas sob a guarda de machos dominantes, têm espermatozoides com maior longevidade, atributo este que lhes permite permanecer viáveis por mais tempo no interior da fêmea e possivelmente competir pela fertilização dos ovócitos no momento da desova (Smith & Ryan, 2010). Nas espécies *Telmatochromis vittatus* e *Gobius niger*, por outro lado, a fertilização é externa e machos territoriais têm controle sobre a entrada dos ninhos, local onde a fêmea instala-se e libera seus ovócitos (Locatello *et al.* 2007; Ota *et al.* 2010). Em ambos os casos, machos subordinados exibem uma desvantagem comportamental e também espacial, uma vez que expõem seus gametas a maiores distâncias da fêmea, externamente à entrada dos ninhos. Em sintonia com tal desvantagem, observa-se que espermatozoides de machos ‘sneakers’ são qualitativamente superiores àqueles de machos dominantes em ambas as espécies (Locatello *et al.* 2007; Ota *et al.* 2010). Curiosamente, no entanto, a seleção quanto aos atributos qualitativos dos gametas de machos ‘sneakers’ parece associada aos contextos de fertilização intrínsecos a cada espécie. Em *T. vittatus*, por exemplo, espermatozoides de machos ‘sneakers’ têm maior longevidade do que aqueles de machos territoriais. Dado que, nessa espécie, a liberação dos ovócitos pela fêmea é prolongada, tal atributo parece aumentar as chances de tais espermatozoides fertilizarem os ovócitos da fêmea conforme estes chegam ao



interior do ninho (Ota *et al.* 2010). Em *G. niger*, em contrapartida, estima-se que espermatozoides de machos ‘sneakers’ devam enfrentar elevadas taxa de diluição, associadas tanto ao longo trajeto percorrido até a entrada dos ninhos quanto ao desacoplamento temporal entre a liberação de seus gametas e dos ovócitos da fêmea. Nessa espécie, machos ‘sneakers’ não somente liberam maiores volumes de gametas do que machos dominantes, mas também espermatozoides com maior longevidade e maior velocidade de natação. Dadas as particularidades quanto aos contextos de fertilização da espécie, é possível que diferentes atributos (quantitativos e qualitativos) possam permitir, em conjunto, que gametas de machos ‘sneakers’ possam competir pela fertilização dos ovócitos da fêmea (Locatello *et al.* 2007).

Já na espécie *Lamprologus callipterus*, machos com táticas divergentes têm comportamentos peculiares, contrários à situação tipicamente descrita para machos dimórficos. Isso porque nessa espécie os machos parasitas têm tamanho diminuto (sendo, por isso, denominados ‘anões’) e conseguem adentrar a concha de caramujo que a fêmea utiliza como ninho para depositar seus ovos. Já machos territoriais, cujos tamanhos corporais são muito maiores, permanecem apenas externamente à entrada do ninho. Tal cenário curioso confere uma vantagem espacial aos machos ‘anões’, capazes de liberar seus gametas a uma distância menor dos ovócitos não-fecundados da fêmea. Nesses peixes, espermatozoides de machos parasitas têm maior velocidade inicial (i.e., logo após sua liberação) do que aqueles de territoriais, mas sua mobilidade decresce rapidamente. Machos territoriais, por sua vez, têm espermatozoides com maior reserva energética, destinada à manutenção de sua longevidade por um período mais extenso, em detrimento de sua velocidade, a qual é reduzida (Taborsky *et al.* 2018). Tal exemplo particular ilustra como, em adição às pressões assimétricas de competição espermática entre machos dimórficos, os diferentes contextos de fertilização e fatores ambientais aos quais os gametas estão sujeitos também podem exercer pressões seletivas diferentes (e até opostas) sobre machos dimórficos, moldando a evolução fenotípica divergente entre seus espermatozoides (Taborsky *et al.* 2018; Kustra & Alonzo, 2020).

Como descrito em detalhes no item 1.2 acima, outros atributos qualitativos dos produtos ejaculatórios, em adição aos próprios espermatozoides, também podem evoluir sob as pressões seletivas assimétricas de competição espermática e, conseqüentemente, influenciar o sucesso reprodutivo dos machos (Kustra & Alonzo, 2020). Na espécie *G. niger*, por exemplo, os fluidos seminais produzidos pelos machos territoriais parecem influenciar

positivamente o sucesso reprodutivo de tais machos. Isso porque, apesar de machos ‘sneakers’ produzirem espermatozoides qualitativamente superiores (como descrito acima) (Poli *et al.* 2018), estes exibem taxas de fertilização inferiores àquelas de machos dominantes. Tal constatação parece relacionada aos fluidos seminais produzidos por esses últimos machos, cujas propriedades são capazes de modificar a performance de seus gametas, elevando sua velocidade a níveis similares àquela de espermatozoides de machos ‘sneakers’ (Poli *et al.* 2018). Curiosamente, no entanto, os gametas de machos ‘sneakers’ não são afetados pela presença de fluidos seminais de machos rivais (Poli *et al.* 2018).

Na espécie *Zosterisessor ophiocephalus*, em contrapartida, os fluidos seminais produzidos por cada tipo de macho parecem exercer efeitos específicos sobre a performance dos gametas de seus adversários (Locatello *et al.* 2013). Nessa espécie em particular, machos territoriais e ‘sneakers’ não diferem quanto a atributos qualitativos (e.g., velocidade, viabilidade, concentração de ATP) de seus gametas, mas sim quanto à quantidade de espermatozoides e fluidos seminais expelidos por ambos. Machos territoriais liberam menor número de gametas, mas em contrapartida ejaculam maiores quantidades de fluidos seminais do que machos ‘sneakers’. Curiosamente, espermatozoides de machos ‘sneakers’, quando na presença de fluidos seminais de machos territoriais, aumentam cerca de 10% de sua velocidade e, conseqüentemente, de sua eficácia de fertilização. Seus fluidos seminais, em contrapartida, exercem um efeito deletério sobre gametas de machos territoriais, reduzindo sua mobilidade e performance (Locatello *et al.* 2013). Tais resultados são interessantes ao evidenciarem como machos subordinados podem aumentar a competitividade de seus espermatozoides, não somente através de atributos diretamente relacionados a seus próprios gametas e propriedades de seus fluidos seminais, mas também através da exploração quanto ao investimento em fluido seminal realizado por machos rivais (Locatello *et al.* 2013).

Por fim, estima-se também que a performance dos gametas, a dinâmica de competição espermática e o sucesso reprodutivo de machos com fenótipos alternativos possam ser mediados pela interação entre os produtos ejaculatórios dos machos e os fluidos ovarianos produzidos pelas fêmeas (Gasparini *et al.* 2020; Kustra & Alonzo, 2020), conforme já descrito em detalhes no item 1.2 acima. Na espécie *Onchorhynchus tshawytscha*, por exemplo, ensaios em laboratório evidenciaram que, quando machos competem entre si em meio aquoso, os gametas dos machos subordinados têm melhor performance (i.e., velocidade de natação) do que aqueles de machos dominantes, conferindo maiores taxas de paternidade aos primeiros.

Curiosamente, no entanto, quando na presença de fluidos ovarianos, espermatozoides de machos dominantes exibem um acréscimo de cerca de 25% em sua velocidade de natação – enquanto que a performance de gametas de machos subordinados permanece inalterada. Como consequência, quando na presença de fluidos da fêmea, ambos os machos obtêm taxas similares de sucesso reprodutivo (Lehnert *et al.* 2017). Na espécie *Symphodus ocellatus*, em contrapartida, os fluidos ovarianos da fêmea elevam a velocidade de natação dos gametas de ambos os morfotipos de forma semelhante, sem afetar de forma distinta os gametas de machos com fenótipos alternativos (Alonzo *et al.* 2016). Apesar disso, os fluidos ovarianos elevam, indiretamente, a vantagem dos gametas de machos dominantes, uma vez que estes já exibem naturalmente velocidades mais elevadas do que aqueles de machos ‘sneakers’. Por essa razão, esses últimos machos obtêm menor sucesso reprodutivo, mesmo liberando maiores volumes de espermatozoides do que machos dominantes (Alonzo *et al.* 2016). Esses resultados evidenciam, novamente, a participação da fêmea na manipulação dos resultados da competição espermática e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo de machos dimórficos (Gasparini *et al.* 2020; Kustra & Alonzo, 2020). Através de mecanismos de escolha críptica da fêmea, esta é capaz de enviesar a dinâmica de fertilização de seus ovócitos, seja para beneficiar machos de sua preferência ou mesmo para garantir maior variabilidade genética em sua prole (Alonzo *et al.* 2016; Lehnert *et al.* 2017).

### **3. LULAS LOLIGINIDAE (MOLLUSCA: CEPHALOPODA)**

As lulas, em conjunto com os polvos, sépias, lulas-vampiro e náutilos, correspondem aos principais representantes viventes da classe Cephalopoda (filo Mollusca). Exclusivamente marinhos, os cefalópodes constituem um grupo fascinante dentre os invertebrados, dada sua admirável capacidade cognitiva e percepção sensorial, as quais lhes permitem a exibição de comportamentos altamente complexos, exemplificados por sua rápida habilidade de camuflagem ao ambiente (Hanlon & Messenger, 2018). Com exceção aos náutilos, os quais exibem uma concha calcária externa robusta, os cefalópodes são tipicamente caracterizados pela presença de um manto altamente muscular, responsável não somente por envolver externamente e proteger a massa visceral, mas também pela execução dos movimentos de jato-propulsão, necessários para a locomoção e ventilação das brânquias do animal (Boyle & Rodhouse, 2005; Hanlon & Messenger, 2018). Além disso, o grupo caracteriza-se pela presença de uma região cefálica altamente desenvolvida, a qual abriga os órgãos sensoriais, o

aparato bucal e um cérebro complexo, considerado o maior dentre todos os táxons de invertebrados (Hanlon & Messenger, 2018). A região cefálica também abriga os apêndices (i.e., braços e tentáculos) utilizados na comunicação intraespecífica, locomoção, reprodução e alimentação (Hanlon & Messenger, 2018).

A espécie-modelo da presente Tese de Doutorado, *Doryteuthis pleii* (Blainville, 1823), pertence à família de lulas Loliginidae. Sua morfologia, similar àquela das demais espécies da família, caracteriza-se pela presença de uma cabeça conspícua e um corpo alongado, o qual abriga internamente a massa visceral e uma concha quitinosa (denominada de ‘gládio’) (Boyle & Rodhouse, 2005). Externamente, há um par de nadadeiras na região posterior do manto e um total de dez apêndices (i.e., oito braços e dois tentáculos alongados) na extremidade anterior do corpo, circundando a região bucal do animal. Além disso, como ocorre tipicamente em lulas Loliginidae, indivíduos do sexo masculino apresentam um de seus braços modificados. Este braço, denominado de hectocótilo, é responsável pela transferência dos espermatóforos do macho para o corpo da fêmea durante a execução da cópula (Jereb & Roper, 2010). Curiosamente, a morfologia, número e posição do hectocótilo no macho são característicos da espécie, o que torna a estrutura um importante caráter taxonômico (Nesis, 1995). Na espécie de estudo, por exemplo, os machos apresentam apenas um hectocótilo, o qual corresponde ao braço ventral esquerdo do indivíduo (Jereb & Roper, 2010).

Os membros da família Loliginidae são considerados os principais representantes da classe Cephalopoda na zona nerítica (i.e., costeira) dos oceanos, sendo encontrados tanto nas zonas tropicais quanto temperadas do globo (Jereb & Roper, 2010). Com seu hábito pelágico e característica gregária, principalmente durante o período reprodutivo, essa família é considerada de grande importância comercial para a pesca (Perez *et al.* 2002). A espécie de estudo, em particular, tem distribuição geográfica ampla na zona costeira oeste do Oceano Atlântico, desde a Argentina até a região central dos Estados Unidos (Jereb & Roper, 2010). No caso das populações estudadas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, seu ciclo de vida é anual e a reprodução ocorre durante o ano todo, com um pico reprodutivo mais elevado durante os meses de verão e outono, menos expressivo, durante o inverno (Perez *et al.* 2002).

### 3.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA

Os representantes da família Loliginidae são animais altamente sociais (Hanlon & Messenger, 2018). Machos e fêmeas apresentam comportamentos promíscuos, acasalando com múltiplos parceiros durante a estação reprodutiva – fato evidenciado pela ocorrência frequente de paternidade múltipla no grupo (e.g., Shaw & Sauer, 2004; Iwata *et al.* 2005; Naud *et al.* 2016). Em geral, os indivíduos adultos encontram-se nas áreas de desova comum, onde formam agregados reprodutivos de centenas a milhares de animais e envolvem-se na exibição de comportamentos reprodutivos complexos (Hanlon *et al.* 1997; Hanlon, 1998). A maioria das interações observadas, sejam elas entre indivíduos do mesmo sexo ou entre animais do sexo oposto, ocorre de forma visual e é mediada por mudanças posturais, locomotoras ou por alterações rápidas da coloração do corpo via cromatóforos (Hanlon *et al.* 1999). As interações mais frequentemente observadas envolvem a exibição de comportamentos agonísticos e combates físicos entre machos rivais e comportamentos de guarda da fêmea antes e após a cópula, além da adoção de cópulas múltiplas com inúmeros parceiros (Hanlon, 1998).

Além disso, uma característica adicional quanto à biologia reprodutiva de lulas Loliginidae está relacionada à adoção de táticas alternativas de reprodução por machos de diferentes tamanhos dentro de uma mesma espécie, temática abordada em maiores detalhes nos Capítulos 1 e 2 da presente Tese de Doutorado (Apostólico & Marian, 2020 e Marian *et al.* 2019, respectivamente). Em geral, machos de maior tamanho (denominados ‘consorts’) pareiam-se temporariamente às fêmeas e realizam cópulas na posição ‘paralela’, depositando seus espermatozoides no interior da cavidade do manto da fêmea, próximo à abertura do oviduto. Estes machos tendem a permanecer próximos às suas parceiras antes e após a execução da cópula, defendendo-as do assédio de outros machos ‘consorts’ (Hanlon, 1998; Iwata *et al.* 2005). Caracteristicamente, esses machos copulam com a fêmea sob sua guarda somente quando esta se encontra próxima ao momento de liberação de seus ovócitos ou mesmo durante a ocorrência da desova (Drew, 1911). Machos de menor porte (denominados ‘sneakers’), em contrapartida, não engajam em competições físicas com outros machos e copulam furtivamente, na posição ‘frontal’, com as fêmeas sob a guarda de machos ‘consorts’. Nesse caso, os espermatozoides são depositados próximos ao receptáculo seminal, estrutura de fundo cego localizada na região ventral da membrana peribucal da fêmea (Hanlon, 1998).

A adoção de táticas alternativas de reprodução dentro de uma mesma espécie é um tema muito bem documentado na literatura dos loliginídeos e já foi averiguada em diversos representantes do grupo (e.g., Hanlon *et al.* 1997; Iwata *et al.* 2005; Apostólico & Marian, 2018a). Apesar disso, investigações dedicadas à compreensão quanto aos mecanismos responsáveis pela determinação fenotípica dos machos ou ainda quanto ao tipo de expressão de tais morfotipos, seja ele irreversível ou plástico, ainda são praticamente inexistentes na literatura do grupo (e.g., Hanlon *et al.* 1997; Iwata & Sakurai, 2007; Apostólico & Marian, 2018b). Estima-se que, mesmo em espécies filogeneticamente próximas, a expressão de fenótipos alternativos ocorra de forma distinta. Enquanto na espécie *Heterololigo bleekeri* presume-se que a adoção de táticas alternativas ocorra de forma irreversível ao longo da vida do indivíduo (Iwata & Sakurai, 2007), nas espécies do gênero *Doryteuthis* sugere-se que as táticas alternativas sejam plásticas, com os machos alternando entre estratégias diferentes inúmeras vezes ao longo da vida, de acordo com o contexto momentâneo (*D. pealeii*; Hanlon *et al.* 1997), ou uma única vez, de acordo com seu desenvolvimento ontogenético (*D. pleii*; Apostólico & Marian, 2018b).

Na espécie de estudo da presente Tese de Doutorado, a hipótese ontogenética quanto à adoção de táticas alternativas de reprodução baseou-se na constatação quanto à existência de machos ‘intermediários’ na população. Curiosamente, esses machos não só apresentam tamanho e idade intermediários entre os já conhecidos machos ‘sneakers’ e ‘consorts’, mas também características peculiares quanto à morfologia dos produtos ejaculatórios armazenados em seu sistema reprodutor (Apostólico & Marian, 2018b). Isso porque, além de apresentarem simultaneamente espermatóforos, espermatângios (i.e., espermatóforos evertidos) e espermatozoides com morfologias similares àquelas encontradas tipicamente em machos ‘sneakers’ e ‘consorts’, são encontrados também produtos ejaculatórios únicos, com morfologia e funcionamento intermediários entre aqueles característicos de ambos os morfotipos (Apostólico & Marian, 2018b). De acordo com tal hipótese ontogenética, machos jovens e de menor tamanho devem adotar majoritariamente táticas oportunistas de ‘sneakers’, ao invés de competirem com machos ‘consorts’ pela monopolização de fêmeas. Posteriormente, com a progressão de seu crescimento somático, deve ocorrer uma modificação gradual de seus produtos ejaculatórios e comportamento reprodutivo, período este caracterizado pelo estágio de transição (i.e., pelo fenótipo ‘intermediário’), antes de se tornarem machos ‘consorts’ ao final da vida (Apostólico & Marian, 2018b).

### 3.2. EVOLUÇÃO FENOTÍPICA DOS PRODUTOS EJACULATÓRIOS

Estudos recentes realizados com diferentes loliginídeos têm evidenciado que, dentro de uma mesma espécie, machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ diferem entre si não somente quanto a aspectos comportamentais (e.g., posição de cópula, adoção de comportamentos agonísticos e de guarda da fêmea), mas também quanto à morfologia funcional de seus produtos ejaculatórios, tais como espermátóforos, espermatângios e espermatozoides – tema revisado em maiores detalhes nos Capítulos 1 e 2 da presente Tese (Apostólico & Marian, 2020 e Marian *et al.* 2019, respectivamente). Na espécie *D. pleii*, por exemplo, seguindo as previsões dos modelos de competição espermática, machos ‘sneakers’ alocam relativamente mais recursos para produção espermática do que ‘consorts’, com estes últimos investindo relativamente mais em crescimento somático (Apostólico & Marian, 2018a). Curiosamente, no entanto, o investimento elevado de machos ‘sneakers’ em atributos reprodutivos não é traduzido na transferência de maior volume de gametas durante a cópula. Isso porque, conforme já averiguado não somente em *D. pleii* mas também em *H. bleekeri*, machos ‘consorts’ produzem espermátóforos maiores, com maior volume de espermatozoides (Iwata & Sakurai, 2007; Apostólico & Marian, 2018a). Machos ‘sneakers’, por sua vez, investem em produtos ejaculatórios morfológica e funcionalmente distintos àqueles tipicamente encontrados em machos ‘consorts’ (Iwata *et al.* 2011; Hirohashi *et al.* 2016a, b; Apostólico & Marian, 2017, 2018a).

Tais diferenças quanto ao investimento espermático e aos produtos ejaculatórios entre machos dimórficos parecem refletir adaptações distintas associadas às pressões divergentes de competição espermática enfrentadas por cada morfotipo (Apostólico & Marian, 2018a; ver também Kustra & Alonzo, 2020). Além disso, dois aspectos da biologia reprodutiva dos loliginídeos parecem conferir forças seletivas adicionais (e distintas) sobre os produtos desses machos, relacionadas ao ambiente e momento da fertilização: a variação nos intervalos entre os eventos de cópula e desova e a existência de dois sítios de deposição de espermátóforos na fêmea. Esse assunto constitui uma das principais temáticas dos Capítulos 1 e 2 da presente Tese (Apostólico & Marian, 2020 e Marian *et al.* 2019, respectivamente) e, portanto, será apenas brevemente resumido ao longo dessa seção.

Fêmeas de lulas Loliginidae, mesmo quando ainda sexualmente imaturas, são frequentemente encontradas com espermatozoides armazenados no interior de seus receptáculos seminais, o que sugere que cópulas com machos ‘sneakers’ devam ocorrer ao

longo de um período considerável de suas vidas e que os espermatozoides de tais machos possam ser retidos por períodos extensos no interior de seus órgãos de armazenamento (e.g., Hanlon, 1998; Shashar & Hanlon, 2013). Curiosamente, enquanto o intervalo entre os eventos de cópula com machos ‘sneakers’ e o momento da desova são altamente variáveis no grupo, cópulas envolvendo fêmeas e machos ‘consorts’, por outro lado, são geralmente seguidas quase imediatamente pela postura de ovos (Drew, 1911). Em sintonia com tal característica, estima-se que a liberação lenta de espermatozoides e sua propriedade de agregação, típicas dos produtos ejaculatórios de machos ‘sneakers’, possam garantir, por exemplo, sua permanência próxima ao receptáculo até o momento de liberação dos ovócitos pela fêmea (Apostólico & Marian, 2017). Além disso, a longevidade dos gametas pode ser um atributo importante, dada a existência de um receptáculo seminal e o desacoplamento entre cópula e ocorrência de desova (Snook, 2005; Pizzari & Parker, 2009). Em sintonia com tal ideia, já foi constatado que, ao menos na espécie *H. bleekeri*, espermatozoides de machos ‘sneakers’ têm maior longevidade do que aqueles de machos ‘consorts’ (Hirohashi *et al.* 2016b).

Dada a existência de dois sítios de fertilização nas fêmeas de lulas Loliginidae, um com localização mais externa (i.e., membrana peribucal) e outro mais confinado (i.e., membranas oviduciais no interior da cavidade do manto), é plausível suspeitar também que existam diferenças quanto às condições locais entre os dois ambientes (e.g., Iwata *et al.* 2011; Hirohashi *et al.* 2016a). Espermatozoides maiores e com propriedade de agregação, tipicamente encontrados em machos ‘sneakers’ das espécies *H. bleekeri* e *D. pleii*, poderiam garantir, por exemplo, melhor resistência à diluição, dada sua permanência no sítio mais externo da fêmea (Iwata *et al.* 2011; Apostólico & Marian, 2017). Adicionalmente, a localização particular dos dois sítios de fertilização também confere diferenças temporais quanto ao momento de colisão dos gametas de machos ‘consorts’ e ‘sneakers’ com os ovócitos da fêmea. Espera-se que, enquanto espermatozoides de machos ‘consorts’ tenham acesso prioritário aos ovócitos liberados do oviduto, aqueles provenientes de machos ‘sneakers’ entrem em contato com os ovócitos apenas quando a massa de ovos passa pela região peribucal da fêmea, antes de ser depositada no substrato (Shaw & Sauer, 2004; Iwata *et al.* 2005; Buresch *et al.* 2009). Dada a desvantagem espacial e temporal de seus gametas, estima-se que machos ‘sneakers’ se beneficiem ao investirem menos por cópula (i.e., através da produção de espermatóforos menores e com menor volume de espermatozoides), o que lhes permitiria, conseqüentemente, investir em maior número de cópulas com diferentes parceiras (Apostólico & Marian, 2018a).



Por fim, é plausível hipotetizar também que a morfologia única dos espermatângios de machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ esteja intimamente associada à própria estrutura dos sítios de fertilização da fêmea (e.g., Apostólico & Marian, 2018a), conforme já constatado em diversos táxons de vertebrados e invertebrados (ver item 2.2). É possível, por exemplo, que a morfologia dos espermatângios típicos de machos ‘sneakers’, com formato de clava e pequeno tamanho, garanta-lhes maior proteção e ancoragem aos tecidos da fêmea – dada sua permanência no sítio mais externo e mais sujeito à turbulência e diluição – ou facilite a migração dos espermatozoides para o interior do receptáculo seminal – dada a menor distância entre as aberturas dos espermatângios e do órgão de armazenamento da fêmea (Apostólico & Marian, 2018a). De forma similar, é plausível que, enquanto tenham um posicionamento subótimo ao sítio mais externo da fêmea, os espermatângios mais alongados de machos ‘consorts’ exibam, por outro lado, melhor potencial de ancoragem e implantação próximo às membranas oviduciais da fêmea, sendo mais eficazes na resistência aos movimentos vigorosos de contração do manto executados pela fêmea (Apostólico & Marian, 2017, 2018a).

De forma similar ao que tem sido observado em inúmeros táxons, estudos recentes com lulas da família Loliginidae têm demonstrado que os contextos de fertilização são componentes importantes na evolução fenotípica divergente dos produtos ejaculatórios em espécies cujos machos adotam táticas alternativas de reprodução (e.g., Taborsky *et al.* 2018; Kustra & Alonzo, 2020). Além disso, dada a existência de dois sítios de fertilização nas fêmeas, algo atípico em Metazoa, estima-se que o sistema de acasalamento de lulas Loliginidae poderá constituir um importante modelo para a compreensão de como as diferenças espaciais e temporais entre os sítios, integrada às pressões assimétricas de competição espermática e à possível escolha críptica da fêmea, podem influenciar não somente a evolução e manutenção de fenótipos alternativos dentro de uma espécie, mas também a dinâmica de fertilização dos ovócitos das fêmeas.

#### **4. JUSTIFICATIVA**

À época da redação do Projeto de Pesquisa que resultou na presente Tese de Doutorado, estudos realizados com o loliginídeo *D. pleii* já haviam constatado a existência de dimorfismo intrasexual entre machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ quanto à morfologia funcional

de seus produtos ejaculatórios, conforme detalhado no item 3.2 acima (Apostólico & Marian, 2017, 2018a). Dadas as descrições existentes na literatura, a presente Tese visou a aprofundar o conhecimento a respeito de machos dimórficos quanto a outras estruturas associadas à reprodução, tais como os hectocótilos. Apesar de trabalhos prévios não detectarem qualquer dimorfismo intrasexual quanto ao tamanho de tal estrutura entre machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ (Iwata & Sakurai, 2007; Apostólico & Marian, 2018a), seria plausível especular a existência de outras diferenças em tais estruturas entre os dois tipos de macho – relacionadas, possivelmente, a sua morfologia funcional. Ao menos na espécie *D. pleii*, por exemplo, machos que adotam táticas alternativas de reprodução não exibem qualquer dimorfismo intrasexual quanto ao tamanho relativo de seus espermatóforos, mas sim quanto à morfologia e funcionamento de tais estruturas (Apostólico & Marian, 2017, 2018a).

Em concordância com tal ideia e com a existência de dois sítios de fertilização na fêmea associados à adoção de táticas alternativas de reprodução em machos, é razoável hipotetizar que características distintas quanto à morfologia funcional de hectocótilos entre machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ possam estar relacionadas, por exemplo, ao implante diferencial de espermatóforos nos dois sítios. Dadas às diferenças espaciais entre os dois locais, somadas às propriedades teciduais características de cada um (Marian, 2012), é possível que os hectocótilos de machos dimórficos auxiliem, de forma desigual, na fixação adequada de espermatóforos, garantindo assim o implante apropriado aos diferentes sítios da fêmea. Vale ressaltar, no entanto, que a validação de tal conjectura depende do conhecimento prévio quanto à morfologia funcional e composição glandular de tal estrutura, tópicos inexplorados até o presente. Apesar de sua importância taxonômica e na reprodução de cefalópodes de uma forma geral, poucos trabalhos até o momento contemplaram uma descrição detalhada quanto à morfologia de hectocótilos (e.g., Nesis, 1995; Bello, 2020). Investigações detalhadas quanto à tal estrutura, envolvendo técnicas de microscopia de luz e eletrônica, ainda eram inexistentes na literatura do grupo à época de redação da presente Tese de Doutorado.

Como descrito em detalhes no item 3.2 acima, estima-se que em lulas Loliginidae as pressões divergentes de competição espermática e quanto aos contextos de fertilização enfrentadas por machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ estejam intimamente relacionadas à evolução fenotípica divergente entre seus produtos ejaculatórios. Além disso, é razoável considerar ainda que tais características distintas entre os dois fenótipos possam influenciar também os

padrões de sucesso reprodutivo obtidos por machos que adotam táticas alternativas de reprodução no grupo, quando estes competem entre si pela fertilização de um mesmo conjunto de ovócitos. Em sintonia com tal proposta, diversos autores têm sugerido, por exemplo, que machos ‘consorts’ devam deter maiores taxas de paternidade da prole do que machos ‘sneakers’, dado o acesso privilegiado de seus gametas, localizados próximos às membranas oviduais (i.e., no sítio de fertilização mais interno da fêmea), aos ovócitos liberados diretamente pelo oviduto (Iwata *et al.* 2005; Buresch *et al.* 2009; Shashar & Hanlon, 2013). Apesar de tal concepção quanto ao sucesso reprodutivo de machos com fenótipos alternativos, a dinâmica de fertilização das cápsulas de ovos e a importância relativa de cada sítio em loliginídeos ainda é pouco conhecida. Não há, até o presente, qualquer trabalho que tenha comparado formal e empiricamente o sucesso reprodutivo entre machos que adotam táticas alternativas no grupo e que, conseqüentemente, depositam seus gametas em sítios espacialmente diferentes no interior da fêmea. Além disso, não há registro de nenhum trabalho, até o momento, que tenha elucidado de forma efetiva o papel dos machos ‘sneakers’ – e de gametas localizados no sítio de fertilização mais externo (membrana peribucal) – na paternidade da prole, os quais são majoritariamente negligenciados ou vistos apenas como responsáveis pela fecundação de uma parcela restrita de ovócitos da fêmea.

Apesar do conhecimento limitado quanto ao papel dos machos que adotam táticas furtivas na dinâmica de fertilização das desovas em loliginídeos, é possível especular que eles devam ter uma participação importante na fertilização dos ovócitos das fêmeas. Sabe-se, por exemplo, que inúmeros machos ‘sneakers’ podem copular com fêmeas durante ou antes mesmo do início da estação reprodutiva e que seus gametas podem permanecer armazenados por períodos incertos no interior do receptáculo seminal de suas parceiras (Hanlon, 1998; Shashar & Hanlon, 2013). Evidências oriundas de diferentes táxons sugerem que a sobrevivência de gametas masculinos no interior de um órgão de armazenamento especializado na fêmea traz diversas implicações para a dinâmica de fertilização da espécie, uma vez que permite não somente o provisionamento de espermatozoides em situações em que os processos de cópula e fecundação dos ovócitos são desacoplados temporalmente, mas também a ocorrência de seleção sexual pós-copulatória (Birkhead & Møller, 1993a; Naud *et al.* 2005; Orr & Zuk, 2014). Em concordância com tais informações, é razoável esperar que, em loliginídeos, ocorra intensa competição espermática entre gametas situados no sítio de fertilização mais externo das fêmeas. No entanto, apesar do reconhecimento quanto à importância do receptáculo seminal em lulas Loliginidae e da constatação indireta de que

gametas provenientes do seu interior participem na fertilização dos ovócitos da fêmea (e.g., Iwata *et al.* 2005; Buresch *et al.* 2009; Naud *et al.* 2016), não há nenhum estudo até o momento que tenha investigado a diversidade genética de espermatozoides estocados em órgãos de armazenamento de Loliginidae ou mesmo estimado o número de machos ‘sneakers’ que tipicamente copulam com a fêmea e que podem potencialmente participar da desova.

De fato, dentre os cefalópodes, há somente um trabalho realizado nesse âmbito, o qual amostrou espermatozoides contidos no interior do receptáculo seminal e em espermátangios implantados externamente ao órgão em fêmeas da sépia *Sepia apama* (Naud *et al.* 2005). Em sépias, no entanto, não é possível diferenciar espermátangios de machos ‘sneakers’ e ‘consorts’, uma vez que, ao contrário das lulas Loliginidae, machos que adotam táticas alternativas de reprodução executam somente um tipo de cópula (cópula frontal) e depositam seus espermatóforos, os quais são morfológicamente similares, próximos ao receptáculo seminal da fêmea (Hanlon & Messenger, 2018). Em loliginídeos, ao contrário, sabe-se que, ao menos em algumas espécies, apenas machos ‘sneakers’ executam cópulas frontais e que estes depositam seus espermátangios (com morfologia típica) próximos à região peribucal da fêmea (e.g., Iwata & Sakurai, 2007; Apostólico & Marian, 2018a). Por essa razão, a quantificação quanto à variabilidade genética de espermatozoides armazenados no receptáculo seminal pode trazer importantes contribuições ao entendimento a respeito do papel potencial de machos ‘sneakers’ – e, conseqüentemente, do sítio mais externo da fêmea – na fertilização dos ovócitos em loliginídeos.

Ainda em sintonia com a ideia de ocorrência de altos níveis de competição espermática entre machos ‘sneakers’ em loliginídeos, um estudo recente, realizado com a espécie *D. pleii*, descreveu uma possível adaptação inédita desse grupo de machos, possivelmente associada à alta competição entre seus gametas e aqueles de machos rivais, também presentes no interior do receptáculo seminal da fêmea (Saad *et al.* 2018). Os autores detectaram a presença de espermátangios em formato de clava, típicos de machos ‘sneakers’, inseridos no interior do receptáculo seminal de fêmeas após a execução de cópula frontal, obstruindo total ou parcialmente sua abertura (Saad *et al.* 2018). Dado que espermátangios de machos ‘sneakers’ são tipicamente encontrados apenas na cutícula que permeia externamente o órgão, os autores sugeriram que o posicionamento de tais estruturas em seu interior poderia atuar como um plugue seminal. Isso porque a oclusão da abertura do receptáculo seminal impediria que espermatozoides inseminados previamente por outros machos e já armazenados

no interior do órgão fossem utilizados pela fêmea para fertilização de seus ovócitos, beneficiando assim o último macho a copular com a fêmea antes da desova ('precedência do último macho') (Saad *et al.* 2018). Para testar tal hipótese, no entanto, ainda será necessário contrastar a presença de possíveis plugues seminais e as taxas de sucesso reprodutivo obtidas por machos que executaram cópulas frontais previamente ao seu implante – algo ainda inexistente para a espécie de estudo.

Além da competição pós-copulatória entre machos, estima-se a possibilidade de participação da fêmea na manipulação do sucesso reprodutivo de seus parceiros (Hanlon, 1998; Shashar & Hanlon, 2013). Nos cefalópodes *Sepiadarium austrinum* (Sepiadariidae) e *Idiosepius paradoxus* (Idiosepiidae), por exemplo, as fêmeas são capazes de remover ou mesmo ingerir espermatângios implantados na região de seus braços, mecanismo possivelmente associado à adoção de escolha críptica (e.g., Wegener *et al.* 2013; Sato *et al.* 2017). Em lulas Loliginidae, em contrapartida, há poucas especulações a respeito da participação da fêmea na dinâmica de fertilização de seus ovócitos (e.g., Shaw & Sauer, 2004; Buresch *et al.* 2009; Naud *et al.* 2016). No entanto, dada a existência de dois sítios de armazenamento de espermatozoides, é plausível especular que a fêmea exerça algum domínio sobre o armazenamento ou mesmo sobre a utilização da reserva de espermatozoides armazenados no interior do receptáculo seminal (Hanlon, 1998; Shaw & Sauer, 2004; Shashar & Hanlon, 2013). Tal controle poderia permitir, por exemplo, uma forma de beneficiar ou impedir o sucesso reprodutivo do macho 'sneaker', seja através da exposição (ou não) das cápsulas de ovos aos gametas estocados no receptáculo seminal ou mesmo através do controle sobre o tempo em que seus ovócitos serão mantidos em cada sítio de fertilização (Hanlon, 1998; Shashar & Hanlon, 2013; Naud *et al.* 2016). É plausível considerar também que a fêmea seja capaz de manipular ou até mesmo ejetar espermatângios implantados no interior da cavidade do manto (i.e., oriundos de machos 'consorts'), por meio do controle da intensidade ou frequência das contrações do manto durante a expulsão de água (Buresch *et al.* 2009; Shashar & Hanlon, 2013). Por meio de tais mecanismos, as fêmeas poderiam, como consequência, influenciar o sucesso reprodutivo de machos 'sneakers' e 'consorts' na paternidade de sua prole (Hanlon, 1998; Shaw & Sauer, 2004; Shashar & Hanlon, 2013).

O detalhamento quanto ao comportamento reprodutivo, mecanismos de armazenamento e utilização de espermatozoides pela fêmea e às diferenças no sucesso reprodutivo entre machos que utilizam diferentes sítios de fertilização ('sneakers' vs.

‘consorts’) em lulas Loliginidae mostrar-se-á uma adição importante para o entendimento quanto à evolução da poliandria e dinâmica de táticas alternativas de reprodução em cefalópodes. Adicionalmente, dada a complexidade quanto a aspectos de sua biologia e comportamento reprodutivo, incluindo a adoção de táticas alternativas de reprodução associadas à existência de dois sítios espacialmente distintos de fertilização, espera-se que esse grupo taxonômico possa trazer importantes contribuições à compreensão integrada dos mecanismos de competição espermática e escolha críptica da fêmea, bem como constituir um modelo inédito para investigações quanto à interação entre seleção sexual e contextos de fertilização em Metazoa.

## 5. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente Tese de Doutorado foi investigar o sucesso reprodutivo de machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ na espécie *Doryteuthis pleii* e os possíveis mecanismos envolvidos na competição pós-copulatória entre machos dimórficos e entre machos pertencentes ao mesmo morfotipo. Além disso, este trabalho também almejou aprofundar o conhecimento a respeito do comportamento reprodutivo de machos ‘intermediários’ e quanto ao dimorfismo intrasexual masculino na espécie de estudo. Mais especificamente, a Tese foi dividida em dois subprojetos, cada um com suas respectivas perguntas:

(1) Adoção de táticas alternativas vs. sucesso reprodutivo dos machos: (1a) Considerando que há um receptáculo seminal nas fêmeas, qual o número potencial de machos ‘sneakers’ que podem participar na fertilização da desova? (1b) Cópulas com mais de um macho resultam em paternidade múltipla na desova? (1c) Em condições experimentais em cativeiro, machos ‘intermediários’ adotam comportamentos reprodutivos semelhantes àqueles de machos ‘sneakers’, ‘consorts’ ou de ambos os morfotipos? (1d) Quando a fêmea possui gametas disponíveis em ambos os sítios de fertilização (membranas peribucal e oviducal) no momento da desova – i.e., machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ competem entre si pela fertilização de um mesmo conjunto de ovócitos –, como se distribui a paternidade da prole entre machos que adotam cópulas frontais e paralelas? (1e) Quando a fêmea possui gametas disponíveis apenas no sítio de fertilização mais externo (membrana peribucal) no momento da desova (i.e., não há cópula recente com macho ‘consort’), como a paternidade da prole se distribui entre machos que adotam cópulas frontais a diferentes intervalos do momento da desova? Há

alterações na dinâmica de fertilização quando comparado a experimentos em que a fêmea possui gametas em ambos os sítios? (1f) Qual é o efeito de cópula frontal recente sobre espermatozoides armazenados no receptáculo seminal (i.e., provenientes de cópulas prévias)? (1g) Quando dois machos copulam sequencialmente com a mesma fêmea na posição frontal, próximo ao momento da desova, o último macho detém maior sucesso reprodutivo (i.e., há precedência do último macho)? (1h) Espermatângios implantados na região peribucal da fêmea durante a execução de cópulas frontais podem atuar como plugues seminais sobre o receptáculo seminal e influenciar o sucesso reprodutivo de machos que copularam previamente com a fêmea?

(2) Dimorfismo intrasexual masculino: (2a) Machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ diferem em relação à morfologia do hectocótilo, apêndice copulatório que auxilia na transferência de seus produtos ejaculatórios à fêmea?

## **6. METODOLOGIA BÁSICA**

### **6.1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS**

Todas as coletas realizadas durante a execução do projeto que resultou na presente Tese de Doutorado ocorreram ao longo dos anos de 2018 e 2019, durante os meses de verão (janeiro a março), período correspondente ao maior pico de reprodução da espécie de estudo nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Perez *et al.* 2002). Para a captura de todos os exemplares necessários foram realizadas 17 expedições aos pontos de coleta, localizados entre as praias da Fome e Serraria (23°43’56” S, 45°17’21” W a 23°48’26” S, 45°14’27” W), situadas na Ilha de São Sebastião, município de Ilhabela, São Paulo. Os espécimes foram capturados com a adoção de técnica de pesca artesanal de lulas utilizando ‘zangarelhos’, instrumentos de pesca compostos por anzóis chumbados. Após a captura, os espécimes foram acondicionados na embarcação em um tanque de 250 litros (L), ao qual foi acoplada uma bomba de porão para a realização de trocas periódicas da água do mar contida em seu interior.

Os animais que sobreviveram ao período de coleta na embarcação foram encaminhados ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP), onde foram alojados em tanques de 100 a 1000 L, com água do mar circulante, temperatura entre 26 e 29°C e alimentados com camarões frescos *ad libitum*. Machos e

fêmeas foram acondicionados em tanques separados e mantidos em isolamento por no mínimo 24 horas (h) para aclimação antes do início dos experimentos. O reconhecimento quanto ao sexo do indivíduo foi realizado através da observação quanto ao formato e coloração das gônadas, visíveis através do manto translúcido de animais vivos. Em machos, o testículo é caracterizado como uma estrutura esbranquiçada e conspícua na região dorsal e posterior do corpo. Nas fêmeas, por outro lado, as glândulas nidimentares acessórias, localizadas no terço anterior do corpo, são facilmente visíveis, dada sua coloração alaranjada ou avermelhada característica (Hanlon *et al.* 1999). Para o presente estudo, foram selecionados apenas indivíduos sexualmente maduros, baseando-se na escala de maturidade publicada por Perez *et al.* (2002).

Ao todo, 117 fêmeas e 124 machos foram acondicionados nos tanques do CEBIMar-USP para a execução dos ensaios e/ou obtenção de amostras para as demais abordagens propostas no Projeto de Pesquisa. A princípio, cada indivíduo seria utilizado em um único experimento. No entanto, devido à dificuldade quanto à obtenção de machos ‘sneakers’ – dada sua possível raridade na população, sua facilidade para desvencilhar-se dos anzóis de captura e/ou sua fragilidade e alta taxa de mortalidade em tanque (L.H. Apostólico, observação pessoal) –, optou-se pela reutilização de um mesmo indivíduo para mais de um experimento. Tal mudança de delineamento experimental não pareceu afetar os machos ‘sneakers’, uma vez que os mesmos têm um comportamento altamente promíscuo em cativeiro, capazes de executarem cópulas múltiplas com uma ou mais parceiras em um curto intervalo de tempo (L.H. Apostólico, observação pessoal). Além disso, a dissecação de tais machos revelou também que, ao término dos experimentos, todos ainda possuíam inúmeros espermatozoides estocados em toda a extensão de seu saco espermatofórico (órgão de armazenamento de espermatozoides prontos), inclusive na região mais distal do órgão – local onde os espermatozoides são captados pelo hectocótilo no momento da cópula. Assim, estima-se que não deva ter ocorrido depleção de seus espermatozoides devido à exposição a várias fêmeas sequencialmente. Fêmeas e machos ‘consorts’, ao contrário, foram utilizados para um único experimento e então sacrificados.

Todos os indivíduos coletados, seja para obtenção de amostras de tecidos ou para análises de biologia molecular, foram devidamente anestesiados antes da fixação do material. Para anestesia, os espécimes foram retirados individualmente do tanque e transferidos para um recipiente de plástico contendo 3 L de água do mar e 1 L de solução isotônica de cloreto



de magnésio a 7,5% (preparada em água destilada). Após constatação de total ausência de movimento, os indivíduos foram retirados da solução e dissecados de acordo com cada abordagem proposta no Projeto de Pesquisa (itens 6.5 a 6.8).

## **6.2. DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DOS MACHOS**

O primeiro passo para a realização dos experimentos em tanque foi determinar quais machos, dentre todos os espécimes capturados, pertenciam a cada morfotipo. Tal classificação foi baseada nos resultados de um trabalho prévio executado com a espécie de estudo, no qual estimou-se o limiar de tamanho (do inglês, 'switch point') que dividiria os machos, de forma geral, entre 'consorts' e 'sneakers' (Apostólico & Marian, 2018a). De acordo com esse trabalho, machos com comprimento total do manto (ML) abaixo de 169 mm seriam classificados tipicamente como 'sneakers', enquanto que os demais (ML > 169 mm) seriam majoritariamente 'consorts' (Apostólico & Marian, 2018a). Assim, previamente à realização dos experimentos, foram efetuadas medidas do comprimento total do manto de todos os machos coletados e, baseando-se na classificação acima, os machos foram categorizados em um ou outro morfotipo. É necessário ressaltar, no entanto, que a confirmação quanto ao verdadeiro morfotipo de cada macho só era possível após a dissecação do animal e análise, sob estereomicroscópio, da morfologia de seus produtos ejaculatórios. Isso porque machos 'consorts' e 'sneakers' têm espermátóforos, espermatângios e espermatozoides com morfologia e funcionamento tipicamente característicos e distintos entre si (Apostólico & Marian, 2017, 2018a). Tal confirmação mostrou-se necessária também após a constatação de que machos 'intermediários' – i.e., indivíduos que exibem uma sobreposição dentre os tamanhos de machos 'sneakers' e 'consorts' e que figuram em uma fase de transição entre os dois morfotipos conhecidos (Apostólico & Marian, 2018b) – também estariam presentes na população amostrada para os experimentos.

Machos 'intermediários' não somente apresentam idade e tamanhos intermediários entre 'sneakers' e 'consorts', mas também aspectos peculiares quanto à morfologia dos produtos ejaculatórios (i.e., espermátóforos, espermatângios e espermatozoides) armazenados em seu sistema reprodutor, incluindo estruturas com morfologias similares àquelas encontradas tipicamente apenas em 'sneakers' e 'consorts', além de uma gama de morfologias intermediárias entre eles (Apostólico & Marian, 2018b). Adicionalmente ao tamanho próximo

ao ‘switch point’ entre os morfotipos – característica que dificultava sua classificação como um ou outro morfotipo –, constatou-se também que machos ‘intermediários’ possuíam comportamentos transitórios, quanto à posição de cópula e agressividade, dentre aqueles tipicamente exibidos por machos ‘sneakers’ e ‘consorts’. Dadas essas características peculiares quanto ao tamanho e comportamento de tais machos, descritas em maiores detalhes no Capítulo 3 da presente Tese (Apostólico & Marian, 2019), seu morfotipo só podia ser confirmado após dissecação do animal e constatação quanto à presença de produtos ejaculatórios ‘intermediários’ em seu sistema reprodutor.

### **6.3. EXPERIMENTOS DE CÓPULA E DESOVA EM TANQUE**

Durante o delineamento do Projeto de Pesquisa, propôs-se inicialmente a execução de 5 (cinco) tipos de experimentos, os quais consistiriam na exposição de fêmeas a (i) um macho ‘consort’, (ii) um macho ‘sneaker’, (iii) um macho ‘sneaker’ e um ‘consort’ simultaneamente, (iv) dois machos ‘consorts’ simultaneamente ou (v) dois machos ‘sneakers’ sequencialmente (Figura 1C-G). Ao longo da execução das coletas, no entanto, alguns ensaios adicionais também envolveram inserir a fêmea no tanque, de forma não-intencional, com machos ‘intermediários’ – sozinhos ou acompanhados de um macho ‘consort’ ou ‘sneaker’ – conforme descrito em detalhes no Capítulo 3 da presente Tese (Apostólico & Marian, 2019). Ao todo, foram executados 52 experimentos em tanque; no entanto, apesar do número elevado, apenas 29 ocorreram de forma bem-sucedida, uma vez que foi observada a ocorrência de cópula e desova e os embriões desenvolveram-se até estágio próximo da eclosão. Dentre os 29 experimentos, 15 foram selecionados para as análises quanto ao sucesso reprodutivo de machos experimentais, temática explorada majoritariamente ao longo dos Capítulos 4 e 5 da presente Tese.

Após a ocorrência da desova (Figura 1H), machos e fêmeas presentes no tanque foram anestesiados para remoção de tecido para biologia molecular e amostras para análises de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme detalhado abaixo e na Figura 1. No caso das fêmeas experimentais, após a anestesia, as membranas próximas ao oviduto foram inspecionadas sob estereomicroscópio, assim como os receptáculos seminais dissecados, para a observação quanto à presença de espermátangios de machos ‘sneakers’, ‘consorts’ e/ou ‘intermediários’. Após a inspeção, os receptáculos

seminais foram fixados para análise histológica, conforme descrito no item 6.7 abaixo (Figura 1K).

#### 6.4. CULTIVO DE EMBRIÕES

Após a deposição das cápsulas de ovos em tanque, as mesmas foram recolhidas e transferidas para recipiente identificado, contendo água do mar filtrada e bomba de aeração, e mantidas em laboratório à temperatura constante de 25 °C. Para cada desova, foi realizada diariamente a troca de água do mar de seu recipiente e seu monitoramento, sob estereomicroscópio, para acompanhamento do desenvolvimento dos embriões. A determinação quanto a seu estágio de desenvolvimento baseou-se em descrições prévias, feitas para a espécie *D. pealeii* (Arnold, 1965). Baseado em artigos que também realizaram análises de paternidade com a utilização de microssatélites em lulas Loliginidae (e.g., Buresch *et al.* 2009), estipulou-se que a fixação dos embriões para extração de DNA ocorreria somente quando estes se encontrassem na fase pré-eclosão. Embriões neste estágio de desenvolvimento caracterizam-se pela apresentação de cromatóforos funcionais em seu epitélio, capacidade de contração do manto (jato-propulsão), olhos bem desenvolvidos e uma reserva de vitelo reduzida (Arnold, 1965). Para a espécie *D. pleii*, mostrou-se necessário um período de cultivo cerca de 7 a 10 dias, desde o momento da postura dos ovos pela fêmea, para que os embriões atingissem tal estágio.

Cada desova de *D. pleii* possui em média 30 cápsulas de ovos, cada uma com cerca de 60 a 80 ovos viáveis em seu interior (L.H. Apostólico, observação pessoal). Para cada experimento, cerca de cinco cápsulas de ovos foram selecionadas a partir da desova total, de forma aleatória, e dissecadas sob estereomicroscópio; as demais cápsulas foram fixadas (etanol a 100%) e armazenadas em freezer. Para cada cápsula selecionada, foram removidos 30 embriões, sendo 10 provenientes de cada região da cápsula (i.e., de suas regiões proximal, mediana e distal). Os embriões selecionados foram dissecados de suas respectivas cápsulas e acondicionados individualmente em microtubos contendo etanol a 100% para análises de paternidade.

## 6.5. GENOTIPAGEM A PARTIR DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Microsatélites são repetições nucleotídicas curtas em tandem (do inglês, ‘short tandem repeats’), encontradas em grande frequência ao longo do genoma de eucariotos e procariotos (Zane *et al.* 2002). Esses marcadores genéticos são altamente polimórficos, codominantes e fáceis de genotipar por meio de técnicas simples de amplificação via PCR (do inglês, ‘polymerase chain reaction’), características que têm permitido sua grande aplicabilidade em áreas de biologia populacional e análises de paternidade, entre outras (e.g., Zane *et al.* 2002).

Uma conquista imprescindível efetuada durante a execução da presente pesquisa refere-se à obtenção de marcadores microsatélites informativos para análises de paternidade e quantificação do sucesso reprodutivo de machos na espécie de estudo. Ao todo, foram testados 11 loci de microsatélites, desenvolvidos previamente para as espécies *D. pealeii* (Lp1, Lp2, Lp4, Lp5, Lp12 e Lfor3) (Maxwell *et al.* 2000) e *D. opalescens* (LODRb44, LODRp04, LODRp101, LODRb32 e LODRp19) (Reichow & Smith, 1999). Dentre todos os marcadores testados, três deles (LODRp19, Lp1 e Lp2) foram amplificados com sucesso durante estudos preliminares realizados com dez indivíduos de *D. pleii*. O sequenciamento posterior de tais marcadores constatou também que os três eram compostos por repetições de três nucleotídeos, de forma semelhante ao que foi descrito para as espécies nos quais eles foram amplificados (Reichow & Smith, 1999; Maxwell *et al.* 2000), evidenciando homologia entre os ‘loci’.

Após a obtenção dos resultados preliminares, um total de 99 indivíduos, coletados durante a execução das primeiras expedições ao CEBIMar-USP, foi genotipado para cada ‘locus’ com a finalidade de estimar parâmetros populacionais necessários às demais análises, calculados com o programa GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset, 1995): número e frequência de alelos, heterozigosidade esperada e observada, equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação. A frequência de alelos nulos, assim como o tamanho e possíveis erros de genotipagem dos alelos, foi checada com auxílio do programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004). Os resultados obtidos com tais análises constataram que os três marcadores selecionados eram polimórficos (i.e., com variabilidade adequada dentre os indivíduos testados) para a espécie de estudo, o que possibilitou a execução posterior dos testes de paternidade da prole com alta confiabilidade.

Para análises de biologia molecular, todas as amostras foram fixadas em etanol a 100% e armazenadas em freezer (Figura 1I). No caso dos embriões, o indivíduo inteiro foi utilizado para a extração de DNA, enquanto que, no caso dos espécimes adultos submetidos aos experimentos de cópula e desova, apenas um pedaço da nadadeira foi dissecado do animal fresco e fixado para execução dos procedimentos de biologia molecular. Para a extração total de DNA, adultos e embriões foram submetidos ao protocolo de extração da ‘Wizard Genomic DNA Purification’ (Promega, EUA). As amplificações de DNA via PCR foram realizadas no volume total de 10  $\mu$ L de solução, composta por 20 ng de DNA (*template*), 75mM de Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu$ M de dNTPs, 0.25  $\mu$ M do primer M13 (com marcador de fluorescência NED, 6-FAM ou HEX incorporado à extremidade 5’), 0.25  $\mu$ M do primer R (*reverse primer*), 0.025 do primer F (*forward primer*) (com sequência M13 incorporada à extremidade 5’) e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific).

O ciclo no termociclador consistiu em: 7 minutos iniciais de desnaturação a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de (i) 30 segundos de desnaturação a 95 °C, (ii) 30 segundos na temperatura de anelamento específica para cada marcador (i.e., 54 °C para os marcadores Lp1 e LODRp19 e 56 °C para Lp2) e (iii) 30 segundos de polimerização a 72 °C, seguidos, por fim, de um período de 3 minutos de polimerização a 72 °C. Os produtos da amplificação dos três marcadores eram então misturados ao volume de 8.925  $\mu$ L de formamida e 0.075  $\mu$ L do marcador de fluorescência GS500-ROX *size standard* (ThermoFisher). Todos os procedimentos moleculares foram realizados no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Zoologia do IBUSP. A genotipagem dos microssatélites foi realizada no Sequenciador Sanger 3730DNA, parcialmente no Laboratório GaTE Lab (‘Genomics and Transposable Elements Lab’), situado no Departamento de Botânica do IBUSP, e parcialmente no Laboratório GENIAL (‘Genome Investigation and Analysis Laboratory’), do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP). Os resultados da genotipagem foram analisados pelo programa Geneious Prime 2020.2.4 (<https://www.geneious.com>).

## 6.6. VARIABILIDADE GENÉTICA DE GAMETAS NO RECEPTÁCULO SEMINAL

Além de animais destinados aos experimentos de cópula e desova, um total de 15 fêmeas adicionais, coletadas da natureza, foram amostradas para a extração do receptáculo

seminal e genotipagem de seu conteúdo (i.e., espermatozoides armazenados no interior do órgão e contidos em espermatângios fixados a sua cutícula externa) (Figura 1A, B), afim de inferir-se o número aproximado de machos ‘sneakers’ que poderiam potencialmente participar na fertilização da desova. Após anestesia total da fêmea, seu receptáculo foi removido e colocado em placa de Petri contendo água do mar filtrada. Sob estereomicroscópio, os receptáculos foram então orientados de forma que sua abertura estivesse voltada para cima. A presença de espermatozoides armazenados no receptáculo é de fácil visualização, uma vez que o interior do receptáculo se torna opaco, ao contrário das demais regiões do tecido. Além disso, para a maioria das fêmeas analisadas, observou-se a presença de inúmeros espermatângios implantados na membrana peribucal, principalmente próximo à abertura do receptáculo.

Para remoção dos espermatozoides armazenados em seu interior, as laterais do receptáculo foram pressionadas com auxílio de pinças de ponta fina até que todo o conteúdo fosse expulso por sua abertura e o receptáculo adquirisse coloração transparente. O conteúdo de espermatozoides foi recolhido com pipeta de ponta fina, armazenado em microtubo contendo etanol a 100% e mantido em freezer (Figura 1B). Após a remoção total dos gametas do interior do órgão, os espermatângios situados externamente (i.e., fixados à cutícula externa do órgão) também foram removidos com auxílio de pinça e armazenados no mesmo microtubo contendo a reserva de espermatozoides da respectiva fêmea. Os procedimentos adotados para a extração total de DNA dos espermatozoides, amplificação de microssatélites e genotipagem foram semelhantes aos já mencionados para embriões e adultos (ver item 6.5 acima).

#### **6.7. INFERÊNCIA SOBRE PLUGUES SEMINAIS NO RECEPTÁCULO SEMINAL**

Para investigar a existência de plugues seminais em fêmeas de *D. pleii*, o receptáculo seminal de fêmeas experimentais submetidas a cópulas frontais (seja com machos ‘sneakers’ e/ou ‘intermediários’; item 6.3) foi dissecado para análise histológica quanto à presença de resquícios de espermatângios implantados internamente ao órgão (Figura 1K). Após anestesia total das fêmeas, as amostras foram dissecadas e fixadas em solução de Karnovsky modificada (paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2.5% em solução tampão de cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> a 2.5 mM, ajustado a 1000 mOsm com sacarose) (Marian,

2012) por 24 horas a 4 °C, e transferidas para solução tampão de cacodilato de sódio a 0.1M e armazenadas em geladeira.

Após o processo de fixação, as amostras de receptáculos seminais foram lavadas em água destilada e desidratadas em série alcoólica até etanol a 100% e incluídas em historresina à base de glicol metacrilato ('Leica Historesin Kit'), seguindo as instruções do fabricante. Previamente à inclusão em historresina, as amostras foram dissecadas, sob estereomicroscópio, de forma a remover o excesso de tecido externo ao receptáculo seminal. As amostras foram orientadas de forma que cortes sagitais permitissem a observação adequada e precisa da abertura do receptáculo e a verificação quanto à existência de possíveis plugues (i.e., espermatângios implantados no interior do receptáculo, obstruindo total ou parcialmente sua abertura). Cortes sagitais de 3 µm de espessura, realizados em micrótomo no Laboratório de Histologia do IBUSP, foram posteriormente submetidos à coloração com Hematoxilina de Mayer e Eosina (H&E), combinada com Ácido Periódico e Reativo de Schiff (PAS), conforme metodologia aplicada em Marian (2012). Após a coloração, as lâminas foram montadas em meio apropriado ('Entellan', Merck) e lamínula e analisadas sob microscópio óptico.

## **6.8. DIMORFISMO INTRASSEXUAL MASCULINO**

Análises histológicas e ultraestruturais dos hectocótilos de machos 'sneakers' e 'consorts' foram realizadas com o intuito de averiguar possível dimorfismo intrassexual masculino quanto à morfologia funcional de tal estrutura dentre machos que adotam táticas alternativas de reprodução na espécie (Figura 1J). Para análises histológicas, amostras de hectocótilos de machos 'sneakers' e 'consorts' foram dissecadas do animal fresco anestesiado e fixadas em paraformaldeído a 4% (em tampão PBS a 0.1M, pH 7.2), por 5 a 7 dias a 4 °C. Após este período, as amostras foram submetidas a lavagens em água destilada, desidratação alcoólica (etanol a 30, 50 e 70%) e posteriormente armazenadas em etanol a 70% a 4 °C.

Sob estereomicroscópio, as amostras de hectocótilos foram dissecadas afim de obter-se porções de 3 a 4 mm de comprimento que incluíssem a região modificada do braço – i.e., a região caracterizada pela presença de papilas na fileira dorsal do braço. Após a dissecção, as amostras foram submetidas à desidratação alcoólica até etanol a 100% e incluídas em

historresina, de forma similar ao que foi descrito acima para as amostras de receptáculos seminais de fêmeas (item 6.7). Cortes sagitais de 3 µm de espessura, realizados em micrótomo, foram posteriormente submetidos a diversos procedimentos de coloração, tais como H&E, PAS, Azul de Alcian pH 2.5 e Azul de Bromofenol, baseados em protocolos adotados previamente em Marian (2012) e Apostólico & Marian (2017). Após a coloração, as lâminas foram montadas em ‘Entellan’ e lamínula e analisadas sob microscópio óptico.

As amostras de hectocótilos para análise sob Microscópio Eletrônico de Transmissão foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (Marian, 2012), conforme descrita no item 6.7 acima, transferidas para solução tampão de cacodilato de sódio a 0.1M e armazenadas a 4 °C. Sob estereomicroscópio, as amostras foram dissecadas de forma a manter apenas regiões de interesse para análises de ultraestrutura (i.e., porções que incluíssem as papilas). As porções dissecadas, de cerca de 2 mm de comprimento, foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% (em tampão de cacodilato de sódio a 0.1 M), durante 1 h a 4 °C, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem, as amostras foram imersas em solução de acetato de uranila aquosa a 1%, por 8 a 12 h a 4 °C, seguida pela desidratação do material em série alcoólica (etanol a 70, 95 e 100%) e inclusão em resina de alta viscosidade (‘Kit Spurr’, Sigma-Aldrich). Após inclusão, secções de 70 nm de espessura foram feitas em ultramicrótomo, contrastadas em citrato de chumbo e montadas em telas de cobre, para posterior análise no Microscópio Eletrônico de Transmissão (Laboratório de Biologia Celular do IBUSP).

## **7. ESTRUTURA DA TESE**

Esta Tese de Doutorado está organizada em sete capítulos, além de duas seções adicionais, intituladas “Introdução” e “Considerações Finais”, presentes ao início e fechamento da Tese, respectivamente. Estas duas seções estão redigidas em português, enquanto que os demais capítulos estão estruturados no formato de artigos científicos e na língua inglesa. As referências citadas em cada capítulo estão padronizadas de acordo com as normas requisitadas por cada periódico internacional para o qual cada manuscrito será (ou já foi) submetido.



O Capítulo 1 da Tese, intitulado “Cephalopod mating systems as models for the study of sexual selection and alternative reproductive tactics: a review”, compreende uma extensa revisão teórica acerca da biologia reprodutiva de cefalópodes, sintetizando o conhecimento atual acerca dos temas de seleção sexual (pré- e pós-copulatória) e adoção de táticas alternativas de reprodução em lulas, sépias e polvos. O capítulo também sumariza as pesquisas recentes realizadas com lulas Loliginidae quanto aos temas supracitados, destacando como a existência de dois sítios de fertilização em fêmeas relaciona-se intimamente à evolução fenotípica dos produtos ejaculatórios de machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ no grupo. Dada a existência desse capítulo, já publicado no periódico “Bulletin of Marine Science” (Apostólico & Marian, 2020), a temática citada acima foi intencionalmente resumida ao longo da redação do item 3 da presente “Introdução”, com o intuito de evitar a repetição de informação apresentada de forma detalhada no capítulo subsequente.

O segundo capítulo da presente Tese, intitulado “Male alternative reproductive tactics and associated evolution of anatomical characteristics in loliginid squid”, apresenta um panorama multiautoral das pesquisas sobre táticas alternativas de reprodução em lulas para embasar uma nova perspectiva sobre a evolução de características anatômicas associadas a adoção de táticas divergentes. Trata-se de um trabalho em conjunto com pesquisadores expoentes da área de seleção sexual de cefalópodes, de diferentes expertises (comportamento, evolução, fisiologia e genética) e múltiplos países (África do Sul, Brasil, Canadá, E.U.A., Japão, Reino Unido e Taiwan). A ideia de confecção do Capítulo 2 surgiu durante o congresso “Cephalopod International Advisory Council Conference”, realizado na University of South Florida St. Petersburg (São Petersburgo, Flórida, E.U.A), evento que propiciou uma discussão bastante produtiva entre os especialistas em seleção sexual e evolução de Cephalopoda, resultando na proposta da elaboração desse capítulo, publicado no periódico “Frontiers in Physiology” (Marian *et al.* 2019).

O Capítulo 3 da Tese, intitulado “Behavior of ‘intermediate’ males of the dimorphic squid *Doryteuthis pleii* supports an ontogenetic expression of alternative phenotypes”, descreve as primeiras observações acerca do comportamento de machos ‘intermediários’ em cativeiro. Tais observações evidenciam que, além de exibirem tamanho, idade e morfologia reprodutiva (i.e., espermatângios, espermatóforos, comportamento de espermatozoides) intermediária entre ‘sneakers’ e ‘consorts’ (Apostólico & Marian, 2018b), tais machos também se caracterizam por uma plasticidade quanto à adoção de táticas alternativas de

reprodução, exibindo uma combinação de comportamentos (quanto a exibições agonísticas e posição de cópula) de ambos os morfotipos. Essas observações comportamentais a respeito desses machos reforçam a hipótese de que eles devam corresponder a uma fase transitória entre os fenótipos de ‘sneakers’ e ‘consorts’, sugerida previamente em Apostólico & Marian (2018b). Esse capítulo foi publicado no periódico “Frontiers in Physiology” (Apostólico & Marian, 2019).

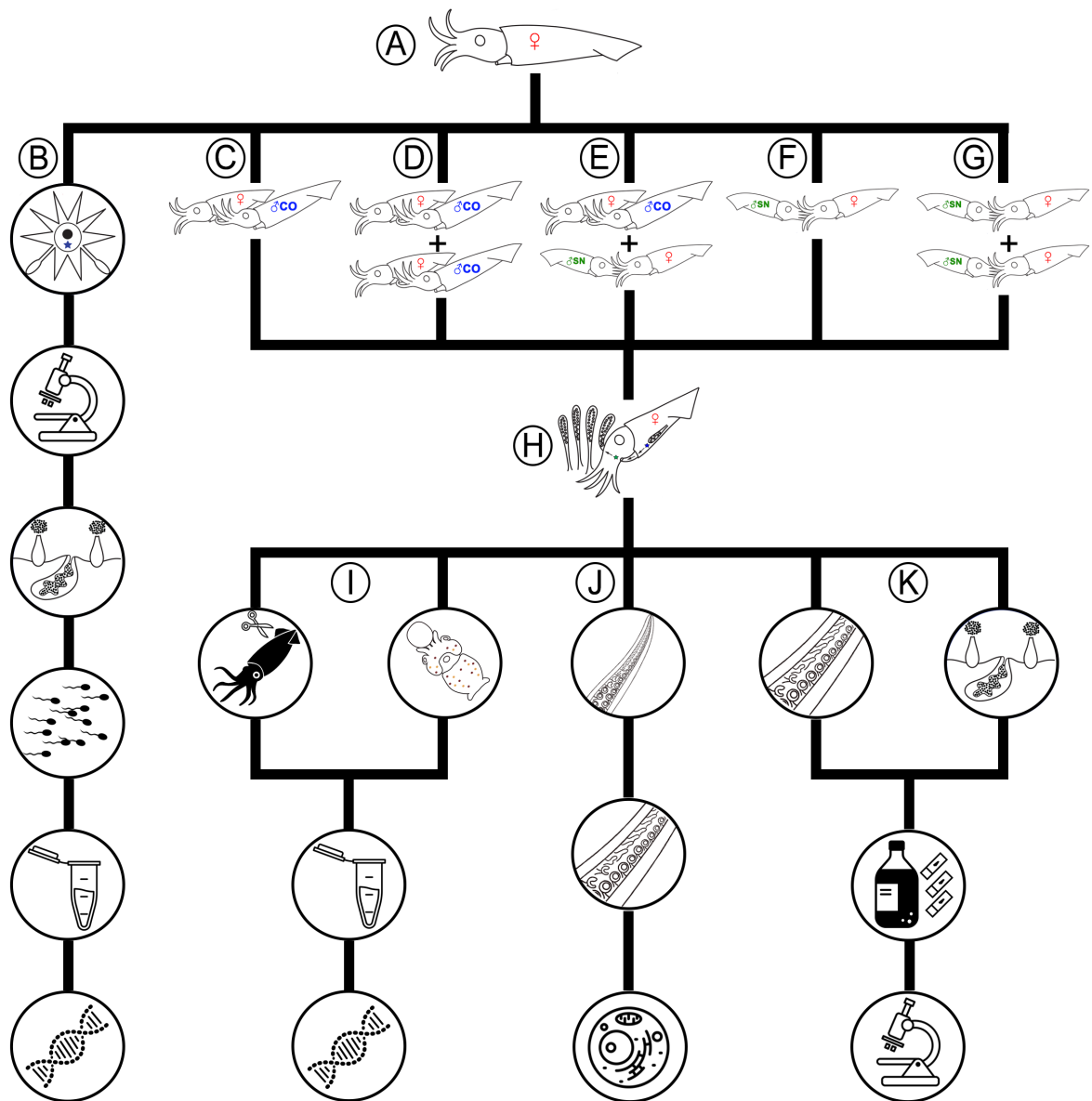
O capítulo seguinte, intitulado “Male alternative reproductive tactics reflect complex spatial and temporal dynamics of fertilization in the squid”, compreende os principais resultados quanto ao sucesso reprodutivo de machos que adotam táticas de ‘sneakers’ (i.e., cópulas frontais) e de ‘consorts’ (i.e., cópulas paralelas) na espécie de estudo. Esse capítulo abrange os resultados obtidos quanto à variabilidade genética de gametas armazenados no interior do receptáculo seminal de fêmeas e quanto aos experimentos em tanque envolvendo machos ‘sneakers’ e ‘consorts’. Tais resultados enfatizam a importância do receptáculo seminal à espécie, uma vez que tal estrutura permite o armazenamento de gametas viáveis por longos períodos e garante maior variabilidade genética à prole da fêmea. Esse capítulo também evidencia empiricamente – e de forma inédita –, como a existência de dois sítios de fertilização em fêmeas de lulas Loliginidae influencia não somente a evolução fenotípica dos produtos ejaculatórios de machos dimórficos – como enfatizado nos Capítulos 1 (Apostólico & Marian, 2020) e 2 (Marian *et al.* 2019) –, mas também seu sucesso reprodutivo quando esses competem pela fertilização de um mesmo conjunto de ovócitos. Juntos, os resultados dos Capítulos 1 a 4 destacam a importância das lulas Loliginidae como um modelo único para a compreensão dos mecanismos de seleção sexual pós-copulatória em animais.

O capítulo subsequente, intitulado “Level up! Behavioral and ejaculate switch leads to higher reproductive success in transitional males of a squid with alternative reproductive tactics”, dá continuidade aos temas apresentados nos dois capítulos anteriores, uma vez que analisa o sucesso reprodutivo de machos ‘intermediários’ durante os experimentos de cópula e desova em tanque. Os resultados apresentados no quinto capítulo evidenciam como a plasticidade comportamental desses machos, em comparação à adoção de táticas fixas em machos ‘sneakers’ e ‘consorts’, proporcionam vantagem aos machos ‘intermediários’, permitindo-lhes obter altas taxas de sucesso reprodutivo, mesmo quando em competição com machos maiores. Os resultados obtidos nesse capítulo são inéditos, uma vez que contrastam a ideia consagrada de que machos ‘consorts’, os quais teriam vantagem sobre machos de

pequeno tamanho – não somente comportamental, mas também quanto ao local de deposição de seus espermatóforos na fêmea – seriam responsáveis pela monopolização da fêmea e, conseqüentemente, pela paternidade majoritária de seus descendentes.

O sexto capítulo da Tese, intitulado “Sneaker spermatophores can function as mating plugs and negatively affect the success of sperm stored in the seminal receptacle of the squid *Doryteuthis pleii*”, conclui a temática relacionada ao sucesso reprodutivo de machos dimórficos na espécie de estudo. Nesse capítulo, são apresentados os resultados quanto às análises histológicas dos receptáculos seminais de fêmeas submetidas a cópulas frontais com machos ‘sneakers’ e/ou ‘intermediários’ durante a execução dos experimentos em tanque. O presente capítulo conecta os dados obtidos quanto à presença de espermátangios implantados no interior do receptáculo seminal das fêmeas, sua possível ação como um plugue seminal e o sucesso reprodutivo dos machos responsáveis por seu implante.

Por fim, o sétimo e último capítulo da Tese, intitulado “Getting a grip on the squid hectocotylus: sexually dimorphic glandular system underlies spermatophore transfer in *Doryteuthis pleii* (Blainville, 1823)”, abrange os resultados das análises histológicas e ultraestruturais de hectocótilos de machos dimórficos. Os resultados obtidos revelaram similaridade morfológica entre as estruturas de ambos os morfotipos, não havendo evidências, portanto, de dimorfismo intrasexual nessa estrutura entre machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ em *D. pleii*. Apesar disso, os resultados encontrados têm caráter inédito, uma vez que trazem uma descrição detalhada quanto à histologia dos hectocótilos, temática inexistente até o presente. Revelou-se, por exemplo, a presença de um epitélio espesso e altamente pregueado, ausente nos demais braços, composto por dois tipos de células secretoras. No presente capítulo, discutem-se as possíveis funções de tais glândulas e seu possível papel no processo de transferência dos espermatóforos durante a cópula.



**Figura 1.** Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção de amostras para cada abordagem descrita na Tese de Doutorado. **(A)** Fêmeas capturadas do ambiente foram utilizadas para **(B)** dissecção do receptáculo seminal ou **(C-G)** execução de experimentos em tanque. **(B)** As fêmeas foram anestesiadas e seus receptáculos seminais dissecados. Sob estereomicroscópio, o conteúdo do receptáculo (i.e., espermatângios implantados em sua cutícula externa e espermatozoides contidos em seu interior) foi removido e colocado em tubo contendo etanol a 100%. As amostras foram mantidas em freezer para procedimentos de biologia molecular, conforme descrito em detalhes no texto (item 6.5). **(C-G)** As fêmeas selecionadas para os experimentos foram inseridas em tanque juntamente com machos de diferentes tamanhos. A princípio, foram delineados cinco tipos de experimentos (item 6.3), os quais envolviam inserir uma fêmea no tanque com **(C)** um macho

‘consort’, **(D)** dois machos ‘consorts’ simultaneamente, **(E)** um macho ‘sneaker’ e um macho ‘consort’, **(F)** um macho ‘sneaker’ ou **(G)** dois machos ‘sneakers’ sequencialmente— até ocorrência de cópula e posterior **(H)** desova. No caso dos experimentos **(C-E)**, estimou-se que as fêmeas experimentais possuiriam gametas disponíveis em ambos os sítios durante o momento da desova. Espermatozoides no sítio mais interno (membranas oviducais) resultariam de cópulas paralelas com um ou dois machos ‘consort’ experimentais, enquanto que espermatozoides no sítio mais externo (membrana peribucal) seriam oriundos de cópulas frontais com macho ‘sneaker’ experimental e/ou da reserva armazenada no interior do receptáculo seminal (i.e., gametas provenientes de cópulas anteriores à captura da fêmea). Já nos experimentos **(F-G)**, as fêmeas experimentais possuiriam gametas apenas no sítio mais externo, dada a ausência de machos ‘consort’ nos ensaios. Novamente, espermatozoides na membrana peribucal seriam oriundos de cópulas frontais com macho(s) ‘sneaker’ experimental(is) e da reserva armazenada no interior do receptáculo seminal. Como descrito em detalhes nos itens 6.2 e 6.3, novos experimentos foram acrescentados ao plano inicial, ao longo da execução do projeto, envolvendo também machos ‘intermediários’ (ver detalhes no texto). **(H)** Após a ocorrência da desova, **(I)** um pedaço de tecido de machos e fêmeas experimentais, assim como os embriões em fase de pré-eclosão, foram fixados em etanol a 100% para análises de biologia molecular e testes de paternidade (item 6.5). Após o término dos experimentos, **(J, K)** os hectocótilos dos machos foram dissecados para **(J)** análise de ultraestrutura sob microscópio eletrônico de transmissão e **(K, esquerda)** análise histológica sob microscópio óptico, conforme descrito em detalhes no item 6.8. Além disso, **(K, direita)** os receptáculos seminais das fêmeas submetidas a cópulas frontais (com machos ‘sneakers’ e/ou ‘intermediários’) foram fixados para análises histológicas quanto à presença de possíveis plugues seminais (item 6.7). Abreviações: ♂<sub>CO</sub>, macho ‘consort’; ♂<sub>SN</sub>, macho ‘sneaker; ♀, fêmea.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos principais destaques da presente Tese de Doutorado diz respeito às constatações inéditas quanto ao sucesso reprodutivo de machos que adotam táticas alternativas de reprodução em lulas Loliginidae quando gametas localizados em sítios espacialmente distintos competem pela fertilização de um mesmo conjunto de ovócitos (i.e., competição espermática; Parker, 1970). Como descrito em detalhes ao longo dos próximos parágrafos, os resultados obtidos no presente trabalho trazem importantes contribuições a um interessante – e relativamente recente – campo de estudo inserido no âmbito da seleção sexual pós-copulatória. Extrapolando o grupo estudado, os resultados aqui descritos fornecem evidências adicionais sobre a importância da compreensão integrada quanto às pressões evolutivas geradas tanto pelos mecanismos de competição espermática e escolha críptica da fêmea quanto pelo contexto (ou ambiente) de fertilização em estudos a respeito da evolução fenotípica dos produtos ejaculatórios (Snook, 2005; Simmons & Fitzpatrick, 2012; Fitzpatrick & Lüpold, 2014). Dado o número restrito de estudos que levam em consideração a interação entre esses processos – particularmente em espécies nas quais os machos adotam táticas alternativas de reprodução –, os presentes resultados têm alta relevância no entendimento quanto a sua influência conjunta na evolução do dimorfismo intrasexual masculino, dinâmica de fertilização e no sucesso reprodutivo de cada morfotipo (e.g., Taborsky *et al.* 2018; Kustra & Alonzo, 2020). Além disso, como será destacado a seguir, os resultados da presente Tese são inéditos ao desvendarem a importância do receptáculo seminal – não somente às fêmeas, mas também aos machos que adotam cópulas frontais. Ao promover o armazenamento prolongado dos gametas masculinos, tal estrutura permite não somente o sucesso reprodutivo e manutenção da tática de ‘sneakers’ em loliginídeos ao longo das gerações, mas também influencia a competição espermática intramórfica (‘sneaker’ vs. ‘sneaker’), levando à evolução de possíveis adaptações nos machos, exemplificada pela inserção de plugues seminais nas fêmeas.

A adoção de táticas alternativas de reprodução (‘consorts’ vs. ‘sneakers’) por machos de diferentes tamanhos constitui uma temática bem documentada na literatura dos loliginídeos, com destaque para estudos publicados ao longo da década de 1990 (revisado em Hanlon & Messenger, 2018). Com foco particularmente nas diferenças comportamentais entre

os dois morfotipos, as pesquisas desse período foram fundamentais na compreensão de como ‘consorts’ e ‘sneakers’ diferiam quanto ao tipo de cópula executada (paralela vs. frontal), ao sítio de deposição dos espermatozoides (membranas oviducais vs. membrana peribucal) e à estratégia reprodutiva adotada (comportamentos agonísticos e guarda da fêmea vs. táticas furtivas) (Hanlon & Messenger, 2018). Investigações a respeito das possíveis diferenças morfológicas e fisiológicas entre machos ‘sneakers’ e ‘consorts’, em contrapartida, iniciaram-se apenas ao longo das décadas seguintes, com os trabalhos realizados na espécie *Heterololigo bleekeri* (e.g., Iwata & Sakurai, 2007; Iwata *et al.* 2011; Hirohashi *et al.* 2016a) e, posteriormente, nas espécies *Doryteuthis pleii* (Apostólico & Marian, 2017, 2018a), *Loligo reynaudii* (Iwata *et al.* 2018) e *Sepioteuthis lessoniana* (Lin *et al.* 2019). Curiosamente, estudos quanto ao dimorfismo intrasexual masculino revelaram que, enquanto machos ‘sneakers’ parecem investir relativamente mais em produção espermática – evidenciado pelos volumes do testículo e complexo espermatofórico relativamente maiores em machos ‘sneakers’ (*D. pleii*: Apostólico & Marian, 2018a) – estes alocam um número menor de gametas por cópula do que machos ‘consorts’. Em ambas as espécies estudadas até o presente nesse quesito, machos ‘sneakers’ produzem espermatozoides menores e com menor volume de espermatozoides (*H. bleekeri*: Iwata & Sakurai, 2007; Iwata *et al.* 2011; *D. pleii*: Apostólico & Marian, 2018a). Em contrapartida, esses machos produzem gametas mais alongados do que aqueles encontrados em machos ‘consorts’ (Iwata *et al.* 2011; Apostólico & Marian, 2018a).

A ideia a respeito de como as pressões seletivas de competição espermática moldam não apenas o investimento quantitativo, mas também a evolução fenotípica dos gametas masculinos, tem se tornado foco importante no âmbito da seleção sexual pós-copulatória (Snook, 2005; Pizzari & Parker, 2009; Simmons & Fitzpatrick, 2012; Fitzpatrick & Lüpold, 2014). Evidências provenientes de estudos inter- e intraespecíficos (neste último caso, resultantes principalmente de espécies nas quais os machos adotam táticas alternativas de reprodução) têm corroborado, de forma contundente, como o risco de competição espermática enfrentada pelos indivíduos pode influenciar a evolução de espermatozoides qualitativamente superiores, seja em termos de longevidade, viabilidade e/ou velocidade mais elevada (Snook, 2005; Fitzpatrick & Lüpold, 2014). Paralelamente, sabe-se também que o contexto de fertilização, i.e., o ambiente no qual os gametas masculinos são liberados ou expostos até o encontro com os ovócitos, também exerce influência sobre sua competitividade, desempenho e até mesmo, indiretamente, sobre sua evolução fenotípica (Simmons & Fitzpatrick, 2012; Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Lüpold & Pitnick, 2018). Em espécies em que a fertilização

ocorre no ambiente externo e milhares de gametas são liberados sincronizadamente, por exemplo, machos com espermatozoides mais velozes e mais competitivos podem prosperar na competição espermática, garantindo-lhes maiores taxas de sucesso reprodutivo (e.g., Fitzpatrick, 2020). Já em espécies em que inseminação e fertilização são temporalmente desconectados, espermatozoides capazes de sobreviver e permanecer viáveis por intervalos maiores e incertos podem prosperar em cenários altamente competitivos (e.g., Smith & Ryan, 2010). Além disso, a própria morfologia do órgão de armazenamento ou do trato reprodutor da fêmea também pode estar intimamente relacionada à morfologia dos gametas masculinos – como já constatado, por exemplo, em aves Passeriformes (Briskie *et al.* 1997) e dípteros (Pitnick *et al.* 1999; Presgraves *et al.* 1999). Em sintonia com essa temática, estudos recentes com lulas Lolidinidae têm sugerido que as diferenças qualitativas entre os produtos ejaculatórios de machos dimórficos devam estar relacionadas aos diferentes contextos de fertilização aos quais cada gameta está submetido. Dada a existência única, dentre os metazoários, de dois sítios de fertilização no interior da fêmea, é plausível que espermatozoides de machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ estejam sujeitos a pressões seletivas divergentes, associadas tanto às diferenças locais entre os dois sítios (i.e., membranas oviducais, mais confinado; membrana peribucal, mais externo) quanto às típicas diferenças temporais entre as cópulas com machos de fenótipos alternativos (e.g., Hirohashi *et al.* 2016b; Apostólico & Marian, 2017). Considerando-se as altas taxas de diluição, o intervalo incerto entre cópula e desova e a competição pelo espaço limitado do receptáculo seminal e membrana peribucal, é possível que espermatozoides mais alongados (Iwata *et al.* 2011; Apostólico & Marian, 2018a), com maior longevidade (Hirohashi *et al.* 2016a) e capacidade de agregação (Hirohashi & Iwata, 2014; Apostólico & Marian, 2017) possam aumentar a chance de sucesso dos machos ‘sneakers’ quando em competição no sítio de fertilização mais externo da fêmea (Apostólico & Marian, 2017).

Dada a importância e crescente interesse quanto aos tópicos descritos no parágrafo anterior, reconheceu-se a necessidade, durante a execução do projeto, quanto à organização de uma síntese acerca do conhecimento atual e publicações recentes dentro dessa temática em lulas Lolidinidae. A partir de tal constatação, propôs-se, após a participação no congresso “Cephalopod International Advisory Council Conference” (realizado em São Petersburgo, Flórida, E.U.A), a redação e publicação de uma revisão teórica a respeito dos temas de seleção sexual (pré- e pós-copulatória), adoção de táticas alternativas de reprodução e evolução do dimorfismo intrasexual em cefalópodes – a qual resultou no Capítulo 1 da



presente Tese de Doutorado (Apostólico & Marian, 2020). Tal capítulo tem como principal propósito fornecer o arcabouço teórico para guiar investigações futuras não apenas a pesquisadores que já atuam na área, mas também – e principalmente – àqueles não familiarizados com a biologia reprodutiva de cefalópodes.

A participação no congresso citado acima também propiciou a confecção e publicação, de forma conjunta com outros pesquisadores na área de seleção sexual de cefalópodes, de um manuscrito adicional, o qual resultou no Capítulo 2 da presente Tese de Doutorado. Com o objetivo de fornecer um panorama integrado – envolvendo aspectos relacionados a comportamento, evolução, fisiologia e genética – sobre a evolução de características anatômicas em machos e fêmeas de lulas Loliginidae associadas a táticas alternativas de reprodução, certamente a publicação do Capítulo 2 consiste em um marco teórico na área de táticas alternativas de reprodução. Ao agregar todos os especialistas da área que empregam cefalópodes como modelo, o capítulo integra suas distintas expertises para apresentar uma releitura desse conhecimento acumulado nos âmbitos de seleção sexual e evolução de Cephalopoda. Espera-se, na verdade, que a publicação combinada dos Capítulos 1 e 2 da presente Tese permitam que as lulas Loliginidae ganhem cada vez maior destaque e visibilidade à comunidade científica. Dadas as particularidades únicas do grupo (e.g., existência de dois sítios de fertilização espacialmente separados nas fêmeas, associados à adoção de táticas alternativas de reprodução nos machos), espera-se que os loliginídeos sejam reconhecidos como um novo e interessante modelo para melhor entendimento quanto à influência conjunta dos mecanismos de seleção sexual e do contexto de fertilização na evolução e manutenção de táticas alternativas de reprodução e dimorfismo intrasexual masculino em metazoários.

Inclui-se também no Capítulo 1 da Tese uma síntese e discussão inéditas quanto aos possíveis mecanismos responsáveis pela expressão de fenótipos alternativos em lulas Loliginidae, assunto este ainda pouco elucidado em cefalópodes de uma forma geral. Enquanto a adoção das táticas de ‘sneaker’ e ‘consort’ aparenta ser fixa ao longo da vida no loliginídeo *H. bleekeri* (Iwata & Sakurai, 2007), nas espécies do gênero *Doryteuthis*, em contrapartida, tal expressão parece ocorrer de forma flexível em cada indivíduo (Hanlon *et al.* 1997; Apostólico & Marian, 2018b). Tal flexibilidade, curiosamente, não ocorre de forma igual em ambas as espécies. Em *D. pealeii*, os machos parecem alternar seus comportamentos de acordo com o contexto momentâneo e oscilam entre táticas ao longo de toda a vida (i.e.,

machos ‘sneakers’ executam cópulas frontais quando na presença de machos ‘consorts’, mas alternam para cópulas paralelas quando na ausência de competidores) (Hanlon *et al.* 1997). Em *D. pleii*, ao contrário, tal alternância parece ocorrer uma única vez durante a ontogenia do indivíduo, atrelada a mudanças drásticas quanto à morfologia e funcionamento de seus produtos ejaculatórios (Apostólico & Marian, 2018b). Machos de pequeno porte atuam apenas como ‘sneakers’, executando apenas cópulas frontais; conforme aumentam de tamanho corporal, eles atravessam uma fase transitória – quando são conhecidos como machos ‘intermediários’ – para então, ao final da vida, atuarem exclusivamente como machos ‘consorts’ (Apostólico & Marian, 2018b).

Em sintonia com a revisão elaborada nos Capítulos 1 e 2, os experimentos de cópula e desova efetuados durante a execução do projeto permitiram, inusitadamente, a contemplação a respeito do comportamento reprodutivo de machos ‘intermediários’ em tanque. Somadas a dados prévios acerca desses machos na espécie de estudo (Apostólico & Marian, 2018b), tais observações mostraram-se fundamentais para reforçar a hipótese previamente sugerida de que machos ‘intermediários’ devam corresponder a uma fase transitória entre os fenótipos de ‘sneaker’ e ‘consort’. Isso porque, além de exibirem tamanho corporal, idade e morfologia dos produtos ejaculatórios com características intermediárias entre aquelas tipicamente reportadas para machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ (Apostólico & Marian, 2018b), machos ‘intermediários’ também se caracterizam por uma plasticidade quanto a seus comportamentos reprodutivos – temática essa contemplada em detalhes no Capítulo 3 da Tese (Apostólico & Marian, 2019). Ao contrário de machos ‘sneakers’, indivíduos ‘intermediários’ podem exibir comportamentos agressivos – e mesmo alterações nos padrões de coloração do manto – quando na presença de competidores de maior tamanho (i.e., machos ‘consorts’). Além disso, machos ‘intermediários’ são capazes de alternar entre os dois tipos de táticas reprodutivas – algo não observado em típicos ‘sneakers’ ou ‘consorts’ (Apostólico & Marian, 2019). Ao contrário do comportamento descrito acima para o loliginídeo *D. pealeii*, no entanto, a alternância entre táticas parece independer da presença ou ausência de competidores no tanque. De fato, em ambos os casos em que tal transição ocorreu, os machos ‘intermediários’ coabitavam o tanque com um macho rival (‘sneaker’ ou ‘consort’). Na realidade, a conversão entre a adoção de cópula frontal ou paralela parece estar relacionada ao ‘status’ da fêmea (i.e., proximidade ou não do momento da desova). Isso porque, em ambos os casos, os machos já haviam executado cópulas frontais em momentos anteriores; no entanto, quando a extrusão das cápsulas de ovos foi iniciada pela fêmea, eles efetuaram cópula paralela. Como

mencionado acima, machos ‘sneakers’ não oscilam entre táticas, mesmo quando se inicia o processo de desova; além disso, nem todos os machos ‘intermediários’ alternaram para a execução de cópulas paralelas quando na presença de uma fêmea desovando (Apostólico & Marian, 2019). Assim, além de sinalizarem que machos ‘intermediários’ devam de fato corresponder a uma fase durante a ontogenia de machos de *D. pleii*, os resultados descritos no Capítulo 3 sugerem que os indivíduos precisam estar em uma fase específica de tal transição para executar tal câmbio.

Como mencionado inicialmente, um dos principais destaques da presente Tese relaciona-se à constatação inédita, em loliginídeos, de como a existência de dois sítios de fertilização em fêmeas influencia não apenas a evolução fenotípica dos produtos ejaculatórios de machos ‘consorts’ e ‘sneakers’ – temática contemplada nos Capítulos 1 e 2 (Apostólico & Marian, 2020 e Marian *et al.* 2019, respectivamente) –, mas também o sucesso reprodutivo diferencial entre eles quando seus gametas, localizados em sítios espacialmente separados, competem pela fertilização do mesmo conjunto de ovócitos. O reconhecimento quanto à ubiquidade de paternidade múltipla em cefalópodes emergiu a partir da década de 1990, com a disseminação de técnicas de biologia molecular e amplo uso de marcadores microsatélites (e.g., Shaw & Boyle, 1997; Buresch *et al.* 2001; Naud *et al.* 2004). Desde então, diversos estudos *in situ*, realizados através da observação direta de fêmeas e machos no ambiente natural e/ou amostragem de cápsulas de ovos depositadas diretamente no substrato, trouxeram resultados significantes ao entendimento quanto à biologia reprodutiva de cefalópodes – particularmente sépias e loliginídeos (e.g., Buresch *et al.* 2001; Naud *et al.* 2004, 2016; Shaw & Sauer, 2004). Em contrapartida, ensaios realizados sob condições controladas, em cativeiro, são mais restritos na literatura (e.g., Iwata *et al.* 2005; Buresch *et al.* 2009). Experimentos realizados em ambientes confinados requerem um controle rigoroso quanto a parâmetros de qualidade da água (e.g., salinidade, temperatura, pH, oxigenação adequada) (Moltschaniwskyj *et al.* 2007). Além disso, cefalópodes – e em particular as lulas – são animais muito delicados, cuja manutenção em tanque pode acarretar elevados níveis de estresse, canibalismo, inanição e mesmo mortalidade dos animais (L.H. Apostólico, observação pessoal). Dadas as dificuldades comumente enfrentadas para experimentação com lulas em cativeiro (Hanlon, 1990), acredita-se que a presente Tese tenha obtido conquistas essenciais para o desenvolvimento do projeto em questão, com a realização de um número relevante de ensaios bem-sucedidos – descritos em detalhes no Capítulo 3 (Apostólico & Marian, 2019) –, cultivo adequado de embriões e sucesso na execução de procedimentos de biologia molecular a partir

de marcadores microsatélites desenvolvidos para outras espécies do gênero *Doryteuthis* (Reichow & Smith, 1999; Maxwell *et al.* 2000).

Os ensaios realizados em tanque – tema do Capítulo 4 da Tese – revelaram que, quando a fêmea possui gametas em ambos os sítios de fertilização (i.e., nas membranas oviduciais e próximo ao receptáculo seminal), machos ‘consorts’ – responsáveis pela deposição de gametas mais internamente na fêmea – tipicamente monopolizam a paternidade da desova, enquanto gametas provenientes de cópulas frontais (i.e., tipicamente de machos ‘sneakers’) e armazenados no sítio mais externo, fertilizam uma parcela muito reduzida (ou mesmo nula) dos embriões remanescentes. Tal fenômeno, já sugerido em trabalhos prévios (e.g., Iwata *et al.* 2005; Buresch *et al.* 2009; Shashar & Hanlon, 2013), parece intimamente relacionado ao posicionamento dos espermatóforos nos dois sítios da fêmea. Dada a localização mais interna dos gametas depositados durante a execução de cópulas paralelas – tipicamente realizadas por machos ‘consorts’ –, esses teriam acesso privilegiado aos ovócitos recém-liberados do oviduto; espermatozoides provenientes de cópulas frontais, em contraste, teriam uma “desvantagem espacial”, dada sua localização mais externa, próximos à membrana peribucal (Iwata *et al.* 2005; Buresch *et al.* 2009; Shashar & Hanlon, 2013). É válido ressaltar que, apesar de tais hipóteses quanto ao sucesso reprodutivo de machos dimórficos serem difundidas na literatura dos loliginídeos, publicações prévias não chegaram a testá-las formal e empiricamente. Em Iwata *et al.* (2005), por exemplo, os machos de *H. bleekeri* participantes dos ensaios executaram ambos os tipos de cópula (frontal e paralela) quando em cativeiro, impossibilitando qualquer associação entre seu sucesso reprodutivo e o tipo de tática – e sítio de fertilização – adotado. Já em Buresch *et al.* (2009), por outro lado, salvo um único ensaio (o qual envolveu machos de *D. pealeii* que adotassem táticas distintas), os demais envolveram apenas cópulas (paralelas) consecutivas com dois machos ‘consorts’. Ademais, os autores do estudo optaram pela genotipagem exclusiva da primeira cápsula de ovos expelida pela fêmea, abordagem esta que dificulta uma compreensão integrada quanto à dinâmica de fertilização de lulas. Em oposição a ambos os estudos, os resultados apresentados no Capítulo 4 da presente Tese levaram em consideração apenas machos que adotaram um único tipo de cópula (frontal vs. paralela)<sup>3</sup>, além de basearem-se na genotipagem de um número considerável de embriões<sup>4</sup>, provenientes de cápsulas selecionadas aleatoriamente a partir de cada desova. A partir da adoção de tal abordagem, averiguou-se de forma inédita,

---

<sup>3</sup> Machos ‘intermediários’ que executaram os dois tipos de cópula (frontal e paralela) foram contemplados exclusivamente no Capítulo 5 da Tese.

<sup>4</sup> Os resultados apresentados no Capítulo 4 baseiam-se na maior amostragem de embriões dentre os estudos de paternidade já realizados com cefalópodes até o presente.

por exemplo, a participação de gametas armazenados na membrana peribucal (i.e., de machos ‘sneakers’ desconhecidos<sup>5</sup>) na fertilização das cápsulas de ovos, tanto em cenários em que a fêmea experimental detinha gametas em apenas um ou em ambos os sítios de fertilização no momento da desova. Como será retomado abaixo, tal constatação traz implicações importantes, não somente acerca do papel do receptáculo seminal na dinâmica de fertilização de loliginídeos, mas também quanto à participação de machos ‘sneakers’ nesse processo, aspecto majoritariamente negligenciado até o momento.

Curiosamente, os dois experimentos excluídos do Capítulo 4 e contemplados de forma singular no Capítulo 5 também se mostraram peças fundamentais para a temática a respeito do papel dos contextos (i.e., sítios) de fertilização no sucesso reprodutivo e manutenção do dimorfismo intrasexual entre fenótipos alternativos em loliginídeos, assunto este que permeou também o restante da Tese. Em ambos os experimentos, o macho ‘intermediário’ – o qual alternou entre as táticas de ‘sneaker’ (cópula frontal) e ‘consort’ (cópula paralela) durante o período do ensaio – foi o responsável pela paternidade da vasta maioria dos embriões amostrados, mesmo quando competindo com um típico macho ‘consort’. Tais resultados parecem corroborar, novamente, que o sucesso reprodutivo dos machos deva estar atrelado à tática adotada – i.e., posição de cópula e sítio de deposição dos espermátóforos – uma vez que, ao adotarem cópulas paralelas, machos ‘intermediários’ foram capazes de fertilizar maior porcentagem da prole. De forma contrastante, no entanto, esses resultados sugerem também a necessidade de cautela ao simplificar o sucesso reprodutivo dos machos somente ao tipo de cópula executada – trazendo à tona, novamente, a importância da coevolução entre gametas masculinos e o ambiente de fertilização da fêmea nesse processo. Tal fenômeno pode ser ilustrado, por exemplo, pelo macho ‘intermediário’ responsável pela transferência de espermátangios em formato de clava (i.e., típicos de machos ‘sneakers’) às membranas oviduciais da fêmea durante a execução de cópula paralela. Dado o possível posicionamento subótimo de tais estruturas ao sítio mais interno da fêmea, é altamente provável que eles tenham sido diluídos ou removidos antes (ou durante) o processo de desova. Consequentemente, nesse caso em particular, as altas taxas de paternidade adquiridas pelo macho ‘intermediário’ podem não estar vinculadas especificamente à execução de cópula paralela (ver Capítulo 5 para maiores detalhes). Tal constatação demonstra, portanto, que o sucesso reprodutivo dos fenótipos alternativos não está apenas atrelado ao tipo de cópula

---

<sup>5</sup> Machos ‘sneakers’ desconhecidos correspondem a machos que executaram cópulas frontais com a fêmea experimental antes de sua captura do ambiente natural e cujos gametas encontravam-se armazenados no interior do receptáculo seminal.

executado, mas também à morfologia de seus produtos ejaculatórios e sua interação com o sítio de fertilização da fêmea.

Um aspecto ainda pouco elucidado quanto à biologia reprodutiva de loliginídeos, mencionado acima, diz respeito à importância do receptáculo seminal e dos machos ‘sneakers’ na dinâmica de fertilização dos ovócitos. Sabe-se que as fêmeas copulam com inúmeros machos ‘sneakers’ ao longo (e até mesmo antes) de seu período reprodutivo e que seus espermatozoides devem permanecer viáveis por longos períodos no interior do receptáculo seminal (e.g., Shashar & Hanlon, 2013). Apesar disso, o papel dos machos ‘sneakers’ na fertilização das cápsulas de ovos tem sido majoritariamente negligenciado, sugerindo-se que eles devam ser responsáveis apenas pela fecundação dos ovócitos não-fertilizados por machos ‘consorts’ (e.g., Naud *et al.* 2016). Em contraste a essa concepção prévia, os ensaios realizados ao longo da execução da presente Tese foram inéditos ao redirecionarem o foco – antes voltado principalmente à importância dos machos ‘consorts’ (e.g., Buresch *et al.* 2009) – para a competição espermática intramórfica (i.e., entre machos ‘sneakers’) no sítio de fertilização mais externo da fêmea. Os resultados, principalmente apresentados no Capítulo 4 da Tese, evidenciaram que, quando machos ‘sneakers’ competem entre si pela fertilização dos ovócitos, o último indivíduo que copula com a fêmea é responsável pela maior parcela de paternidade da prole, sobrepujando-se aos demais machos que copularam anteriormente – independentemente do intervalo entre cópulas consecutivas e entre estas e o momento da desova. De acordo com hipóteses – não mutuamente exclusivas – sugeridas ao longo dos Capítulos 4 e 6, tal fenômeno de ‘precedência dos espermatozoides do último macho’ poderia estar relacionado, por exemplo, ao acesso privilegiado dos gametas liberados a partir de espermatângios recém-implantados sobre aqueles expelidos vagarosamente pela estreita abertura do órgão de armazenamento da fêmea. Além disso, considerando-se que o receptáculo seminal de loliginídeos é constituído por um órgão de fundo cego, portador de uma única abertura ao ambiente externo, é plausível hipotetizar também que, existindo estratificação de gametas em seu interior, o último esperma armazenado seja o primeiro a ser liberado, conferindo maior vantagem ao último macho que copula antes da desova.

A constatação de que machos ‘sneakers’ desconhecidos tipicamente fertilizam parte dos ovócitos das fêmeas – mesmo quando essa detém gametas em ambos os sítios durante a desova –, somada aos resultados inéditos quanto à variabilidade genética de espermatozoides

armazenados no interior do receptáculo seminal, também permitiu maior visibilidade quanto à importância de tal órgão para fêmeas e machos de loliginídeos. Isso porque, além dos típicos benefícios (indiretos) às fêmeas – e.g., maior variabilidade genética à prole e provisionamento de gametas adicionais para garantir a fecundação de todos os ovócitos –, o armazenamento de espermatozoides por períodos extensos no interior do receptáculo seminal também parece garantir o sucesso reprodutivo de machos ‘sneakers’. Mesmo investindo menos recursos por cópula (e.g., espermatóforos menores, com menor volume de gametas) do que machos ‘consorts’, machos ‘sneakers’ ainda garantem a paternidade de parte da prole. Dadas as desvantagens comportamentais e quanto ao sítio (mais externo) de deposição de seus gametas, a alocação de mais recursos por cópula pode não beneficiar machos ‘sneakers’ quando em competição com machos de maior tamanho (Apostólico & Marian, 2018a). Em contrapartida, o fracionamento de seus produtos ejaculatórios entre um número maior de fêmeas, amparado pela possibilidade de armazenamento no receptáculo seminal, pode garantir seu sucesso reprodutivo cumulativo, auxiliando na manutenção da tática de ‘sneaker’ ao longo das gerações.

Além de benefícios a fêmeas e machos ‘sneakers’, a existência de um receptáculo seminal também pode promover um cenário de intensa competição espermática, uma vez que gametas de inúmeros machos compartilham e disputam pelo mesmo espaço limitado até o momento da fertilização dos ovócitos (e.g., Birkhead & Møller, 1993). Compatível com essa ideia, observações recentes quanto à presença de espermátangios implantados precisamente na abertura do receptáculo seminal de fêmeas de *D. pleii* levaram à hipótese de que tais estruturas poderiam atuar como ‘plugues seminais’, obstruindo o estreito orifício do órgão e impedindo, conseqüentemente, o uso da reserva de gametas provenientes de machos rivais durante a desova (Saad *et al.* 2018). Com o intuito de testar formalmente esta hipótese, a presente Tese optou por combinar os dados quanto às análises de paternidade – temáticas dos Capítulos 4 e 5 – com informações obtidas através da histologia dos receptáculos seminais das próprias fêmeas experimentais. Surpreendentemente, no entanto, os resultados – detalhados no Capítulo 6 – evidenciaram que, apesar de as taxas de paternidade atribuídas a machos ‘sneakers’ desconhecidos serem visualmente menores quando ‘plugues seminais’ estão presentes do que quando ausentes, a diferença entre os tratamentos não foi estatisticamente significativa. Apesar de não se descartar a possibilidade de que tal resultado esteja relacionado ao número limitado de réplicas, hipóteses alternativas também poderiam explicá-los. Conforme discutido em detalhes no Capítulo 6, o implante de plugues seminais no trato

reprodutor feminino nem sempre se traduz em maiores taxas de sucesso reprodutivo ao macho responsável por sua introdução ou mesmo no impedimento quanto à execução de novas cópulas pela fêmea (Moreira & Birkhead, 2003; Timmermeyer *et al.* 2010; Sutter *et al.* 2016). Enquanto a alocação de plugues seminais pode beneficiar o macho responsável, esta ação pode, por muitas vezes, ser contrária aos interesses da fêmea, prejudicando a fertilização de seus ovócitos e impossibilitando o reabastecimento de sua reserva de espermatozoides. Nesse cenário de conflito de interesses, não é inconcebível que, mesmo evoluindo sob às pressões de competição espermática, plugues seminais tenham sua eficiência reduzida por contra adaptações exibidas pelas próprias fêmeas (e.g., Sutter *et al.* 2016).

Com uma temática relativamente distinta ao restante da Tese de Doutorado – mas ainda inserida no âmbito do dimorfismo intrasexual masculino –, o Capítulo 7 conclui a pesquisa aqui sumarizada através de um trabalho detalhado a respeito da morfologia dos hectocótilos, estrutura de suma importância para a reprodução de loliginídeos e responsável pela transferência dos espermatóforos para o corpo da fêmea no momento da cópula. Apesar de os resultados apresentados divergirem do objetivo original – uma vez que não foram detectadas diferenças qualitativas entre as estruturas de machos ‘sneakers’ e ‘consorts’ – os dados obtidos quanto à morfologia dos hectocótilos têm caráter inédito, inseridos em um tópico inexistente até o presente. Em *D. pleii*, o hectocótilo (braço ventral esquerdo) apresenta uma estrutura peculiar quando comparado aos demais braços do macho e das fêmeas: enquanto os braços exibem apenas duas fileiras paralelas e simétricas de ventosas ao longo de toda a sua extensão, os hectocótilos apresentam uma fileira de ventosas de tamanho normal (‘ventosas ventrais’) e outra de estruturas altamente reduzidas (‘ventosas dorsais’). Além disso, a região compreendida entre as ventosas dorsal e ventral é composta por um epitélio espesso e altamente pregueado – ausente nos demais braços –, onde são encontrados diferentes tipos de células secretoras. Dentre as células identificadas nessa região, dois tipos (denominados ‘tipo I’ e ‘tipo II’) são encontrados exclusivamente nos braços ventrais esquerdos dos machos, estando ausentes nos demais braços de ambos os sexos. Ao longo do capítulo, discute-se como os dois tipos celulares, responsáveis pela secreção de polissacarídeos neutros e proteínas básicas, devam atuar no processo de transferência dos espermatóforos durante a cópula. Estima-se que, atuando de forma sinérgica, células do ‘tipo I’ e ‘tipo II’ sejam responsáveis pela formação de uma secreção adesiva e viscosa única, capaz de auxiliar na adesão dos escorregadios espermatóforos ao braço do macho durante sua transferência para o corpo da fêmea.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO, S.H.; STIVER, K.A.; MARSH-ROLLO, S.E. Ovarian fluid allows directional cryptic female choice despite external fertilization. **Nat Commun**, 7, 12452, 2016.
- ANDERSSON, M. **Sexual selection**. Princeton: Princeton University Press, 1994.
- ANDERSSON, M.; SIMMONS, L.W. Sexual selection and mate choice. **Trends Ecol Evol**, 21, 296–302, 2006.
- APOSTÓLICO, L.H.; MARIAN, J.E.A.R. Dimorphic ejaculates and sperm release strategies associated with alternative mating behaviors in the squid. **J Morphol**, 278, 1490–1505, 2017.
- APOSTÓLICO, L.H.; MARIAN, J.E.A.R. Dimorphic male squid show differential gonadal and ejaculate expenditure. **Hydrobiologia**, 808, 5–22, 2018a.
- APOSTÓLICO, L.H.; MARIAN, J.E.A.R. From sneaky to bully: reappraisal of male squid dimorphism indicates ontogenetic mating tactics and striking ejaculate transition. **Biol J Linn Soc**, 123, 603–614, 2018b.
- APOSTÓLICO, L.H.; MARIAN, J.E.A.R. Behavior of “intermediate” males of the dimorphic squid *Doryteuthis pleii* supports an ontogenetic expression of alternative phenotypes. **Front Physiol**, 10, 1180, 2019.
- APOSTÓLICO, L.H.; MARIAN, J.E.A.R. Cephalopod mating systems as models for sexual selection and alternative reproductive tactics: a review. **Bull Mar Sci**, 10, 1281, 2020.
- ARNOLD, J.M. Normal embryonic stages of the squid, *Loligo pealii* (Lesueur). **Biol Bull**, 128, 24–32, 1965.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Anim Behav**, 60, 145–164, 2000.
- AVILA, F.W.; SIROT, L.K.; LAFLAMME, B.A.; RUBINSTEIN, C.D.; WOLFNER, M.F. Insect seminal fluid proteins: identification and function. **Ann Rev Entomol**, 56, 21–40, 2011.
- BALL, M.A.; PARKER, G.A. Sperm competition games: external fertilization and “adaptive” infertility. **J Theor Biol**, 180, 141–150, 1996.
- BATEMAN, A.J. Intrasexual selection in *Drosophila*. **Heredity**, 2, 349–368, 1948.
- BELLO, G. Evolution of the hectocotylus in Sepiolinae (Cephalopoda: Sepiolidae) and description of four new genera. **Eur J Taxon**, 655, 1–53, 2020.
- BIRKHEAD, T.R. Sperm competition in birds. **Rev Reprod**, 3, 123–129, 1998.
- BIRKHEAD, T.R. How stupid not to have thought of that: post-copulatory sexual selection. **J Zool**, 281, 78–93, 2010.
- BIRKHEAD, T.R.; MØLLER, A.P. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. **Biol J Linn Soc**, 50, 295–311, 1993a.
- BIRKHEAD, T.R.; MØLLER, A.P. Female control of paternity. **Trends Ecol Evol**, 8, 100–104, 1993b.
- BIRKHEAD, T.R.; MØLLER, A.P. **Sperm competition and sexual selection**. San Diego: Academic Press, 1998.
- BIRKHEAD, T.R.; PIZZARI, T. Postcopulatory sexual selection. **Nat Ver**, 3, 262–273, 2002.

- BLEEKER, K.; DE JONG, K.; VAN KESSEL, N.; HINDE, C.A.; NAGELKERKE, A.J. Evidence for ontogenetically and morphologically distinct alternative reproductive tactics in the invasive round goby *Neogobius melanostomus*. **PLoS One**, 12, e0174828, 2017.
- BOYLE, P.R.; RODHOUSE, P.G. **Cephalopods: ecology and fisheries**. Oxford: Blackwell, 2005.
- BRISKIE, J.V.; MONTGOMERIE, R.; BIRKHEAD, T.R. The evolution of sperm size in birds. **Evolution**, 51, 937–945, 1997.
- BURESCH, K.C.; HANLON, R.T.; MAXWELL, M. R.; RING, S. Microsatellite DNA markers indicate a high frequency of multiple paternity within individual field-collected egg capsules of the squid *Loligo pealeii*. **Mar Ecol Prog Ser**, 210, 161–165, 2001.
- BURESCH, K.C.; MAXWELL, M.R.; COX, M.R.; HANLON, R.T. Temporal dynamics of mating and paternity in the squid *Loligo pealeii*. **Mar Ecol Prog Ser**, 387, 197–203, 2009.
- BURNESS, G.; CASSELMAN, S.J.; SCHULTE-HOSTEDDE, A.I.; MOYES, C.D.; MONTGOMERIE, R. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Behav Ecol Sociobiol**, 56, 65–70, 2004.
- DARWIN, C. **The descent of man and selection in relation to sex**. London: John Murray, 1871.
- DELBARCO-TRILLO, J. Adjustment of sperm allocation under high risk of sperm competition across taxa: a meta-analysis. **J Evol Biol**, 24, 1706–1714, 2011.
- DEN BOER, S.P.A.; BAER, B.; BOOMSMA, J.J. Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. **Science**, 327, 1506–1509, 2010.
- DREW, G.A. Sexual activities of the squid, *Loligo pealii*. I. Copulation, egg-laying and fertilization. **J Morphol**, 22, 327–359, 1911.
- DYBAS, L.K.; DYBAS, H.S. Coadaptation and taxonomic differentiation of sperm and spermatheca in featherwing beetles. **Evolution**, 35, 168–174, 1981.
- EBERHARD, W.G. **Female control: sexual selection by cryptic female choice**. New Jersey: Princeton University Press, 1996.
- FIRMAN, R.C. Of mice and women: advances in mammalian sperm competition with a focus on the female perspective. **Philos Trans Royal Soc B**, 375, 20200082, 2020.
- FITZPATRICK, J.L. Sperm competition and fertilization mode in fishes. **Philos Trans Royal Soc B**, 375, 20200074, 2020.
- FITZPATRICK, J.L.; BRIDGE, C.D.; SNOOK, R.R. Repeated evidence that the accelerated evolution of sperm is associated with their fertilization function. **Proc Royal Soc B**, 287, 20201286, 2020.
- FITZPATRICK, J.L.; LÜPOLD, S. Sexual selection and the evolution of sperm quality. **Mol Hum Reprod**, 20, 1180–1189, 2014.
- GASPARINI, C.; PILASTRO, A. Cryptic female preference for genetically unrelated males is mediated by ovarian fluid in the guppy. **Proc Royal Soc B**, 278, 2495–2501, 2011.
- GASPARINI, C.; PILASTRO, A.; EVANS, J.P. The role of female reproductive fluid in sperm competition. **Philos Trans Royal Soc B**, 375, 20200077, 2020.

- GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. **Int J Dev Biol**, 52, 439–447, 2008.
- GROSS, M.R. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. **Trends Ecol Evol**, 11, 92–98, 1996.
- HANLON, R.T. Maintenance, rearing, and culture of teuthoid and sepioid squids. In: ADELMAN, W.J.J.; ARNOLD, J.M.; GILBERT, D.L. **Squids as experimental animals**. Boston: Springer, 1990. p. 35–62.
- HANLON, R.T. Mating systems and sexual selection in the squid *Loligo*: how might commercial fishing on spawning squids affect them? **CalCOFI**, 39, 92–100, 1998.
- HANLON, R.T.; MAXWELL, M.R.; SHASHAR, N. Behavioral dynamics that would lead to multiple paternity within egg capsules of the squid *Loligo pealei*. **Biol Bull**, 193, 212–214, 1997.
- HANLON, R.T.; MAXWELL, M.R.; SHASHAR, N.; LOEW, E.R.; BOYLE, K-L. An ethogram of body patterning behavior in the biomedically and commercially valuable squid *Loligo pealei* off Cape Cod, Massachusetts. **Biol Bull**, 197, 49–62, 1999.
- HANLON, R.T.; MESSENGER, J.B. **Cephalopod Behavior**. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2018.
- HIROHASHI, N.; IWATA, Y. The different types of sperm morphology and behavior within a single species. Why do sperm of squid sneaker males form a cluster? **Commun Integr Biol**, 6, e26729, 2014.
- HIROHASHI, N.; IIDA, T.; SATO, N.; WARWICK, S.H.H.; IWATA, Y. Complex adaptive traits between mating behaviour and post-copulatory sperm behaviour in in squids. **Rev Fish Biol Fish**, 26, 601–607, 2016a.
- HIROHASHI, N.; TAMURA-NAKANO, M.; NAKAYA, F.; IIDA, T.; IWATA, Y. Sneaker male squid produce long-lived spermatozoa by modulating their energy metabolism. **J Biol Chem**, 291, 19324–19334, 2016b.
- HOSKEN, D.J.; STOCKLEY, P. Benefits of polyandry: a life history perspective. **Evol Biol**, 33, 173–194, 2003.
- IMMLER, S.; PITNICK, S.; PARKER, G.A.; DURRANT, K.L.; LÜPOLD, S.; CALHIM, S.; BIRKHEAD, T.R. Resolving variation in the reproductive tradeoff between sperm size and number. **PNAS**, 108, 5325–5330, 2011.
- IWATA, Y.; MUNEHARA, H.; SAKURAI, Y. Dependence of paternity rates on alternative reproductive behaviors in the squid *Loligo bleekeri*. **Mar Ecol Prog Ser**, 298, 219–228, 2005.
- IWATA, Y.; SAKURAI, Y. Threshold dimorphism in ejaculate characteristics in the squid *Loligo bleekeri*. **Mar Ecol Prog Ser**, 345, 141–146, 2007.
- IWATA, Y.; SAUER, W.H.H.; SATO, N.; SHAW, P.W. Spermatophore dimorphism in the chokka squid *Loligo reynaudii* associated with alternative reproductive tactics. **J Molluscan Stud**, 84, 157–162, 2018.
- IWATA, Y.; SHAW, P.; FUJIWARA, E.; SHIBA, K.; KAKIUCHI, Y. HIROHASHI, N. Why small males have big sperm: dimorphic squid sperm linked to alternative mating behaviours. **BMC Evol Biol**, 11, 1–9, 2011.

- JENNIONS, M.D.; PETRIE, M. Why do females mate multiple? A review of the genetic benefits. **Biol Ver**, 75, 21–64, 2000.
- JEREB, P.; ROPER, C.F.E. **Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Vol. 2: Myopsid and Oegopsid Squids**. Rome: FAO, 2010.
- KELLY, C.D.; JENNIONS, M.D. Sexual selection and sperm quantity: meta-analysis of strategic ejaculation. **Biol Rev**, 86, 863–884, 2011.
- KUSTRAS, M.C.; ALONZO, S.H. Sperm and alternative reproductive tactics: a review of existing theory and empirical data. **Philos Trans Royal Soc B**, 375, 20200075, 2020.
- KVARNEMO, C.; SIMMONS, L.W. Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. **Philos Trans Royal Soc B**, 368, 20100042, 2013.
- LEHNERT, S.J.; BUTTIS, I.A.E.; FLANNERY, E.W.; PETERS, K.M.; HEATH, D.D.; PITCHER, T.E. Effects of ovarian fluid and genetic differences on sperm performance and fertilization success of alternative reproductive tactics in Chinook salmon. **J Evol Biol**, 30, 1236–1245, 2017.
- LIN, C.Y.; CHEN, C.S.; CHIAO, C-C. The overlapping reproductive traits of the two male mating types of the oval squid *Sepioteuthis lessoniana*. **Fish Sci**, 85, 339–347, 2019.
- LOCATELLO, L.; PILASTRO, A.; DEANA, R.; ZARPELLON, A.; RASOTTO, M.B. Variation pattern in sperm quality traits in two gobies with alternative mating tactics. **Funct Ecol**, 21, 975–981, 2007.
- LOCATELLO, L.; POLI, F.; RASOTTO, M.B. Tactic-specific differences in seminal fluid influence sperm performance. **Proc Royal Soc B**, 280, 20122891, 2013.
- LÜPOLD, S.; DE BOER, R.A.; EVANS, J.P.; TOMKINS, J.L.; FITZPATRICK, J.L. How sperm competition shapes the evolution of testes and sperm: a meta-analysis. **Philos Trans Royal Soc B**, 375, 20200064, 2020.
- LÜPOLD, S.; FITZPATRICK, J.L. Sperm number trumps sperm size in mammalian ejaculate evolution. **Proc Royal Soc B**, 282, 20152122, 2015.
- LÜPOLD, S.; PITNICK, S. Sperm form and function: what do we know about the role of sexual selection? **Reproduction**, 155, R229–R243, 2018.
- MAGRIS, M. Strategic adjustment of ejaculate quality in response to variation of the socio-sexual environment. **Behav Ecol Sociobiol**, 75, 91, 2021.
- MARIAN, J.E.A.R. Spermatophoric reaction reappraised: novel insights into the functioning of the loliginid spermatophore based on *Doryteuthis plei* (Mollusca: Cephalopoda). **J Morphol**, 273, 248–278, 2012.
- MARIAN, J.E.A.R.; APOSTÓLICO, L.H.; CHIAO, C-C.; HANLON, R.T.; HIROHASHI, N.; IWATA, Y.; MATHER, J.; SATO, N.; SHAW, P.W. Male alternative reproductive tactics and associated evolution of anatomical characteristics in loliginid squid. **Front Physiol**, 10: 1281, 2019.
- MAXWELL, M.R.; BURESCH, K.M.; HANLON, R.T. Pattern of inheritance of microsatellite loci in the squid *Loligo pealeii* (Mollusca: Cephalopoda). **Mar Biotechnol**, 2, 517–521, 2000.

- MILLER, J.S.; BOSE, A.P.H.; FITZPATRICK, J.L.; BALSHINE, S. Sperm maturation and male tactic-specific differences in ejaculates in the plainfin midshipman fish *Poryichthys notatus*. **J Fish Biol**, 94, 434–445, 2019.
- MOLTSCHANIWSKYJ, N.A.; HALL, K.; LIPINSKI, M.R.; MARIAN, J.E.A.R.; NISHIGUCHI, M.; SAKAI, M.; et al. Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. **Rev Fish Biol Fisher**, 17, 455–476, 2007.
- MOREIRA, P.L.; BIRKHEAD, T.R. Copulatory plugs in the Iberian Rock lizard do not prevent insemination by rival males. **Funct Ecol**, 17, 796–802, 2003.
- NAUD, M.J.; HANLON, R.T.; HALL, K.C.; SHAW, P.W.; HAVENHAND, J.N. Behavioural and genetic assessment of reproductive success in a spawning aggregation of the Australian giant cuttlefish, *Sepia apama*. **Anim Behav**, 67, 1043–1050, 2004.
- NAUD, M.-J.; SAUER, W.H.H.; MCKEOWN, N.J.; SHAW, P.W. Multiple mating, paternity and complex fertilisation patterns in the chokka squid *Loligo reynaudii*. **PLoS ONE**, 11, e0146995, 2016.
- NAUD, M.-J.; SHAW, P.W.; HANLON, R.T.; HAVENHAND, J.N. Evidence for biased use of sperm sources in wild female giant cuttlefish (*Sepia apama*). **Proc Royal Soc B**, 272, 1047–1051, 2005.
- NESIS, K.N. Mating, spawning, and death in oceanic cephalopods: a review. **Ruthenica**, 6, 23–64, 1995.
- OLIVEIRA, R.T.; TABORSKY, M.; BROCKMANN, H.J. **Alternative Reproductive Tactics: An Integrative Approach**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- OOSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol Ecol Notes**, 4, 535–538, 2004.
- ORR, T.J.; ZUK, M. Reproductive delays in mammals: an unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. **Biol Ver**, 89, 889–912, 2014.
- OTA, K.; HEG, D.; HORI, M.; KOHDA, M. Sperm phenotypic plasticity in a cichlid: a territorial male's counterstrategy to spawning takeover. **Behav Ecol**, 21, 1293–1300, 2010.
- PARKER, G.A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biol Rev**, 45, 525–567, 1970.
- PARKER, G.A. Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. **J Theor Biol**, 96, 281–294, 1982.
- PARKER, G.A. Sperm competition games: sneaks and extra-pair copulations. **Proc Royal Soc B**, 242, 127–133, 1990.
- PARKER, G.A. Sperm competition games: sperm size and sperm number under adult control. **Proc Royal Soc B**, 253, 245–254, 1993.
- PARKER, G.A. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: BIRKHEAD, T.R.; MØLLER, A.P. **Sperm Competition and Sexual Selection**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 3–54.
- PARKER, G.A.; LESSELLS, C.M.; SIMMONS, L.W. Sperm competition games: a general model for precopulatory male-male competition. **Evolution**, 67, 95–109, 2013.

- PEREZ, J.A.A.; AGUIAR, D.C.; OLIVEIRA, U.C. Biology and population dynamics of the long-finned squid *Loligo plei* (Cephalopoda: Loliginidae) in southern Brazilian waters. **Fish Res**, 58, 267–279, 2002.
- PITNICK, S.; MARKOW, T.; SPICER, G.S. Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. **Evolution**, 53, 1804–1822, 1999.
- PIZZARI, T.; PARKER, G.A. Sperm competition and sperm phenotype. In: BIRKEHAD, T.R.; HOSKEN, D.J.; PITNICK, S. **Sperm Biology: An Evolutionary Perspective**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 207–245.
- POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behav Ecol Sociobiol**, 60, 289–310, 2006.
- POLI, F.; IMMLER, S.; GASPARINI, C. Effects of ovarian fluid on sperm traits and its implications for cryptic female choice in zebrafish. **Behav Ecol**, 30, 1298–1305, 2019.
- POLI, F.; LOCATELLO, L.; RASOTTO, M.B. Seminal fluid enhances competitiveness of territorial males' sperm in a fish with alternative male reproductive tactics. **J Exp Biol**, 221, jeb175976, 2018.
- PRESGRAVES, D.C.; BAKER, R.H.; WILKINSON, G.S. Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 266, 1041–1047, 1999.
- RAMM, S.A. Seminal fluid and accessory male investment in sperm competition. **Philos Trans Royal Soc B**, 375, 20200068, 2020.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, 3, 248–249, 1995.
- REICHOW, D.; SMITH, M.J. Highly variable microsatellites in the California market squid *Loligo opalescens*. **Mar Biotechnol**, 1, 403–406, 1999.
- ROWE, M.; LASKEMOEN, T.; JOHNSEN, A.; LIFJELD, J.T. Evolution of sperm structure and energetics in passerine birds. **Proc Royal Soc B**, 280, 20122616, 2013.
- RUDOLFSSEN, G.; SERRANO, J.V.; FOLSTAD, I. Own, but not foreign seminal fluid inhibits sperm activation in a vertebrate with external fertilization. **Front Ecol Evol**, 3, 92, 2015.
- SAAD, L.O.; SCHWAHA, T.; HANDSCHUH, S.; WANNINGER, A.; MARIAN, J.E.A.R. A mating plug in a squid? Sneaker spermatophores blocking the female seminal receptacle in *Doryteuthis plei* (Blainville, 1823). **Zoology**, 130, 47–56, 2018.
- SATO, N.; YOSHIDA, M.-A.; KASUGAI, T. Impact of cryptic female choice on insemination success: larger sized and longer copulating male squid ejaculate more, but females influence insemination success by removing spermatangia. **Evolution**, 71, 111–120, 2017.
- SHASHAR, N.; HANLON, R.T. Spawning behavior dynamics at communal egg beds in the squid *Doryteuthis (Loligo) pealeii*. **J Exp Mar Biol Ecol**, 447, 65–74, 2013.
- SHAW, P.W.; BOYLE, P.R. Multiple paternity within the brood of single females of *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae), demonstrated with microsatellite DNA markers. **Mar Ecol Prog Ser**, 160, 279–282, 1997.
- SHAW, P.W.; SAUER, W.H.H. Multiple paternity and complex fertilisation dynamics in the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. **Mar Ecol Prog Ser**, 270, 173–179, 2004.

- SHUSTER, S.M.; WADE, M.J. **Mating systems and strategies**. Princeton: Princeton University Press, 2003.
- SIMMONS, L.W. The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. **Annu Rev Ecol Evol Syst**, 36, 125–146, 2005.
- SIMMONS, L.W. Sperm competition. In: SHUKER, D.M.; SIMMONS, L.W. **The evolution of insect mating systems**. Oxford: Oxford University Press, 2014. p. 181–203.
- SIMMONS, L.W.; FITZPATRICK, J.L. Sperm wars and the evolution of male fertility. **Reproduction**, 144, 519–534, 2012.
- SIMMONS, L.W.; LÜPOLD, S.; FITZPATRICK, J.L. Evolutionary trade-off between secondary sexual traits and ejaculates. **Trends Ecol Evol**, 32, 964–976, 2017.
- SMALLEGANGE, I.M. Complex environmental effects on the expression of alternative reproductive phenotypes in the bulb mite. **Evol Ecol**, 25, 857–873, 2011.
- SMITH, C.C.; RYAN, M.J. Evolution of sperm quality but not quantity in the internally fertilized fish *Xiphophorus nigrensis*. **J Evol Biol**, 23, 1759–1771, 2010.
- SNOOK, R.R. Sperm in competition: not playing by the number. **Trends Ecol Evol**, 20, 46–53, 2005.
- SUTTER, A.; SIMMONS, L.W.; LINDHOLM, A.K.; FIRMAN, R.C. Function of copulatory plugs in house mice: mating behavior and paternity outcomes of rival males. **Behav Ecol**, 27, 185–195, 2016.
- TABORSKY, M. Sneakers, satellites, and helpers: parasitic and cooperative behavior in fish reproduction. **Adv Study Behav**, 23, 1–100, 1994.
- TABORSKY, M.; SCHUTZ, D.; GOFFINET, O.; VAN DOORN, G.S. Alternative male morphs solve sperm performance/longevity trade-off in opposite directions. **Sci Adv**, 4, eaap8563, 2018.
- THORNHILL, R.; ALCOCK, J. **The evolution of insect mating systems**. Cambridge: Harvard University Press, 1983.
- TIMMERMEYER, N.; GERLACH, T.; GUEMPEL, C.; KNOCHE, J.; PFANN, J.F.; SCHLIESSMANN, D.; MICHIELS, N.K. The function of copulatory plugs in *Caenorhabditis remanei*: hints for female benefits. **Front Zool**, 7, 28, 2010.
- TOMKINS, J.L.; HAZEL, W. The status of the conditional evolutionarily stable strategy. **Trends Ecol Evol**, 22, 522–528, 2007.
- TOURMENTE, M.; ROWE, M.; GONZÁLEZ-BARROSO, M.M.; RIAL, E.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Postcopulatory sexual selection increases ATP content in rodent spermatozoa. **Evolution**, 67, 1838–1846, 2013.
- WEDELL, N.; GAGE, M.J.G.; PARKER, G.A. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. **Trends Ecol Evol**, 17, 313–320, 2002.
- WEGENER, B.J.; STUART-FOX, D.; NORMAN, M.D.; WONG, B.B.M. Spermatophore consumption in a cephalopod. **Biol Lett**, 9, 20130192, 2013.
- WIGBY, S.; CHAPMAN, T. Sperm competition. **Curr Biol**, 14, R100–R103, 2004.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol Ecol**, 11, 1–16, 2002.