



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA (ECOLOGIA)

**ALOCÇÃO DE RECURSO MATERNO MEDIADA PELA QUALIDADE DO
CUIDADO PARENTAL DOS MACHOS NO PEIXE AMAZÔNICO *Crenuchus
spilurus***

RAQUEL LEITE DE OLIVEIRA ALVES

Manaus, Amazonas

Julho/2022

RAQUEL LEITE DE OLIVEIRA ALVES

**ALOCÇÃO DE RECURSO MATERNO MEDIADA PELA QUALIDADE DO
CUIDADO PARENTAL DOS MACHOS NO PEIXE AMAZÔNICO *Crenuchus
spilurus***

Orientador: Dr. Jansen Alfredo Sampaio Zuanon

Coorientador: Dr. Tiago Henrique da Silva Pires

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia (Ecologia).

Manaus, Amazonas

Julho/2022



PG·ECO·INPA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO
DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DO INSTITUTO
NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA.**

Aos 27 dias do mês de Julho do ano de 2022, às 14h00min, por videoconferência. Reuniu-se a Comissão Examinadora de Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: o Dr. **Igor Luís Kaefer**, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, a Dra. **Daiani Kochhann**, da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA e a Dra. **Cristhiana Paula Röpke**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, tendo como suplentes a Dra. Lucélia Nobre Carvalho, da Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT e a Dra. Lis Fernandes Stegmann, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, sob a presidência do orientador, a fim de proceder a arguição pública do trabalho de **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** de **RAQUEL LEITE DE OLIVEIRA ALVES**, intitulado: **“ALOCAÇÃO DE RECURSO MATERNO MEDIADA PELA QUALIDADE DE MACHOS NO PEIXE AMAZÔNICO CRENUCHUS SPILURUS”**, orientada pelo Dr. Jansen Alfredo Sampaio Zuanon e co-orientada pelo Dr. Tiago Henrique da Silva Pires, ambos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

- APROVADO (A) REPROVADO (A)
 POR UNANIMIDADE POR MAIORIA

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

DR. IGOR LUÍS KAEFER

Igor Luis Kaefer

DR. DAIANI KOCHHANN

Daiani Kochhann

DRA. CRISTHIANA PAULA RÖPKE

Cristhiana Paula Röpke

DR. LUCÉLIA NOBRE CARVALHO

DRA. LIS FERNANDES STEGMANN

Lis Fernandes Stegmann
(Coordenação PPG-ECO/INPA)

A474d Alves, Raquel Leite de Oliveira

Alocação de recurso materno mediada pela qualidade do cuidado parental dos machos no peixe amazônico *Crenuchus spilurus* / Raquel Leite de Oliveira Alves; orientador Jansen Alfredo Sampaio Zuanon; coorientador Tiago Henrique da Silva Pires. - Manaus:[s. l.], 2022.

1.1 MB

34 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biologia.) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2022.

1. Alocação diferencial. 2. Carotenoides 3. Cuidado paternal. I. Zuanon, Jansen Alfredo Sampaio. II. Pires, Tiago Henrique da Silva. III. Título

CDD 595.372

Sinopse

Investigamos se fêmeas do peixe amazônico *Crenuchus spilurus* alocam carotenoides para os ovos de acordo com a ornamentação dos machos. Testamos o investimento das fêmeas na reprodução, assim como também estamos o esforço despendido pelos machos durante o cuidado parental.

Palavras-chave: alocação diferencial; carotenoides; cuidado paternal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Ferreira e Célia, por todo amor, carinho, apoio nos momentos difíceis e por sempre acreditarem no meu potencial. Tudo fica mais fácil com vocês ao meu lado. À minha avó Francisca, aos meus avôs Raimundo e José. Aos meus irmãos Tiago e Rebeca e ao meu querido sobrinho Matheus por todo o apoio.

Aos meus amigos Julie Kenya, Ítalo Silva e Rêgila Melo que estão comigo desde a graduação, por todo o carinho e apoio. À Adriely Melo, minha quase irmã, por toda a parceria desde o início da graduação até aqui, passamos por muitos dias de luta e poucos dias de glória, e ainda tem mais.

Agradeço aos meus orientadores Tiago Pires e Jansen Zuanon pelo imenso apoio, ensinamentos e paciência. Obrigada por tudo. Aos meus colegas de laboratório Kalebe, Álvaro e Maria por terem me auxiliado na montagem dos experimentos, me ensinado a usar os equipamentos e me ajudarem a coletar os peixes.

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia por todo o conhecimento, experiência e pela oportunidade de realização desse trabalho. À CAPES pela bolsa de pesquisa (n. 88882.347470/2019-01).

RESUMO

A teoria de alocação diferencial de recursos prediz que fêmeas são capazes de alocar mais recursos para os ovos de acordo com as condições do ambiente experienciado pela mãe, o que também inclui a qualidade dos machos. A qualidade dos machos pode ser sinalizada pelos ornamentos, que é um sinal de fácil avaliação para a decisão da fêmea de investimento na reprodução. Nós investigamos a alocação de carotenoides para os ovos por fêmeas de *Crenuchus spilurus* em resposta à ornamentação dos machos em que foram pareadas. A quantidade de carotenoides pode ser facilmente acessada através da coloração dos ovos, pois a intensidade da cor vermelha indica quantidade. Avaliando a coloração dos ovos das fêmeas, mostramos que fêmeas depositaram ovos mais ricos em carotenoides quando pareadas com machos mais ornamentados. Avaliando o esforço parental, mostramos que machos mais ornamentados realizam mais cuidado parental do que machos menos ornamentados. A qualidade do cuidado parental dos machos é honestamente sinalizada pelos ornamentos, sendo o estímulo para fêmeas alocarem mais carotenoides para ovos que estarão sob os cuidados de machos mais ornamentados. Sugerimos que ocorre uma estimulação mútua entre machos e fêmeas, enquanto ornamentos estimulam maior alocação de carotenoides para os ovos, a coloração dos ovos estimula os machos mais ornamentados a realizarem maior esforço parental.

ABSTRACT

The differential allocation hypothesis predicts that females are able to allocate energetic resources to eggs according to characteristics of the environment, including the quality of mating partner. Male quality can be evaluated through ornamentation, as it represents a signal that is easy to assess by females and can convey information on direct and indirect fitness benefits to the female. We investigated carotenoid resource allocation to eggs in females of the sailfin tetra (*Crenuchus spilurus*), a fish species with paternal-only care. We assessed female resource allocation as a response to ornamentation of paired males during reproduction. By inspecting the color of eggs, we show that females produced oocytes richer in carotenoid when paired with highly ornamented males. By investigating time in egg fanning, we show that more ornamented males put more effort in paternal care. We suggest that male quality is honestly signaled by the ornaments, which stimulate females to allocate more resources to the oocytes that will be fertilized and under care of higher quality males. We propose mutual stimulation by males and females during reproduction in *C. spilurus*: while ornaments trigger increased allocation of resources to the oocytes, the color of eggs laid by females triggers further resource allocation to the offspring in the form of higher paternal care by males.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	14
MODELO ANIMAL: <i>CRENUCHUS SPILURUS</i>	14
FOTOGRAFIA DOS MACHOS E MEDIÇÃO DAS NADADEIRAS	15
ESTIMATIVA DO ESFORÇO DESPENDIDO PELOS MACHOS DURANTE O CUIDADO PARENTAL	16
MEDIÇÃO DA COLORAÇÃO DA DESOVA	17
ANÁLISE DE DADOS	18
NOTA ÉTICA.....	19
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO.....	26
REFERENCIAS	27
MATERIAL SUPLEMENTAR	32

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Macho (A) e fêmea (B) de <i>Crenuchus spilurus</i>	13
Fig. 2. Ovos de duas fêmeas de <i>Crenuchus spilurus</i> aderidos à uma folha de plástico transparente sob superfície branca. Foi medido o valor de vermelho em cada ovo e calculamos a média de cor vermelha para cada desova, como estimativa da quantidade de carotenoides presentes nos ovos. Escala: 0,5 mm. Diferentes tons de banco no fundo das imagens ocorreram por diferenças na coloração do plástico. As imagens originais e não recortadas, que enquadram o alvo de cores que garante calibração consistente das cores das fotos estão disponíveis como Material suplementar.	17
Fig. 3. Relação entre a intensidade de vermelho desova e os resíduos da nadadeira dorsal dos machos (a) e relação entre cor da desova e os resíduos da nadadeira anal dos machos (b). Os valores da cor da desova estão invertidos em ordem decrescente, valores mais altos da cor da desova indicam cor vermelha mais clara e valores mais baixos indicam cor vermelha mais escura.....	20
Fig. 4. Relação entre o abano realizado no cuidado parental (média/min de cada macho) e os resíduos da nadadeira dorsal (a) e relação entre o abano e os resíduos da nadadeira dorsal (b).....	21
Fig. 5. Relação entre o abano realizado durante o cuidado parental (média/min de cada macho) e a intensidade de vermelho da desova sob o cuidado dos machos. Os valores da cor da desova estão em ordem decrescente, valores mais altos da cor da desova indicam cor vermelha mais clara e valores mais baixos indicam cor vermelha mais escura.....	21
Fig. S1. Ovos de uma fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> aderidos à uma folha de plástico transparente sob superfície branca. Foto enquadrando o alvo de cores que garante calibração consistente das cores das fotos. Escala: 1 cm.	32
Fig. S2. Ovos de uma fêmea de <i>Crenuchus spilurus</i> , em tom vermelho escuro, aderidos à uma folha de plástico transparente sob superfície branca. Foto enquadrando o alvo de cores que garante calibração consistente das cores das fotos. Escala: 1 cm.	33

Manuscrito redigido e submetido nas normas da revista *Animal Behaviour*.

INTRODUÇÃO

O ganho de *fitness* dos pais não depende apenas da escolha de parceiros, mas também de decisões de investimento em reprodução ao longo da vida. Isso pode envolver, por exemplo, investimento entre oportunidades de reprodução presentes e futuras ou investimento entre qualidade e quantidade da prole (Rios-Cardenas et al., 2013). Essas decisões de investimento na reprodução são importantes pois têm influência na sobrevivência, crescimento, comportamento e uso de recursos pela prole (Dentressangle et al., 2008; Velando et al., 2006). A qualidade genética dos pais tem um papel importante no desenvolvimento da prole, mas o fenótipo da prole também pode ser alterado de formas não-genéticas, como resultado das decisões de investimento dos pais nas condições ambientais que experienciam (Donelson et al., 2008).

A alocação diferencial de recursos é uma forma muito comum de contribuição não-genética das mães para a prole. A teoria da alocação diferencial de recursos (Burley, 1986) prediz que o investimento em reprodução do macho ou da fêmea pode ser afetado pela ornamentação do seu parceiro. Parceiros mais atraentes seriam parceiros de maior qualidade, pois podem oferecer cuidado parental de maior qualidade ou “bons genes” transmitidos para a prole (Burley, 1986; Sheldon, 2000). Dessa forma, a qualidade dos machos é um potencial fator ambiental avaliado pelas fêmeas que afeta o fenótipo da prole (Gilbert et al., 2006, 2012). Os ornamentos dos machos podem representar um sinal honesto da qualidade dos machos para as fêmeas. Além disso, é um sinal de mais fácil avaliação, já que em muitas espécies o desempenho dos machos durante o cuidado parental pode não ser facilmente observado (Mitchell et al., 2007). Portanto, fêmeas podem usar informação dos ornamentos para decidir o quanto investir na prole atual, realizando alocação diferencial de recursos nos ovos ou ovócitos (Kolm, 2001; Velando et al., 2006).

Em aves, uma das formas de alocação diferencial mais comum ocorre quando fêmeas depositam ovos maiores quando o macho possui ornamentação exagerada (Alonso-Alvarez et al., 2012; Cunningham & Russell, 2000; Dentressangle et al., 2008) Isso resulta em aumento do investimento na prole atual, pois filhotes que se desenvolvem a partir de ovos maiores têm maiores chances de sobreviverem nos primeiros dias após o nascimento (Cunningham & Russell, 2001; Gilbert et al., 2006).

Em peixes, há estudos sobre a alocação de recursos de acordo com tamanho do parceiro, onde fêmeas põem mais ovos quando escolhem machos maiores, que são mais atraentes (Skinner & Watt, 2007). Também foi reportado que fêmeas põem ovos maiores quando são pareadas com machos maiores, preferidos pelas fêmeas (Evans et al., 2010; Kolm, 2001). Em algumas espécies de peixes os machos maiores também apresentam benefícios diretos às fêmeas, como sítios de desova de melhor qualidade e melhor cuidado parental (Hudman & Gotelli, 2007; Wiegmann & Baylis, 1995). A alocação diferencial em resposta ao tamanho do parceiro também foi reportada em outros organismos aquáticos, como o lagostim *Austropotamobius italicus* (Galeotti et al., 2006).

Além do tamanho dos ovos, fêmeas podem aumentar a concentração de nutrientes que é passada para os ovos. Isso é mais facilmente observado quando há diferença no investimento das fêmeas na pigmentação dos ovos. Dentre os pigmentos mais importantes, os carotenoides são pigmentos naturais que determinam a coloração amarela, laranja e vermelha (Brush, 1990). Por serem responsáveis pela forte coloração, os carotenoides têm um papel importante na transmissão de sinais entre os animais. Por exemplo, durante o cortejo é comum que machos apresentem partes do corpo que possuem pigmentação vermelha e amarela baseada em carotenoides, e podem sinalizar a qualidade e a condição do parceiro (Olson & Owens, 1998; Saino et al., 2002).

Em ovos de peixes, répteis e aves, os carotenoides são os responsáveis pela cor amarela-alaranjada do vitelo (gema) do ovo (Blount et al., 2000). Quanto mais escuro o vitelo, maior a quantidade de carotenoides que foi transferida aos ovos. A associação entre qualidade dos ovos e cor do vitelo é bem estabelecida, especialmente em ovos de aves (Englmaierová et al., 2014) e também com ovos de peixes, especialmente salmonídeos (Craik, 1985). Os carotenoides podem fazer parte de diversos processos fisiológicos nos ovos de peixes, atuando como fonte de pigmento para cromatóforos, podem ser precursores de vitamina A, além de poderem atuar como reserva intracelular de oxigênio em caso de baixa disponibilidade de oxigênio no ambiente (Craik, 1985).

Em estudos com aves, a cor da casca dos ovos pode refletir a quantidade de carotenoides presentes no vitelo (Butler & McGraw, 2013; Navarro et al., 2011), visto que o aspecto visual do vitelo não pode ser acessado durante o crescimento do embrião. Porém, ovos de peixes permitem observar de forma mais direta a quantidade de carotenoide presente no vitelo por não possuírem casca opaca e rígida de carbonato de cálcio, onde a intensidade da cor dos ovos indica a presença e quantidade de carotenoides.

A possibilidade de uso da coloração do ovo como indicativo da quantidade de carotenoides presentes no vitelo foi observada em vários estudos com peixes (Alijanpour et al., 2015; Baki et al., 2019; Riesch et al., 2011), sugerindo que a coloração é uma medida direta e simples de obter que representa a quantidade de carotenoides investidos na prole.

Neste estudo, investigamos se fêmeas do peixe Amazônico *Crenuchus spilurus* alocam mais carotenoides nos ovos de acordo com a ornamentação de machos oferecidos como parceiros reprodutivos. *Crenuchus spilurus* Günther, 1863 (Characiformes: Crenuchidae) é uma espécie de peixe de pequeno porte que apresenta dimorfismo sexual acentuado e os machos realizam cuidado parental exclusivo dos ovos (Pires et al., 2016). As fêmeas da espécie são menores e menos coloridas, já os machos são maiores têm nadadeiras dorsal e anal hipertrofiadas que apresentam ornamentação muito conspícua em vermelho e amarelo (Fig. 1; Pires et al., 2016). É uma espécie de peixe amazônico em que foram desenvolvidas técnicas para otimizar a reprodução em cativeiro, o que inclui o estabelecimento das condições abióticas mais favoráveis para a reprodução e a formação de casais de tamanho corporais similares (Borghazan et al., 2019; Stefanelli-Silva et al., 2019). Por conta desses protocolos, é possível reproduzir esses peixes em ambiente laboratorial, e a partir disso, mensurar variáveis simples dos ovos, como a cor, quantidade e tamanho dos ovos. Além disso, também é possível quantificar o cuidado parental dos ovos realizado pelo macho como indicador de investimento energético na prole.

Assim, para testar se fêmeas alocam recursos de acordo com a ornamentação dos machos, tomamos a área das nadadeiras dos machos como medida de ornamentação e utilizamos a coloração vermelha dos ovos como indicativo de quantidade de carotenoides alocados. Também acompanhamos o esforço realizado pelos machos em cuidado paternal com o objetivo de verificar a potencial honestidade do sinal sexual.

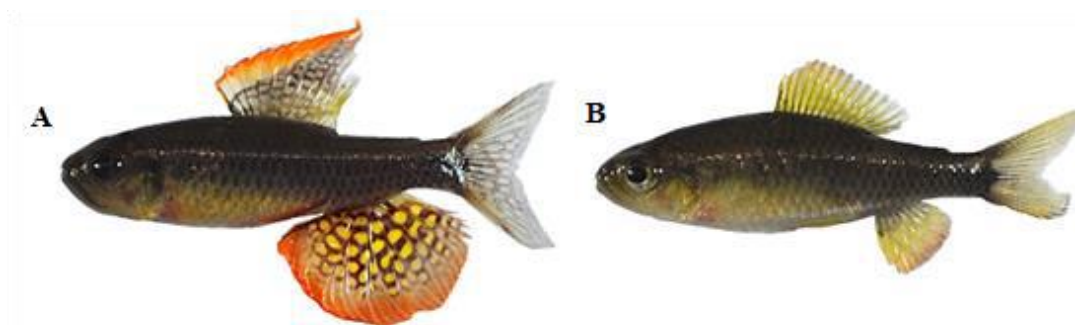


Fig. 1. Macho (A) e fêmea (B) de *Crenuchus spilurus*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar se fêmeas de *Crenuchus spilurus* alocam carotenoides para os ovos de acordo com a ornamentação dos machos.

Objetivos específicos

- Verificar se há variação na quantidade de carotenoides alocados nos ovos pelas fêmeas;

- Verificar se machos mais ornamentados realizam mais esforço no cuidado parental das desovas mais ricas em carotenoides.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo animal: *Crenuchus spilurus*

Crenuchus spilurus é uma espécie de peixe amazônico de pequeno porte (máximo 6 cm de comprimento padrão) e sexualmente dimórfica que habita predominantemente pequenos igarapés. Em ambiente natural, as fêmeas dessa espécie depositam os ovos em substratos duros como galhos e troncos, bainhas de palmeiras e folhas mortas. O cuidado dos ovos é realizado exclusivamente pelo macho, que permanece dentro do ninho posicionado sob ou à frente dos ovos e realizando movimentos de abano (para oxigenação e limpeza dos ovos) quase constantes. O cuidado parental do macho dura aproximadamente oito dias, terminando quando as larvas estão na fase livre-natante (Pires et al., 2016).

Os indivíduos de *Crenuchus spilurus* utilizados neste estudo foram coletados em um igarapé de terra firme localizado em um fragmento florestal urbano em Manaus, Amazonas (3° 6' 22,94" S; 59° 58' 42,48" O) e transportados ao laboratório. Os peixes foram mantidos em aquários-estoque (60 x 40 x 20 cm) com bomba submersa para aeração e circulação de água, substrato de areia branca e plantas artificiais. As fêmeas de *Crenuchus spilurus* foram separadas em aquários-estoque para aclimação durante uma semana. O mesmo foi realizado com os machos. Durante esse período, os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes ornamentais que promove a cor (ColorBits - Tetra®). A ração ColorBits - Tetra® tem em sua composição os carotenoides beta-caroteno e bixina, e o corante vermelho eritrosina. A ração também

contém 475 g/kg de proteína bruta, 65 g/kg de extrato etéreo, 8000 mg/kg de ácidos graxos, 105 g/kg de matéria mineral, dentre outros componentes nutricionais.

A temperatura da água foi mantida em 24° C com auxílio de dois condicionadores de ar e foram feitas trocas parciais de água (25%) dos aquários-estoque semanalmente. Os aquários foram iluminados por luz natural indireta por meio de grandes janelas de vidro que ocupam uma parede do laboratório, assim os peixes permaneceram em regime de iluminação de 12 h de luz e 12 h no escuro. Nos aquários experimentais, disponibilizamos seções de tubos de PVC (20 a 25 mm de diâmetro, 10 cm de comprimento) para serem utilizados como abrigo e sítio de desova para os peixes. Esse arranjo estrutural permitiu a realização de observações e filmagens dos peixes e dos ovos depositados na parede interna dos tubos e quantificação das variáveis comportamentais estabelecidas para o estudo (Pires et al., 2018; Stefanelli-Silva et al., 2019).

Fotografia dos machos e medição das nadadeiras

Foram formados 18 casais de *Crenuchus spilurus*, sendo que em cada casal o macho e a fêmea tinham comprimento padrão similar, pois tanto machos quanto fêmeas rejeitam parceiros de comprimento padrão muito maiores do que os seus (Borghazan et al., 2019). Antes do início do experimento, foi feito o registro fotográfico dos machos para realizar a medição da área das nadadeiras dorsal e anal. Para isso, os machos foram anestesiados em solução de eugenol (150 mg/L). Após a diminuição da atividade natatória, os machos foram transferidos para uma superfície branca e úmida, onde suas nadadeiras dorsal e anal foram estendidas com um pincel de cerdas macias umedecidas e fixadas na superfície com alfinetes entomológicos finos. Cada macho tinha uma etiqueta de identificação e escala de referência (1 cm) para posterior mensuração do tamanho (Comprimento padrão - CP, em milímetros) do indivíduo e das áreas das nadadeiras (mm²).

As fotos foram tiradas dentro de um estúdio contendo uma câmera fotográfica digital (Nikon D3300) acoplada a um tripé colocado em posição superior à superfície branca onde os peixes estavam posicionados. Para melhor avaliação das cores dos peixes, foi utilizada uma fonte de luz *full spectrum* posicionada na parte superior do estúdio. Não houve interferência da luz ambiente nas fotos tiradas, pois o estúdio fotográfico foi fechado com placas de madeira. Todas as fotos foram tiradas com um alvo de cores (X-

Rite) para calibração de cor. As medidas de área das nadadeiras dorsal e anal dos machos foram tomadas a partir das imagens digitais obtidas no estudo, utilizando o software livre Image J (Schneider et al., 2012).

Após esse procedimento, os machos foram transferidos para aquários individuais com bomba aeradora para recuperação da anestesia. O período que compreendia anestesia dos machos, fotografias dos machos e a transferência dos machos para aquários com bomba para recuperação durou cerca de 10 minutos. Os machos foram mantidos nos aquários individuais para recuperação durante 24 h. Nenhum peixe sofreu sequelas devido à manipulação e uso de alfinetes entomológicos.

Estimativa do esforço despendido pelos machos durante o cuidado parental

Após as fotografias e recuperação dos machos da anestesia, os peixes foram transferidos para aquários experimentais. Cada aquário experimental abrigava um macho e uma fêmea de *Crenuchus spilurus* de tamanhos semelhantes (tolerância de diferença de tamanho < 5 mm). O aquário experimental (40 x 30 x 30 cm) foi montado de forma a simular o ambiente natural dos peixes, contendo areia branca de sílica como substrato, pequenas plantas artificiais e uma seção de tubo de PVC escuro (25 mm de diâmetro, 10 cm de comprimento) posicionado sobre o substrato no centro do aquário, que foi utilizado como sítio de desova. Foi inserida uma pequena folha de plástico transparente sobre a superfície interna do tubo de PVC, para que a desova ficasse aderida à ela e fosse possível retirar a desova para registro fotográfico (Fig. 2). Essa folha de plástico foi levemente lixada para facilitar a aderência dos ovos à superfície lisa do plástico.

O comportamento de cada casal foi gravado com uso de uma câmera digital posicionada na parte frontal do aquário e focalizando a parte interna do tubo, para que fosse possível visualizar o macho cuidando da desova até o fim do cuidado parental. Utilizamos câmeras de um sistema de vigilância para monitorar a ocorrência desovas e filmar o cuidado parental dos machos. As fêmeas não foram retiradas do aquário depois da desova, permanecendo até o fim do cuidado parental. Não foi possível obter filmagens do comportamento de cortejo de macho e fêmea antes da desova por conta do limite de armazenamento dos vídeos, sendo possível apenas filmar o período do cuidado parental.

A partir das filmagens, foi possível avaliar o esforço parental dos machos, estimado por meio da frequência média de movimentos de abano da desova. Foi calculada

uma média de frequência de abano para cada macho (ver tabela S1, Material suplementar). Essa frequência foi calculada por meio da contagem dos movimentos de abano realizados durante cinco intervalos de um minuto cada, distribuídos aleatoriamente em cada hora de observação do vídeo, enquanto durou o cuidado parental. Os movimentos de abano dos machos foram realizados nos períodos diurno e noturno, e as contagens dos movimentos de abano abrangeram todo esse período até o final do cuidado parental. O cuidado parental teve fim quando os machos consumiram todos os ovos presentes no sítio. Todos os machos apresentaram esse comportamento.

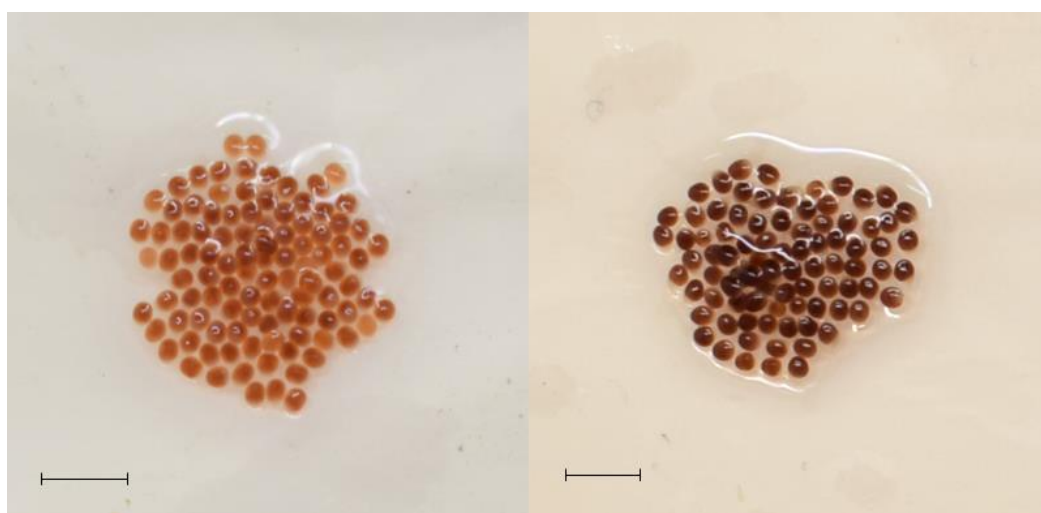


Fig. 2. Ovos de duas fêmeas de *Crenuchus spilurus* aderidos à uma folha de plástico transparente sob superfície branca. Foi medido o valor de vermelho em cada ovo e calculamos a média de cor vermelha para cada desova, como estimativa da quantidade de carotenoides presentes nos ovos. Escala: 0,5 mm. Diferentes tons de fundo das imagens ocorreram por diferenças na coloração do plástico. As imagens originais e não recortadas, que enquadram o alvo de cores que garante calibração consistente das cores das fotos estão disponíveis como Material suplementar.

Medição da coloração da desova

Toda vez que uma desova foi detectada nas imagens do sistema de vigilância, a folha de plástico com a desova foi retirada do interior do tubo e transferida para a mesma superfície branca no interior do estúdio fotográfico com uso de fonte de luz *full spectrum* para o registro da imagem e estimativa da sua coloração (Fig. 2). Cada desova possuía um código de identificação individual e escala de referência (1 cm). Após a obtenção das

imagens, a folha de plástico com a desova foi recolocada cuidadosamente no interior do tubo de PVC no aquário que continha o macho em cuidado parental. Em três ocorrências de desovas não realizamos o registro de imagem dos ovos, pois foi notado risco de que os ovos pudessem se soltar da folha de plástico onde estavam aderidos, o que causaria a interrupção imediata do cuidado parental.

As medidas de coloração das desovas foram realizadas a partir das imagens digitais obtidas. Foi utilizado o software livre Image J (Rasband et al. 2018) para realizar as mensurações de cor dos ovos. De cada imagem, nós extraímos valores de RGB de um pixel de cada ovo depositados sobre a folha de plástico. Nós utilizamos apenas o valor de R (*Red*, vermelho) como estimativa da quantidade de carotenoides presentes nos ovos. Foi calculada a média de cor vermelha para cada desova, feita a partir dos valores de vermelho dos ovos, para representar a quantidade de vermelho de cada desova. Também realizamos a contagem dos ovos e medição do diâmetro dos ovos utilizando o *software* Image J.

A avaliação da coloração por meio de imagens fotográficas é simples e rápida, além de quantificar as cores com precisão (Stevens et al., 2007). O nível de vermelho dos ovos é um estimador confiável da quantidade de carotenoides (Morrongiello et al., 2010; Riesch et al., 2011), visto que a expressão dessa cor em tecidos biológicos indica a presença desses compostos, que são obtidos apenas por meio de ingestão de alimentos, não sendo sintetizados. Além disso, no nosso estudo, a avaliação da quantidade de carotenoides através de imagens possibilita a obtenção de informações sem a necessidade de inutilizar os ovos, que foram devolvidos aos cuidados do macho e permitiram a avaliação do esforço do cuidado parental.

Análise de dados

Utilizamos as medidas das áreas das nadadeiras anal e dorsal como medida do grau de ornamentação e como potenciais indicadores da qualidade dos machos para as fêmeas. Uma vez que as áreas das nadadeiras dependem do tamanho do macho, utilizamos uma regressão linear simples para remover esse efeito. A medida de grau de ornamentação do macho foi obtida por meio dos resíduos da relação entre a raiz quadrada da área de cada nadadeira (dorsal e anal) e o comprimento padrão dos machos. Essa medida de grau de ornamentação foi investigada como tendo efeito sobre o investimento

materno em termos de carotenoides armazenados nos ovos. Investigamos a relação entre a ornamentação dos machos (variável independente) e a intensidade da coloração vermelha da desova (variável dependente) por meio de uma regressão linear simples. Também investigamos a relação entre ornamentação dos machos (variável independente) e o esforço despendido pelos machos no cuidado parental (variável dependente) por meio de regressão linear simples.

Realizamos uma regressão linear simples para investigar a relação entre a intensidade da coloração vermelha da desova (variável independente) e o esforço despendido pelos machos durante o cuidado parental (variável dependente). Calculamos a frequência média dos movimentos de abano realizados pelo macho durante todo o cuidado parental. Também realizamos regressão linear simples para avaliar se há relação entre o tamanho corporal das fêmeas e a cor dos ovos, tamanho (diâmetro) dos ovos e a quantidade de ovos, separadamente.

Consideramos a cor vermelha como indicativo de carotenoide na desova, onde valores mais altos de coloração indicam que a desova é mais clara (laranja-vermelho claro) e valores mais baixos indicam que a desova é mais escura (vermelho escuro). Todos os procedimentos estatísticos e figuras foram realizados no software R (R Core Team, 2019).

Nota ética

Todos os procedimentos realizados durante a execução deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), registrado sob o protocolo nº 012/2020. Nenhum peixe morreu ou sofreu sequelas físicas permanentes em decorrência dos procedimentos experimentais empregados no presente estudo.

RESULTADOS

Observamos uma relação significativa entre o grau de ornamentação dos machos e a intensidade de pigmentação vermelha da desova das fêmeas, indicando que fêmeas colocaram ovos com coloração vermelha mais escura quando pareadas com machos mais ornamentados (área da nadadeira dorsal: $n=15$; $p=0,002$; $r^2=0,52$; Fig. 3a; área da nadadeira anal: $n=15$; $p=0,01$; $r^2=0,40$; Fig. 3b).

Nós também observamos uma relação significativa entre a frequência média de abano da desova pelo macho (tido como indicador de esforço no cuidado paternal) e o grau de ornamentação (área da nadadeira dorsal: $n=18$; $p=0,0005$; $r^2=0,53$; Fig. 4a; área nadadeira anal: $n=18$; $p=0,0007$; $r^2=0,52$; Fig. 4b). Também observamos relação significativa indicando que machos mais ornamentados cuidaram de desovas mais ricas em carotenoides e realizaram mais esforço durante o cuidado parental das desovas mais pigmentadas ($n=15$; $p=0,001$; $r^2=0,55$; Fig. 5).

Não encontramos relação entre o tamanho das fêmeas e a intensidade da coloração vermelha dos ovos ($n=15$; $p=0,73$), tamanho das fêmeas e o tamanho dos ovos ($n=15$; $p=0,26$) e tamanho das fêmeas e a quantidade de ovos depositados nos ninhos ($n=15$; $p=0,23$).

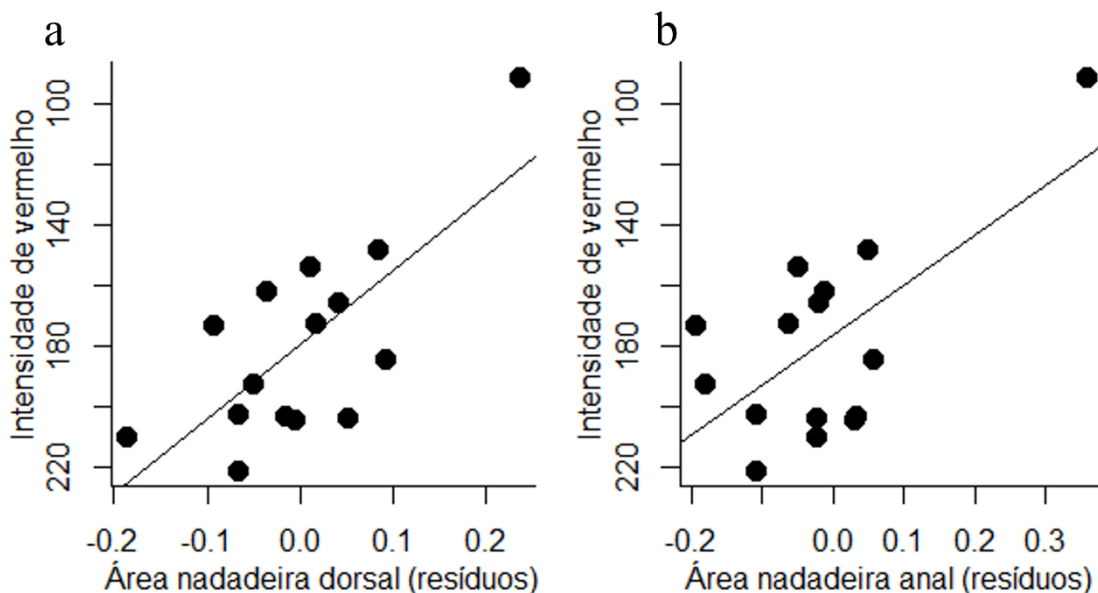


Fig. 3. Relação entre a intensidade de vermelho desova e os resíduos da nadadeira dorsal dos machos (a) e relação entre cor da desova e os resíduos da nadadeira anal dos machos (b). Os valores da cor da desova estão invertidos em ordem decrescente, valores mais altos da cor da desova indicam cor vermelha mais clara e valores mais baixos indicam cor vermelha mais escura.

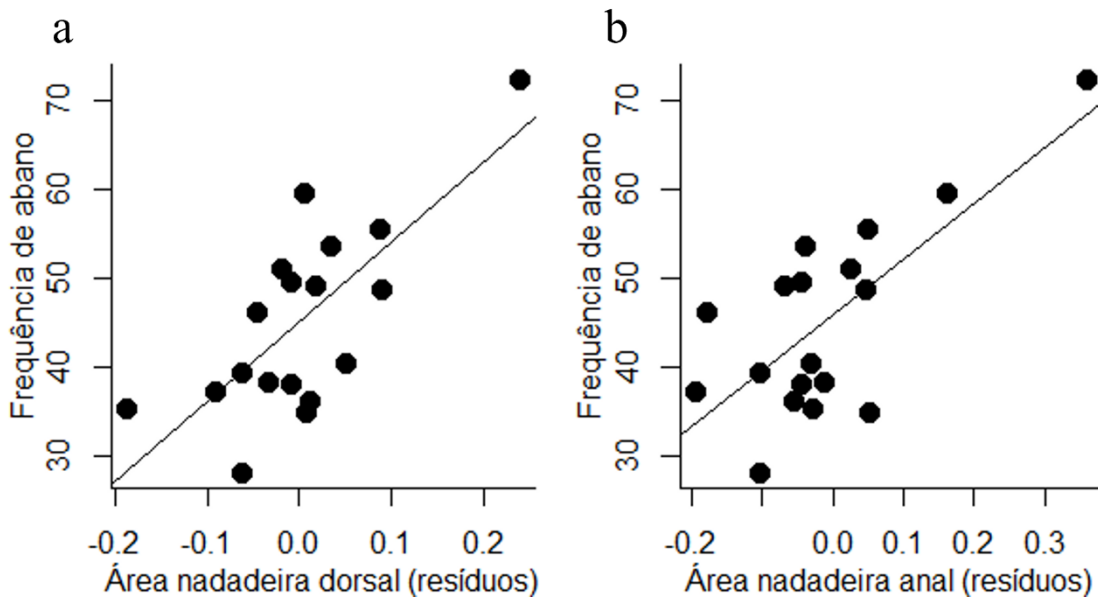


Fig. 4. Relação entre a frequência de abano realizado no cuidado parental (média/min de cada macho) e os resíduos da nadadeira dorsal (a) e relação entre a frequência de abano e os resíduos da nadadeira anal (b).

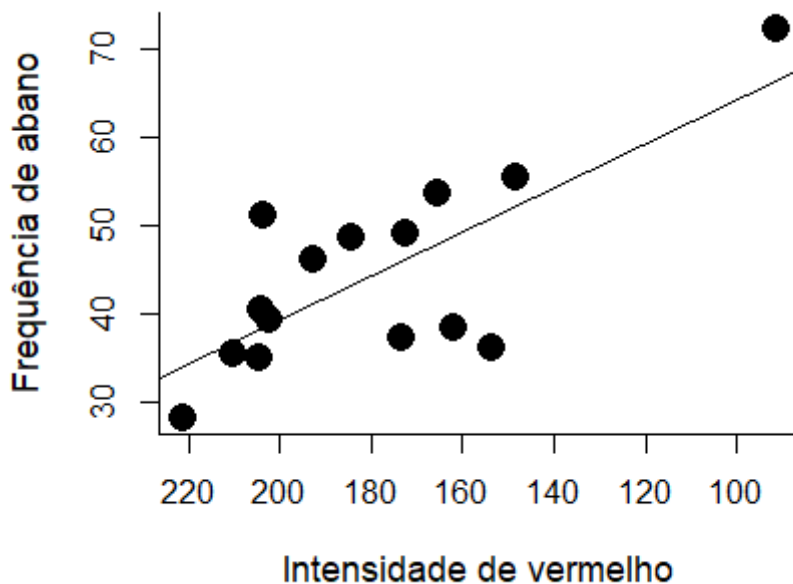


Fig. 5. Relação entre o abano realizado durante o cuidado parental (média/min de cada macho) e a intensidade de vermelho da desova sob o cuidado dos machos. Os valores da cor da desova estão em ordem decrescente, valores mais altos da cor da desova indicam cor vermelha mais clara e valores mais baixos indicam cor vermelha mais escura.

DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que fêmeas de *Crenuchus spilurus* ajustam o investimento materno conforme a qualidade dos machos com quem interagem e se reproduzem. Mais especificamente, observamos que fêmeas pareadas com machos com alto grau de ornamentação depositaram ovos com tons mais escuros de vermelho, um indicativo de maior transferência de carotenoides para os ovócitos. Ainda, machos que possuem ornamentos maiores do que o esperado pelos seus tamanhos investiram mais energia no cuidado parental de desovas com coloração vermelha mais escura. Olhando os resultados de forma combinada, sugerimos que o tamanho do ornamento dos machos é um sinal honesto de qualidade do parceiro, ao sinalizar a qualidade do cuidado parental do macho. Nossos resultados são compatíveis com a hipótese da alocação diferencial de recursos pela fêmea, que prevê que o investimento nos ovos é maior quando o macho apresenta maior qualidade (Burley, 1986).

Nossos resultados sugerem que fêmeas de *C. spilurus* modulam o investimento em carotenoide para os ovos em resposta à qualidade dos machos, este sendo indicado pelo grau de ornamentação. A alocação diferencial de recursos é aparentemente comum em aves (Cunningham & Russell, 2000; de Lope & Moller, 1993; Gilbert et al., 2006; Horváthová et al., 2011; Velando et al., 2006), e alguns casos também já foram reportados para peixes (Evans et al., 2010; Kolm, 2001; Skinner & Watt, 2007). Esses estudos indicam que fêmeas ajustam o investimento de recursos nos ovos de acordo com a ornamentação do parceiro, e que esta alocação diferencial ocorre durante o período entre o início do cortejo (*pairing*) e o momento da desova (Uusi-Heikkilä et al., 2012; Velando et al., 2006). É importante mencionar que a intensidade da coloração vermelha da desova não apresenta relação com o tamanho da fêmea, o que indicaria uma possível relação simples entre o investimento em carotenoides na desova e a quantidade de energia/condição corporal das fêmeas. Isso reforça a hipótese de que haja de fato mecanismos envolvendo a alocação diferencial de recursos na prole pelas fêmeas, mediada pela qualidade do macho parceiro.

Carotenoides possuem papel importante na transmissão de sinais visuais e são importantes no desenvolvimento embrionário dos ovos (Royle et al., 1999; Saino et al., 2002). Isso justifica a atenção sobre esses pigmentos como indicadores de qualidade e viabilidade da prole. Estudos com aves se aprofundaram sobre a importância dos carotenoides para o desenvolvimento dos filhotes (Berthouly et al., 2008; Royle et al.,

1999). Em peixes, os efeitos dos carotenoides são mais complexos. Trabalhos reportaram ausência de efeito dos carotenoides na sobrevivência ou qualidade da prole (Craik, 1986; Christiansen & Torrissen, 1997; Svensson et al., 2006), mas também há evidências de que carotenoides são muito importantes nos estágios iniciais do desenvolvimento (Palma et al., 2017; Tyndale et al., 2008). Contudo, mesmo na ausência inequívoca de benefícios fisiológicos diretos de uma alta quantidade de carotenoides na desova, há a possibilidade de que essa característica tenha evoluído sendo mediada por seleção sexual. A prole desenvolvida com maior teor de carotenoide pode ser mais eficiente na aquisição e uso de carotenoides e com isso ser mais efetiva na transmissão de sinais sexuais na fase adulta (Biard et al., 2009). Não sabemos os efeitos diretos dos carotenoides no desenvolvimento de ovos e larvas de *Crenuchus spilurus*, mas parece claro o papel desses pigmentos na modulação do investimento de recursos dos pais na prole.

Alguns autores argumentam que, segundo a hipótese da alocação diferencial de recursos, as fêmeas escolheriam os machos para a obtenção de benefícios indiretos (bons genes). Entretanto, essa hipótese não prevê o aumento no cuidado parental de acordo com a ornamentação dos machos. Seria esperado menor investimento paterno em machos conspícuos, como evidenciado por relações negativas entre cuidado parental e grau de ornamentação do macho (Burley, 1986; Linville et al., 1998; Mitchell et al., 2007). Essa relação negativa explicaria o investimento inicial alto da fêmea na desova, que alocaria mais recursos para complementar ou compensar o baixo investimento do macho no cuidado parental (ou em outros benefícios diretos). Salientamos que a maioria desses estudos foram conduzidos com aves de cuidado biparental, e onde outros fatores podem influenciar a relação entre o investimento do macho em cuidado parental e seu grau de ornamentação. Por exemplo, Mitchell et al. (2007), estudando a ave de pequeno porte *Geothlypis trichas* (*Common yellowthroat*), observaram que machos mais ornamentados realizam menos cuidado parental, pois tais machos investem mais energia em defender o território contra outros machos e em esforço de corte para obter chances de reprodução com outras fêmeas. Em *Crenuchus spilurus*, os ovos são depositados em cavidades pequenas e normalmente em locais afastados de onde há elevada concentração de coespecíficos. Acreditamos que isso possa impedir machos de aumentar *fitness* ao deixar uma desova no ninho e sair para cortejar outras fêmeas.

Em nossa experiência investigando o comportamento reprodutivo de *C. spilurus* em laboratório, não é comum que machos tenham oportunidade de cuidar de mais de uma

desova ao mesmo tempo. Um caso em que um macho possivelmente cuidou de desovas de mais de uma fêmea no mesmo ninho foi sugerido em uma observação de campo (Pires et al., 2016). Assim, na maioria das vezes o macho precisa investir em uma única desova de cada vez, e a quantidade de investimento é baseada no valor da desova, já que ele não pode sair do ninho com frequência em busca de outras oportunidades de reprodução.

Fêmeas também podem basear suas escolhas em benefícios diretos oferecidos, mas que não são benefícios herdáveis (Cunningham & Russell, 2001; Mousseau & Fox, 1998; Ratikainen & Kokko, 2010), e nossos resultados também indicam que fêmeas de *Crenuchus spilurus* obtêm benefícios diretos da escolha de machos mais ornamentados. Diferente da relação esperada se fêmeas escolhessem machos ornamentados para obtenção de benefícios indiretos, nós observamos uma relação positiva entre grau de ornamentação e investimento em cuidado parental, indicando que a qualidade do cuidado com a prole é honestamente sinalizada pelos ornamentos do macho. Nesse cenário, a qualidade do cuidado parental desempenhado pelos machos possivelmente constitui um alvo de seleção sexual.

Com base no conjunto de resultados obtidos neste estudo, sugerimos que o investimento na prole por machos e fêmeas de *C. spilurus* seja resultado de uma relação de estimulação mútua. É possível que o bom desempenho de machos mais ornamentados no cuidado parental dos machos só possa ser realizado quando combinado com o alto investimento da fêmea na prole. Por outro lado, a modulação do investimento das fêmeas poderia ser mantida pela evolução dos ornamentos como um sinal honesto de qualidade do cuidado parental, o que permitiria que fêmeas investissem uma quantidade de nutrientes na desova de acordo com os benefícios diretos que poderiam receber. De fato, um parceiro pode ter influência no investimento do outro, levando-o mais próximo ou mais longe de sua capacidade máxima de cuidado parental, como reportado em muitos casos de conflito sexual sobre o cuidado parental, onde o cuidado de um dos pais compensa ou complementa o investimento mais baixo do parceiro (Paquet & Smiseth, 2016). Especulamos que, mesmo que machos mais ornamentados de *C. spilurus* sejam bons pais em potencial, em um cenário onde um macho mais ornamentado consiga uma desova de menor qualidade ou com poucos ovos, ele provavelmente não irá realizar o seu melhor desempenho durante cuidado parental, pois a desova não teria valor reprodutivo alto o suficiente. Nesses casos, o macho poderia consumir os ovos e investir em oportunidades futuras de reprodução. Estudos futuros deveriam conseguir manipular

apenas a percepção da fêmea sobre a qualidade do macho para conseguir claramente separar esses efeitos.

Os mecanismos evolutivos que mantêm os sinais sexuais como indicadores honestos de qualidade ainda é um tema amplamente discutido. O princípio do handicap (*handicap hypothesis*) é uma das hipóteses mais populares que tentam explicar como um sinal sexual permanece honesto ao longo do tempo evolutivo (Cotton et al., 2004; Grafent, 1990; Zahavi, 1975). Para isso, os sinais sexuais devem ser custosos e/ou representarem riscos extras à sobrevivência do emissor, o que manteria o sinal honesto pois apenas parceiros de alta qualidade poderiam transmitir sinais sexuais com custos altos (Zahavi, 1975). Entretanto, essa hipótese é alvo de críticas, pois não considera que parceiros de baixa qualidade podem blefar na transmissão de sinais, e reforça apenas que os sinais custosos seriam apenas exagerados, e não necessariamente mais eficientes (Penn & Számadó, 2020).

Blefas na sinalização sexual ocorre entre machos de *Gasterosteus aculeatus*: machos que foram mal alimentados e se encontram em más condições e investem mais na coloração vermelha do corpo do que machos em boas condições (Candolin, 1999). Isso ocorre porque machos em más condições têm menores chances futuras de reprodução e sobrevivência, o que os levaria a investir mais energia na reprodução atual (Candolin, 1999), resultando em sinalização desonesta de qualidade. Entretanto, pode ser que esse tipo de blefe ocorra apenas em situações muito específicas. Candolin (2000) mostrou em outro trabalho com *G. aculeatus* que quando há competição sexual entre machos, essa competição pode contribuir para os sinais de qualidade serem mais honestos, pois machos em más condições que estejam blefando na transmissão dos sinais podem diminuir a intensidade da coloração corporal quando confrontados por machos em melhores condições. Em *Crenuchus spilurus*, nossos resultados indicam que os ornamentos dos machos constituem um sinal honesto da qualidade, visto que machos mais ornamentados realizam melhor cuidado parental e as fêmeas respondem ao sinal dos machos colocando ovos mais pigmentados. No nosso desenho amostral, um sinal desonesto de qualidade do macho seria evidenciado por machos de elevado grau de ornamentação mas que tivessem baixo desempenho no cuidado parental, o que não ocorreu.

Em nosso estudo, machos de *Crenuchus spilurus* consumiram todos os ovos presentes no sítio de desova. Não está claro o motivo pelo qual os machos consumiram os ovos e não sabemos o quanto a manipulação dos ovos pela pesquisadora pode ter tido

efeito nesse comportamento. Esperávamos que, em caso de estresse somente por manipulação da desova, machos iriam consumir imediatamente os ovos, interrompendo o cuidado parental. Mas o consumo dos ovos, na maioria dos casos ocorreu muitos dias após a remoção dos ovos para fotografia. É possível que o consumo dos ovos pelos machos tenha sido resultado da combinação de práticas do ambiente de laboratório, como a manipulação do ninho e observação constante do ambiente. Acreditamos que o consumo dos ovos pelos machos não interferiu nos resultados do trabalho, mais especificamente no desempenho dos machos durante o cuidado parental, pois os machos apresentaram comportamento comum durante o cuidado e não mostravam sinais de estresse imediato por manipulação do ovos do ninho.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que fêmeas de *Crenuchus spilurus* alocam mais carotenoides para os ovos quando desovam com machos mais ornamentados. O estímulo para a alocação de carotenoides nos ovos aparenta ser a qualidade do cuidado parental provida pelos machos e sinalizada pelo tamanho relativo (ou conspicuidade) de seus ornamentos. A quantidade de carotenoides depositados nos ovos (e, talvez, na pigmentação dos ornamentos dos machos) parecem mediar o investimento dos pais na reprodução, e é razoável supor que têm importância para o desenvolvimento dos ovos e nas fases iniciais de desenvolvimento das larvas.

Sugerimos que, em estudos futuros, os efeitos dos carotenoides no desenvolvimento de ovos e larvas sejam avaliados, o que poderá fornecer evidências extras das vantagens (aumento de *fitness*) associadas a esse tipo de investimento em peixes. Também sugerimos que estudos futuros avaliem a relação entre tempo efetivo de cortejo e a quantidade de carotenoides alocados nas desovas, como uma forma adicional de inferir a capacidade das fêmeas de avaliar a qualidade dos machos e modular o seu investimento na prole.

REFERENCIAS

- Alijanpour, N., Bani, A., Tizkar, B., Amiri, K., & Nazari, R. M. (2015). Carotenoid content and colour of eggs in migratory broodstock kutum (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901) (Osteichthyes: Cyprinidae) in the Shirud and Tajan Rivers, South Caspian Sea. *Italian Journal of Zoology*, 82(1), 25–32.
- Alonso-Alvarez, C., Pérez-Rodríguez, L., Ferrero, M. E., de-Blas, E. G., Casas, F., & Mougeot, F. (2012). Adjustment of female reproductive investment according to male carotenoid-based ornamentation in a gallinaceous bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(5), 731–742.
- Baki, B., Kaya Öztürk, D., & Tomgışı, S. (2019). The Use of Egg Color of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a Quality Criterion. *Journal of Engineering Research and Application*, 9(3), 43–46.
- Berthouly, A., Helfenstein, F., Tanner, M., & Richner, H. (2008). Sex-related effects of maternal egg investment on offspring in relation to carotenoid availability in the great tit. *Journal of Animal Ecology*, 77(1), 74–82.
- Biard, C., Gil, D., Karada, F., Saino, N., Spottiswoode, C. N., Surai, P. F., & Møller, A. P. (2009). Maternal effects mediated by antioxidants and the evolution of carotenoid-based signals in birds. *American Naturalist*, 174(5), 696–708.
- Blount, J. D., Houston, D. C., & Møller, A. P. (2000). Why egg yolk is yellow. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(2), 47–49.
- Borghazan, E., da Silva Pinto, K., Zuanon, J., & da Silva Pires, T. H. (2019). Someone like me: Size-assortative pairing and mating in an Amazonian fish, sailfin tetra *Crenuchus spilurus*. *PLoS ONE*, 14(9), e0222880.
- Brush, A. H. (1990). Metabolism of carotenoid pigments in birds. *The FASEB Journal*, 4(12), 2969–2977.
- Burley, N. (1986). Sexual selection for aesthetic traits in species with biparental care. *The American Naturalist*, 127(4), 415–445.
- Butler, M. W., & McGraw, K. J. (2013). Eggshell coloration reflects both yolk characteristics and dietary carotenoid history of female mallards. *Functional Ecology*, 27(5), 1176–1185.
- Candolin, U. (1999). The relationship between signal quality and physical condition: is sexual signalling honest in the three-spined stickleback? *Animal Behaviour*, 58(6), 1261–1267.

- Candolin, U. (2000). Changes in expression and honesty of sexual signalling over the reproductive lifetime of sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1460), 2425–2430.
- Christiansen, R., & Torrissen, O. J. (1997). Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon. In *Aquaculture*, 153(1997), 51-62.
- Cotton, S., Fowler, K., & Pomiankowski, A. (2004). Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1541), 771–783.
- Craik, J. C. A. (1985). Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47(1), 61–88.
- Cunningham, E. J. A., & Russell, A. F. (2000). Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. *Nature*, 404(6773), 74–77.
- Cunningham, E. J. A., & Russell, A. F. (2001). Differential allocation and ‘good genes’: comment from Cunningham & Russell. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(1), 21.
- de Lope, F., & Moller, A. P. (1993). Female Reproductive Effort Depends on the Degree of Ornamentation of Their Mates. *Evolution*, 47(4), 1152-1160.
- Dentressangle, F., Boeck, L., & Torres, R. (2008). Maternal investment in eggs is affected by male feet colour and breeding conditions in the blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(12), 1899–1908.
- Donelson, J. M., McCormick, M. I., & Munday, P. L. (2008). Parental condition affects early life-history of a coral reef fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360(2), 109–116.
- Englmaierová, M., Bubancová, I., & Skřivan, M. (2014). Carotenoids and egg quality. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 17(02), 55–57.
- Evans, J. P., Box, T. M., Brooshooft, P., Tatler, J. R., & Fitzpatrick, J. L. (2010). Females increase egg deposition in favor of large males in the rainbowfish, *Melanotaenia australis*. *Behavioral Ecology*, 21(3), 465–469.
- Galeotti, P., Rubolini, D., Fea, G., Ghia, D., Nardi, P. A., Gherardi, F., & Fasola, M. (2006). Female freshwater crayfish adjust egg and clutch size in relation to multiple male traits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1590), 1105–1110.

- Gilbert, L., Williamson, K. A., & Graves, J. A. (2012). Male attractiveness regulates daughter fecundity non-genetically via maternal investment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1728), 523–528.
- Gilbert, L., Williamson, K. A., Hazon, N., & Graves, J. A. (2006). Maternal effects due to male attractiveness affect offspring development in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1595), 1765–1771.
- Grafent, A. (1990). Biological Signals as Handicaps. In *J. theor. Biol*, 144, 517-546.
- Horváthová, T., Nakagawa, S., & Uller, T. (2011). Strategic female reproductive investment in response to male attractiveness in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1726), 163–170.
- Hudman, S. P., & Gotelli, N. J. (2007). Intra - and intersexual selection on male body size are complimentary in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). In *Source: Behaviour*, 144(9), 1068-1086.
- Kolm, N. (2001). Females produce larger eggs for large males in a paternal mouthbrooding fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1482), 2229–2234.
- Linville, S. U., Breitwisch, R., & Schilling, A. J. (1998). Plumage brightness as an indicator of parental care in northern cardinals. In *Animal Behaviour*, 55(1), 119-127.
- Mitchell, D. P., Dunn, P. O., Whittingham, L. A., & Freeman-Gallant, C. R. (2007). Attractive males provide less parental care in two populations of the common yellowthroat. *Animal Behaviour*, 73(1), 165–170.
- Morrongiello, J. R., Bond, N. R., Crook, D. A., & Wong, B. B. M. (2010). Nuptial coloration varies with ambient light environment in a freshwater fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(12), 2718–2725.
- Mousseau, T. A., & Fox, C. W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), 403–407.
- Navarro, C., Pérez-Contreras, T., Avilés, J. M., McGraw, K. J., & Soler, J. J. (2011). Blue-green eggshell coloration reflects yolk antioxidant content in spotless starlings *Sturnus unicolor*. *Journal of Avian Biology*, 42(6), 538–543.
- Olson, V. A., & Owens, I. P. F. (1998). Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(12), 510–514.

- Palma, J., Andrade, J. P., & Bureau, D. P. (2017). The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality and growth of long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 23(2), 304–312.
- Paquet, M., & Smiseth, P. T. (2016). Maternal effects as a mechanism for manipulating male care and resolving sexual conflict over care. In *Behavioral Ecology*, 27(3), 685–694.
- Penn, D. J., & Számadó, S. (2020). The Handicap Principle: how an erroneous hypothesis became a scientific principle. *Biological Reviews*, 95(1), 267–290.
- Pires, T. H. S., Borghezán, E. A., Machado, V. N., Powell, D. L., Röpke, C. P., Oliveira, C., Zuanon, J., & Farias, I. P. (2018). Testing Wallace’s intuition: water type, reproductive isolation and divergence in an Amazonian fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(6), 882–892.
- Pires, T. H. S., Farago, T. B., Campos, D. F., Cardoso, G. M., & Zuanon, J. (2016). Traits of a lineage with extraordinary geographical range: ecology, behavior and life-history of the sailfin tetra *Crenuchus spilurus*. *Environmental Biology of Fishes*, 99(12), 925–937.
- Rasband, W.S. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018
- Ratikainen, I. I., & Kokko, H. (2010). Differential allocation and compensation: Who deserves the silver spoon? In *Behavioral Ecology*, 21(1), 195–200.
- Riesch, R., Schlupp, I., Langerhans, R. B., & Plath, M. (2011). Shared and unique patterns of embryo development in extremophile poeciliids. *PLoS ONE*, 6(11), e27377.
- Rios-Cardenas, O., Brewer, J., & Morris, M. R. (2013). Maternal investment in the swordtail fish *Xiphophorus multilineatus*: Support for the differential allocation hypothesis. *PLoS ONE*, 8(12), e82723.
- Royle, N. J., Surai, P. F., McCartney, R. J., & Speake, B. K. (1999). Parental investment and egg yolk lipid composition in gulls. *Functional Ecology*, 13(3), 298–306.
- Saino, N., Bertacche, V., Ferrari, R. P., Martinelli, R., Møller, A. P., & Stradi, R. (2002). Carotenoid concentration in barn swallow eggs is influenced by laying order, maternal infection and paternal ornamentation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1501), 1729–1733.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.

- Sheldon, B. C. (2000). Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology & Evolution*, *15*(10), 397–402.
- Skinner, A. M. J., & Watt, P. J. (2007). Strategic egg allocation in the zebra fish, *Danio rerio*. *Behavioral Ecology*, *18*(5), 905–909.
- Stefanelli-Silva, G., Zuanon, J., & Pires, T. (2019). Revisiting Amazonian water types: experimental evidence highlights the importance of forest stream hydrochemistry in shaping adaptation in a fish species. *Hydrobiologia*, *830*(1), 151–160.
<https://doi.org/10.1007/s10750-018-3860-0>
- Stevens, M., Párraga, C. A., Cuthill, I. C., Partridge, J. C., & Troscianko, T. S. (2007). Using digital photography to study animal coloration. *Biological Journal of the Linnean Society*, *90*, 211–237.
- Svensson, P. A., Pélabon, C., Blount, J. D., Surai, P. F., & Amundsen, T. (2006). Does female nuptial coloration reflect egg carotenoids and clutch quality in the Two-Spotted Goby (*Gobiusculus flavescens*, Gobiidae)? *Functional Ecology*, *20*(4), 689–698.
- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Tyndale, S. T., Letcher, R. J., Heath, J. W., & Heath, D. D. (2008). Why are salmon eggs red? Egg carotenoids and early life survival of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Evolutionary Ecology Research*, *10*, 1187–1199.
- Uusi-Heikkilä, S., Böckenhoff, L., Wolter, C., & Arlinghaus, R. (2012). Differential allocation by female zebrafish (*Danio rerio*) to different-sized males—an example in a fish species lacking parental care. *PLoS One*, *7*(10), e48317.
- Velando, A., Beamonte-Barrientos, R., & Torres, R. (2006). Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: An honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia*, *149*(3), 535–542.
- Wiegmann, D. D., & Baylis, J. R. (1995). Male body size and paternal behaviour in smallmouth bass, *Micropterus dofomiei* (Pisces: Centrarchidae). In *Anim. Behav* (Vol. 50).
- Zahavi, A. (1975). Mate Selection - A Selection for a Handicap. In *J. theor. Biol*, *53*, 205–214.

MATERIAL SUPLEMENTAR



Fig. S1. Ovos de uma fêmea de *Crenuchus spilurus* aderidos à uma folha de plástico transparente sob superfície branca. Foto enquadrando o alvo de cores que garante calibração consistente das cores das fotos. Escala: 1 cm.



Fig. S2. Ovos de uma fêmea de *Crenuchus spilurus*, em tom vermelho escuro, aderidos à uma folha de plástico transparente sob superfície branca. Foto enquadrando o alvo de cores que garante calibração consistente das cores das fotos. Escala: 1 cm.

Tabela S1. Média de abano por minuto realizado por cada macho e quantidade de ovos presentes no sítio de desova.

Macho	Comprimento padrão macho (mm)	Comprimento padrão fêmea (mm)	Média de abano/minuto do macho	Número de ovos no sítio de desova
1	41.48	40.31	38.08	14
2	41.48	39.23	49.59	104
3	40.31	39.35	34.9	119
4	36.86	37.05	59.66	14
5	36.83	36.74	28.21	46
6	36.83	35.11	39.29	10
7	36.77	36.3	46.11	29
8	36.25	37.22	72.3	86
9	36.19	36	38.4	103
10	35.94	36.01	55.5	77
11	35.86	36.64	37.2	74
12	35.05	34.07	49.2	39
13	35	34	36.2	14
14	34.73	34.32	35.36	43
15	34.34	34.98	40.54	46
16	34.15	34.03	51.1	93
17	34.03	33.51	48.7	42
18	32.15	34.86	53.6	38