



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE  
INDIRIZZO: BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA  
CICLO XXII

# **CARATTERI SESSUALI MULTIPLI E SCELTA FEMMINILE IN *SALARIA PAVO***

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Tulio Pozzan

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

**Supervisore :**Ch.mo Prof. Maria Berica Rasotto

**Dottorando :** Matteo Pizzolon



## RIASSUNTO

*Il concetto di selezione sessuale basata sulla scelta femminile è sempre stato una delle parti più controverse della teoria evolutiva proposta da Darwin, tanto che solo nel 1982 è stato compiuto uno studio sperimentale che ha dimostrato per la prima volta che le femmine possono scegliere il compagno riproduttivo sulla base degli ornamenti maschili. In seguito a questo primo lavoro, numerosi studi hanno dimostrato in moltissime specie animali che la selezione intersessuale è uno dei più importanti processi per l'evoluzione e la speciazione, in quanto porta allo sviluppo di caratteri connessi alla segnalazione della qualità del compagno riproduttivo e/o al riconoscimento dei conspecifici. Inoltre, sia modelli genetici che studi sperimentali hanno dimostrato l'idea fischeriana della coevoluzione auto rinforzante dei caratteri sessuali secondari (CSS) e della preferenza femminile. Tuttavia, il problema cruciale della teoria Darwiniana, cioè la ragione per cui le femmine debbano preferire gli individui con ornamenti più sviluppati, e quali benefici possano ottenere da questa scelta, rimane ancora controverso.*

*I benefici che le femmine possono ottenere possono essere raggruppati in due differenti categorie: benefici diretti, come ad esempio una maggiore fecondità, migliori cure parentali o un minor rischio di contrarre infezione durante l'accoppiamento, oppure in benefici indiretti, legati a benefici genetici che aumentano la sopravvivenza o il successo riproduttivo della prole. Se la scelta femminile è volta ad ottenere benefici, allora è lecito aspettarsi che lo sviluppo dei CSS e la qualità dei maschi siano tra loro correlati positivamente. Questo in realtà non è sempre vero, e esistono diversi motivi per cui invece i maschi che investono maggiormente nello sviluppo dei CSS possano non avere sufficienti risorse per le altre qualità, come ad esempio le cure parentali, l'investimento per la produzione di spermatozoi e per il sistema immunitario. Ad esempio in alcuni casi, in specie in cui sono presenti tattiche riproduttive alternative, i maschi territoriali, che hanno CSS più sviluppati, producono eiaculati di minor qualità rispetto ai maschi che parassitano gli accoppiamenti. Inoltre, esiste un sempre maggior numero di testimonianze che in molte specie, soprattutto insetti e uccelli, siano presenti compromessi tra l'investimento in CSS e l'investimento per il sistema immunitario.*

*La comprensione dei meccanismi di selezione intersessuale risulta ancora più complicata, se si considera che nell'ultimo ventennio ci si è resi conto che in molte specie le femmine basano la scelta del compagno non su un singolo tratto, ma sulla base di caratteri multipli. Il perché di questa contemporanea presenza di più tratti è tuttora dibattuta, e ha portato alla formulazione di diverse ipotesi. L'uso dei tratti multipli potrebbe essere: I) adattativa, se aumenta la fitness della femmina riducendo il costo della scelta e la possibilità di errori; II) non avere influenza sulla fitness della femmina, ma essere dovuta al mantenimento di preferenze femminili innate o sviluppatesi in altri contesti e con altre funzioni; III) disadattativa, se diminuisce la fitness delle femmine, in quando i maschi sfruttano bias sensoriali per manipolare la scelta femminile.*

*Lo scopo di questo progetto è stato quello di determinare se i diversi tratti esibiti dai maschi siano informativi e, se sì, di quali qualità maschili. Inoltre, ha cercato di valutare la possibile presenza di compromessi tra l'investimento maschile in alcuni tratti o qualità a discapito dell'investimento in altri. Infatti, sebbene la presenza di CSS multipli sia molto diffusa nel regno animale, raramente si sono condotti studi che abbiano cercato di valutare tutte le diverse componenti dei tratti maschili e la possibile presenza di compromessi tra l'investimento per il loro sviluppo e l'investimento in tratti post-copulatori o del sistema immunitario.*

*La specie modello scelta per questo lavoro è Salaria Pavo (Risso, 1810). Salaria pavo è un blennide di medie dimensioni (lunghezza massima 15 cm), che presenta un forte dimorfismo sessuale, in cui i maschi hanno dimensioni maggiori rispetto alle femmine, esibiscono una vistosa cresta cefalica e hanno i primi due raggi della pinna anale modificati in una coppia di ghiandole anali. Durante la stagione riproduttiva i maschi difendono un nido (generalmente una cavità nella roccia o un guscio vuoto di bivalve) in cui diverse femmine depongono uova di tipo demerso, incollandole in singolo strato alle pareti interne del nido. Il maschio poi difenderà le uova, compiendo cure parentali su di esse, sino alla schiusa. In questa specie è stata inoltre descritta la presenza di tattiche riproduttive alternative, con maschi piccoli e che non hanno CSS sviluppati che parassitano gli accoppiamenti dei maschi territoriali. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che il secreto delle ghiandole anali produce un muco ricco di una sostanza con potere antimicrobico. È stato ipotizzato che i maschi spalmano questo secreto sulle uova durante le cure parentali.*

*Il progetto è stato organizzato in tre parti: I) studio della relazione fra l'espressione dei caratteri maschili dimorfici e il successo di accoppiamento; II) studio della relazione fra lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari dei maschi e le loro possibili qualità; III) studio delle relazioni tra diversi aspetti dell'investimento riproduttivo. Durante la prima fase sono stati raccolti in natura i dati del successo di accoppiamento dei maschi (numero di uova nel nido e numero di display di corteggiamento femminili ricevuti) e confrontati con lo sviluppo dei tratti maschili. Sia la ghiandola anale che la cresta cefalica sono risultati tratti che hanno influenza sul successo di accoppiamento maschile. Con esperimenti di preferenza femminile si è inoltre dimostrato che questi tratti sono sottoposti a selezione intersessuale, in quanto le femmine hanno preferito corteggiare di maschi che avevano creste e ghiandole maggiormente sviluppate. La seconda parte del lavoro è stata incentrata sulla valutazione delle informazioni sulla qualità dei maschi che le femmine possono ricavare valutando i maschi sulla base di questi due CSS. Questo studio è stato affrontato con due differenti approcci, per valutare: a) l'espressione dei caratteri sia pre che postcopulatori in maschi sottoposti ad uno stress immunitario; b) il ruolo svolto dalle ghiandole anali nella protezione delle uova da infezioni. Per valutare il legame tra l'espressione dei CSS maschili, la qualità del loro eiaculato e lo stato di salute, un gruppo di maschi è stato trattato con iniezione di LPS, un antigene di Escherichia coli, che è un potente attivatore del sistema immunitario che induce rapidamente una risposta infiammatoria. La cresta è risultata l'unico tratto a subire l'influenza del trattamento, mostrando una diminuzione sia nell'estensione che nell'intensità della sua colorazione gialla. Per valutare il ruolo delle ghiandole anali nella protezione delle uova sono state studiate tre diverse caratteristiche: a) la relazione tra le dimensioni delle ghiandole e il contenuto proteico del loro secreto; b) l'attività antimicrobica del loro secreto contro 7 diversi ceppi batterici marini; c) l'efficacia del secreto nell'aumentare la sopravvivenza delle uova. Le dimensioni delle ghiandole anali sono risultate positivamente correlate con il contenuto proteico della loro secrezione, secrezione che è risultata inoltre avere potere antimicrobico, inibendo la crescita di 5 dei 7 ceppi batterici testati e proteggendo le uova da infezioni batteriche. Nella terza e ultima parte del lavoro sono stati raccolti dati sul campo relativi all'apporto delle cure parentali sulle uova di un gruppo di maschi. Questi dati sono quindi stati confrontati con le caratteristiche maschili, sia in termini dello sviluppo dei CSS, che in qualità dell'eiaculato e stato del sistema immunitario. L'investimento complessivo in cure parentali (considerando sia le ghiandole anali che alcuni comportamenti) è risultato negativamente correlato con l'investimento per l'accoppiamento (sia in termini di dimensioni della cresta che numero di spermatozoi prodotti). Le dimensioni delle ghiandole anali e il tasso di frequenza con cui i maschi spalmano il loro secreto sulle uova sono risultati correlati positivamente con due indici di stress immunitario, rispettivamente il rapporto tra il numero di granulociti e quello dei linfociti e il livello di nitriti e nitrati nel sangue. Le*

dimensioni della cresta sono inoltre risultate correlate positivamente al numero di spermatozoi, mentre nessuna relazione è risultata tra questa caratteristica dell'eiaculato e le dimensioni complessive del maschio e delle ghiandole anali.

I risultati di questo studio evidenziano l'importanza della cresta cefalica e della ghiandola anale nel successo riproduttivo dei maschi di *S. pavo*. La preferenza femminile sulla base delle dimensioni della cresta è stata dimostrata sia dalle osservazioni in natura che negli esperimenti con i modelli di maschio, in cui i maschi con cresta di maggiori dimensioni sono stati i maschi più corteggiati dalle femmine. La colorazione gialla della cresta è risultata essere un carattere legato allo stato di salute del maschio, come dimostrato negli esperimenti con l'LPS. È noto infatti che questo antigene provoca negli organismi un aumento delle specie reattive dell'ossigeno, con conseguente aumento dello stress ossidativo. Questo stress viene spesso contrastato attraverso la mobilitazione di antiossidanti a spese dell'espressione dei CSS. La diminuzione della colorazione gialla della cresta osservata nei maschi dopo il trattamento potrebbe quindi essere dovuta alla mobilitazione dei carotenoidi, probabilmente responsabili della colorazione, in risposta al forte stress ossidativo indotto dall'LPS. Infatti i carotenoidi sono composti antiossidanti e hanno un ruolo nell'attivazione del sistema immunitario. Inoltre, queste sostanze non possono essere direttamente prodotte dall'organismo, ma vengono unicamente acquisite attraverso la dieta, e gli individui sono costretti quindi ad ottimizzarne l'utilizzo tra l'espressione dei CSS, la risposta immunitaria e la protezione da stress ossidativo. La colorazione della cresta dei maschi di *S. pavo* sembra quindi rappresentare un segnale onesto della loro condizione, e potrebbe essere usata dalle femmine per valutare la qualità del maschio in termini di stato di salute. Le dimensioni complessive della cresta sono invece risultate correlate positivamente al numero di spermatozoi presenti nell'eiaculato. Questa correlazione è prevista dalla "phenotype-linked fertility hypothesis", secondo cui gli ornamenti potrebbero segnalare onestamente la fertilità dei maschi, e le femmine sceglierebbero sulla base di questi caratteri per ottenere un maggior tasso di fecondazione delle proprie uova. Tuttavia, le prove sperimentali a sostegno di questa ipotesi sono controverse, e un'ipotesi più convincente potrebbe consistere nel fatto che maschi di migliore qualità generale siano in grado di produrre sia CSS più sviluppati che eiaculati di miglior qualità.

La cresta cefalica di questa specie sembra essere un tratto multi-componente, che trasmette informazioni relative a differenti aspetti della qualità del maschio, con la sua colorazione legata allo stato di salute e le sue dimensioni complessive che co-variano con la fertilità. Le femmine quindi, preferendo maschi con creste più grandi e colorate, potrebbero ottenere benefici diretti, sia in termini di fecondità, ma anche dovuti all'accoppiarsi con maschi più sani, come ad esempio un minor rischio di contrarre infezioni durante l'accoppiamento. Inoltre le femmine potrebbero ottenere anche benefici indiretti, se l'essere in buone condizioni è anche legato ad alcune componenti genetiche e queste possono essere trasmesse alla prole.

Lo studio relativo alla funzione delle ghiandole anali ha dimostrato che in questa specie i maschi sono in grado di aumentare la sopravvivenza della prole attraverso il rilascio, durante le cure parentali, di sostanze dal potere antimicrobico. Il secreto prodotto da queste ghiandole è risultato attivo contro 5 dei 7 ceppi batterici testati in questo lavoro, tre dei quali sono causa di comuni patologie per i pesci, mentre due (*M. luteus* e *B. subtilis*) vengono comunemente usate come indicatori di attività del lisozima. Quest'ultimo risultato in particolare suggerisce che la sostanza lisozima-simile, che alcuni Autori hanno individuato nel secreto delle ghiandole anali, viene rilasciata nel muco da loro prodotto. Gli esperimenti di sopravvivenza delle uova hanno infine confermato che questo muco contribuisce alla protezione delle uova dalla colonizzazione batterica. Inoltre, le femmine hanno mostrato di preferire i maschi con le ghiandole più sviluppate, sia considerando i dati raccolti in natura, sia i dati degli esperimenti condotti in cattività. Poiché ghiandole più grandi

*producono un secreto più ricco di proteine, presumibilmente anche di antimicrobici, la scelta femminile sulla base di questo tratto sembra favorita dall'acquisizione di benefici diretti, in termini di maggior sopravvivenza della prole. Sia le dimensioni delle ghiandole che la frequenza con cui i maschi spalmano il loro secreto sulle uova sono risultate inoltre correlate positivamente a due indici di stress immunitario. Considerando che il secreto delle ghiandole anali può essere considerato una componente delle cure parentali, questi risultati potrebbero indicare che i maschi che allocano maggiori risorse per aumentare la sopravvivenza della prole subiscano un aumento del loro livello di stress.*

*La cresta cefalica e le ghiandole anali sono risultati due tratti indicativi di differenti qualità maschili, come atteso secondo l'ipotesi dei messaggi multipli, che prevede che i diversi CSS siano informativi di differenti qualità maschili. Secondo questo modello, i differenti caratteri potrebbero essere valutati insieme dalle femmine che in questo modo potrebbero ottenere informazioni sulla qualità complessiva del maschio, oppure femmine diverse potrebbero prestare differente attenzione ai diversi tratti. Infatti spesso le femmine possono scegliere il compagno sulla base di diversi segnali che possono fornire informazioni diverse, che non sono necessariamente correlate positivamente tra loro. Esiste infatti un crescente numero di prove che esistono compromessi tra l'investimento che i maschi fanno verso tratti che ne aumentano l'attrattività e altri tratti che invece possono determinare importanti conseguenze per la fitness della femmina o della prole, come ad esempio la fertilità, le cure parentali o lo stato del sistema immunitario. Le femmine potrebbero quindi valutare queste caratteristiche in maniera differente, in dipendenza che la loro scelta sia volta all'ottenimento di benefici diretti o genetici. In *S. pavo* l'investimento maschile nelle cure parentali è risultato negativamente correlato allo sviluppo della cresta, evidenziando come anche in questa specie esista un trade-off tra la condizione/fertilità dei maschi e le loro qualità di genitori. Sarà interessante in futuro valutare se anche in questa specie le femmine valutino la qualità complessiva dei maschi o se sia presente una scelta differenziale femminile.*

## SUMMARY

*Darwin's idea of intersexual selection based on female choice was one of the most controversial parts of his theory of evolution, and only in 1982 was performed the first empirical study showing that male ornaments are favored by female choice. Since this pivotal study, several studies had demonstrated in many animal species that intersexual selection is one of most important process in evolution and speciation, as it drives the evolution of characters involved in signaling mate quality and/or species recognition. Moreover, genetic models and empirical studies had verified the Fisherian idea of self reinforcing coevolution of secondary sexual characters (SSCs) and female preference. However, the major problem left open by Darwin, the reasons why females prefer ornamented males and which benefits they could obtain from this choice, remain controversial. Female benefits can be included in two different categories: direct benefits, such as fecundity benefits, parental care, lower risk of sexually transmitted diseases and parasites, or indirect benefits, related to genetic benefits, enhancing survival or reproductive success of their offspring. If choice for males with the most elaborated traits is finalized to obtain benefits, male ornaments are expected to show a positive covariance with male qualities. This is not always the case and there are several reasons to expect that males that invest heavily in SSCs have less resources to invest on other qualities, as ejaculates qualities, parental care effort o immune system qualities. For instance in some species with alternative male reproductive strategies, an inverse relationship is observed between pre- and post-copulatory traits, with more ornamented territorial males investing relatively less in ejaculate quality compared to sneaker ones. Moreover, there is increasing evidence, mainly in birds and insects, that males face a phenotypic trade-off between investment in sexual traits and immune function.*

*In the last two decades, the picture is getting even more complicated by the fact that in many species females base their mate choice on multiple signals. Why this occurs is debated and many different hypotheses have been proposed. The use of multiple cues in mate choice may: (I) be adaptive and increase fitness by reducing mate choice errors or costs of choice; (II) have no influence on fitness but include preferences that are exploited by the signaler; or (III) be maladaptive and decrease fitness, as the signaler manipulates mating resistance of the receiver by taking advantage of preexisting sensory biases. Despite the fact that multiple ornaments are widespread in nature, a comprehensive analysis of the different components of male ornaments and their relationship with post-copulatory traits, and the tradeoffs between post-copulatory traits and immune function in relation to male ornamentation, has rarely been attempted before.*

*The aim of this project was to determine whether the different male traits signal different aspects of male quality and whether the different quality traits co-vary or are traded-off.*

*The model species chosen is a teleost fish, the peacock blenny, *Salaria pavo* (Risso,1810). This blenny is a medium sized species (up to 11 cm standard length) that exhibits a strong sexual dimorphism, with males attaining larger size than females, showing a pronounced head crest and having the first two rays of the anal fin transformed into a pair of anal glands. *S. pavo* is a demersal spawner with males that defend nests (usually cavities or bivalve empty shells) and guard eggs laid by several females. Females lay eggs on the nest wall in a single layer of roughly uniform density and, during breeding season, may spawn with several males. Alternative male mating tactics occurs in this species with small-sized males acting as sneakers and showing less developed SSCs. Recent studies have demonstrated that, in this species, a male sexually dimorphic trait, the anal glands (AG),*

*produces a mucus enriched with antimicrobial substance and that males, while performing egg care, rub the anal region over the nest internal surface, likely facilitating the transfer of mucus to eggs. The project was organized in three major parts: I) expression of male traits in relation to male mating success. II) expression of male SSCs and male qualities. III) intra and inter-relationships of male traits and quality. In the first part of this work field data about male mating success (number of eggs inside the nests and number of females playing courtship displays to males) were collected and these data were compared with male trait expression to get information on which of them are involved in male mating success. Both anal gland size and head crest appeared to contribute to male mating success. The influence of intersexual selection in the expression of these two traits was confirmed by female preference tests, where females preferred to court male dummies exhibiting a larger head crest or larger anal glands. The second part of this study was focused to investigate which information on male quality (in terms of health status and parental care) anal glands and head crest may convey to females. Two different experimental approaches were used in order to evaluate: I) the expression of pre- and post-copulatory sexual characters in male exposed to an immune challenge; II) the role of anal glands in protecting eggs from infections. To evaluate the relationship between the expression of male SSCs, their ejaculate traits and their health status, a group of males was injected with LPS, an Escherichia coli antigen, known to be a potent activator of the immune system, rapidly inducing an inflammatory response. The head crest was the only one trait showing a variation after the treatment, decreasing both in intensity and extension of its yellow coloration. To study the function of anal gland and their role in parental care three different aspects were taken into account: a) the relationship between anal gland size, anal gland weight and the protein content of their secretion; b) the activity of anal gland secretion in inhibiting the growth of 7 marine bacteria; c) the efficacy of anal gland secretion in protecting eggs from infections. Anal gland size was positively related to their mass, and with protein content of their secretion. In addition the secretion inhibited the growth of 5 of the bacterial strains tested and efficiently protected eggs against microbial infection in egg survival rate test. In the last part of the work the relationships between male SSC expression and parental care in field were analyzed and related to some parameter of innate immune system and ejaculates. Head crest size, but not anal glands or male body size, was positively related to sperm number. Anal gland size and the frequency of one behaviour related to parental care, the time spent to rubbing anal gland secretion on eggs, resulted positively related to two indices of immune stress, i.e. the ratio between number of granulocytes and lymphocytes and nitric oxide levels respectively. Analyzing the male investment in parental care (in terms of anal gland expression plus parental behaviour) versus the investment in mating (in terms of head crest size, coloration and sperm number), a trade-off was observed.*

*The findings of this study highlight the role played by anal glands and head crest in the reproductive success for S. pavo males. Females preferences for males exhibiting a larger head crest have been shown by both experiments with dummies and field observations, where larger crested males were courted by more females. Head crest, and in particular its yellow coloured area, is influenced by male health status, as demonstrated by the immune challenge experiments with LPS. This E. coli antigen is known to provoke an increase of reactive oxygen species, inducing a remarkable oxidative stress in animals. The high flux of oxidants produced by the immune activation should be counteracted by the mobilization of antioxidant at the expense of the expression of sexual traits. The decrease observed in the crest yellow spot quality (in terms of both area and colour intensity) in LPS injected males strongly suggests that, in the peacock blenny, a mobilization of carotenoids, possibly responsible for the yellow colouration, may occur in response to the oxidative stress induced by the immune challenge, as it has been observed in other species. Indeed, carotenoids are antioxidant and*



immuno-stimulatory compounds that are only acquired with food (i.e. not synthesized by the organism). Thus, individuals are expected to carefully optimize carotenoid allocation between competing functions: expression of coloured signals, immune response, and/or combat against oxidative stress. On this basis, the head crest colouration of peacock blenny males seems to represent an honest signal of individual condition, and may be used by female to assess male quality with respect to health status. The head crest total area, is positively related to a fertility trait: the sperm number. A positive covariance between traits used by females to assess male quality and the size or quality of the male's ejaculate, is predicted by the phenotype-linked fertility hypothesis. Accordingly, male's ornaments would honestly signal his fertilizing efficiency, and selection may act directly on females to choose mates that are able to fertilize all their eggs. However, so far the experimental evidences in support of this hypothesis are controversial, whereas a more powerful explanation is that intrinsically high quality males can afford to produce both better quality sperm and fancier ornaments.

The head crest of *S. pavo* appears to be a multi-component trait conveying information on different aspects of male quality. Indeed the extension and intensity of its colouration is related to health status, whilst its total area co-varies with fertility. Consequently, female preferences for larger and colorful head crest might be driven by the pursuit of both direct benefit, in terms of fecundity but also other benefit related to male good condition such as for instance the reduced risk of parasite transmission. However, if the good conditions have also a genetic component, not demonstrated in this study, then female might in addition gain indirect benefits in terms of quality transmissible to offspring.

The study on anal gland function provides evidences that peacock blenny males performing parental care can affect the fitness of their offspring releasing antimicrobial compound. Anal gland secretion (AGS) is active against five out of the seven bacteria species tested in this study. Three of them are common in temperate sea water and cause major fish diseases in both field and cultured marine species. Instead, *M. luteus* and *B. subtilis* have been found as occasional pathogens of freshwater fishes, and they are widely used as indicator of lysozyme activity. The finding of AGS antibacterial activity against these two species strongly indicates that the lysozyme-like substance previously described to be produced in blenny anal glands is released in their mucus secretion. The result of the egg survival experiment indicate that AGS contribute in protecting eggs from bacterial colonization. Indeed, males, while performing parental care, rub the anal urogenital region over the nest internal surface, transferring AGS secretion to eggs, and eggs deprived of this secretions have a lower probability of surviving. Both mate preference tests and field collected data showed that females, in choosing mates, care for this traits preferring individuals with more developed anal glands. Furthermore, since larger anal glands produce a secretion richer in protein and, likely in antimicrobials, female preference for larger glands, strongly suggest that female choice is driven by the direct benefit of egg protection from infections. Anal gland size e time spent to rubbing their secretion on eggs resulted respectively related with to the ratio between number of granulocytes and lymphocytes and nitric oxide levels, both two indices of immune stress. Since anal gland secret could be considered part of the parental care effort, this finding might indicated that males allocating more resources to favour offspring survivorship, increase their general stress level.

Anal glands and head crest are indicative of different male qualities, as expected by the multiple message hypothesis, predicting that different signals provide information on different individual qualities. According to this model, the signals might be evaluated together to assess the general quality of the mate, or alternatively, different receivers may pay attention to different signals. Indeed, females are often faced with multiple signals from males which convey a range of information

*that are not necessarily positively correlated. There are increasing evidences of a trade-off between male attractiveness and different male traits which can have profound effects on progeny fitness, such as fertility, parental care, or immune function, and female might evaluate them differently depending on whether they are choosing direct or genetic benefits. In S.pavo, male investment in parental care is negatively related to the development of head crest (a proxy of male health status and fecundity), highlighting the occurrence of a trade-off between male condition/fertility and parental qualities. If females in this species assess the general male qualities or pay attention to different qualities need further investigation.*

## INDICE

<b>Introduzione</b>	1
Selezione sessuale	1
Caratteri sessuali multipli	8
I Teleostei come modello negli studi di selezione sessuale	11
Obiettivi della ricerca	17
Salario pavo	17
Organizzazione della ricerca	19
<b>Capitolo I</b>	
<b>Relazioni fra lo sviluppo dei caratteri maschili dimorfici e il successo di accoppiamento</b>	
Introduzione	23
Materiali e metodi	27
Risultati	35
Discussione	39
<b>Capitolo II</b>	
<b>Relazione fra lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e le qualità maschili</b>	
Premessa	45
<b>Capitolo IIA: identificazione dei caratteri indicatori di condizione</b>	
Introduzione	47
Materiali e metodi	51
Risultati	55
Discussione	59
<b>Capitolo II B: funzione delle ghiandole anali</b>	
Introduzione	63
Materiali e metodi	67
Risultati	73
Discussione	75
<b>Conclusioni</b>	79
<b>Capitolo III</b>	
<b>Relazioni tra i diversi aspetti dell'investimento riproduttivo</b>	
Introduzione	85
Materiali e metodi	89
Risultati	93
Discussione	97
<b>Conclusioni generali</b>	103
<b>Bibliografia</b>	111



## INTRODUZIONE

Una delle parti più originali, ma allo stesso tempo più controversa, della teoria evolutiva proposta da Darwin, è quella relativa alla selezione sessuale (Darwin, 1859; 1871). Darwin venne ispirato dall'osservazione che in molte specie è presente uno spiccato dimorfismo sessuale, dove generalmente i maschi, oltre ad avere maggiori dimensioni, esibiscono caratteri particolarmente vistosi e stravaganti, quali ad esempio livree variopinte, corna, canti elaborati e corteggiamenti, la cui presenza difficilmente può essere spiegata dalla selezione naturale. Ipotizzò quindi che questi caratteri si siano evoluti attraverso un altro meccanismo, la selezione sessuale, che agisce favorendo gli individui che li portano non tanto nella lotta per la sopravvivenza, quanto in termini di successo riproduttivo. Alla base del concetto di selezione sessuale vi è quindi la competizione tra gli individui di un sesso per l'accesso all'accoppiamento con gli individui del sesso opposto. Dalla sua prima formulazione, ne *L'Origine delle specie* (Darwin, 1859) e poi sviluppata ulteriormente ne *L'Origine dell'uomo e la scelta in rapporto col sesso* (Darwin, 1871), il tema della la selezione sessuale è stato un argomento molto controverso, richiamando grande attenzione e un crescendo di lavori sia teorici che sperimentali volti a verificarne la validità e a spiegarne i meccanismi. A tutt'oggi essa rimane uno dei campi della biologia evoluzionistica in cui il dibattito è più acceso e la ricerca sperimentale vivace e stimolante.

### **Selezione sessuale**

Il fattore considerato responsabile dell'insorgere delle differenze tra i due sessi, è la diversità manifestata dai maschi e dalle femmine nell'investimento riproduttivo, inteso nel suo complesso, dalla produzione di gameti, all'espressione dei caratteri sessuali secondari (CSS) fino all'eventuale cura dedicata alla prole (Trivers, 1972; Andersson, 1994). Queste differenze portano ad un conseguente sbilanciamento del potenziale riproduttivo (definito come numero di figli prodotti nell'unità di tempo), con il sesso che deve sopportare un costo maggiore per la produzione dei gameti e/o la cura della prole che, a parità di risorse disponibili, può produrre una progenie meno numerosa (Clutton-Brock & Vincent, 1991; Kvarnemo & Ahnesjö, 1996). La diversità in investimento riproduttivo tra i sessi genera anche differenze nella *sex-ratio* operativa, ossia nel rapporto tra gli individui dei due sessi che sono disponibili a riprodursi in un determinato momento, in quanto la numerosità del sesso che ha potenziale riproduttivo più basso sarà inferiore rispetto all'altro, che dovrà quindi competere per l'accesso alla riproduzione (Kvarnemo & Ahnesjö, 1996). Normalmente sono i maschi ad avere un maggiore potenziale riproduttivo e a competere quindi per l'accesso alle femmine. Questa condizione trova una spiegazione nell'anisogamia, cioè nell'asimmetria dimensionale dei gameti prodotti dai due sessi, con le femmine che producono gameti di maggiori dimensioni rispetto ai maschi (Trivers, 1972; Clutton-Brock & Parker, 1992). È stato ipotizzato che in seguito alla nascita della sessualità, l'anisogamia si sia evoluta da una situazione di isogamia attraverso processi di selezione distruttiva sulla dimensione e la numerosità dei gameti, portando alla produzione da parte delle femmine di

gameti grandi, poco o affatto mobili e molto costosi (uova), in quanto ricchi di tuorlo, e di gameti più piccoli, mobili e più economici (spermi), in quanto privi di materiale di riserva, da parte dei maschi (Parker *et al.*, 1972). Tuttavia nel caso in cui l'investimento in cure parentali maschili superi i costi della produzione dei gameti femminili, ci si può trovare nella condizione che viene chiamata di inversione dei ruoli sessuali, in cui i maschi, affrontando un costo maggiore per la riproduzione, diventano il sesso limitante e sono le femmine a competere per accoppiarsi (Andersson, 1994).

La selezione sessuale quindi opera sul sesso per così dire limitato dalla numerosità dei partner disponibili, favorendo negli individui la comparsa di alcuni caratteri particolari, come ad esempio le corna o le colorazioni variopinte che tanto avevano catturato l'attenzione di Darwin. La selezione sessuale può agire in due modi: I) favorendo i tratti che aumentano il successo nella competizione tra i membri dello stesso sesso (selezione intrasessuale), II) favorendo i tratti che attraggono i membri del sesso opposto (selezione intersessuale) (Darwin, 1971; Andersson, 1994; Andersson & Iwasa, 1996). Fu lo stesso Darwin a riconoscere questi come i due meccanismi principali attraverso cui agiva la selezione sessuale e a definire caratteri CSS quei caratteri che si evolvono sotto la sua spinta. I CSS, a differenza dei caratteri sessuali primari (gonadi, dotti, ghiandole accessorie e organi copulatori), che sono direttamente coinvolti nella produzione e nello scambio di gameti, sono indirettamente legati alla fecondazione, ma svolgono invece un ruolo determinante per accedere all'accoppiamento. Secondo la definizione di Darwin, i caratteri sessuali primari si sarebbero originati per selezione naturale, mentre quelli secondari attraverso quella sessuale. Questo non significa, come già ipotizzato dallo stesso Darwin, che l'espressione dei caratteri sessuali primari non sia sottoposta a selezione sessuale. Infatti, oggi sono numerosissime le evidenze di come la selezione sessuale svolga un ruolo cruciale ad esempio nel modellare e diversificare le vie genitali e gli organi copulatori e nell'influenzare la dimensione delle gonadi, la morfologia e le prestazioni degli spermi, e il contenuto del liquido seminale (Birkhead & Pizzari, 2002; Wedell *et al.*, 2002; Hosken & Stockley, 2004; Snook, 2005).

La selezione intrasessuale si origina dalla competizione diretta tra gli individui dello stesso sesso per l'accesso agli individui del sesso limitante, favorendo la comparsa di quei caratteri, definiti armamenti, che aumentano il successo negli scontri per la conquista del compagno. Questi tratti possono essere rappresentati da armi vere e proprie, come corna, zanne, speroni etc., ma anche da segnali di status o comportamenti utilizzati durante forme di lotta ritualizzate (Andersson, 1994; Andersson & Iwasa, 1996). Sebbene questo tipo di competizione possa essere diffuso in specie caratterizzate da diversi sistemi di accoppiamento, è nelle specie poliginiche, dove pochi maschi sono in grado di monopolizzare l'accesso alle femmine, che il successo nella competizione intrasessuale diventa cruciale e fortemente legato al successo riproduttivo degli individui, portando all'evoluzione di armamenti particolarmente sviluppati (Andersson, 1994).

La selezione intersessuale agisce invece quando un sesso, generalmente le femmine, sceglie attivamente gli individui con cui accoppiarsi preferendoli sulla base di alcuni caratteri, quali ad esempio colorazioni e piumaggi vistosi, canti, display di corteggiamento, ect.,

definiti ornamenti. I vantaggi legati ad una scelta del partner basata su questi tratti peculiari è sempre stata e tuttora rimane uno degli argomenti maggiormente dibattuti dai biologi evolutivisti e sono numerose le ipotesi proposte per spiegarne il significato adattativo (Fisher, 1930; Marshall, 1936; Trivers, 1972; West-Eberhard, 1979; Hamilton & Zuk, 1982; Ryan, 1990; Folstad & Karter, 1992; Wedekind & Folstad, 1994; Berglund *et al.*, 1996; Holland & Rice, 1998). La scelta femminile infatti implica costi, ad esempio in termini di tempo che viene sottratto ad altre attività vitali, può comportare spostamenti maggiori e un maggior rischio di predazione (Slagsvold *et al.*, 1988; Gibson & Bachman, 1992; Byers *et al.*, 2006). Bisogna quindi ritenere che questi costi sostenuti dalle femmine vengano compensati dall'acquisizione di benefici, altrimenti le femmine che si accoppiano a caso avrebbero una fitness maggiore (non dovendo sopportare costi). A questo riguardo negli ultimi 30 anni, e in particolare dopo la dimostrazione che in moltissime specie le femmine attuano una ben definita scelta del compagno, moltissime ricerche, così come diversi modelli teorici, sono state rivolte allo studio di quali benefici possano essere associati alla scelta femminile (per *review* vedi: Andersson & Simmons, 2006). Da questi studi è emerso che gli ornamenti maschili possono segnalare dei vantaggi diretti, di cui la femmina beneficia immediatamente, oppure dei vantaggi cosiddetti genetici, perché si manifestano solo sulla prole durante l'accrescimento e la vita adulta.

I benefici diretti vengono ottenuti se i caratteri su cui si basa la scelta femminile riflettono l'abilità del maschio di fornire "vantaggi materiali" per la femmina stessa, quali ad esempio doni nuziali, un miglior territorio, un minor rischio di trasmissione di parassiti durante l'accoppiamento, oppure la sopravvivenza delle proprie uova, come un maggior apporto di cure parentali e protezione sui figli (Heywood, 1989; Hoelzer, 1989; Kirkpatrick & Ryan, 1991; Andersson, 1994). Se invece i tratti maschili non sono correlati a benefici diretti, ma sono legati a qualità genetiche del maschio che possono essere trasmesse alla prole, allora si parla di benefici indiretti (Andersson, 1994). Mentre la scelta femminile basata su tratti che riflettono benefici diretti è stata ampiamente dimostrata in molti taxa animali, confermandone di fatto il valore adattativo (Andersson, 1994), rimane ancora aperta la discussione relativa alla scelta basata su possibili benefici indiretti, data anche la difficoltà di correlare lo sviluppo dei CSS con le potenziali qualità genetiche dell'individuo (Møller & Alatalo, 1999). I principali modelli proposti possono essere distinti in due gruppi a seconda che considerino che il contributo genetico dei maschi incida sulla sopravvivenza della prole oppure riguardi il successo riproduttivo dei figli maschi. Questi due tipi di benefici genetici vengono solitamente indicati come "good genes" (modello dei "buoni geni") e "sexy sons" (modello dei "figli attraenti"). A quest'ultimo tipo appartiene una delle prime ipotesi formulate riguardo il significato degli ornamenti e la scelta femminile, l'ipotesi della *run-away selection* di Fisher (1915; 1930) secondo la quale lo sviluppo dei CSS non è legato a o informativo di particolari qualità del maschio e questi caratteri si sono evoluti e mantenuti semplicemente perché rendono i maschi attraenti per le femmine. In questo scenario, unitamente allo sviluppo del carattere maschile, dovrebbe svilupparsi nelle femmine la preferenza per quel tratto e le femmine, scegliendo di accoppiarsi con gli individui più attraenti, trasmetterebbero alla prole le stesse caratteristiche di attrattività (ai figli maschi) e

di attrazione (alle figlie femmine). Attraverso quindi un meccanismo a cascata auto rinforzante, i geni per il carattere e la loro preferenza si sarebbero diffusi e fissati nella specie (Fisher, 1930). Oltre ad essere di difficile dimostrazione sperimentale, questa ipotesi pone un importante problema evolutivo: l'esaurimento della variabilità genetica (detto anche "paradosso del lek"; Borgia, 1979; Taylor & Williams, 1982). Infatti se in una popolazione tutte le femmine scelgono i maschi con gli ornamenti più sviluppati, in poche generazioni tutti i maschi dovrebbero essere ugualmente attraenti. Diversamente dai modelli dei "figli attraenti", per i modelli dei "buoni geni" i CSS sono degli indicatori di qualità del maschio (Andersson, 1994). Anche questi modelli, nelle loro prime formulazioni, sono afflitti dal problema dell'esaurimento della variabilità genetica. A questo si aggiunge la mancanza di indicazioni su quale possa essere la relazione tra espressione dei CSS e qualità del maschio. Che cosa assicura ad una femmina che colorazioni sgargianti, piume elaborate o inusitati bozzi cefalici segnalino che il maschio possiede "buoni geni" che verranno trasmessi alla prole? Che cosa impedisce ad un maschio di bassa qualità di investire in ornamenti così vistosi da poter attirare le femmine? In sintesi che cosa mantiene l'onestà del segnale trasmesso dai CSS?

Una prima soluzione a questo problema è venuta dalla teoria dell'*handicap* di Zahavi (1975), secondo cui gli ornamenti sono costosi da produrre e solo i maschi di miglior qualità sono in grado di affrontare questi costi. In questo scenario quindi i CSS sarebbero indicativi della qualità genetica dell'individuo che li porta, dato che, essendo particolarmente vistosi e ingombranti, conferiscono uno svantaggio agli individui che li portano, rendendoli più facilmente esposti alla predazione o meno abili nel foraggiamento. Per tale ragione la femmina, preferendo quei maschi che, nonostante lo sviluppo di questo "handicap" sono riusciti a sopravvivere sino alla riproduzione, sceglie partner di miglior qualità intrinseca, assicurando la trasmissione di queste qualità genetiche alla prole. Seppur supportata da studi che hanno confermato come in diverse specie i CSS siano costosi e riflettano la condizione e la qualità del maschio, l'ipotesi dell'*handicap* non sembra applicarsi così bene ad altre specie, aprendo così il campo alla possibilità che altri meccanismi intervengano nel mantenimento dell'onestà del segnale. Un primo meccanismo è quello che ipotizza che l'espressione degli ornamenti sia collegata, direttamente o indirettamente, al sistema immunitario (Hamilton & Zuk, 1982) mentre un altro è quello della "doppia funzione" dei CSS (Berglund *et al.*, 1996).

Nel 1982, Hamilton e Zuk, proposero che i CSS siano segnali dello stato di salute dell'individuo, fornendo in particolare informazioni sulle capacità di resistenza a parassiti e malattie. Questa ipotesi, oltre a mettere in relazione i CSS a una specifica qualità maschile, fornisce anche una soluzione al problema del "paradosso del lek" (Kotihao *et al.*, 2001). Infatti, data la maggiore rapidità di variazione mostrata dagli agenti patogeni rispetto ai loro ospiti, questi ultimi (nel caso specifico i maschi) sono sempre un passo indietro, per cui la variabilità genetica alla base della resistenza a parassiti e malattie non è mai destinata ad esaurirsi. Scegliere individui con CSS sviluppati e quindi più sani nella stagione riproduttiva in corso, porterebbe alla femmina dei benefici indiretti, fornendole informazioni su una caratteristica maschile ereditabile, il suo sistema immunitario, di grande rilevanza per la



sopravvivenza e, in generale, il buon funzionamento dell'individuo. Oltre a questo la femmina, nel preferire maschi con CSS sviluppati, potrebbe anche acquisire benefici diretti dato che, se questi riflettono lo stato di salute del maschio, essa può ridurre il rischio di infezioni/parassitosi legato all'accoppiamento. Tuttavia i geni di questi maschi, che si sono diffusi nella popolazione grazie alla scelta femminile, non necessariamente saranno i più idonei anche a fronteggiare le infezioni/parassitosi future, portando quindi allo sviluppo di cicli ospite/parassita e al mantenimento della variabilità genetica degli individui, CSS compresi. L'ipotesi di Hamilton & Zuk ha ricevuto diverse conferme sperimentali (Andersson, 1994), tra cui uno degli studi più completi ed eleganti è stato condotto sulla rondine *Hirundo rustica*. In questa specie le femmine preferiscono i maschi con le timoniere più sviluppate (Møller, 1988) e sono proprio questi i maschi che meglio resistono e sopravvivono agli attacchi parassitari (Saino *et al.*, 1997).

Diversi studi si sono poi rivolti alla comprensione dei meccanismi fisiologici che legano l'espressione dei CSS alla condizione dell'individuo e al funzionamento del suo sistema immunitario. È stato così invocato da alcuni Autori il duplice ruolo degli ormoni sessuali maschili di stimolazione dello sviluppo dei CSS e, contemporaneamente, di immunosoppressione (Folstad & Karter, 1992; Wedekind & Folstad, 1994). In questo scenario solo i maschi che possiedono un sistema immunitario di buona qualità sono in grado di affrontare i costi legati ad una elevata produzione di testosterone per garantirsi dei CSS sviluppati. Sempre sul fronte dei legami fisiologici tra CSS e immuno-resistenza, negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta ai caratteri che devono la loro colorazione (tra il giallo e il rosso) alla presenza di carotenoidi. Questi composti, che non possono essere prodotti direttamente dagli animali ma solo acquisiti attraverso la dieta, rappresentando di fatto una risorsa limitata (per *review* vedi: Dowling & Simmons, 2009), svolgono anche un ruolo importante nella protezione dell'organismo dallo stress ossidativo e nell'attivazione del sistema immunitario (Lozano, 1994; Von Schantz *et al.*, 1999). Caratteri molto colorati potrebbero quindi segnalare alla femmina la capacità dei maschi di trovare, assorbire e accumulare questa risorsa (Kodric-Brown, 1989; Hill, 1991; McGraw, 2005) e rappresentare un segnale onesto di buona salute degli individui. Solo i maschi in buona salute potrebbero infatti privare l'organismo della funzione protettiva dei carotenoidi, deviandoli verso le colorazioni degli ornamenti (Lozano, 1994; Von Schantz *et al.*, 1999).

Un altro meccanismo che può permettere il mantenimento dell'onestà del segnale trasmesso dai CSS è quello della loro "doppia funzione", sia come armamenti che come ornamenti (Berglund *et al.*, 1996). In diverse specie animali è stato infatti dimostrato il duplice ruolo di alcuni caratteri, sia durante i processi di competizione tra individui dello stesso sesso, sia come caratteri sottoposti a scelta femminile (per *review*: Berglund *et al.*, 1996). Secondo gli Autori, questi caratteri si sarebbero sviluppati inizialmente attraverso la competizione tra maschi, per poi essere utilizzati dalle femmine nella scelta del compagno. Gli armamenti sono infatti per lo più caratteri costosi e, poiché la loro efficacia viene continuamente messa alla prova negli scontri tra i maschi, vengono ritenuti essere generalmente onesti. Di conseguenza, la valutazione da parte delle femmine degli armamenti maschili nella scelta del compagno potrebbe essere favorita proprio dall'onestà

di questi tratti, difficilmente falsificabili (Berglund *et al.*, 1996). Questa situazione appare più frequente nelle specie territoriali o in quelle specie in cui i maschi si riuniscono in arene ed esibiscono alcuni tratti che agiscono come segnale di dominanza sia nei confronti dei maschi rivali, sia verso le femmine (Berglund *et al.*, 1996).

Al di là dei modelli dei “buoni geni” e dei “figli attraenti”, sono state avanzate anche altre ipotesi per spiegare l’evoluzione dei CSS in relazione alla scelta femminile. Gli ornamenti ad esempio potrebbero svolgere un ruolo nel riconoscimento interspecifico (Fisher, 1930; Trivers, 1972), anche se tale idea appare poco realistica nello spiegare, in particolare, tratti eccessivamente cospicui e costosi, che appaiono troppo accentuati rispetto alla sola funzione di riconoscimento dei conspecifici (Andersson, 1994). È stato anche proposto che i caratteri che si sviluppano (o diventano particolarmente vistosi) solamente durante il periodo riproduttivo e i display di corteggiamento possano svolgere un ruolo nella sincronizzazione dell’accoppiamento e nella stimolazione del partner (Marshall, 1936). I CSS avrebbe anche potuto svilupparsi “sfruttando” una caratteristica pre-esistente del sistema sensoriale femminile, un “*bias* sensoriale” (West-Eberhard, 1979; Ryan, 1990). I maschi svilupperebbero un tratto per attrarre le femmine sfruttando una loro predisposizione naturale per una particolare forma o un determinato colore, preferito ad esempio dalle femmine nella ricerca di cibo. La presenza di *bias* sensoriali è stata verificata sperimentalmente in diverse specie, come ad esempio nel teleosteo *Xiphophorus maculatus*, in cui è stato dimostrato che le femmine vengono attratte dalla lunghezza della coda dei maschi al punto da preferire quelli della specie *Xiphophorus helleri* o i maschi conspecifici con la coda allungata artificialmente (Ryan & Wagner, 1987; Basolo, 1990). La scelta basata su questi tratti potrebbe non portare all’acquisizione di alcun beneficio per le femmine, e, addirittura, risultare svantaggiosa, portandole ad accoppiarsi in maniera non ottimale (Holland & Rice, 1998). La presenza di una scelta non ottimale sarebbe alla base della “*chase-away selection*”, secondo la quale il conflitto tra l’interesse femminile a non accoppiarsi in modo svantaggioso e quello maschile a sfruttare le preferenze femminili innate, porterebbe ad un abbassamento della sensibilità al tratto nelle femmine ed un aumento degli ornamenti nei maschi, attraverso un meccanismo a cascata auto rinforzante (Holland & Rice, 1998). I meccanismi sin qui proposti non sono comunque tra loro mutualmente esclusivi, e potrebbero aver interagito con diversi gradi di combinazione nel determinare lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e della scelta femminile (Andersson, 1994).

Se la scelta femminile è finalizzata all’ottenimento di benefici, sia diretti che indiretti, dai compagni, ci si aspetta che vi sia una correlazione positiva tra il grado di sviluppo dei caratteri e una o più qualità del maschio (Birkhead & Pizzari, 2002; Evans *et al.*, 2003). La relazione tra caratteri maschili e benefici per la femmina però non è sempre positiva, tanto che esistono numerosi casi in cui tratti e qualità sono legati da correlazioni negative. L’attrattività del maschio è risultata infatti essere in molti casi negativamente correlata sia all’apporto di cure parentali dei maschi sulla prole (Badyaev & Vleck, 2007), sia rispetto allo stato del sistema immunitario (Blount *et al.*, 2003; Faivre *et al.*, 2003; Simmons & Roberts, 2005). L’espressione degli ornamenti può essere spesso costosa e richiedere quindi una

allocazione di risorse in competizione con l'investimento in altre attività (*trade-off*) (Kokko, 1998), e maschi che investono le energie nello sviluppo di CSS particolarmente costosi potrebbero non essere più in grado di fornire cure parentali di buona qualità (Andersson, 1994; Magrath & Komdeur, 2003). È questo il caso ad esempio della rondine (*H. rustica*), in cui i maschi che hanno la coda più lunga sono, come detto prima, migliori sotto il profilo immunitario, ma allo stesso tempo dedicano meno energie alla costruzione del nido, che risulta così di scarsa qualità (Soler *et al.*, 1998).

La selezione sessuale, così come inizialmente ipotizzata da Darwin, è sempre stata ritenuta agire esclusivamente nelle fasi precedenti all'accoppiamento, mentre negli ultimi quarant'anni ci si è resi conto che essa influisce anche su quei caratteri la cui azione si manifesta solo nelle fasi successive alla copula (Parker, 1970; Birkhead & Møller, 1998; Birkhead, 2000). Nelle specie poliandriche o promiscue, ma anche in quelle specie ritenute monogame e in cui sono invece comuni le copule extra parentali (Gowaty *et al.*, 1989; Westneat & Sherman, 1997), diversi eiaculati competono fra loro per la fecondazione delle uova. I vantaggi per le femmine di accoppiarsi con differenti maschi, sebbene ancora largamente discussi, possono consistere in benefici diretti, quali l'aumento di cure parentali (Nakamura, 1998), l'acquisizione di un maggior quantitativo di nutrienti (Wedell, 1997), la riduzione del rischio di bassa/incompleta fecondazione delle uova (Petrie *et al.*, 1992) ect., e in benefici indiretti, quando l'accrescimento della variabilità genetica della prole, conseguente alla poliandria, porta ad un aumento della possibilità di sopravvivenza della prole stessa, come ad esempio in ambienti caratterizzata da un'elevata instabilità ed imprevedibilità delle condizioni future (Ligon & Zwartjes, 1995; Jennions & Petrie, 2000). La dimostrazione di come la promiscuità femminile sia molto più comune di quanto si ritenesse ha aperto il campo allo studio di quella che oggi chiamiamo la selezione post-copulatoria, che può agire attraverso due diversi meccanismi: la competizione spermatica e la scelta criptica femminile. La competizione spermatica è definita come la competizione tra gli eiaculati di due o più maschi per fecondare le uova di una femmina (Parker, 1970), mentre per scelta criptica femminile si intende la capacità della femmina di influenzare il successo di fecondazione di un determinato maschio, favorendo attivamente il suo eiaculato nella competizione spermatica rispetto a quello di altri maschi (Eberhard, 1996). Questo tipo di selezione sull'eiaculato, che avviene a livello delle vie riproduttive femminili (da qui la definizione "criptica"), risulta particolarmente difficile da studiare e misurare, e per tale ragione ha ricevuto relativamente poche attenzioni. Al contrario, la competizione spermatica è stata chiaramente dimostrata in molte specie e viene considerata una potente pressione selettiva che influenza le specie sia a livello morfologico che fisiologico e comportamentale (Birkhead & Møller, 1998; Birkhead & Pizzari, 2002). I maschi infatti possono aumentare il loro successo di fecondazione impedendo che altri maschi si accoppino con la femmina, attraverso comportamenti di "*mate guarding*" o ricorrendo a copule ripetute e prolungate. In molte specie, soprattutto negli insetti, i maschi hanno evoluto inoltre sistemi per scoraggiare le copule successive della femmina, come la secrezione di sostanze antifrodisiache sia per le femmine che per i maschi rivali, o addirittura di sostanze che impediscono direttamente l'accesso degli altri maschi all'apparato riproduttore femminile,

quali ad esempio veri e propri tappi spermatici deposti sui genitali femminili (Birkhead & Møller, 1998; Chapman, 2001). In altre specie sono invece presenti modificazioni morfologiche a livello degli organi copulatori, come spine e aculei, che hanno lo scopo di rimuovere lo sperma dei maschi che si sono accoppiati in precedenza con la femmina (Birkhead & Møller, 1998). Una importante previsione dei modelli di competizione spermatica elaborati da Parker, oggi ampiamente provata in moltissimi taxa, è che all'aumentare del livello di competizione spermatica segua un aumento dell'investimento da parte dei maschi nella produzione dell'eiaculato, a livello quantitativo, con aumento delle dimensioni dei testicoli e del numero di spermatozoi prodotti, e/o qualitativo, con una produzione di spermatozoi più veloci e/o vitali (Birkhead & Møller, 1998; Birkhead & Pizzari, 2002).

### **Caratteri sessuali multipli**

Sebbene le relazioni tra CSS e scelta del compagno siano state spesso studiate considerando un solo carattere, in realtà nella gran parte delle specie le femmine basano la loro scelta non su un singolo carattere, ma sulla base di diversi tratti. Le femmine di moltissime specie infatti esprimono preferenze comprendenti sia caratteri visivi che acustici e olfattivi ma anche comportamentali (per *review* vedi: Candolin, 2003), rendendo ancora più complessa la comprensione delle dinamiche riproduttive e delle interazioni fra i sessi. Il significato di questa contemporanea presenza di diversi CSS e della scelta femminile basata sulla loro valutazione è ancora dibattuto e sono diverse le ipotesi formulate a riguardo. I caratteri maschili multipli possono essere suddivisi in due gruppi, sulla base che siano o meno informativi della qualità del maschio. Se un tratto è informativo, si presume sia indicatore onesto della qualità del maschio, e l'uso di CSS multipli potrebbe aumentare le informazioni che vengono trasmesse alla femmina. In questo caso l'uso di CSS multipli informativi nella scelta del compagno sarebbe adattativa, dato che le femmine potrebbero in questo modo ridurre la possibilità di errore o i tempi e i costi di scelta (Candolin, 2003). La scelta femminile basata sui segnali multipli non informativi potrebbe invece essere: I) adattativa, se aumenta la fitness della femmina, facilitando la ricezione del segnale e riducendo il costo della scelta; II) non avere influenza sulla fitness della femmina, ma essere dovuta al mantenimento di preferenze femminili innate o sviluppatesi in altri contesti e con altre funzioni; III) disadattativa, se diminuisce la fitness delle femmine in quando i maschi ne sfruttano i *bias* sensoriali per manipolare la scelta (Candolin, 2003). I caratteri che non sono indicativi di benefici diretti per la femmina o non correlati alle qualità del maschio possono essersi evoluti attraverso meccanismi fisheriani di *run-away selection* (Fisher, 1930), sfruttando *bias* sensoriali delle femmine (Ryan & Rand, 1993), come residuo di pressioni selettive avvenute in passato (Holland & Rice, 1998), oppure derivare da tratti informativi, in seguito alla perdita di variabilità genetica nella qualità segnalata da questi tratti (Iwasa & Pomiankowski, 1994). È stato proposto che la coevoluzione antagonista tra i sessi abbia portato all'evoluzione dei caratteri multipli non informativi (Holland & Rice, 1998). Secondo questa teoria infatti, lo sfruttamento da parte dei maschi delle predisposizioni sensoriali delle femmine porta, attraverso processi di "*chase-away selection*", nelle femmine ad un

innalzamento della soglia di induzione della risposta al segnale e, nei maschi, a un aumento dello sviluppo dell'ornamento, in quanto in grado di stimolare anche le femmine con più alta soglia di stimolazione (Holland & Rice, 1998). Questa coevoluzione antagonistica può portare ad una successiva perdita di attrattività dello stesso tratto, che rimane comunque necessario per stimolare le femmine alla riproduzione. In seguito sarebbero comparsi nuovi caratteri per attrarre le femmine, portando ad un accumulo di ornamenti nei maschi (Holland & Rice, 1998).

Sebbene la presenza di scelta per caratteri non informativi sia stata dimostrata in alcune specie (Zuk *et al.*, 1990; Ligon & Zwartjes, 1995; Omland, 1996 a, b), un numero consistente di lavori indica che nella maggior parte dei casi le preferenze delle femmine si concentrano su tratti multipli che trasmettano informazioni relative alla/e qualità del partner (Candolin, 2003). Non è tuttavia ancora chiaro se in questi casi i diversi CSS riflettono a) qualità diverse del maschio (ipotesi dei segnali multipli) o b) tutti la stessa qualità (ipotesi dei segnali ridondanti) e la loro contemporanea presenza rafforza il segnale inviato alle femmine. Secondo l'ipotesi dei segnali multipli, i diversi caratteri segnalano differenti qualità del maschio (Møller & Pomiankowski, 1992; Johnstone, 1997), e numerosi studi sembrano confermare questa ipotesi. Un esempio ben studiato sono le colorazioni ornamentali costituite da diverse tipologie di pigmenti che spesso riflettono differenti proprietà, con i carotenoidi ad esempio che riflettono il grado di condizione, ed in particolare lo stato di salute (Hill & Montgomerie, 1994; Olson & Owens, 1998; Faivre *et al.*, 2003; Baeta *et al.*, 2008; Fitze *et al.*, 2009), mentre le colorazioni a base di composti melaninici rispecchiano lo status sociale (per *review* vedi: Senar, 1999). Così nel cardellino americano (*Carduelis tristis*) le colorazioni a carotenoidi del piumaggio e del collo sono indicatrici della presenza di infezioni intestinali, mentre l'estensione e la brillantezza della colorazione nera del cappuccio (melaninica) è determinata dalle interazioni sociali (McGraw & Hill, 2000). È stato inoltre notato come alcuni caratteri, comunemente considerati "singoli", fossero in realtà costituiti da diversi aspetti, ciascuno portatore di un proprio diverso segnale di qualità (Wedekind 1992; Lindström & Lundström, 2000; Scheuber *et al.*, 2003) e come questi ultimi, considerati nel loro insieme, permettano una valutazione complessiva della qualità del partner. Una ulteriore possibilità è che i diversi tratti indichino la condizione del maschio in base a differenti scale temporali, con tratti che segnalano la condizione su lunga scala temporale, ad esempio lo sviluppo ontogenetico, mentre altri rispondono in maniera più dinamica ai rapidi cambiamenti di condizione dell'individuo, segnalandone lo stato in quel preciso momento (Sorenson & Derrickson, 1994; Møller *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999). Un'ipotesi interessante è che i tratti che hanno un lungo periodo di sviluppo siano buoni indicatori di qualità genetiche, mentre i tratti più flessibili, che riflettono la condizione immediata, siano indicatori migliori di benefici diretti quali l'abilità nelle cure parentali o la qualità dell'eiaculato (Candolin, 2003).

La scelta femminile basata su CSS che segnalano diversi aspetti della qualità maschile potrebbe risultare evolutivamente stabile nel caso in cui le femmine fossero in grado di valutare la qualità complessiva del compagno o, alternativamente, nel caso in cui le femmine diverse prestassero differente attenzione alle diverse qualità dei maschi, scegliendo in

maniera differenziale rispetto ai vari caratteri (Wedekind, 1992). In particolare ci sono indicazioni di scelta differenziale femminile nel caso in cui le femmine debbano decidere tra benefici diretti o indiretti. In alcune specie di uccelli, ad esempio, è stato osservato che le femmine scelgono il compagno con cui nidificare in base ai tratti che riflettono benefici diretti, ad esempio un miglior territorio o possibili migliori cure parentali, mentre durante le copule extra parentali preferiscono i maschi che hanno i tratti legati a qualità genetiche maggiormente sviluppati (canto, colorazioni, particolari penne) (Searcy, 1992; Hasselquist *et al.*, 1996; Sheldon *et al.*, 1997; Sheldon & Ellegren, 1999). La scelta differenziale femminile può essere legata anche alla qualità della femmina stessa, che può scegliere in base ai benefici indiretti se il suo stato di salute e le sue condizioni le permettono di compensare alla mancanza dei benefici diretti che la sua scelta comporta (Burley, 1986; Sheldon, 2000). Grosse differenze nella scelta femminile sono state notate anche in specie in cui la femmina sceglie principalmente in base a benefici indiretti, come ad esempio nelle specie in cui i maschi contribuiscono alla riproduzione con i soli gameti (Jennions & Petrie, 1997; Widemo & Saether, 1999). È stato dimostrato che differenze nella preferenza femminile possano dipendere da differenze genetiche (per *review* vedi: Tregenza & Wedell, 2000), dall'età (Kodric-Brown & Nicoletto, 2001), dal costo della scelta in termini di riproduzione futura (per *review* vedi: Jennions & Petrie, 1997), e dal contesto sociale e ambientale (Reid & Weatherhead, 1990; Kodric-Brown, 1993; Endler & Houde, 1995; Marchetti, 1998). Sebbene la scelta femminile differenziale possa essere un elemento fondamentale per la comprensione dei caratteri multipli e delle dinamiche di scelta femminile, rimane ancora un argomento poco studiato e che necessita sicuramente di future osservazioni e sperimentazioni.

Contrariamente all'ipotesi dei messaggi multipli, l'ipotesi dei segnali ridondanti prevede che i CSS multipli forniscano informazioni relative alla stessa qualità del partner (Møller & Pomiankowski, 1993; Johnstone, 1997). L'uso dei segnali ridondanti potrebbe ridurre il tempo e l'energia per la valutazione della qualità del compagno, facilitando il rilevamento delle differenze tra i maschi o, alternativamente, potrebbe ridurre i possibili errori nella scelta (Candolin, 2003). Infatti, se tutti i tratti fossero costosi da produrre, le femmine, valutandoli contemporaneamente, potrebbero ottenere maggiori informazioni sulla qualità complessiva del maschio rispetto alle informazioni trasmesse da ciascun singolo tratto (Møller & Pomiankowski, 1993). Inoltre, i segnali ridondanti potrebbero rendere più difficile la falsificazione del segnale riducendo la possibilità per i maschi di essere disonesti sulle loro qualità (Candolin, 2003). Infatti, in un sistema di comunicazione stabile è atteso un certo grado di disonestà (Dawkins & Guilford, 1991; Johnstone, 1994), e questo diventa più elevato nel caso vi sia una maggiore variabilità nel costo del segnale per i diversi individui (Johnstone & Grafen, 1993). La presenza di caratteri multipli ridondanti potrebbe portare ad una riduzione della variabilità del costo complessivo dei segnali, rendendo quindi più difficile per gli individui riuscire ad esprimere molti segnali disonesti, e rendendo più facile per la femmina l'individuazione della sincerità del segnale (Candolin, 2003). Se i CSS multipli rispondono all'ipotesi dei segnali ridondanti è attesa una forte e positiva correlazione tra i diversi ornamenti e tra gli ornamenti e la qualità maschile (Zuk *et al.*, 1990; Loyau *et al.*,

2005), ma questa condizione sembra rara (Møller & Pomiankowski, 1993). Infatti, i modelli teorici di selezione sessuale predicono che l'evoluzione dovrebbe indirizzare le femmine che scelgono sulla base di più tratti costosi verso la preferenza per un singolo tratto (Schluter & Price, 1993; Iwasa & Pomiankowski, 1994; Johnstone, 1996), anche se i CSS ridondanti potrebbero mantenersi se la specie non è in condizioni di equilibrio stabile (van Doorn & Weissing, 2006). Per queste ragioni, si ritiene che i CSS multipli dovrebbero essere segnali di differenti qualità del maschio piuttosto che segnali ridondanti (Doucet & Montgomerie, 2003; Freeman-Gallant *et al.*, 2009).

La scelta femminile basata su diversi caratteri maschili, per la scarsità di informazioni disponibili e per la sua oggettiva complessità, rappresenta la sfida con cui gli studi di selezione sessuale devono oggi confrontarsi per poter meglio comprendere il reale significato dei diversi CSS maschili e, qualora presenti, i possibili vantaggi ad essi connessi.

### ***I Teleostei come modello negli studi di selezione sessuale***

Tra i taxa su cui si sono maggiormente concentrati gli studi di selezione sessuale vi sono, oltre a uccelli, insetti e mammiferi, i pesci Teleostei, data la loro straordinaria diversità nelle modalità riproduttive. Questa si può ritrovare a diversi livelli: dai sistemi di accoppiamento, al pattern sessuale, le dinamiche di fecondazione, la tipologia di uova e di ambiente utilizzato per la deposizione, la frequenza, durata e stagionalità degli accoppiamenti, la presenza ed intensità delle cure parentali e non ultimo, la presenza di diverse tattiche riproduttive alternative (Breder & Rosen, 1966; Thresher, 1984; Helfman *et al.*, 1997). I pesci Teleostei inoltre presentano un'estrema variabilità nei caratteri sessuali secondari, e i sistemi di comunicazione intraspecifici e in particolare intersessuali possono coinvolgere tutti i canali sensoriali, comprendendo segnali visivi, acustici e chimici (Andersson, 1994). Sebbene lo studio dei Teleostei preveda oggettive difficoltà tecniche nella loro gestione e nella possibilità di osservarli, dovute all'ambiente acquatico in cui vivono, la loro estrema eterogeneità riproduttiva li rende un modello ottimale negli studi di selezione sessuale (Taborsky, 2001).

Nei Teleostei vi sono specie monogame, poliginiche, poliandriche e promiscue; inoltre in questo gruppo è diffuso l'ermafroditismo, che può essere sia simultaneo che successivo, sia con specie proterandriche che proteroginiche (Breder & Rosen, 1966). La fecondazione può essere sia interna che esterna (Breder & Rosen, 1966). Le specie a fecondazione interna, caratterizzate dal trasferimento degli spermatozoi all'interno del corpo materno, possono avere diverse modalità di sviluppo degli embrioni, con specie ovipare, ma anche ovovivipare e vivipare (Breder & Rosen, 1966). Un caso particolare è quello dei signatidi, gruppo in cui il trasferimento dei gameti è inverso, con le femmine che trasferiscono le uova non ancora fecondate all'interno di strutture specializzate del maschio, all'interno delle quali vengono rilasciati gli spermatozoi e avviene la fecondazione (Breder & Rosen, 1966; Thresher, 1984). Le specie a fecondazione esterna possono rilasciare i gameti nella colonna d'acqua, producendo uova pelagiche che hanno evoluto diversi adattamenti al galleggiamento, come ad esempio la presenza di gocce lipidiche o di un elevato contenuto in acqua, o adese ad un substrato, con uova demerse caratterizzate dalla presenza di strutture

adesive che ne consentono l'adesione al substrato stesso (Balon, 1975). In alcune specie, pur essendo la fecondazione esterna, vi è però inseminazione: gli spermatozoi si uniscono alla membrana vitellina (si parla di *internal gametic association*) che penetrano fecondandole solo quando queste vengono rilasciate all'esterno (Munheara *et al.*, 1989).

Spesso le specie che presentano uova di tipo demerso non limitano l'investimento parentale alla sola produzione di gameti, ma compiono cure parentali sulle uova sino al momento della schiusa, e in alcuni casi anche successivamente (Gross & Sargent, 1985; Chong *et al.*, 2006). È infatti noto come in molte specie a uova demerse, uno o entrambi i genitori accudiscano le uova, con una tipologia estremamente diversificata di cure parentali, che può variare dalla semplice costruzione del nido alla difesa delle uova dai predatori, alla ventilazione e ossigenazione delle uova sino alla rimozione selettiva delle uova non sviluppate, malate o morte (Helfman *et al.*, 1997). Inoltre è stato ipotizzato che in alcune specie i genitori prevengano il possibile insorgere di infezione batteriche sulle ovature non solo attraverso la pulizia dai sedimenti e la rimozione di uova infette, ma anche attraverso il rilascio di sostanze antimicrobiche all'interno del nido e sulla superficie delle uova (Knouft *et al.*, 2003; Little *et al.*, 2008).

Le cure parentali sono diffuse in almeno 87 famiglie di Teleostei, e in circa il 78% dei casi vengono svolte da un solo genitore, il maschio o la femmina a seconda della specie, mentre negli altri casi vengono fornite da entrambi i genitori (Gross & Sargent, 1985). Nelle specie che hanno fecondazione interna, le cure parentali femminili sono maggiormente diffuse (Gross & Sargent, 1985) mentre, caso particolare nei pesci, in quelle a fecondazione esterna sono predominanti le cure parentali maschili, soprattutto nelle specie a uova demerse (Blumer, 1979). È stato ipotizzato che questa diffusa presenza di cure parentali maschili possa essere dovuta al differente rapporto nei due sessi tra i costi e benefici derivanti dalla cura delle uova (Gross & Sargent, 1985). Posto infatti che i vantaggi per entrambi i sessi, in termini di aumento di sopravvivenza della prole, possano essere uguali, maschi e femmine possono differire nei costi associati alle cure parentali. In particolare l'investimento in cure parentali potrebbe portare ad una diminuzione del numero di accoppiamenti possibili e, più in generale, della riproduzione futura (Gross & Sargent, 1985). L'attività delle cure parentali sfrutta infatti risorse che vengono sottratte ad altre attività, in particolare all'aumento delle dimensioni corporee. Poiché nelle femmine la fecondità normalmente aumenta in maniera esponenziale con le dimensioni (Bagenal, 1966), mentre generalmente per i maschi la crescita è lineare, il costo del mancato aumento delle dimensioni corporee in termini di riproduzione futura risulta superiore per le femmine (Gross & Sargent, 1985).

La maggior parte dei pesci Teleostei presenta uno spiccato dimorfismo sessuale, che comprende differenze nella taglia, nel comportamento, nella colorazione del corpo e nella produzione di segnali chimici e acustici (Andersson, 1994; Helfman *et al.*, 1997). Il carattere sessualmente dimorfico più diffuso è rappresentato dalle dimensioni corporee, che nel caso dei Teleostei può raggiungere valori estremi, come ad esempio nel caso dei pesci abissali ceratoidei, in cui i maschi hanno dimensioni molto piccole rispetto alle femmine, alle quali vivono attaccati diventandone un'appendice (Andersson, 1994). Casi in cui le femmine



hanno dimensioni maggiori rispetto ai maschi (dimorfismo sessuale inverso) sono diffusi, e trovano spiegazione nella pressione sia della selezione naturale che di quella sessuale. La selezione naturale può infatti favorire femmine di grandi dimensioni in quanto queste risultano avvantaggiate nella produzione di uova. Meccanismi di selezione intrasessuale favoriscono inoltre le femmine più grandi nel caso soprattutto di specie territoriali, nelle quali maggiori dimensioni portano vantaggi nella competizione per l'accesso e il possesso del territorio (Bagenal, 1966; Andersson, 1994). Inoltre in alcuni casi sono proprio le piccole dimensioni dei maschi che vengono favorite, come nel caso di *Gambusia holbrooki*, in cui il successo di accoppiamento risulta negativamente correlato con le dimensioni corporee (Pilastro *et al.*, 1997). Generalmente sono comunque i maschi ad avere dimensioni maggiori rispetto alle femmine (Andersson, 1994), soprattutto nelle specie caratterizzate da una forte competizione maschile per l'accesso alle femmine o per la difesa di territori (Foote, 1990; Candolin & Voigt, 2001; Andersson *et al.*, 2002). Dimensioni maggiori possono venir favorite anche perché preferite dalle femmine (Fleming & Gross, 1994; Quinn & Foote, 1994; Creighton, 2001; Wong & Candolin, 2005) o perché spesso comportano un successo di fecondazione più alto (Dewsbury, 1982; Andersson, 1994; Esteve *et al.*, 2005).

Oltre al dimorfismo nella taglia, i maschi possono esibire diversi caratteri sessuali secondari, come pinne allungate, protuberanze ossee e carnose distribuite sul capo o sul corpo e livree variopinte e vistose (Helfman *et al.*, 1997). Queste strutture possono essere permanenti o, come avviene invece in molte specie, svilupparsi e diventare particolarmente evidenti unicamente durante la stagione riproduttiva (Helfman *et al.*, 1997). I maschi possono utilizzare anche altri tratti per attrarre le femmine, che possono scegliere il compagno sulla base di display di corteggiamento, segnali acustici e segnali chimici (Myrberg, 1981; Andersson, 1994; Stacey & Sorensen, 1999). L'uso di segnali visivi per attrarre le femmine è molto frequente nei Teleostei ed esistono numerose dimostrazioni della preferenza femminile per i maschi che esibiscono le colorazioni più vistose (per *review* vedi: Andersson, 1994). Sebbene meno frequentemente, anche le femmine possono sviluppare colorazioni vistose per attrarre il compagno, come ad esempio nel caso dei signatidi, in cui, in seguito all'inversione dei ruoli sessuali, sono i maschi a scegliere le femmine sulla base delle loro livree nuziali (Berglund *et al.*, 1986; Berglund & Rosenqvist, 2001). Colorazioni più vistose sono presenti comunque anche nelle femmine di specie in cui non vi è una netta inversione dei ruoli sessuali, soprattutto quando i maschi difendono nidi dalle dimensioni limitate e compiono cure parentali sulle uova (Amundsen & Forsgren, 2001; Pizzolon *et al.*, 2008).

I maschi di molte specie utilizzano suoni, soprattutto nelle fasi precoci del corteggiamento per attirare la femmina e segnalare la propria presenza (Myrberg *et al.*, 1986; Lugli *et al.*, 1996), e sembra possibile che le femmine possano scegliere attivamente il compagno proprio sulla base dei suoni emessi dai maschi (Myrberg *et al.*, 1986). La comunicazione chimica nei pesci ha ricevuto relativamente poca attenzione negli studi di selezione sessuale, a causa soprattutto della difficoltà di individuare e misurare le sostanze chimiche rilasciate in acqua. È comunque ben documentata la presenza nei Teleostei di feromoni utilizzati nell'attrarre il partner (Stacey & Sorensen, 1999; 2005). I feromoni

maschili e femminili possano svolgere un ruolo importante in diverse fasi del comportamento riproduttivo dei pesci (Kobayashi *et al.*, 2002; Stacey & Sorensen, 2005) e in molte specie sono rappresentati da prostaglandine, steroidi e dai loro metaboliti (Stacey & Sorensen, 1999; Stacey, 2003). I pesci possono rilasciare i loro ormoni sessuali insieme ai metaboliti attraverso l'urina, le feci, le branchie e la pelle (Colombo & Burighel, 1974; Colombo *et al.*, 1980; Van Den Hurk & Resink, 1992; Stacey & Sorensen, 2005).

La scelta femminile nelle specie che hanno uova demerse e cure parentali maschili può essere influenzata anche dalla qualità del nido e delle cure parentali compiute dal maschio. Una delle forme più comuni di scelta femminile basata sulle caratteristiche del nido è la preferenza verso nidi che contengono un numero maggiore di uova (Marconato & Bisazza, 1986; Petersen, 1989; Kraak & Videler, 1991; Petersen, 1995, Forsgren *et al.*, 1996; Goulet, 1997). Questa preferenza potrebbe essere dovuta al vantaggio che questi nidi conferiscono in termini di sopravvivenza delle uova (Petersen, 1995), probabilmente grazie ad un effetto di "diluizione" della probabilità di subire predazione o cannibalismo sulle proprie uova se deposte in nidi con numerosità maggiore (Rohwer, 1978; Marconato & Bisazza, 1986). Vantaggi potrebbero anche derivare da un maggior impegno del maschio nelle cure parentali verso ovature di maggiori dimensioni (Sargent, 1988; Manica, 2003). Inoltre le femmine potrebbero scegliere di deporre le uova in nidi già parzialmente occupati perché la presenza di altre uova è indice della capacità parentale del maschio, o infine perché le femmine copiano la scelta delle altre femmine (Ridley, 1978). La scelta femminile basata sul copiare il comportamento delle altre femmine è infatti un comportamento descritto in diverse specie e potrebbe essere dovuta al vantaggio di risparmiare tempo e quindi energie per la scelta o, nel caso di femmine ancora giovani e inesperte, un minor rischio di accoppiarsi con maschi di scarso valore. Le femmine potrebbero inoltre scegliere il maschio in base alla qualità delle sue cure parentali (Andersson, 1994; Jamieson, 1995) valutandole in modo diretto (Östlund & Ahnesjö, 1998; Marlowe, 2004a,b; Pampoulie *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2006), o valutando caratteristiche che dipendono dalla qualità delle cure parentali, come ad esempio la presenza di giovanili (Jamieson, 1995) o le condizioni e la sopravvivenza delle prole (Knapp, 1993; Forsgren, 1997).

Oltre al dimorfismo sessuale, esiste nei Teleostei, generalmente tra i maschi, anche un dimorfismo intrasessuale, con individui dello stesso sesso che sviluppano fenotipi differenti (Taborsky, 1994). Questo si manifesta generalmente nelle specie in cui la competizione intrasessuale per l'accesso all'accoppiamento risulta particolarmente forte e diventa vantaggioso adottare, soprattutto per gli individui con abilità competitive minori che rimarrebbero esclusi dalla riproduzione, modalità riproduttive diverse rispetto agli individui dominanti (Taborsky, 1994; 2001). È infatti ampiamente documentata nei Teleostei la presenza di tattiche di riproduzione alternative con lo sviluppo di fenotipi maschili che possono differire tra loro per morfologia, fisiologia e comportamento (Taborsky, 1994; Gross, 1996; Taborsky, 1998; 2001). Queste tattiche possono essere fissate a vita, ma più frequentemente sono flessibili, variando in base alle condizioni sociali o allo sviluppo ontogenetico dell'individuo (Taborsky, 1994; Gross, 1996; Taborsky, 1998; 2001). I maschi che riescono ad accaparrarsi le risorse fondamentali per la riproduzione si comportano da

dominanti (maschi territoriali/parentali/*bourgeois*) e ottengono l'accesso diretto alle femmine, mentre i maschi che hanno scarso o nullo accesso alle risorse cercano di riprodursi sfruttando l'investimento fatto dai maschi dominanti, parassitandone gli accoppiamenti (maschi parassiti/opportunisti/*sneakers*) (Taborsky, 1994; 1998; 2001). Sebbene la presenza di tattiche alternative sia diffusa soprattutto in specie a fecondazione esterna, essa è stata descritta anche in specie a fecondazione interna, in cui i maschi possono ottenere accoppiamenti con le femmine o attraverso il corteggiamento o con copule forzate (Meffe & Snelson, 1989). I maschi *sneaker*, descritti nelle specie che depongono uova demerse, sono generalmente più piccoli dei maschi parentali e assumono morfologia e colorazione simile a quella delle femmine, caratteristiche queste che consentono loro di avvicinarsi o penetrare furtivamente nei nidi dei maschi dominanti e rilasciare velocemente gli spermatozoi durante gli accoppiamenti (Gonçalves *et al.*, 1996; Mazzoldi & Rasotto, 2002). Sempre in queste specie i maschi opportunisti possono anche comportarsi da "satelliti", vivendo all'interno del territorio difeso dal maschio dominante e collaborando con lui nella difesa e nell'attrarre le femmine (Taborsky, 1994). Nelle specie a uova pelagiche, invece, sono state descritte essenzialmente due diverse tattiche alternative. Quella dei maschi cosiddetti *streakers*, che tentano di parassitare gli accoppiamenti, inserendosi velocemente tra il maschio e la femmina al momento del rilascio dei gameti (Warner, 1984) e quella dei *group spawners*. In quest'ultimo caso i maschi sub dominanti si riuniscono in gruppi, cercano di attirare delle femmine, con cui si accoppiano tutti assieme, deviandone l'attenzione dai maschi dominanti (Warner & Robertson, 1978; Thresher, 1984).

La presenza di tattiche alternative porta ad un conseguente innalzamento della competizione spermatica, soprattutto nei maschi opportunisti, in quanto il rilascio dei loro gameti avviene sempre in contemporanea a quello di altri maschi, e spesso in situazione sfavorevole (Petersen & Warner, 1998). Una delle conseguenze più evidenti di alti livelli di competizione spermatica è l'aumento delle dimensioni dei testicoli, come previsto dai modelli teorici di selezione post-copulatoria, sia a livello interspecifico che a livello intraspecifico (Parker, 1990 a, b). Infatti non solo nelle specie in cui vi è sempre accoppiamento di gruppo (più maschi con una sola femmina) le dimensioni dei testicoli sono significativamente maggiori di quelle delle specie in cui l'accoppiamento avviene in coppia (Stockley *et al.*, 1997) ma, nelle specie in cui vi sono tattiche riproduttive alternative, i maschi opportunisti presentano testicoli più sviluppati di quelli dei maschi dominanti (Taborsky, 1994; Petersen & Warner, 1998; Taborsky, 2008). La maggiore allocazione energetica da parte dei maschi opportunisti nella produzione dei gameti può risultare anche in caratteristiche qualitative dell'ejaculato, con i maschi parassiti che producono ejaculati di migliore qualità (Locatello *et al.*, 2007). Le differenze tra le diverse tipologie di maschi possono coinvolgere inoltre le strutture accessorie dell'apparato riproduttore, come le ghiandole accessorie all'apparato riproduttore, che nei gobidi sono maggiormente sviluppate nei maschi parentali (Scaggiante *et al.*, 1999; Mazzoldi *et al.*, 2000; Rasotto & Mazzoldi, 2002).

Tra i Teleostei le specie ad uova demerse e cure parentali maschili rappresentano degli eccellenti modelli per lo studio della scelta femminile basata su diversi caratteri

maschili. In molte di queste infatti, particolarmente in Blenniidae e Gobiidae, due tra le famiglie più ricche in specie, il dimorfismo sessuale è molto accentuato, nella taglia ma anche nella colorazione e nella presenza di ghiandole o ornamenti cefalici. A questo si aggiungono inoltre tratti comportamentali, quali il corteggiamento, le cure parentali, o qualità come i territori e/o nidi che difendono (Breder & Rosen, 1966; Thresher, 1984). Tutti tratti che, singolarmente, sono stati dimostrati essere oggetto di preferenza da parte delle femmine ma delle cui relazioni nella reciproca espressione e, spesso anche delle possibili informazioni trasmesse alla femmina, si hanno nel complesso informazioni limitate.

## OBIETTIVI DELLA RICERCA

Questo lavoro è stato focalizzato allo studio dei caratteri multipli maschili e del loro ruolo nella scelta femminile in una specie modello, il Teleosteo Blenniidae *Salaria pavo* (Risso, 1810). La ricerca si è inoltre proposta di studiare i rapporti che intercorrono sia tra le diverse qualità che tra i diversi caratteri maschili, al fine di valutare la presenza di possibili compromessi tra l'investimento maschile in alcuni tratti o qualità a discapito dell'investimento in altri.

### ***Salaria pavo***

La specie scelta come specie modello per questo lavoro è la bavosa pavonina, *Salaria pavo* (Risso, 1810). *S. pavo* è un blennide di medie dimensioni (lunghezza massima: 15 cm), tipico della fascia intertidale e subtidale delle coste rocciose, diffusa nel Mar Mediterraneo, Mar Nero e coste orientali dell'Oceano Atlantico (Zander, 1986). Nell'alto Adriatico questa specie ha colonizzato anche le acque salmastre, risultando ampiamente diffusa anche all'interno della laguna di Venezia.

Come la maggior parte dei blennidi, *S. pavo* è una specie bentonica che compie spostamenti limitati, anche in quanto priva della vescica natatoria (Gibson, 1969; Thompson, 1983; Zander, 1986). La forma corporea è quella tipica della famiglia, con il corpo allungato e leggermente compresso lateralmente, la pelle priva di scaglie, una lunga pinna anale e con un'unica pinna dorsale costituita da raggi molli e spinosi (Zander, 1986). Le pinne pelviche sono ridotte a due raggi liberi posti anteriormente rispetto alle pinne pettorali (Zander, 1986). La colorazione in questa specie è giallo-verde diffusa, con fasce verticali più scure lungo i fianchi delimitate da linee blu accese nella metà anteriore del corpo, e da piccole macchie della stessa colorazione nella parte posteriore e nella testa dove è presente anche una macchia ocellare rosso-violacea, sempre delimitata da una linea blu accesa (Zander, 1986). Questa specie presenta uno spiccato dimorfismo sessuale (Fig. 1.1 a,b) che diventa particolarmente evidente durante la stagione riproduttiva, che nelle acque dell'alto Adriatico va dalla seconda metà del mese di maggio al mese di agosto. I maschi hanno mediamente dimensioni maggiori rispetto alle femmine e presentano una colorazione più accesa. I maschi inoltre esibiscono una vistosa cresta cefalica, che nella stagione riproduttiva si colora di un giallo acceso, e i primi due raggi della pinna anale modificati in una coppia di ghiandole anali, che aumentano di dimensioni durante il periodo degli accoppiamenti (Zander, 1986; Patzner & Seiwald, 1987). Le femmine invece non presentano particolari caratteristiche distintive, ad eccezione della regione addominale che durante l'ovulazione aumenta di dimensioni e assume una colorazione più chiara, generalmente bianco-giallastra (Zander, 1986).

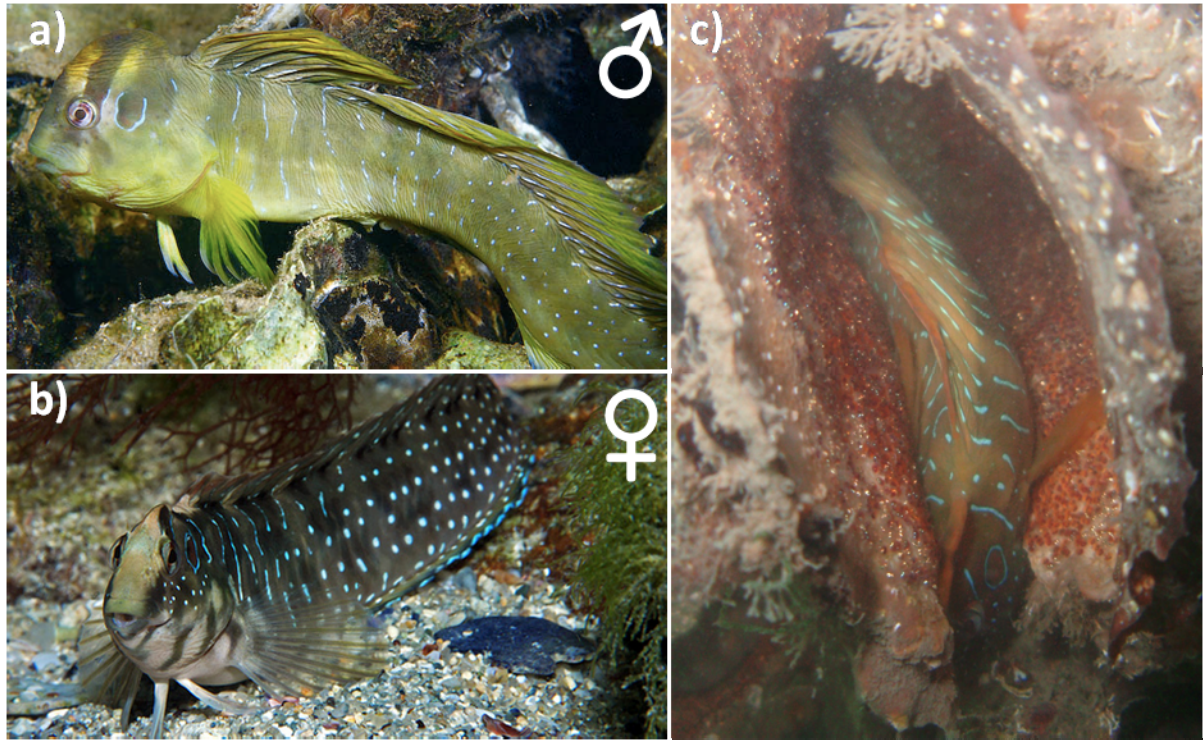
Durante la stagione riproduttiva i maschi difendono un nido, solitamente un anfratto in una roccia o gusci vuoti di bivalvi morti, come mitili o ostriche (Fig. 1.1 c), ma anche qualsiasi oggetto che presenti una piccola cavità protetta. Il sistema di accoppiamento in questa specie è promiscuo, con maschi poliginici che accolgono nel proprio nido ovature di

diverse femmine, e femmine poliandriche che durante la stagione riproduttiva depongono le uova in nidi di diversi maschi (Patzner *et al.*, 1986). La fecondazione è esterna ed asincrona, con i maschi che rilasciano strisce spermatiche attaccandole alla parete dei nidi dove la femmina deporrà uova di tipo demerso, incollandole in singolo strato e con il micropilo rivolto verso la parete del nido (Patzner *et al.*, 1986; Gallo, 2004). Le cure parentali sono poi affidate interamente al maschio, che curerà le uova sino alla schiusa, proteggendole da eventuali predatori, ventilandole, pulendole e rimuovendo le uova morte o non sviluppate (Patzner *et al.*, 1986). Il maschio inoltre strofina la regione urogenitale sulle ovature, spalmando su di esse il secreto prodotto dalle ghiandole anali, che è stato dimostrato essere un muco ricco di una sostanza lisozima simile che potrebbe avere un'azione antimicrobica protettiva sulle uova (Giacomello *et al.*, 2006). La presenza di tattiche riproduttive alternative è stata riscontrata in una popolazione portoghese di *S. pavo*, in cui vi è una forte competizione intrasessuale per il possesso dei nidi, che, nell'area oggetto di quello studio, hanno una limitata disponibilità. In questa popolazione è stata notata la presenza di maschi opportunisti (*sneaker*), più piccoli e simili nell'aspetto alle femmine, essendo privi di cresta cefalica e con ghiandole anali molto ridotte. Questi maschi non nidificano ma tentano di parassitare gli accoppiamenti di maschi parentali, avvicinandosi o entrando nei loro nidi durante la deposizione di una femmina e rilasciando velocemente spermatozoi per cercare di fecondare una parte delle uova (Almada *et al.*, 1994; Gonçalves *et al.*, 1996).

La scelta di lavorare utilizzando questa specie è stata presa sulla base delle sue caratteristiche che la rendono un ottimo modello negli studi di selezione sessuale, in particolare in relazione alla scelta femminile sulla base dei CCS multipli, in quanto:

- > è ampiamente diffusa e facilmente osservabile in natura;
- > si adatta bene alle condizioni di cattività, anche a causa delle dimensioni ridotte che ne permettono il mantenimento in acquari anche di piccole dimensioni;
- > presenta uno spiccato dimorfismo sessuale e in particolare numerosi CSS potenzialmente implicati nella scelta femminile.

Inoltre, il fatto che i maschi difendano un nido e compiano cure parentali sulle uova, oltre ad essere una caratteristica qualitativa del maschio facilmente quantificabile, permette una valutazione del successo di accoppiamento dei maschi.



**Fig. 1.1** - Maschio (a) e femmina (b) di *S. Pavo*, sessualmente dimorfici nelle dimensioni corporee, nella colorazione e nella presenza di una cresta cefelica ben sviluppata nei maschi. Maschio che difende le uova all'interno del proprio nido ricavato da un guscio vuoto di ostrica (c).

### **Organizzazione della ricerca**

La ricerca è stata suddivisa in tre parti, studiando in particolare:

- la relazione fra l'espressione dei caratteri maschili dimorfici e il successo di accoppiamento
- la relazione fra lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari dei maschi e le loro possibili qualità;
- le relazioni tra diversi aspetti dell'investimento riproduttivo.

### **Relazione fra lo sviluppo dei caratteri maschili dimorfici e il successo di accoppiamento**

In questa prima fase di lavoro sono stati raccolti dati in natura per valutare quali tra i diversi caratteri esibiti dai maschi di *S. pavo* avessero un possibile ruolo nel conferire maggiore successo di accoppiamento agli individui. In seguito sono stati compiuti in cattività test di preferenza femminile su caratteri risultati rilevanti dagli studi in natura, allo scopo di valutare se essi sono sottoposti a selezione di tipo intersessuale.

### ***Relazione fra lo sviluppo dei CSS e qualità maschili***

In questa seconda parte del lavoro si è cercato di valutare se i CSS che risultano essere sottoposti a scelta femminile sono indicatori di qualità dei maschi. A questo scopo sono stati utilizzati due distinti approcci:

- ***Relazione tra i CSS e la condizione del maschio:***

Attraverso l'induzione sperimentale di uno stress immunitario si è cercato di valutare quali tra i diversi CSS sono condizione-dipendenti, e quindi possano segnalare alla femmina lo stato di salute e/o condizione del maschio.

- ***Funzione delle ghiandole anali:***

Attraverso un approccio multidisciplinare si sono studiati nello specifico i possibili vantaggi diretti della scelta femminile, basata sulla dimensione delle ghiandole anali, in termini di sopravvivenza delle uova.

### ***Relazioni tra diversi aspetti dell'investimento riproduttivo***

In quest'ultima parte della ricerca si è cercato di valutare quali siano i rapporti tra gli investimenti maschili nei diversi aspetti della riproduzione, al fine di valutare la possibile presenza di compromessi tra le diverse qualità maschili e tra le diverse qualità e i diversi CSS. In particolare si è cercato di valutare le relazioni tra l'investimento per l'accoppiamento, sia pre-copulatorio (investimento in CSS) che post-copulatorio (qualità dell'ejaculato), e l'investimento in cure parentali, in relazione anche allo stato del sistema immunitario.



## **CAPITOLO I**

***Relazioni fra lo sviluppo dei caratteri maschili dimorfici  
e il successo di accoppiamento***



## INTRODUZIONE

Le motivazioni che stanno alla base delle preferenze femminili per i maschi con i caratteri sessuali secondari (CSS) maggiormente sviluppati sono state, fin dalla prima formulazione della teoria della selezione sessuale (Darwin, 1859), largamente dibattute. Se i CSS riflettono una o più qualità del maschio, sono cioè “informativi”, le femmine potrebbero scegliere sulla base del loro sviluppo perché questi danno indicazioni sui possibili benefici diretti che la femmina può ottenere dal compagno (Heywood, 1989; Hoelzer, 1989; Kirkpatrick & Ryan, 1991; Andersson, 1994), o sulle qualità/caratteristiche che possono essere trasmesse geneticamente alla prole (Fisher, 1930; Zahavi, 1975; Hamilton & Zuk, 1982; Andersson, 1994). Fondamentalmente, tutte le teorie e i modelli proposti prevedono una relazione positiva tra il successo riproduttivo del maschio e le dimensioni del proprio ornamento (Griffith *et al.*, 1999). In particolare prevedono anche che le femmine basino la propria scelta preferendo i maschi che esibiscono i CSS di maggiori dimensioni o qualitativamente migliori, ad esempio colorati più intensamente come nel caso delle sule dai piedi azzurri, con più ocelli come per la coda dei pavoni o più frequenti e stentorei come i canti di diverse specie di uccelli e anfibi (Andersson, 1994; Jennions & Petrie, 1997). A questo si aggiunga che la preferenza femminile si può esprimere anche su altre caratteristiche, quali la qualità o le dimensioni del territorio o del nido difeso da un maschio, come osservato in diverse specie di pesci, anfibi, uccelli e mammiferi (Andersson, 1994) o, come proposto invece per diverse specie di pesci a cure parentali maschili, sul numero di uova presenti nel nido (Marconato & Bisazza, 1986; Petersen, 1989; Kraak & Videler, 1991; Petersen, 1995; Forsgren *et al.*, 1996; Goulet, 1997). Per questo, soprattutto nel caso proprio dei Teleostei a cure parentali maschili, nel valutare caratteri maschili che influenzano il successo di accoppiamento è necessario tenere in considerazione anche le caratteristiche dell'eventuale territorio e/o nido difeso dal maschio.

Nei blennidi esiste uno spiccato dimorfismo sessuale, sia nelle dimensioni, con i maschi che generalmente sono più grandi delle femmine, ma anche per la presenza nei maschi di colorazioni più vistose, pinne dorsali sviluppate, ornamenti cefalici come creste, tentacoli orbitali e nasali, e di ghiandole sulla pinna anale, dorsale o caudale (Breder & Rosen, 1966; Zander, 1975; Papaconstantinou, 1979; Zander, 1986). Nonostante la presenza di questi numerosi caratteri sessualmente dimorfici particolarmente vistosi, sono pochi gli studi che ne hanno analizzato il significato funzionale in relazione al successo di accoppiamento. La scelta femminile nei blennidi sembra essere influenzata soprattutto dalle dimensioni corporee dei maschi, come evidenziato in *Istiblennius anosimae* (Sunobe *et al.*, 1995), *Parablennius sanguinolentus parvicornis* (Côté & Hunte, 1989 a,b; Oliveira *et al.*, 2000) e *Aidablennius sphynx* (Neat & Locatello, 2002). L'attenzione alle dimensioni del compagno è ampiamente diffusa in natura, e sono diverse le ipotesi che ne evidenziano i possibili vantaggi adattativi (Andersson, 1994). In specie in cui è il maschio a occuparsi delle prole e a fornire le cure parentali, le femmine potrebbero preferire compagni più grandi in quanto più abili nel difendere il proprio nido dai predatori (Keenleyside *et al.*, 1985) o da altri

maschi che cercano di impadronirsi (Sheppey & Ribbink, 1985), oppure perché hanno più energie da dedicare nelle cure parentali per tutto il tempo necessario allo sviluppo della prole (Downhower & Brown, 1980; Downhower *et al.*, 1983; Colgan & Salmon, 1986). È stato inoltre proposto che maschi più grandi possano trasmettere geneticamente le loro caratteristiche alla prole, producendo una discendenza che ha maggiori abilità nella competizione (Turner, 1993).

Nel caso dei blennidi, per alcune specie è stato dimostrato che i vantaggi nella scelta di compagni più grandi possono consistere in benefici di tipo diretto, derivanti da un maggior investimento nelle cure parentali, come in *A. sphynx* e *P. sanguinolentus parvicornis*, in cui maschi di maggiori dimensioni effettuano cure parentali più intense, ventilando le uova con maggiore frequenza e investendo più tempo nell'attività di pulizia del nido (Oliveira *et al.*, 2000; Neat & Locatello, 2002). Anche per *Ophioblennius atlanticus*, questa scelta garantisce benefici diretti in quanto maschi più grandi trascorrono più tempo all'interno del nido, effettuando maggiori cure parentali diminuendo il rischio di predazione sulle uova (Côté & Hunte, 1989a). È stato inoltre ipotizzato che la scelta per le dimensioni sia basata sull'ottenimento per le femmine di benefici diretti in termini di efficienza di fecondazione, come nel caso di *A. sphynx*, in cui le dimensioni del maschio correlano positivamente con il numero di spermatozoi rilasciati durante l'accoppiamento (Neat & Locatello, 2002). In *A. sphynx* e *S. pavo* la scelta femminile è influenzata anche dal numero di uova presenti all'interno del nido, con le femmine che preferiscono i maschi i cui nidi contengono più uova (Kraak & Videler, 1991; Kraak, 1994; Fagundes *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009). La ragione di questa preferenza potrebbe risiedere nel significativo aumento della probabilità di sopravvivenza delle uova all'interno di nidi più densamente occupati (Kraak, 1994), anche se non si può escludere una forma di imitazione della scelta, comportamento per cui le femmine copiano quanto fatto da altre femmine, scegliendo i maschi con cui queste si stanno accoppiando o si sono appena accoppiate. È stato inoltre proposto che la femmina potrebbe basarsi sul numero di uova presenti nel nido anche in *I. inosimae* e *O. atlanticus*, nelle quali il successo riproduttivo dipende in modo significativo dalle dimensioni del nido, che risultano correlate al numero di uova presenti al loro interno (Côté & Hunte, 1989a,b; Sunobe *et al.*, 1995). In *P. sanguinolentus parvicornis* sembra che, oltre alle dimensioni corporee, anche alcune caratteristiche comportamentali, come l'intensità del corteggiamento e l'aggressività dimostrata verso i conspecifici, entrino in gioco nel garantire un maggiore successo riproduttivo ai maschi. È stato ipotizzato che questi caratteri siano indicativi del grado di motivazione sessuale dell'individuo e possano conferire un vantaggio sia nella competizione intrasessuale che nella scelta femminile (Oliveira *et al.*, 2000). Nessuno studio ha invece dimostrato che il successo riproduttivo nei blennidi è legato ad altri caratteri sessualmente dimorfici dei maschi, ad eccezione del *Parablennius tentacularis*, il cui successo di accoppiamento maschile è risultato legato all'espressione dei tentacoli orbitali (Giacomello & Rasotto, 2005).

*S. pavo* presenta uno spiccato dimorfismo sessuale in cui i maschi hanno maggiori dimensioni, una cresta cefalica ben sviluppata che durante il periodo riproduttivo diventa particolarmente evidente colorandosi di un giallo acceso e i primi due raggi della pinna anale

modificati in una coppia di ghiandole anali (Zander, 1975; Patzner & Seiwald, 1987). Questi caratteri sono ben sviluppati nei maschi parentali, nei maschi cioè che difendono attivamente i nidi a compiono cure parentali sulla uova, mentre sono assenti o sviluppati solo in modo rudimentale nei maschi che adottano tattiche alternative parassitando gli accoppiamenti dei maschi parentali (Almada *et al.*, 1994; Gonçalves *et al.*, 1996). Uno studio compiuto su una popolazione portoghese ha dimostrato che sia le dimensioni dei maschi sia le dimensioni delle ghiandole anali sono legate al successo di accoppiamento. Infatti maschi di dimensioni maggiori e con ghiandole più sviluppate avevano un numero di uova maggiore all'interno dei propri nidi (Oliveira *et al.*, 1999). Nessun legame è stato trovato tra il successo riproduttivo in natura dei maschi e altri caratteri, come ad esempio la cresta cefalica (Oliveira *et al.*, 1999). Sono state formulate differenti ipotesi sul ruolo e la funzione delle ghiandole anali nei processi riproduttivi, spesso supportate da prove sperimentali, ma al momento le conoscenze sono ancora limitate e i risultati a volte in contraddizione. Lo sviluppo delle ghiandole anali è risultato correlato allo sviluppo delle gonadi (Patzner & Seiwald, 1987) e in particolare promosso dall'azione dell'11-cheto-testosterone, che in *S. pavo* è in grado di promuovere anche l'espressione dei caratteri sessuali, sia primari (gonadi) che secondari, come la cresta cefalica (Oliveira *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2007). Una possibile funzione delle ghiandole anali potrebbe risiedere nella produzione di feromoni, come suggerito da diversi autori, che hanno dimostrato sperimentalmente che queste strutture producono una sostanza pseudoferomonale che sembra attrarre le femmine e provocarne l'esibizione dei display tipici di corteggiamento (Laumen *et al.*, 1974; Zeek & Ide, 1995; Barata *et al.*, 2008). Tuttavia la preferenza diretta per questo tratto nella scelta femminile non è ancora stata dimostrata, ma si ipotizza che la secrezione del feromone possa rivestire un ruolo nell'attrarre le femmine da una lunga distanza, indicando la presenza di un maschio pronto alla riproduzione (Barata *et al.*, 2008). È stato inoltre ipotizzato che le ghiandole anali possano avere un ruolo nell'aumentare la sopravvivenza della prole, e in particolare che il secreto prodotto da questa strutture e che viene spalmato dai maschi sulle uova, abbia azione protettiva antimicrobica (Zander, 1975; Giacomello *et al.*, 2006). Infatti, negli estratti di ghiandole anali è presente una sostanza lisozima-simile che ha azione antibatterica (Giacomello *et al.*, 2006). Se questa sostanza venisse rilasciata con il secreto, in maniera proporzionale alle dimensioni delle ghiandole e se essa fornisse una reale protezione alle uova in sviluppo, la scelta femminile basata sulle dimensioni di questi organi potrebbe essere volta all'acquisizione di benefici diretti per la propria prole. Anche la cresta cefalica potrebbe rivestire un ruolo importante per il successo riproduttivo, come suggerito da Gonçalves *et al.* (2002), che hanno dimostrato in esperimenti di scelta in cattività che il numero di display di corteggiamento eseguiti dalle femmine sono correlati alle dimensioni della cresta dei maschi. Tuttavia, la bassa numerosità del campione testato (n=6) e i dati raccolti sul campo sulla stessa popolazione, che al contrario mostrano come il successo riproduttivo dei maschi sia indipendente dalle dimensioni della cresta (Oliveira *et al.*, 1999), non chiariscono pienamente il ruolo della cresta cefalica nella scelta femminile. È stato inoltre ipotizzato che la cresta cefalica possa essere sottoposta a selezione

intrasessuale e venga utilizzata quale segnale di abilità nella competizione tra i maschi (Saraiva *et al.*, 2009 a, b).

In questa specie è stata anche dimostrata una significativa eterogeneità a livello comportamentale, morfologico e fisiologico, tra popolazioni provenienti da siti differenti, (Saraiva *et al.*, 2009 a, b). In particolare, uno studio comparativo tra due popolazioni provenienti da un sito nell'alto Adriatico (Trieste) e da un sito in Portogallo ha mostrato una relazione tra il comportamento, lo sviluppo dei CSS, il livello di 11-cheto-testosterone circolante e la disponibilità di nidi potenziali nei due siti, con i maschi che vivono in aree in cui vi è una maggiore competizione intrasessuale per il possesso del nido che sviluppano una maggiore aggressività e CSS più sviluppati (Saraiva *et al.*, 2009 b). Purtroppo la grande distanza tra i due siti e la mancanza di siti di confronto vicini, soprattutto per una specie dalla mobilità limitata come *S. pavo* (Gibson, 1969; Thompson, 1983; Zander, 1986), rendono difficile dimostrare se le differenze osservate siano esclusivamente dovute alla disponibilità di nidi o se non influiscano invece altri parametri ambientali. Inoltre è stato ipotizzato che in ambienti in cui vi sia scarsa disponibilità di nidi potenziali rispetto al numero di maschi pronti per la riproduzione, si vada incontro ad un'inversione dei ruoli sessuali, con i maschi che riescono ad ottenere il nido che diventano il sesso limitante e le femmine che competono tra loro per l'accesso alla riproduzione e che vengono scelte dai maschi (Almada *et al.*, 1994; 1995).

Dal quadro descritto risulta quindi come i tratti che possono influenzare il successo riproduttivo dei maschi di *S. pavo* siano molteplici e come questi possano svolgere un ruolo sia nei processi di competizione tra maschi, sia durante la scelta femminile.

Gli obiettivi di questa prima parte della ricerca sono stati quelli di valutare quali tra i diversi tratti esibiti dai maschi potessero essere sottoposti a scelta femminile.

Lo studio è stato affrontato in tre diverse fasi:

- ***l'identificazione dei siti naturali di studio e loro descrizione (studio in natura)***  
sono state identificate diverse aree in cui era presente *S. pavo*, e attraverso censimenti e misurazioni della densità di nidi e di individui sono stati identificati i siti che meglio si adattavano agli scopi di questa ricerca;
- ***la valutazione del successo di accoppiamento in relazione allo sviluppo dei caratteri dimorfici maschili (studio in natura)***  
sono stati identificati quali tratti, considerando la taglia corporea, la cresta cefalica, le ghiandole anali e le dimensioni del nido, fossero indicatori del successo di accoppiamento dei maschi;
- ***gli esperimenti di scelta femminile (studio in cattività)***  
sono stati eseguiti esperimenti di scelta femminile sui tratti, esclusa la taglia corporea, che risultavano correlati con il successo di accoppiamento per valutare se questi fossero sottoposti a selezione intersessuale.

## MATERIALI E METODI

I dati in natura e tutti gli individui di *S. pavo*, sono stati raccolti durante le stagioni riproduttive degli anni 2007, 2008 e 2009 che, per questa specie e nell'area di studio di questo lavoro, va dal mese di maggio a quello di agosto (Segantin, 1968).

### ***Distribuzione e abbondanza di S. pavo in natura***

I siti di studio sono stati identificati in base ad osservazioni preliminari compiute durante la stagione riproduttiva del 2006. Sono stati identificati 4 siti in cui era presente e nidificava *S. pavo*: tre all'interno della Laguna di Venezia (Casone: un allevamento abbandonato di mitili, 45°13'50"N, 12°18'43"E; Relitto: una nave mercantile arenata, 45°13'39"N, 12°16'18"E; Canal Lombardo: un canale navigabile periferico della città di Chioggia, 45°13'27"N, 12°16'22"E) e uno marino (Sottomarina: diga foranea sud della bocca di porto di Chioggia, lato mare, 45°13'43"N, 12°18'43"E) (Fig. 2.1).



**Fig. 2.1** – Foto aerea della Laguna di Venezia (a) in cui è indicata l'area di studio. Foto aerea dell'area della bocca di porto (b) di Chioggia (VE) in cui sono visibili i quattro siti di studio.

Nel mese di giugno 2007 è stato condotto uno studio in subacquea, con la tecnica del *visual census* (tecnica dei transetti orizzontali) (per *review* vedi: Lejeune, 1985), per valutare l'abbondanza di nidi ed individui nei quattro siti selezionati. Per ogni sito sono stati eseguiti 8

transetti di 10 m di lunghezza per 0,6 m di larghezza lungo i quali venivano contati il numero di individui di *S. pavo* e i nidi occupati. Da questo lavoro preliminare è risultato che i siti di Sottomarina e Casone erano quelli con la maggiore abbondanza di nidi ed individui (media  $\pm$  deviazione standard: nidi totali/m<sup>2</sup>: Casone=1,08 $\pm$ 0,22; Sottomarina=0,22 $\pm$ 0,10; Relitto=0,20 $\pm$ 0,09; Canal Lombardo=0,18 $\pm$ 0,06; individui/m<sup>2</sup>: Casone=0,35 $\pm$ 0,14; Sottomarina=0,26 $\pm$ 0,26; Relitto=0,11 $\pm$ 0,01; Canal Lombardo=0,13 $\pm$ 0,03). Per questa ragione, i successivi studi sono stati condotti solo in questi due siti.

Nel mese di giugno e nella prima metà del mese di luglio 2008, sono stati raccolti i dati relativi al numero di individui dei due sessi in entrambi i siti. I dati sono stati raccolti in *visual census* eseguendo 10 transetti orizzontali (10 x 0,6 m) per sito. Sono stati inoltre acquisiti dati relativi al numero di nidi occupati dai maschi di *S. pavo* e di nidi potenziali. I nidi venivano contati all'interno di un'area (0,9 x 0,6 m) delimitata da un rettangolo di metallo posizionato in modo casuale sul fondale (tecnica dei quadrati). Sono stati considerati nidi potenziali tutti gli anfratti o i gusci vuoti di bivalvi che avessero dimensioni tali da permetterne l'occupazione da parte di un maschio. Sono state eseguite 20 repliche per sito.

### **Raccolta di maschi e nidi**

La cattura dei maschi è avvenuta in subacquea utilizzando retini a mano e sacchetti di plastica trasparenti. Unitamente a ciascun maschio catturato è stato raccolto il nido che difendeva. Tutte le catture sono avvenute durante la stagione riproduttiva e successivamente alla fase di raccolta dei dati relativi alle abbondanze e distribuzione di *S. pavo* in natura.

Nel corso del triennio sono stati catturati in totale 212 maschi (Sottomarina: 68; Casone: 144). Nello specifico, nel 2007 sono stati catturati 52 maschi (Sottomarina: 27; Casone: 25), nel 2008, 58 maschi (Sottomarina: 25; Casone: 33) e nel 2009 altri 102 (Sottomarina: 16; Casone: 86). Dopo la cattura i maschi e i nidi venivano trasportati presso la Stazione Idrobiologica dell'Università di Padova in Chioggia (Venezia) dove si procedeva a tutte le misurazioni.

Gli animali, anestetizzati con MS222 (Sandoz), venivano pesati (con bilancia di precisione 0,01 g) e fotografati con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7.2 Megapixel). Le fotografie sono state effettuate con l'animale disteso lateralmente (Fig. 2.2 a) su un supporto con scala di riferimento in centimetri. Attraverso un software di analisi di immagine (ImageJ, disponibile online presso il sito: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) sono state analizzate le fotografie ottenute e raccolte le misure morfologiche con precisione del decimo di millimetro. Le misure raccolte sono state: lunghezza totale (LT) e standard (LS); altezza (HC), lunghezza (LC) e area della cresta (AC); area delle ghiandole anali (AG). Ogni misura è stata presa in doppio e per le successive analisi è stato utilizzato il valore medio.

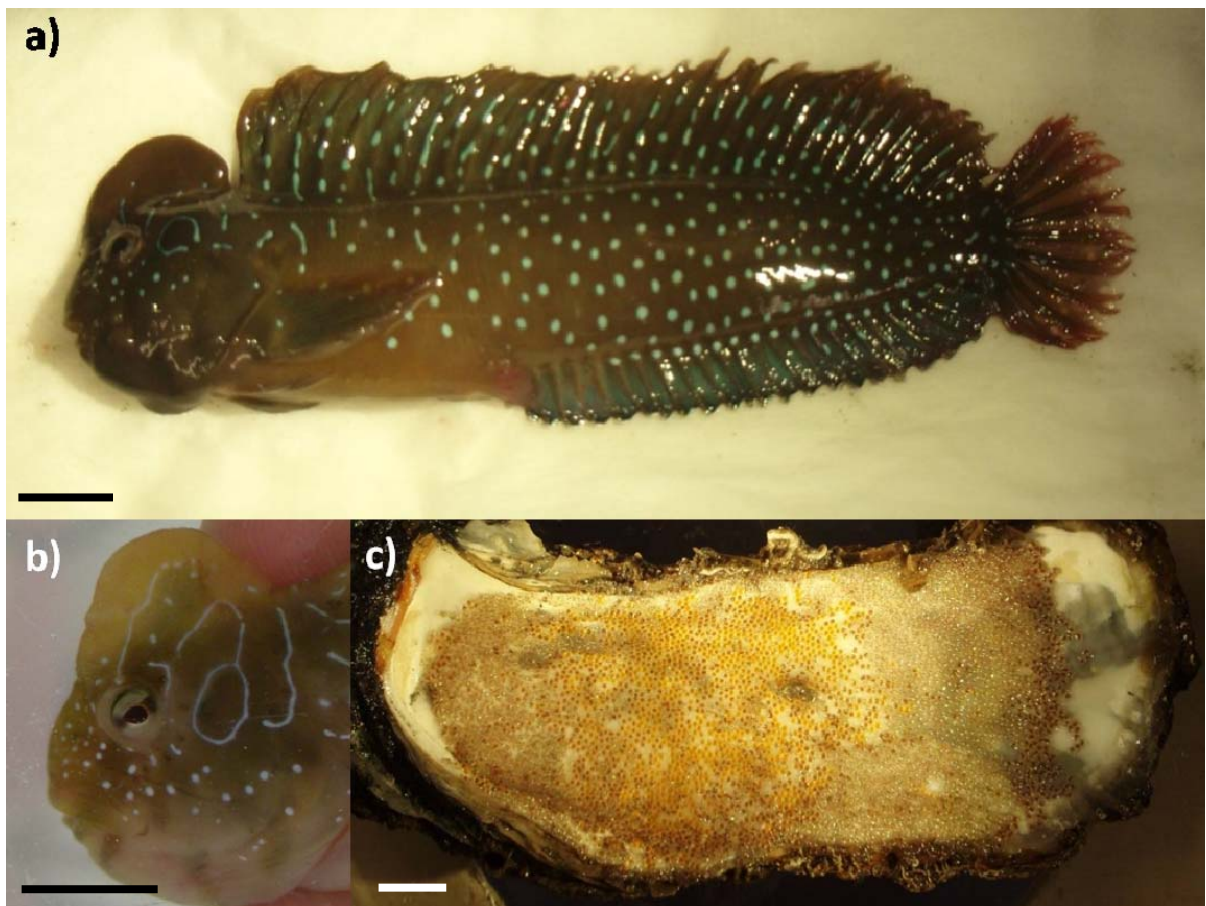
Per un sottocampione di 88 maschi catturati durante la stagione riproduttiva 2009 è stata raccolta anche la misura dell'estensione della colorazione gialla della cresta. Poiché l'anestesia provoca la scomparsa della caratteristica colorazione vistosa dei maschi in periodo riproduttivo (Pizzolon, osservazioni personali), questa misura non poteva essere effettuata sulle fotografie scattate con la metodica descritta precedentemente. Sono state



scattate quindi fotografie particolareggiate della cresta degli animali posti in vaschette trasparenti durante la fase di risveglio, nella quale riemerge la colorazione nuziale (Pizzolon, osservazioni personali) (Fig. 2.2 b).

I nidi sono stati fotografati (Fig. 2.2 c) con una scala dimensionale di riferimento con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7.2 Megapixel). Le fotografie sono state analizzate con software di analisi di immagine ImageJ e sono state misurate l'area complessiva del nido (AN) e l'area ricoperta dalle uova (AU). Le fotografie sono state successivamente utilizzate per eseguire la conta delle uova (NU) presenti in ciascun nido con un software di analisi di immagine appositamente progettato. Dopo esser stati fotografati, i nidi sono stati trasferiti in vasche con acqua marina a temperatura di  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e areazione continua sino alla schiusa delle uova; le larve sono state quindi liberate nell'ambiente di provenienza dei nidi stessi.

Tutti gli animali sono sopravvissuti alla cattura e ai trattamenti, e dopo la fase di studio sono stati liberati nei siti di provenienza.

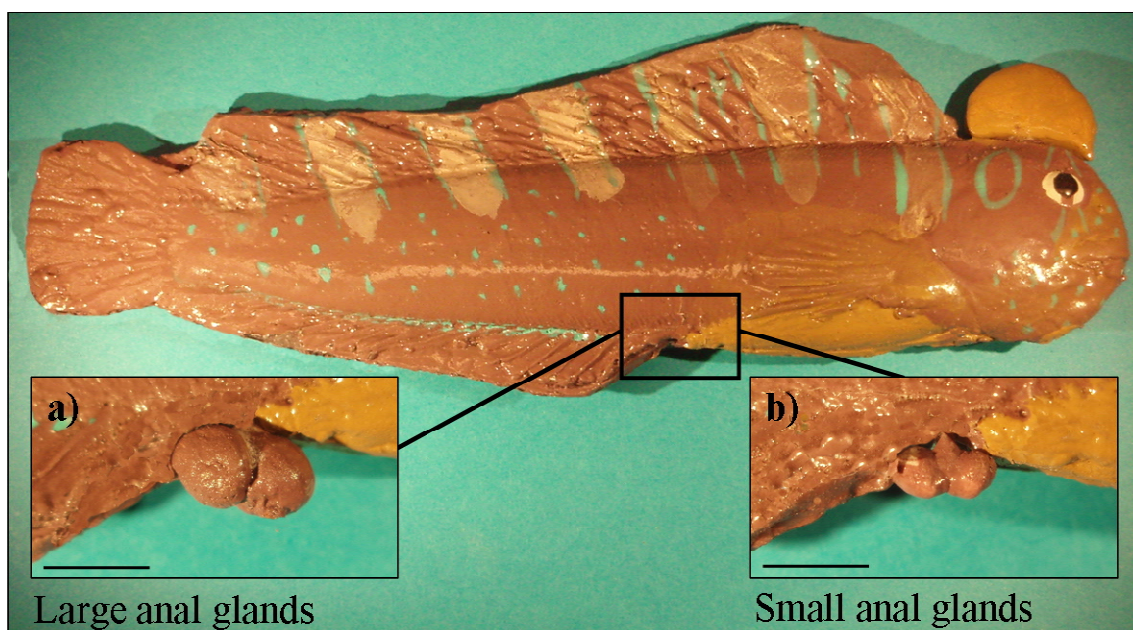


**Fig. 2.2** – Foto di maschio di *S. pavo* anestetizzato (a). Particolare della cresta in fase di risveglio durante la quale riemerge la colorazione gialla (b). Foto di un nido con uova (c). Barra di scala = 1 cm.

### **Esperimenti di preferenza femminile**

A partire dalle indicazioni fornite dalla letteratura e dai dati in natura nella stagione riproduttiva 2007, nel 2008 sono stati condotti esperimenti di preferenza femminile, al fine di valutare se la cresta cefalica e le ghiandole anali fossero caratteri sottoposti a selezione intersessuale. Gli esperimenti sono stati condotti valutando la preferenza delle femmine

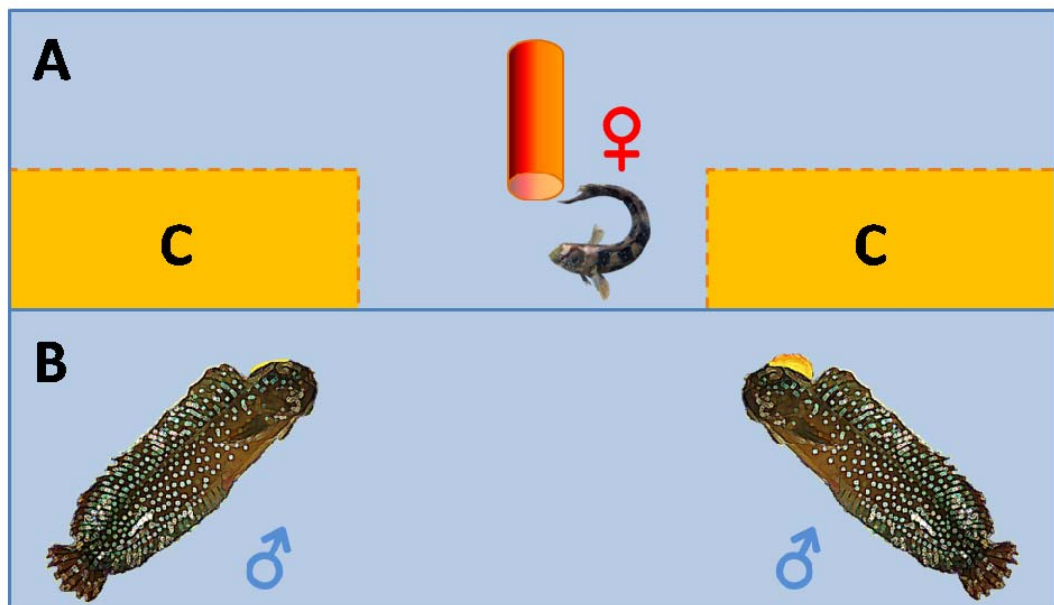
rispetto a due modellini in silicone aventi la forma di maschi di *S. pavo*. La scelta di adottare modellini rispetto a maschi veri è dovuta alla contemporanea presenza in questa specie di diversi tratti che possono interagire nell'attrarre le femmine, a alla conseguente impossibilità, utilizzando maschi veri, di poter discriminare la scelta femminile sulla base di un singolo tratto. L'uso dei modellini ha permesso inoltre di parificare per tutti gli esperimenti il comportamento e i display di corteggiamento dei maschi, che in alcuni blennidi sono anch'essi sottoposti a scelta femminile (Oliveira *et al.*, 2000). Durante la stagione riproduttiva 2007 sono state condotte prove preliminari per valutare la reazione delle femmine a diverse tipologie di sagome di maschio, ottenendo con i modelli in silicone il tasso più elevato di risposta (Pizzolon, osservazioni personali). Sono state quindi costruite 42 sagome aventi forma e livrea tipiche dei maschi durante il periodo riproduttivo (Fig. 2.3). La loro lunghezza totale era di 8, 10 e 12 cm e per ciascuna classe di taglia sono state costruite 14 sagome. Le dimensioni sono state scelte come lunghezze rappresentative dei maschi sulla base delle dimensioni degli individui catturati durante la stagione 2007. A parte sono state costruite 20 paia di ghiandole anali in silicone suddivise in due gruppi: 10 paia di ghiandole grandi (diametro maggiore = 0,4 cm) e 10 paia di ghiandole piccole (diametro maggiore = 0,1 cm). Le misure scelte rappresentano la misura massima e la misura minima rilevate negli animali raccolti in natura nella stagione 2007. In particolare la prima è stata riscontrata nel 7,7% degli animali campionati, mentre la seconda nel 11,9%. Con la stessa procedura sono state costruite 20 riproduzioni in silicone della cresta cefalica suddivise in due gruppi: 10 creste grandi (altezza = 0,9 cm) e 10 creste piccole (altezza = 0,1 cm). Anche in questo caso le misure scelte rappresentano la misura massima (riscontrata nel 9,2% della popolazione) e la misura minima (riscontrata nel 7,7% della popolazione) rilevate negli animali raccolti in natura nella stagione 2007.



**Fig. 2.3** – Foto di sagoma di maschio e particolari di ghiandole grandi (a) e di ghiandole piccole (b); barra di scala = 5mm.

Tratto da: Pizzolon *et al.*, 2010.

Per entrambi i set sperimentali (ghiandole e cresta) sono state utilizzate femmine con evidente addome rigonfio per la presenza delle uova, indice della prossimità alla deposizione. Ogni femmina è stata anestetizzata (MS222, Sandoz), misurata (lunghezza e peso, con le stesse metodiche descritte in precedenza) e stabulata in una vasca sperimentale. La vasca sperimentale era costituita da un acquario da 80 litri (60 x 35 x 34 cm) dotato di un setto stagno in plexiglas trasparente che lo divideva longitudinalmente in due compartimenti uguali (60 x 17,5 x 34 cm) (Fig. 2.4). Un compartimento (A) era dedicato ad ospitare la femmina ed era dotato di un nido artificiale costituito da tubo in PVC (15 cm di lunghezza, 3 cm di diametro) posizionato al centro, mentre nel secondo comparto (B) venivano posizionati durante l'esperienza i modellini dei maschi. La vasca era allestita con fondo sabbioso, areazione continua e ricambio giornaliero di acqua. La stabulazione è avvenuta alla temperatura di  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperiodo naturale.



**Fig 2.4** – Schema della vasca sperimentale: A – compartimento dove veniva alloggiata la femmina; B – compartimento dove venivano alloggiate le due sagome; C – area di scelta.

Le femmine venivano lasciate nella vasca sperimentale due giorni perché si acclimatassero alla condizione di cattività e avessero modo di esplorare la vasca. Trenta minuti prima della prova la partizione in plexiglas tra i due compartimenti veniva oscurata mediante l'introduzione di un secondo setto opaco, per permettere l'allestimento del compartimento B senza distrarre o spaventare la femmina. Due sagome appartenenti alla stessa categoria di dimensioni venivano scelte casualmente e abbinata rispettivamente ad un CSS (un paio di ghiandole nel set sperimentale 1 e cresta nel set 2) di grandi dimensioni e ad uno di piccole dimensioni. La dimensione dei modellini da utilizzare per ogni esperimento è stata scelta in base alle dimensioni della femmina testata. Da osservazioni sul campo ed esperimenti preliminari era emerso infatti che le femmine preferiscono maschi di dimensione maggiori, ma che spesso sono spaventate da maschi eccessivamente grandi rispetto a loro, in quanto questi tendono a mostrare comportamenti aggressivi verso

femmine troppo piccole (Pizzolon, osservazioni personali). Sulla base di queste osservazioni si è quindi scelto di usare le classe dimensionale di sagome più piccola che avesse comunque lunghezza superiore a quella della femmina.

I due modellini quindi venivano introdotti nella vasca sperimentale e posizionati ai due angoli estremi del compartimento B, insieme a due nidi artificiali (tubi in PVC, 15 cm di lunghezza, 3 cm di diametro). In particolare nelle prove del set sperimentale 1, la sagoma veniva collocata nelle immediate vicinanze del nido, ma esternamente ad esso, in modo che la femmina potesse valutare le dimensioni delle ghiandole. Durante le prove del set sperimentale 2 invece la sagome veniva inserita parzialmente nel nido, in modo che solo la testa, e in particolare la cresta fossero visibili per la femmina, come normalmente avviene per con i maschi veri in natura (Oliveira *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2002). Sia l'abbinamento sagoma-CSS (ghiandole o cresta), sia quello sagoma-nido, sia la scelta del lato rispetto alla femmina in cui venivano rispettivamente disposte le sagome, avvenivano in maniera casuale. Durante i test di preferenza femminile per le dimensioni delle ghiandole veniva montata per entrambe le sagome una cresta di grandi dimensioni.

La prova di scelta aveva inizio con il sollevamento della partizione opaca tra la femmina e le sagome (compartimento A e B) e aveva una durata di 30 minuti, suddivisa in intervalli continui di 5 minuti. La preferenza femminile è stata valutata sulla base del tempo trascorso dalla femmina davanti a ciascuna sagoma, considerando area di scelta (C) la zona di 17 x 5 cm di fronte ad ogni sagoma. Il tempo trascorso dalla femmina nella zona tra le due aree di scelta o nella parte posteriore della vasca è stato considerato come tempo di non scelta. Non sono state considerate prove valide al fine delle successive analisi, gli esperimenti in cui la femmina non si spostava dalla posizione di partenza o non eseguiva i tipici display di corteggiamento di questa specie (rapidi movimenti verticali di fronte al maschio, esibizione della pancia e inarcamento del corpo seguito da un rapido colpo di coda (Patzner *et al.*, 1986; Almada *et al.*, 1995; Pizzolon, osservazioni personali)) nei primi 15 minuti. Non sono inoltre state considerate valide quelle prova in cui la femmina trascorrevano meno del 10% (3 minuti) del tempo totale di osservazione nelle zone di scelta.

Nel set sperimentale relativo alle ghiandole anali, in media le femmine hanno trascorso il  $47,4 \pm 19,8$  % (media  $\pm$  deviazione standard) del tempo totale di osservazione nella zona di scelta, e solo 2 femmine su 14 testate non hanno mostrato interesse per le sagome e sono state pertanto escluse dall'analisi dei risultati. Nel set sperimentale relativo alla cresta cefalica, delle 22 femmine testate 20 femmine hanno mostrato interesse per le sagome esibendo display di corteggiamento e trascorrendo in media il  $39,9 \pm 22,2$ % del tempo totale di osservazione nelle zone di scelta. Solo due femmine non hanno reagito agli esperimenti e non sono state considerate nella successiva analisi dei dati.

## ***Analisi statistiche***

### *Distribuzione e abbondanza di *S. pavo* in natura*

Tutti i dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard. I test parametrici o non parametrici sono stati applicati sulla base della distribuzione dei dati e i vincoli dei test. La normalità della distribuzione dei dati è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk e, se non distribuiti normalmente, i dati sono stati trasformati su base logaritmica (Sokal & Rohlf, 1997). Le differenze tra i diversi siti sono state valutate attraverso un test t per dati indipendenti per gruppi, se distribuiti normalmente, altrimenti attraverso un test U di Mann-Whitney.

### *Misure dei maschi e dei loro nidi*

Tutti i dati sono presentati come il valore minimo e il valore massimo; tra parentesi vengono indicate media  $\pm$  deviazione standard. I test parametrici o non parametrici sono stati applicati sulla base della distribuzione dei dati e i vincoli dei test. La normalità della distribuzione dei dati è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk e, se non distribuiti normalmente, i dati sono stati trasformati su base logaritmica (Sokal & Rohlf, 1997).

Il data set comprendente i dati di tutti i maschi catturati è stato analizzato con un'analisi della varianza ANOVA a due fattori (anno, sito di cattura) utilizzando il numero di uova all'interno dei nidi, la dimensione del nido e la lunghezza dei maschi come variabili dipendenti (Undewood, 1997). Poiché i dati relativi agli animali catturati nella stagione riproduttiva 2007 sono risultati diversi, questi sono stati esclusi nelle restanti analisi.

La relazione tra il successo riproduttivo (numero di uova; variabile dipendente) e le dimensioni del nido dei maschi (predittori continui) nei due siti (Sottomarina e Casone) per i due anni (2008-2009) (predittori categoriali) è stata testata con un'analisi multi fattoriale della covarianza ANCOVA (Undewood, 1997).

Le correlazioni tra diversi caratteri maschili e del nido sono state valutate attraverso un'analisi delle correlazioni di Pearson. Per discriminare le variabili predittive importanti per il successo riproduttivo dei maschi (numero di uova nel nido) e per le dimensioni del nido, è stata usata una regressione multipla a migliori sottoinsiemi utilizzando l'indice Cp di Mallows come criterio per scegliere il miglior sottoinsieme di effetti predittivi

### *Esperimenti di scelta femminile*

Tutti i dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard. La preferenza femminile è stata calcolata come proporzione fra il tempo trascorso di fronte ad ciascuna specifica sagoma e il tempo totale di scelta. Il rapporto (trasformato in arcoseno della radice quadrata) è stato testato in un test t a campione singolo contro l'aspettativa di non scelta della femmina (proporzione uguale a 0,5).

Tutti i test statistici sono stati eseguiti con il software STATISTICA 7.1 (StatSoft).



## RISULTATI

### ***Distribuzione e abbondanza di *S. pavo* in natura***

I dati raccolti sul campo durante la stagione riproduttiva 2008 con le tecniche dei transetti orizzontali e dei quadrati hanno mostrato una maggiore densità di maschi nidificanti nel sito del Casone ( $2,78 \pm 3,15$  nidi/m<sup>2</sup>) rispetto al sito di Sottomarina ( $0,74 \pm 1,51$  nidi/m<sup>2</sup>) ( $t_{18}=3,06$ ,  $p<0,01$ ). Inoltre il sito del Casone è risultato essere caratterizzato da un maggiore disponibilità di nidi non occupati (potenziali) ( $11,11 \pm 6,69$  nidi disponibili/m<sup>2</sup>) rispetto a Sottomarina ( $1,00 \pm 1,93$  nidi disponibili/m<sup>2</sup>) ( $t_{18}=7,85$ ,  $p<0,01$ ). Il numero dei nidi occupati rispetto alla totalità dei nidi disponibili (considerata come la somma dei nidi occupati e quelli potenziali) è risultata comunque bassa in entrambi i siti. Infatti nel sito del Casone i maschi utilizzano solo il 19,88% dei nidi disponibili e il 42,52% nel sito di Sottomarina. Nel sito di Sottomarina è stata registrata inoltre la presenza di maschi al di fuori del nido ( $0,13 \pm 0,14$  maschi fuori dal nido/m<sup>2</sup>) che invece non è stata rilevata nelle osservazioni compiute nel Casone. Il numero di femmine registrate con la tecnica dei transetti orizzontali non è risultato significativamente diverso tra i due siti (Casone:  $0,06 \pm 0,12$  femmine/m<sup>2</sup>; Sottomarina:  $0,17 \pm 0,20$  femmine/m<sup>2</sup>; test U Mann-Whitney:  $U=28,5$ ;  $p>0,05$ ;  $n_{\text{Sottomarina}}=10$ ;  $n_{\text{Casone}}=10$ ).

### ***Raccolta di maschi e dei loro nidi***

I dati ottenuti dai 212 maschi catturati e dai relativi nidi sono stati riuniti in un unico *data set*.

L'analisi fattoriale ANOVA su questi dati (considerando le variabili: numero di uova, area del nido e lunghezza del maschio) ha mostrato differenze in base all'anno ( $F=6,02$ ;  $p<0,01$ ), al sito di cattura ( $F=19,60$ ;  $p<0,01$ ) e all'interazione anno e sito ( $F=3,98$ ;  $p<0,01$ ). Il test post hoc (HSD diseguali) ha mostrato differenti interazioni tra i dati relativi all'anno 2007, e per questa ragione le informazioni sugli animali catturati nel 2007 sono state escluse dalle successive analisi. L'analisi della covarianza ANCOVA non ha mostrato differenze nelle interazioni tra il numero di uova, le dimensioni del nido e dei maschi tra i due siti (Casone e Sottomarina) e tra gli anni (2008 e 2009) (Tab. 2.1), e per questa ragione per le successive analisi è stato usato un set di dati costruito con le informazioni, raccolte negli anni 2008 e 2009 in entrambi i siti, relative a 160 maschi e ai loro nidi.

I 160 maschi catturati variavano in lunghezza totale tra i 6,89 e 13,78 cm (media  $\pm$  deviazione standard:  $10,03 \pm 1,41$  cm) e in peso tra i 2,82 e 23,90 gr ( $9,52 \pm 4,16$  gr). Le dimensioni della cresta, misurata come area totale, variavano tra i 0,10 e 1,26 cm<sup>2</sup> ( $0,57 \pm 0,24$  cm<sup>2</sup>) e l'area delle ghiandole tra 0,02 e 0,29 cm<sup>2</sup> ( $0,09 \pm 0,04$  cm<sup>2</sup>). I nidi sono risultati avere superficie interna tra i 20,28 e 256,40 cm<sup>2</sup> ( $83,06 \pm 35,43$  cm<sup>2</sup>), e contenere tra le 1.521 e le 16.510 uova ( $5892 \pm 2505$  uova), che ricoprivano tra il 27,74% e il 98,86% ( $73,35 \pm 13,59\%$ ) della superficie interna del nido. Le dimensioni della macchia gialla della cresta cefalica, raccolte per un sottocampione di 88 maschi, variavano tra i 0,04 cm<sup>2</sup> e i 0,82

cm<sup>2</sup> (0,31±0,17 cm<sup>2</sup>), mentre la percentuale della sua estensione rispetto alla superficie totale della cresta variava tra lo 11,60% e il 100,00% (57,94±19,74%).

I maschi di maggiori dimensioni sono risultati avere caratteri sessuali più sviluppati, sia per quanto riguarda le dimensioni delle ghiandole (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,53$ ,  $p<0,01$ ;  $n=160$ ) (Fig. 2.5 a), che per le dimensioni della cresta cefalica, in termini sia di area totale (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,56$ ,  $p<0,01$ ;  $n=160$ ) (Fig. 2.5 b), che di lunghezza ( $r=0,71$ ,  $p<0,01$ ;  $n=160$ ) e di altezza ( $r=0,45$ ,  $p<0,01$ ;  $n=160$ ). I maschi più grandi inoltre risultati difendono nidi con superficie interna maggiore (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,65$ ,  $p<0,01$ ;  $n=160$ ) (Fig. 2.5 c) e le dimensioni del nido correlano positivamente con il numero di uova (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,60$ ;  $p<0,01$ ;  $n=160$ ) (Fig. 2.5 d).

Le dimensioni della macchia gialla della cresta sono correlate positivamente sia alle dimensioni del maschio (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,38$ ;  $p<0,01$ ;  $n=88$ ) che alle dimensioni totali della cresta cefalica, misurata come area (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,85$ ;  $p<0,01$ ;  $n=88$ ) (Fig. 2.5 e). Non vi sono invece relazioni significative tra la frazione dell'area della cresta colorata di giallo (calcolata come area gialla/area totale) e le dimensioni del maschio (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=-0,06$ ;  $p>0,05$ ;  $n=88$ ) o l'area totale della cresta ( $r=0,10$ ;  $p>0,05$ ;  $n=88$ ) (Fig. 2.5 f).

L'analisi del *data set* applicando una regressione multipla al miglior sottoinsieme tra il numero di uova (variabile dipendente) e l'area del nido, la lunghezza del maschio, l'area della cresta e le dimensioni delle ghiandole anali (predittori), ha evidenziato che il numero di uova è positivamente correlato con le dimensioni del nido e delle ghiandole anali ( $NU=5239,9*AN+7853,1*AG-17682,5$ ;  $r_{\text{multiplo}}=0,84$ ;  $p<0,01$ ; AN:  $F=226,4$ ,  $p<0,01$ ; AG:  $F8,1$ ,  $p<0,01$ ;  $n=160$ ). La regressione multipla al miglior sottoinsiemi tra l'area del nido (variabili dipendente) e la lunghezza totale del maschio, l'area della cresta e le dimensioni delle ghiandole (predittori), ha evidenziato come le dimensioni del nido siano correlate positivamente alle dimensioni del maschio e all'area della cresta ( $AN=0,1320*LT+0,2619*AC+0,9076*AG+2,8169$ ;  $r_{\text{multiplo}}=0,67$ ;  $p<0,01$ ; LT:  $F=3,2$ ,  $p<0,01$ ; AC:  $F=0,4$ ,  $p<0,05$ ;  $n=160$ ).

### ***Esperimenti di scelta femminile***

#### ***Esperimenti di preferenza sulla dimensioni della cresta***

Tutte le femmine (20) che hanno reagito alla presenza della sagome hanno mostrato preferenza per la sagoma con cresta di grandi dimensioni, spendendo di fronte ad essa un tempo superiore rispetto al tempo trascorso davanti alla sagoma con la cresta piccola (Test t:  $t_{1-19}=9,50$ ;  $p<0,01$ ) trascorrendo l'81,6±11,3% del tempo totale di scelta di fronte alla sagoma con cresta grande (Fig. 2.5 g).

#### ***Esperimenti di preferenza sulla dimensioni delle ghiandole anali***

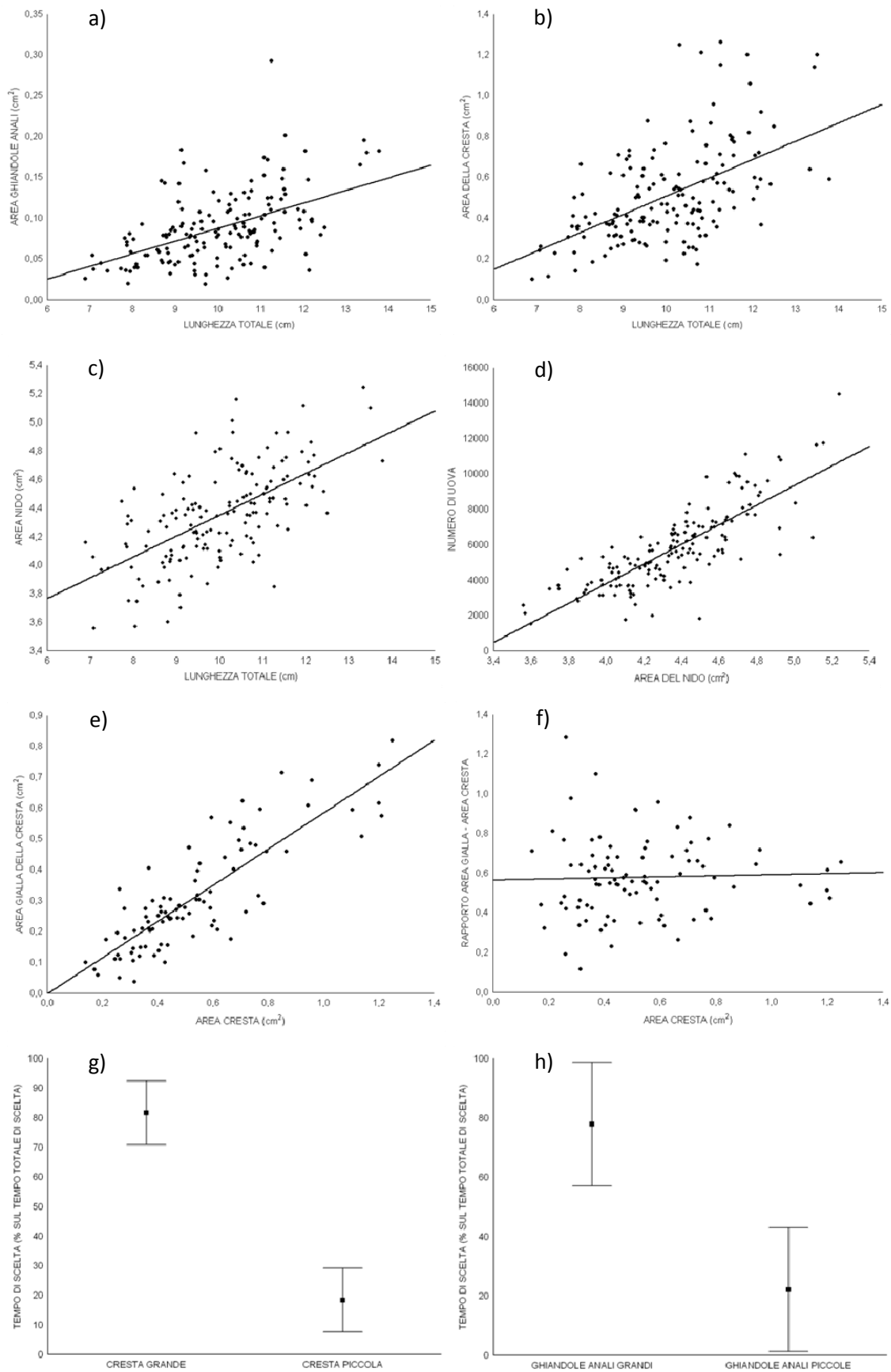
Undici femmine sulle 12 femmine che hanno reagito alla presenza della sagome hanno mostrato preferenza per la sagoma con le ghiandole di grandi dimensioni, spendendo di fronte ad essa un tempo superiore rispetto al tempo trascorso davanti alla sagoma con le



ghiandole piccole (Test t:  $t_{1-11}=4,11$ ;  $p<0,01$ ) trascorrendo l'77,9±21,9% del tempo totale di scelta di fronte alla sagoma con ghiandole grandi (Fig. 2.5 h). Solo una femmina ha trascorso la maggior parte del tempo totale di scelta di fronte alla sagoma con le ghiandole di piccole dimensioni.

	SS	Gl	MS	F	p
Sito	454	1	454	<0,01	0,99
Anno	13889	1	13889	<0,01	0,93
AN	265499	1	265499	0,16	0,69
LT	3467290	1	3467290	2,14	0,15
Sito x Anno	1643370	1	1643370	1,01	0,32
Sito x AN	17282	1	17282	0,01	0,92
Anno x AN	5644	1	5644	<0,01	0,95
Sito x LT	25662	1	25662	0,02	0,90
Anno x LT	5774	1	5774	<0,01	0,95
AN x LT	3657001	1	3657001	2,25	0,14
Sito x Anno x AN	1748502	1	1748502	1,08	0,30
Sito x Anno x LT	971540	1	971540	0,60	0,44
Sito x AN x LT	2134	1	2134	<0,01	0,97
Anno x AN x LT	2497	1	2497	<0,01	0,97
Sito x Anno x AN x LT	1066317	1	1066317	0,66	0,42
Errore	232233427	143	1624010		

**Tab. 2.1** - Risultati dall'analisi ANCOVA sulla relazione fra successo riproduttivo (NU) e la lunghezza totale (LT) dei maschi e le dimensioni del nido (AN) per i due siti (Casone, Sottomarina) e i due anni (2008, 2009).



**Fig. 2.5** – Relazione fra lunghezza totale dei maschi e area delle ghiandole anali (a), area della cresta (b) e area del nido (c). Relazione fra area del nido e numero di uova (d). Relazione tra area della cresta e area gialla della cresta (e) e frazione della cresta colorata di giallo (f). Percentuale del tempo (media  $\pm$  deviazione standard) trascorso dalle femmine davanti alle due tipologie di sagome rispetto al tempo totale di scelta per l'esperimento sulle dimensioni della cresta (g) e sulle dimensioni delle ghiandole (h).

## DISCUSSIONE

I dati raccolti in natura in questa prima parte del lavoro indicano come sia la cresta cefalica che le ghiandole anali siano caratteri che influenzano il successo di accoppiamento dei maschi di *S. pavo*. Infatti i dati raccolti in natura hanno messo in luce come il successo di accoppiamento, valutato sulla base del numero di uova presenti all'interno del nido, sia legato alle dimensioni del nido e a quelle delle ghiandole anali. A loro volta, le dimensioni del nido difeso sono correlate alle dimensioni corporee del maschio e allo sviluppo della sua cresta cefalica, con maschi più grandi e con creste più sviluppate che difendono nidi di maggiori dimensioni. Gli esperimenti di preferenza femminile hanno poi mostrato come sia la cresta cefalica che le ghiandole anali siano sottoposti a selezione intersessuale.

I siti di studio utilizzati in questa ricerca sono risultati caratterizzati da diverse densità sia di individui che di nidi; in particolare il sito del Casone è risultato essere molto più densamente popolato rispetto al sito di Sottomarina. Tuttavia non sono emerse significative differenze tra gli individui di *S. pavo* dei due siti nelle relazioni tra il successo di accoppiamento, le dimensioni dei nidi e le caratteristiche morfologiche dei maschi. Pertanto, sebbene in altre popolazioni di questa specie sia stata descritta una certa diversità sia a livello comportamentale che morfologico e fisiologico, tra gli individui che abitano ambienti con caratteristiche diverse (Saraiva *et al.*, 2009 a, b), i nostri dati non hanno dimostrato questa eterogeneità tra i due gruppi. Alla luce quindi dei nostri risultati, si è ritenuta opportuna la scelta di includere tutti gli individui catturati nel biennio 2008-2009 in un unico gruppo per le analisi successive.

I dati raccolti indicano l'area del nido e le dimensioni delle ghiandole anali come i fattori correlati al successo di accoppiamento dei maschi di *S. pavo*, valutato come numero di uova presenti all'interno del nido. La correlazione tra le dimensioni del nido e il numero di uova difese dal maschio, anche alla luce dell'alta percentuale di superficie del nido ricoperta dalle uova, che in alcuni casi risulta quasi totale (98,89% di superficie interna del nido ricoperta da uova), indica che l'area del nido in alcuni casi può rappresentare una limitazione al successo riproduttivo dei maschi e limitare quindi il potere di scelta delle femmine. In una popolazione portoghese di *S. pavo* è stata descritta una situazione simile, in cui è stata ipotizzata una inversione dei ruoli sessuali, causata da una disponibilità limitata di nidi che porta all'impossibilità per tutti i maschi di riprodursi e di fatto ad una *sex ratio* operativa spostata a favore delle femmine (Almada *et al.*, 1994; 1995). La minor percentuale di copertura media registrata nei nostri campioni (73,35%) rispetto alla popolazione portoghese (89,1%; Almada *et al.*, 1995), e l'alto numero di nidi potenziali non occupati misurato in entrambi i siti da noi esaminati, rispetto alla mancanza di nidi liberi misurati da Almada *et al.* (1995), fanno escludere che anche nella popolazione da noi studiata possa verificarsi una inversione dei ruoli sessuali. Nella stessa popolazione portoghese, la scarsa disponibilità di nidi sembra essere alla base anche del manifestarsi di tattiche riproduttive alternative, con maschi *sneaker*, che non riuscendo a difendere un proprio nido parassitano gli accoppiamenti degli altri maschi (Almada *et al.*, 1994; 1995). Nel nostro studio invece non

è mai stata osservata la presenza di tattiche riproduttive alternative, anche se alcuni maschi che nuotavano liberamente sono stati osservati nei transetti condotti, unicamente per il sito di Sottomarina. Questo dato non indica comunque che questi individui non possedessero nidi, ma può essere dovuto a movimenti alla ricerca di cibo o per corteggiare altre femmine. Non essendo stati compiuti studi *ad hoc*, la presenza di *sneakers* anche nella popolazione da noi osservata non può comunque essere esclusa.

La ghiandole anali sono risultate essere l'unico tratto morfologico maschile correlato al successo maschile in termini di numero di uova presenti all'interno del nido. Il maggior successo dei maschi che esibiscono ghiandole di maggiori dimensioni potrebbe dipendere da una maggiore produzione in questi organi di feromoni che attraggono le femmine (Laumen *et al.*, 1974; Zeek & Ide, 1995; Barata *et al.*, 2008). Tuttavia, gli esperimenti di scelta femminile hanno dimostrato l'esistenza di una preferenza della femmina basata proprio sulle dimensioni delle ghiandole, preferenza espressa in seguito a valutazione esclusivamente visiva. Questi risultati suggeriscono quindi che, oltre ad un potere attrattivo di natura chimica, le ghiandole di dimensioni maggiori vengono preferite sulla base di altre informazioni che comunicano alle femmine. Le femmine potrebbero favorire i maschi che hanno ghiandole più sviluppate dato che, se queste sono in grado di produrre maggiori quantità di antimicrobici che contrastano l'insorgere di infezioni batteriche, aumenterebbero la probabilità di sopravvivenza delle proprie uova (Zander, 1975; Giacomello *et al.*, 2006; presente lavoro: Capitolo II). Alternativamente, i maschi con il maggior numero di uova da curare potrebbero dover aumentare il loro investimento sulle ghiandole per produrre più antimicrobici, e la scelta femminile sulla base delle loro dimensioni potrebbe essere finalizzata ad accoppiarsi con un maschio che sta difendendo un maggior numero di uova. La preferenza femminile per maschi che hanno ovature di maggior dimensioni è ampiamente conosciuta nei teleostei (Marconato & Bisazza, 1986; Petersen, 1989; Kraak & Videler, 1991; Petersen, 1995, Forsgren *et al.*, 1996; Goulet, 1997) ed è già stata descritta anche in *S. pavo* (Fagundes *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009).

Le dimensioni del nido sono correlate alla dimensioni del maschio e alle dimensioni della cresta cefalica, indicando un possibile ruolo di questi due caratteri nei processi di competizione intrasessuale, che in questa specie avvengono soprattutto nella competizione che si instaura tra i maschi per il possesso e la difesa del nido (Almada *et al.*, 1994; 1995), e che risulta più accentuata laddove i nidi rappresentano una risorsa limitata (Saraiva *et al.*, 2009 a, b). Il fatto che i siti in cui è stato condotto questo studio siano caratterizzati da un alto numero di nidi potenzialmente utilizzabili dai maschi di *S. pavo*, suggerisce che la competizione tra maschi per il possesso del nido non sia elevata come in altri casi riportati in letteratura. Le dimensioni del nido sono comunque risultate molto importanti per il successo di accoppiamento dei maschi, potendo infatti in alcuni casi limitare il numero di uova che gli individui possono ottenere dalle femmine. La competizione tra i maschi, in questo caso, potrebbe avvenire non tanto per l'acquisizione di un nido, ma per il possesso di quelli di maggiori dimensioni. Maschi di dimensioni maggiori sembrano favoriti nella competizione intrasessuale, come già largamente dimostrato in molti teleostei (Foote, 1990; Candolin & Voigt, 2001; Andersson *et al.*, 2002), e in parte anche in *S. pavo*, in cui in condizioni di scarsità

di substrati idonei alla nidificazione solo i maschi più grandi riescono ad acquisirli (Almada *et al.*, 1994). I risultati di questo studio suggeriscono che anche la cresta cefalica può influire sui processi di competizione fra maschi, favorendo gli individui con creste di maggiori dimensioni. Questo tratto potrebbe funzionare come *badge of status*, segnalando la posizione dominante o la forza nella difesa del nido agli altri maschi, come già ipotizzato da alcuni autori (Saraiva *et al.*, 2009 a). La correlazione tra dimensioni della cresta e del nido potrebbe essere anche dovuta al ruolo svolto dall'11 cheto-testosterone che in questa specie è stato dimostrato promuovere contemporaneamente sia lo sviluppo dei CSS che i comportamenti aggressivi verso gli altri maschi (Saraiva *et al.*, 2009 b). Gli individui che hanno alti livelli ormonali risulterebbero quindi favoriti nella competizione solamente perché più aggressivi, e il maggiore sviluppo della cresta, conseguente a questi alti livelli ormonali, potrebbe non svolgere un ruolo attivo nella competizione tra maschi. Tuttavia, al di là del suo possibile ruolo nella competizione intrasessuale la cresta cefalica è risultata essere anche sottoposta a selezione intersessuale. Infatti tutte le femmine utilizzate nei test di preferenza femminile hanno trascorso più tempo di fronte al modellino avente cresta di maggiori dimensioni. Se nel caso delle ghiandole anali il loro possibile coinvolgimento nelle cure parentali apre il campo alla verifica del loro effetto e dei possibili benefici a questo legati, nel caso della cresta cefalica sono diverse le possibili spiegazioni riguardo i vantaggi connessi alla scelta femminile basata sulla sua espressione. Innanzitutto bisogna sottolineare che, considerata la relazione esistente tra dimensioni corporee, le dimensioni della cresta e dimensioni dei nidi, la valutazione della cresta cefalica potrebbe fornire alle femmine informazioni su altri tratti dell'eventuale partner anche se questo rimane dentro il nido, mostrando esclusivamente la testa. A questo si aggiunga che la colorazione gialla della cresta potrebbe a sua volta essere un indicatore dello stato di salute del maschio o della sua fecondità come mostrato in altre specie in cui i maschi esibiscono colorazioni di questo tipo (Lozano, 1994; Von Schantz *et al.*, 1999; Dowling & Simmons, 2009). La diversità tra il ruolo della cresta cefalica nel successo di accoppiamento maschile nella popolazione qui studiata rispetto a quella portoghese potrebbe risiedere nel sistema di accoppiamento osservato in quest'ultima. Infatti, la scarsità dei nidi disponibili porta ad una situazione di inversione dei ruoli sessuali con le femmine che corteggiano i maschi per poter deporre le uova nei loro nidi (Almada *et al.*, 1994; 1995). Secondo gli stessi Autori, il contrasto tra la mancata relazione tra successo di accoppiamento maschile e dimensioni della cresta osservata in natura (Oliveira *et al.*, 1999) e la preferenza femminile, sperimentalmente mostrata, verso gli individui che esibivano creste più sviluppate potrebbe essere dovuto al fatto che il fattore più importante per le femmine diventa trovare un nido in cui deporre le uova e le loro preferenze per un carattere quale la cresta potrebbe passare in secondo piano (Gonçalves *et al.* 2002).

Considerato quindi il ruolo che le ghiandole anali e la cresta cefalica hanno nel successo di accoppiamento dei maschi e le preferenze mostrate dalle femmine nei riguardi del loro sviluppo, le parti successive di questo lavoro, riportate nei capitoli II e III sono state dedicate alla verifica delle possibili informazioni veicolate da questi due caratteri.



## **CAPITOLO II**

### ***Relazioni fra lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e qualità maschili***





## PREMESSA

In molte specie i maschi sviluppano contemporaneamente diversi ornamenti allo scopo di attrarre le femmine per l'accoppiamento (Møller & Pomiankowski, 1993; Candolin, 2003). Le ragioni di questa simultanea presenza sono spesso ancora poco studiate e rimangono comunque di difficile approccio sperimentale. I diversi caratteri sessuali secondari potrebbero non fornire alcuna informazione sulla/e qualità del maschio, se non che sulla sua avvenenza, e essersi evoluti attraverso meccanismi fisheriani di *run-away selection*, o, al contrario, essere correlati alla qualità del maschio e, di conseguenza, segnalare alla femmina i possibili benefici, diretti e/o indiretti, derivanti dall'accoppiamento (Candolin, 2003). Sebbene la contemporanea presenza di più caratteri non informativi sia stata dimostrata in alcune specie di uccelli (Zuk *et al.*, 1990; Ligon & Zwartjes, 1995; Omland, 1996 a, b), un crescente numero di lavori suggerisce che nella maggior parte dei casi i caratteri multipli trasmettano informazioni sul loro possessore (Candolin, 2003). A questo si aggiunga che, data la difficoltà di identificare il legame tra carattere e informazione trasmessa, in molti casi, vengono considerati non informativi anche caratteri di cui non si conosce se in realtà trasmettano o meno una qualche informazione e quale questa possa essere (Candolin, 2003). Tuttavia, l'evoluzione dei caratteri sessuali secondari attraverso processi fisheriani di *run-away selection* rimane una spiegazione possibile del legame tra lo sviluppo dei tratti maschili e la scelta femminile, e in molti casi non può essere esclusa (Iwasa & Pomiankowski, 1994).

Se i caratteri sono informativi della qualità del maschio, questi potrebbero segnalare contemporaneamente la stessa qualità (ipotesi dei segnali ridondanti), oppure i diversi tratti potrebbero dare informazioni relative a differenti qualità del maschio (ipotesi dei segnali multipli) (Møller & Pomiankowski, 1993; Candolin, 2003). La distinzione fra l'ipotesi dei messaggi multipli e quella dei segnali ridondanti può essere spesso difficile da valutare, soprattutto se oltre ai CSS vengono considerati anche altri tratti maschili legati al suo possibile successo riproduttivo, quali ad esempio la qualità del territorio difeso o il tipo di nido. Infatti tratti che segnalano qualità differenti possono essere a loro volta correlati fra loro e funzionare quindi da segnali ridondanti della qualità generale del maschio (Candolin, 2003). La correlazione fra due tratti infatti non dimostra univocamente che questi non indichino qualità diverse e seguano l'ipotesi dei segnali ridondanti (Candolin, 2003). Ad esempio in due specie di antilope, *Kobus vardonii* e *Damaliscus lunatus*, sia i CSS che il territorio difeso dai maschi sono correlati tra loro e riflettono la qualità generale dell'individuo (segnali ridondanti), ma allo stesso tempo i CSS segnalano qualità fenotipiche e probabilmente genetiche, mentre il territorio è legato a benefici diretti per la femmina, quali il minor rischio di predazione e miglior cibo a disposizione (messaggi multipli) (Balmford *et al.*, 1992).

Un numero consistente di lavori ha dimostrato come i segnali multipli siano legati all'acquisizione di benefici diretti per la femmina, come ad esempio l'abilità del maschio nelle cure parentali e le qualità territoriali (Candolin & Reynolds, 2001; Freeman-Gallant *et*

*al.*, 2009), mentre pochi lavori hanno invece valutato la presenza della scelta femminile multipla basata su benefici indiretti, anche a causa della difficoltà di dimostrare la relazione tra espressione dei caratteri sessuali secondari e la qualità del maschio, sia per quanto riguarda la condizione/stato di salute ma soprattutto sotto il profilo genetico (Candolin, 2003).

*S. pavo* è una specie in cui i maschi presentano tratti multipli. Infatti oltre alle dimensioni corporee e alla dimensione del nido, anche lo sviluppo della cresta cefalica e le ghiandole anali influenzano il successo di accoppiamento dei maschi e, queste ultime, sono sottoposte a preferenza femminile (Capitolo I). Questa parte dello studio è stata quindi focalizzata alla valutazione delle possibili relazioni tra l'espressione dei caratteri maschili e la qualità dell'individuo ed è stata svolta con due differenti approcci.

In una prima parte si è cercato di analizzare la relazione tra l'espressione dei caratteri e lo stato di condizione dell'individuo. Per questo alcuni maschi di *S. pavo* sono stati sottoposti ad una sfida immunitaria. Di ciascun maschio, oltre ai tratti pre-copulatori, quali ghiandole anali, cresta cefalica e comportamento di corteggiamento, è stata valutata l'espressione, prima e dopo il trattamento sperimentale, anche di alcuni tratti post-copulatori (numero e qualità degli spermatozoi).

Nella seconda parte, considerato che una delle funzioni ipotizzate per le ghiandole anali è la protezione delle uova da infezioni per mezzo delle sostanze antimicrobiche da loro prodotte (Giacomello *et al.*, 2006), si è cercato di verificare questa ipotesi. Per questo, con un approccio multidisciplinare si sono analizzati a) i rapporti tra sviluppo delle ghiandole e componente proteica della loro secrezione, b) l'efficacia della secrezione nell'inibire la crescita di alcuni ceppi batteri patogeni per gli organismi marini, c) l'effetto della presenza delle ghiandole nello sviluppo delle uova, confrontando la sopravvivenza di ovature curate da maschi normali con quelle curate da maschi deprivati di questi organi.

## CAPITOLO II A

### *Identificazione dei caratteri indicatori di condizione\**

#### INTRODUZIONE

Molti dei modelli riguardanti la selezione inter-sessuale prevedono che i caratteri sessuali secondari siano segnali onesti della qualità fenotipica e/o genetica dell'individuo (Andersson, 1994). La scelta femminile fondata sulla preferenza di questi caratteri comporterebbe quindi il vantaggio di accoppiarsi con gli individui migliori e la possibilità di trasmettere queste caratteristiche alla prole (Andersson, 1994). In particolare, secondo la teoria dell'handicap la selezione sessuale avrebbe favorito lo sviluppo di CSS particolarmente evidenti e/o costosi da produrre in quanto solo gli individui di migliore qualità sarebbero stati in grado di supportare i costi della loro produzione e del loro mantenimento (Zahavi, 1975; Andersson, 1982; Nur & Hasson; 1984; Grafen, 1990; Iwasa *et al.*, 1991). Questa ipotesi, così come altri modelli che propongono un legame tra espressione dei CSS e qualità genetica del portatore (i cosiddetti modelli dei "buoni geni"; per *review* vedi: Andersson, 1994), richiedono ovviamente che i CSS siano legati ad una qualche qualità maschile, che questa qualità sia geneticamente codificata e che sia variabile nella popolazione. Con questi presupposti rimane tuttavia aperto il dilemma riguardo la rapida perdita in variabilità genetica, e quindi anche nell'espressione dei CSS, in cui dovrebbe incorrere la popolazione in presenza di forte selezione sessuale, come ad esempio nel caso in cui le femmine si accoppiassero solo con maschi che mostrano una determinata espressione di un certo CSS (Fisher, 1930; Pomiankowski & Møller, 1995). Questo problema, spesso definito "paradosso del lek" perché è proprio nelle specie in cui i maschi si riuniscono in arene che la selezione operata dalle femmine è notoriamente molto forte, con situazioni in cui il 10% dei maschi si accoppia con l'80% delle femmine, trova soluzione nell'ipotesi presentata da Hamilton & Zuk nel 1982. Questi Autori, sempre nell'ottica dei "buoni geni", hanno proposto che i CSS indichino la capacità di resistenza a infezioni e parassiti dell'individuo. La ben nota estrema variabilità dei geni coinvolti nella resistenza ai parassiti è mantenuta dalla rapidità di variazione genetica mostrata da patogeni e parassiti e, di conseguenza, se l'espressione dei CSS fosse in qualche modo legata ad essa, la variabilità in questa espressione continuerebbe a mantenersi nonostante la scelta femminile. In uno scenario in cui la capacità di resistere ai parassiti è determinata geneticamente e può quindi essere trasmessa alla discendenza, la scelta femminile, se basata su caratteri indicatori di questa qualità, avrebbe un valore adattativo in termini di benefici indiretti per la prole. Oltre a questo, i vantaggi di accoppiarsi con maschi in miglior stato di salute potrebbero essere anche di tipo diretto, come ad esempio un minor rischio di contrarre parassiti durante l'accoppiamento, oppure, nel caso in cui il maschio curi

\* Questa parte della ricerca è stata svolta in collaborazione con L. Locatello (post-doc, Università degli studi di Padova).

la prole, maschi in migliori condizioni potrebbero assicurare maggiori e/o migliori cure parentali (Andersson, 1994). E' ben noto e largamente condiviso che infezioni e parassitosi giocano un ruolo importante nell'evoluzione degli organismi (Grenfell & Dobson, 1995), tuttavia l'ipotesi di Hamilton & Zuk che queste influenzassero anche lo sviluppo dei CSS ha fatto guardare con un ottica nuova ad un, diciamo pure, annoso problema, aprendo il campo a nuove sperimentazioni. Infatti sono numerosi gli studi e anche le proposte teoriche che, a partire dall'ipotesi di Hamilton & Zuk, sono stati dedicati da un lato a verificare le relazioni tra espressione dei CSS e il tasso di parassitosi o la risposta immunitaria, e dall'altro, a comprendere i possibili meccanismi che legano l'espressione dei CSS allo stato di salute o alle capacità del sistema immunitario.

Il sistema immunitario ha costi elevati sia per il suo mantenimento di base in assenza di infezioni (Kraaijeveld & Godfray, 1997; Klasing, 1998; Webster & Woolhouse, 1999), ma soprattutto in seguito all'attivazione da parte di un patogeno, quando si aggiungono i costi energetici dovuti alla richiesta metabolica delle cellule immunitarie e i costi risultanti dagli effetti della sovra-espressione del sistema immunitario, come ad esempio la degenerazione di alcuni tessuti o l'inappetenza conseguente l'infezione (Lochmiller & Deerenberg, 2000). Il mantenimento e l'attivazione del sistema immunitario comportano quindi l'allocazione da parte degli individui di risorse che potrebbero essere investite in altre attività o altre strutture (Sheldon & Verhulst, 1996; Norris & Evans, 2000). In diverse specie è stata dimostrata la presenza di compromessi tra l'investimento nel sistema immunitario e l'investimento riproduttivo, in termini di sviluppo dei CSS, cure parentali o in qualità dell'ejaculato, con gli individui che allocano maggiori energie nella riproduzione che diventano maggiormente sensibili alle infezioni (Festa-Bianchet, 1989; Gustafsson *et al.*, 1994; Norri *et al.*, 1994; Allander & Bennett, 1995; Richner *et al.*, 1995; Nordling *et al.*, 1998). Ad esempio, l'aumento dello sforzo in cure parentali porta, nel diamante mandarino *Taeniopygia guttata*, a una diminuzione nella produzione di anticorpi in individui trattati sperimentalmente con antigeni di patogeni (Deerenberg *et al.*, 1997; Nordling *et al.*, 1998), e nel salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*) i maschi che investono maggiormente nel difendersi dalle infezioni hanno meno risorse da allocare nella produzione di spermatozoi, sviluppando testicoli più piccoli e rilasciando un minor numero di spermatozoi (Masvaer *et al.*, 2004). L'attivazione del sistema immunitario può anche portare ad una riduzione dell'espressione dei CSS (Blount *et al.*, 2003; Faivre *et al.*, 2003; Simmons & Roberts, 2005). Ad esempio, nel merlo (*Turdus merula*), dove la colorazione gialla del becco è sottoposta a scelta femminile, si osserva una diminuzione dell'intensità di questa colorazione in seguito ad uno stress immunitario (Faivre *et al.*, 2003). Il costo dell'attivazione del sistema immunitario potrebbe quindi rappresentare un importante meccanismo nell'ipotesi di selezione sessuale mediata dai parassiti, il cui modello teorico implica che i caratteri sessuali secondari siano segnali onesti della salute del maschio (Jacot *et al.*, 2004).

La relazione ipotizzata da Hamilton & Zuk tra espressione dei CSS e lo stato di salute dell'individuo è stata quindi effettivamente documentata in diverse specie, anche se la sua intensità e/o variabilità in relazione al tipo di patogeni sembra esser piuttosto ampia (Hamilton & Poulin 1997). A tutt'oggi rimane invece più problematica la comprensione dei

meccanismi fisiologici alla base di questa relazione, cioè di come i costi legati ad un infezione/parassitosi e della conseguente attivazione del sistema immunitario si riflettano nell'espressione CSS. Una delle ipotesi proposte a questo riguardo è la *Immunocompetence Handicap Hypothesis* (ICHH) che lega i CSS, l'espressione di molti dei quali è sotto il controllo degli androgeni, all'effetto immunodepressore che hanno questi ormoni sessuali maschili (Folstad & Karter, 1992; Wedekind & Folstad, 1994). In questo scenario solo gli individui con i migliori geni per l'immunocompetenza potrebbero anche esibire CSS sviluppati dato l'effetto depressore che, ad esempio il testosterone, ha sul sistema immunitario. Ancora questa ipotesi potrebbe spiegare l'assenza o la scarsa relazione tra l'espressione dei CSS e il carico di parassiti osservata in alcune specie (Hamilton & Poulin, 1997) in quanto, sempre a causa dell'effetto immunodepressore degli androgeni, un maschio con buoni geni di immunocompetenza e CSS molto sviluppati potrebbe risultare con un carico di parassiti simile a un individuo con geni di minore qualità e CSS meno sviluppati. Le evidenze sperimentali sulla validità di questa idea rimangono tuttavia ambigue. Infatti, sebbene sia stata documentata in molte specie una relazione tra i livelli di testosterone e lo sviluppo dei CSS e/o il grado di infezione, in molti altri casi non è emersa alcuna correlazione, o sono state trovate relazioni solo per alcune di queste caratteristiche (per *review* vedi: Roberts *et al.*, 2004). Ad esempio, nel merlo dalle ali rosse (*Agelaius phoeniceus*), sebbene vi sia una correlazione tra i livelli di testosterone, lo sviluppo di uno degli ornamenti e il numero di parassiti intestinali, nessuna correlazione è emersa tra i livelli ormonali e la presenza di altri parassiti e la colorazione del piumaggio (Weatherhead *et al.*, 1993). Ancora, nel cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) i maschi che hanno corna di dimensioni maggiori hanno anche livelli di testosterone più alti e un minor tasso di infezione da nematodi, ma non vi è nessuna correlazione tra i livelli ormonali e il numero dei parassiti (Ditchkoff *et al.* 2001).

Sempre riguardo i meccanismi che potrebbero legare i CSS e il sistema immunitario, una particolare attenzione sperimentale è stata rivolta ai carotenoidi, dato il loro coinvolgimento sia nell'espressione di diversi CSS, quali ad esempio le colorazioni sgargianti di molti uccelli e dei Teleostei, sia nella risposta a stress o infezioni. I carotenoidi infatti, oltre ad essere responsabili delle colorazioni giallo/rosse in quasi tutte le specie animali (Andersson, 1994), svolgono un importante ruolo nella protezione dell'organismo da stress di tipo ossidativo, favorendo l'eliminazione dei radicali liberi (specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto) e stimolando l'attivazione del sistema immunitario in presenza di antigeni (Lozano, 1994; Von Schantz *et al.*, 1999). I CSS che utilizzano carotenoidi sono generalmente considerati dei segnali onesti in quanto queste sostanze: I) sono una risorsa limitata per l'individuo, potendo essere acquisiti solo attraverso la dieta; II) sono difficili da assorbire e metabolizzare; III) il loro investimento nella colorazione ne limita la disponibilità per altri utilizzi (Olson & Owens, 1998; Møller *et al.*, 2000; Dowling & Simmons, 2009). Dato il loro coinvolgimento in diverse funzioni chiave per l'individuo e la loro limitata disponibilità, è ragionevole assumere che l'allocazione di queste sostanze possa portare a compromessi nel loro utilizzo. Per esempio, a seguito della risposta immunitaria attivata da un patogeno, gli individui possono favorire l'impiego dei carotenoidi verso le funzioni di attivazione del sistema immunitario piuttosto che nell'espressione dei CSS (Blount *et al.*, 2003; McGraw &

Ardia, 2003; Fitze *et al.*, 2007). Allo stesso modo, fattori di stress possono deviare l'uso dei carotenoidi dalle colorazioni ornamentali verso la protezione dell'organismo da danni di tipo ossidativo causate dall'innalzamento del livello di specie reattive dell'ossigeno circolanti nel sangue (Landys *et al.*, 2006), come dimostrato in molte specie che in seguito a stress subiscono una riduzione della colorazione (Milinski & Bakker, 1990; Brawner *et al.*, 2000; Blount *et al.*, 2001; Cote *et al.*, 2008). Situazioni di stress o di infezione provocano infatti un aumento di radicali liberi e specie reattive all'ossigeno circolanti, nel primo caso in seguito all'aumento del metabolismo, mentre nel secondo dovuto alla liberazione di ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>) da parte delle cellule della linea leucocitaria. Gli ossidi di azoto hanno infatti azione distruttiva sui patogeni (Crippen *et al.*, 2003), ma possono causare danni anche alle cellule ospite, portando ad esempio all'apoptosi dei leucociti stessi (Guzik *et al.*, 2003; Bourgeon *et al.*, 2007). Possibili infezioni o condizioni di stress possono inoltre interferire su altri caratteri, quali ad esempio il corteggiamento, come nel caso del pavone (*Pavo cristatus*), in cui a seguito di uno stress indotto con un potente attivatore del sistema immunitario, si è registrato un calo del tasso di display nuziali (Torres & Velando, 2007).

Recentemente gli studi focalizzati a verificare la possibile relazione tra la condizione e/o lo stato di salute del maschio e l'espressione dei CSS, hanno beneficiato della scoperta di tecniche per indurre sperimentalmente la risposta del sistema immunitario, utilizzando diversi tipi di antigeni. A questo scopo sono stati infatti utilizzati sia iniezioni di eritrociti di specie diverse da quella oggetto di studio (Faivre *et al.*, 2003; Ros *et al.*, 2006), fitoemagglutinine (per *review*: Kennedy & Nager, 2006) o, generalmente negli insetti, inseriti nell'organismo piccolissimi corpi di plastica (Moret & Schmid-Hempel, 2000; Tregenza *et al.*, 2006). Uno degli antigeni che risulta particolarmente adatto a questo scopo, perché si è rivelato un potente attivatore del sistema immunitario, è dato dai lipopolisaccaridi di parete (LPS) di *Escherichia coli* (Bonneaud *et al.*, 2003; Loyau *et al.*, 2005; Torres & Velando, 2007). L'LPS infatti mima l'infezione batterica scatenando dapprima una reazione di infiammazione ben conosciuta e studiata, spesso evidenziata da fenomeni di edema (Passos *et al.*, 2004), e attivando la risposta immunitaria dell'organismo, senza però causare gli effetti negativi provocati dalla reale azione di un patogeno (Bonneaud *et al.*, 2003). In particolare LPS induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno e di prodotti dell'ossidazione dei lipidi, come anioni superossidi e perossidi, provocando un considerevole stress ossidativo negli animali (Wiesel *et al.*, 2000; Escames *et al.*, 2003). Considerata la buona conoscenza del meccanismo con cui questo antigene opera, la sua agevole applicazione e la possibilità di modularne perfettamente la somministrazione in relazione al peso corporeo dell'individuo, si è scelto di utilizzarlo in questa parte del lavoro il cui obiettivo era quello di valutare se e quali tratti maschili fossero indicatori di condizione in *S. pavo*. Per questo un gruppo di maschi di *S. pavo* è stato trattato con LPS al fine di scatenare una risposta immunitaria e valutare quindi la reazione da parte degli animali sia per quanto riguarda i caratteri pre-copulatori (sviluppo dei CSS e comportamento di corteggiamento) che i post-copulatori (numero e qualità degli spermatozoi).

## MATERIALI E METODI

Gli individui, sia maschi che femmine, utilizzati in questo studio sono stati catturati nel sito del Casone in subacquea (vedere Capitolo I). L'esperimento, condotto su 23 maschi, ha avuto durata complessiva di 9 giorni, suddivisa in 3 parti: un pre-trattamento (giorni 1-4), il trattamento (giorno 5) e un post-trattamento (giorni 6-9). Tutti i maschi dopo la cattura (giorno 1) sono stati anestetizzati (MS222; Sandoz), pesati (con bilancia di precisione 0,01g), fotografati con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7.2 Megapixel) e infine è stato prelevato, per spremitura, un campione di spermi. I maschi sono stati quindi trasferiti in acquari individuali di 36 litri per la stabulazione pre-trattamento. Ogni acquario era munito di un nido artificiale costituito da un tubo in PVC (lunghezza 15 cm, diametro 3 cm), aveva fondo ricoperto di sabbia, areazione continua e ricambio d'acqua giornaliero. La temperatura è stata mantenuta per tutta la durata dell'esperimento a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperiodo coincidente a quello naturale. Gli animali sono stati nutriti quotidianamente con pezzi di cozza (*Mitylus sp.*) a regime alimentare controllato. Il regime alimentare è stato valutato in prove preliminari e corrisponde ad una alimentazione tale da mantenere inalterato il peso degli individui (Pizzolon, osservazioni personali). Il quinto giorno di stabulazione è avvenuto il trattamento degli animali. Gli individui sono stati suddivisi in maniera casuale (utilizzando Microsoft Excel 2007) in due gruppi: il primo gruppo (n=13) costituito da maschi che avrebbero subito l'inoculazione di LPS (maschi LPS) e un secondo gruppo (n=10) costituito da maschi di controllo che avrebbero ricevuto un'analogia iniezione, ma di una soluzione fisiologica (maschi CNT).

I maschi LPS sono stati inoculati con iniezione intramuscolare sul dorso (siringa da 0,50 ml (Nipro) e ago 30 G da 12 mm (Biotekne)) di una dose di 40 ml/kg di LPS (*serotype*: O26:B6; Sigma-Aldrich) 0,05 % in tampone Na-fosfato (PBS) [NaCl 8,18 g/l, KCl 0,2 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/l, ph 7,2], corrispondente ad una dose complessiva di 2 mg di LPS su kg di massa corporea. Gli animali appartenenti al gruppo controllo sono stati inoculati con una uguale dose (40 ml/kg) di tampone PBS. Gli animali sono stati quindi trasferiti nuovamente nei propri acquari per il periodo post-trattamento, al termine del quale (giorno 9) sono stati nuovamente anestetizzati, pesati e fotografati secondo la metodica descritta precedentemente ed è stato quindi effettuato il prelievo degli spermi. Al termine dell'esperimento tutti gli animali sono stati mantenuti in acquario e nutriti *ad libidum* per 2 giorni e successivamente rilasciati nell'ambiente di provenienza. Tutti gli animali sono sopravvissuti al trattamento.

### **Osservazioni comportamentali**

I maschi sono stati osservati sia nel periodo di pre- che di post-trattamento e ne sono stati registrati i comportamenti. Nei giorni 3 e 4 (pre-trattamento) e 7 e 8 (post-trattamento) sono state eseguite quattro osservazioni giornaliere della durata di 10 minuti ciascuna, suddivise casualmente tra le ore 10<sup>00</sup> e le ore 18<sup>00</sup>. Si è scelto di effettuare i rilevamenti nei

giorni indicati in quanto, nei test preliminari, si era riscontrato che i maschi, dopo aver ricevuto trattamenti che implicano anestesia (giorni 1 e 5), necessitano di un paio di giorni per riprendere le proprie normali attività (Pizzolon, osservazioni personali).

Durante le osservazioni sono stati registrati: il tempo speso dall'individuo all'interno del nido, il tempo speso nell'attività di ventilazione e il tempo trascorso a nuotare all'esterno del nido. Le prime due osservazioni giornaliere sono state eseguite mentre il maschio era da solo nell'acquario, mentre durante la terza e la quarta veniva introdotta nella vasca una femmina. Questa, scelta casualmente tra un gruppo di femmine pronte alla deposizione (addome gonfio e papilla genitale arrossata), veniva introdotta di volta in volta nell'acquario con il maschio e rimossa al termine dei 10 minuti di osservazione. Se entrava dentro il nido e si apprestava a deporre, la femmina veniva subito tolta dalla vasca e l'osservazione veniva bloccata e ripetuta successivamente. Ogni femmina è stata utilizzata una sola volta con ciascun maschio e per un massimo di cinque diverse osservazioni. Durante le osservazioni con la femmina, sono stati registrati, oltre ai dati rilevati per la prima tipologia di osservazione, anche: il tempo passato dal maschio a corteggiare la femmina, la frequenza di un particolare display di corteggiamento (attacco: rapido movimento verso la femmina) del maschio e il tempo trascorso tra l'introduzione della femmina e il primo attacco. Se il maschio si dimostrava troppo aggressivo, compiendo più di trenta attacchi in un minuto o mordendo la femmina e trattenendola con i denti, la femmina veniva rimossa dall'acquario e l'osservazione veniva interrotta e ripetuta successivamente.

### ***Misure morfologiche***

Sono state scattate tre fotografie per ogni maschio: disteso lateralmente su un supporto con scala di riferimento in centimetri (fotografia A), particolare della cresta cefalica in visione laterale durante la fase di risveglio degli animali (vedi Capitolo I) con accanto una scala colorimetrica di riferimento di 4 crescenti intensità di giallo (valori RGM: 255 200 000; 255 210 047; 225 220 91; 225 230 139) (fotografia B), particolare della cresta in visione frontale dell'animale (fotografia C). Con un software di analisi di immagine (ImageJ) le fotografie ottenute sono state analizzate. In particolare sono state rilevate le seguenti misure:

Fotografia A - lunghezza totale (LT) e standard (LS); area della cresta (AC); area delle ghiandole anali (AG);

Fotografia B - area della macchia gialla della cresta cefalica (AMC); intensità della colorazione gialla della cresta (IC).

Fotografia C - spessore della cresta (SC).

L'intensità della colorazione della cresta è stata valutata visivamente utilizzando la scala colorimetrica come riferimento ed è stata registrata secondo una scala di valori tra 1 e 4 (1=intensità minima; 4=intensità massima). La misura è stata presa separatamente da 3 diversi operatori, e la media (arrotondata all'unità) tra le osservazioni è stata utilizzata per le analisi.

Ogni misura è stata rilevata due volte e per le successive analisi è stato utilizzato il valore medio.



### ***Analisi dell'eiaculato***

Il prelievo di spermatozoi è stato eseguito con spremitura manuale attraverso leggera pressione esterna sulle gonadi e contemporanea suzione fatta con micropipetta Gilson (P200) posta sulla papilla genitale. Lo sperma è stato quindi misurato in volume e inattivato attraverso la diluizione in una soluzione inattivante [NaCl 3,5 g/l, KCl 0,11 g/l, MgCl<sub>2</sub> 1,23 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,39 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 1,68 g/l, Glucosio 0,08 g/l] isotonica (pressione osmotica = 310 mOsm/kg, pH = 7,7) e conservato alla temperatura di 0°C fino al momento delle analisi (Billard & Cosson, 1992). Al fine della valutazione della qualità dell'eiaculato sono stati considerati tre parametri: numerosità, vitalità e velocità degli spermatozoi.

Il numero degli spermatozoi è stato misurato tramite un conteggio in ematocitometro. I campioni sono stati riattivati attraverso diluizione dell'eiaculato inattivato con una soluzione attivante (rapporto 1<sub>inattivante</sub>:2<sub>attivante</sub>) [acqua marina filtrata (filtri Millipore da 0,22µm), albumina 2mg/ml]. L'aggiunta di albumina è risultata necessaria per impedire che gli spermatozoi aderissero contro le pareti del vetrino durante le analisi. Il campione è stato ulteriormente diluito con soluzione di attivante-inattivante (rapporto 2:1) al fine di ottenere una concentrazione tale da avere circa 50 spermatozoi per campo visivo ad ingrandimento 400x. Sette microlitri di eiaculato riattivato sono stati dosati nella camera di conteggio dell'ematocitometro (camera Neubauer modificata; profondità 0,1 mm) e osservati al microscopio ottico a ingrandimento 400x. Sono stati conteggiati gli spermatozoi presenti in 5 quadrati E (area=0,04 mm<sup>2</sup>). Il numero totale di spermatozoi presenti nel campione è stato ottenuto moltiplicando il risultato del conteggio per la diluizione utilizzata e moltiplicando il risultato per il volume totale dell'eiaculato.

La vitalità degli spermatozoi è stata valutata come la percentuale di spermatozoi vivi all'interno dell'eiaculato. Il campione di sperma è stato riattivato con soluzione attivante (rapporto 1:2) e ulteriormente diluito con metodica uguale a quella utilizzata per la misura del numero degli spermatozoi (vedi sopra). Gli spermatozoi sono stati quindi colorati con LIVE/DEAD sperm assay kit (Molecular Probes) e osservati al microscopio a fluorescenza (Olympus BH-2) a ingrandimento 400x. Il conteggio degli spermatozoi vivi (colorati in verde) e quelli morti (colorati in rosso) è stato fatto su campi visivi completi fino al raggiungimento di un numero totale di almeno 100 spermatozoi. La vitalità è stata valutata immediatamente dopo la riattivazione (T<sub>0</sub>) e su spermatozoi mantenuti alla temperatura di 25±1°C per tre ore (T<sub>3h</sub>). Il tempo di 3 ore è stato deciso come compromesso tra i risultati di prove preliminari che avevano mostrato vitalità molto lunghe (superiori alle cinque ore; Pizzolon, osservazioni personali) e il tempo di deposizione delle femmine, che in natura è indicato avere durata massima di circa due ore (Giacomello *et al.*, 2008). La temperatura di 25°C è stata scelta sulla base dei valori di temperatura dell'acqua dei siti da cui provenivano gli animali, e rappresenta la temperatura media in natura durante la stagione riproduttiva (Pizzolon, osservazioni personali). Ogni misura è stata replicata due volte e per le successive analisi è stato utilizzato il valore medio.

La velocità degli spermatozoi è stata misurata attraverso l'analisi dell'eiaculato allo Sperm Tracker. Il campione di sperma precedentemente inattivato veniva riattivato con soluzione attivante

[acqua marina filtrata (filtri Millipore da 0,22 $\mu$ m), albumina (BSA) 2mg/ml] in rapporto (1:2). Il campione è stato ulteriormente diluito con soluzione di attivante-inattivante (rapporto 2:1) al fine di ottenere una concentrazione tale da avere circa 50 spermatozoi per campo visivo ad ingrandimento 400x, come precedentemente descritto, e mantenuto alla temperatura di 25 $\pm$ 1°C. Immediatamente dopo l'attivazione ( $T_0$ ) e dopo 30 minuti dall'attivazione ( $T_{30 \text{ min}}$ ) è stata effettuata la misura della motilità degli spermatozoi. Tutte le analisi sono state eseguite con CEROS Sperm Tracker (Hamilton Thorne Research) utilizzando vetrini monouso Microcell (profondità=12  $\mu$ m).

Sono stati misurati i seguenti parametri:

- > VAP (*average path velocity*): velocità lungo l'interpolazione curvilinea del percorso originale ( $\mu$ m/sec);
- > VSL (*straight line velocity*): velocità rettilinea lungo due punti del percorso ( $\mu$ m/sec);
- > VCL (*curvilinear velocity*): velocità lungo il percorso originale ( $\mu$ m/sec);
- > ALH (*amplitude of lateral head displacement*): ampiezza dello spostamento laterale della testa dello spermatozoo ( $\mu$ m/sec);
- > LIN (*linearity*): rapporto tra lo spostamento rettilineo e il percorso originale (VSL/VCL);
- > BCF (*beating cross frequency*): frequenza del battito del flagello ( $\text{sec}^{-1}$ ).

Sono state considerate per le successive analisi le misure dei parametri VAP, VSL e VCL, in quanto è stato dimostrato che queste sono le caratteristiche che nei pesci maggiormente correlano con il tasso di fertilizzazione (Rurangwa *et al.*, 2004). Sono stati inoltre introdotti dei valori soglia di velocità minima, settati a 20  $\mu$ m/sec per la VAP e a 15  $\mu$ m/sec per la VSL. Questo ha permesso di escludere dalle misurazioni tutte le cellule non completamente riattivate o le cellule mosse unicamente da moti browniani.

### **Analisi statistiche**

Tutti i dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard. I test parametrici o non parametrici sono stati applicati sulla base della distribuzione dei dati e i vincoli dei test. La normalità della distribuzione dei dati è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk e, se non distribuiti normalmente, i dati sono stati trasformati su base logaritmica (Sokal & Rohlf, 1997).

Le differenze tra i due gruppi di maschi (LPS-CNT), prima e dopo il trattamento, sulla base dei parametri misurati, sono state valutate attraverso test t per campioni indipendenti, se distribuiti normalmente, altrimenti test U di Mann-Whitney. Le differenze tra i parametri misurati prima e dopo il trattamento sono state valutate separatamente nei due gruppi attraverso un test t per campioni dipendenti, se distribuiti normalmente, altrimenti attraverso un test per campioni appaiati di Wilcoxon.

La variazione subita dai maschi in seguito al trattamento con LPS o PBS è stata valutata come il rapporto tra i valori di ciascun parametro misurato dopo e prima del trattamento. Le correlazioni tra le variazioni riscontrate e le caratteristiche maschili prima del trattamento sono state valutate attraverso un'analisi delle correlazioni di Pearson.

Tutti i test statistici sono stati eseguiti con il software STATISTICA 7.1 (StatSoft).

## RISULTATI

Nella fase di pre-trattamento non sono risultate differenze significative tra i due gruppi di maschi di *S. pavo*, sperimentali (LPS) e controlli (CNT), per tutti i parametri misurati (vedi Tab. 3.1.1).

	MASCHI LPS		MASCHI CNT		t (U)	p
	Media ± Dev.st	n	Media ± Dev.st	n		
<b>Caratteristiche del nido</b>						
Area (cm <sup>2</sup> )	86,98±25,46	13	82,94±26,60	10	0,37	0,72
Superficie ricoperta da uova (cm <sup>2</sup> )	62,77±23,22	13	65,40±25,75	10	-0,26	0,80
Numero di uova	6482±2513	13	6114±2671	10	0,34	0,74
Numero di ovature	5,92±1,98	13	5,50±1,96	10	0,51	0,61
<b>Caratteristiche del maschio</b>						
Lunghezza totale (cm)	10,65±0,93	13	10,26±1,32	10	0,83	0,42
Peso (gr)	10,60±3,32	13	9,39±3,41	10	0,86	0,40
Area delle ghiandole anali (cm <sup>2</sup> )	0,12±0,05	13	0,11±0,04	10	0,57	0,57
Area delle cresta (cm <sup>2</sup> )	0,41±0,18	13	0,39±0,18	10	0,16	0,87
Area gialla della cresta (cm <sup>2</sup> )	0,25±0,14	13	0,29±0,20	10	-0,55	0,59
Area gialla della cresta/Area della cresta	0,61±0,24	13	0,68±0,28	10	-0,58	0,57
Intensità della colorazione della cresta	3,08±0,49	13	2,70±0,82	10	(U=44,5)	0,21
Spessore della cresta (cm)	0,11±0,03	13	0,12±0,03	10	1,36	0,19
<b>Attività in acquario (oss. di 900 sec)</b>						
Tempo dentro al nido (sec)	820,88±171,45	13	856,35±70,41	10	-0,61	0,55
Tempo di ventilazione (sec)	39,46±42,18	13	92,14±128,99	10	-1,39	0,18
Tempo a nuotare fuori dal nido (sec)	9,69±34,95	13	20,14±31,91	10	-0,74	0,47
<b>Attività in acquario con femmina (oss. Di 900 sec)</b>						
Tempo dentro al nido (sec)	752,56±200,43	13	729,95±183,72	10	0,28	0,78
Tempo di ventilazione (sec)	45,55±56,42	13	129,24±232,61	10	-1,26	0,22
Tempo in display di corteggiamento (sec)	39,64	13	118,47±136,22	10	-1,75	0,10
Numero di display "attacco"	1,37±1,96	13	6,76±12,09	10	-1,59	0,13
Tempo tra inizio osservazione e primo display (sec)	128,35±140,97	13	179,00±127,53	10	-0,89	0,38
<b>Caratteri dell'eiaculato</b>						
Numero di sperm	1.779.426±2.133.472	13	5.353.220±12.471.025	10	-1,02	0,32
Sperm vivi a t <sub>0</sub> (%)	96,87±3,06	13	91,29±12,36	10	1,58	0,13
Sperm vivi a t <sub>3h</sub> (%)	95,31±3,19	13	89,66±14,44	10	1,38	0,18
VAP t <sub>0</sub> (µm/sec)	90,34±18,05	12	94,77±19,34	8	-0,52	0,61
VSL t <sub>0</sub> (µm/sec)	87,22±18,01	12	89,29±17,94	8	-0,25	0,80
VCL t <sub>0</sub> (µm/sec)	120,60±16,93	12	126,24±18,02	8	-0,71	0,49
VAP t <sub>30 min</sub> (µm/sec)	59,47±12,38	12	61,88±15,16	8	-0,39	0,70
VSL t <sub>30 min</sub> (µm/sec)	56,12±13,02	12	57,24±16,08	8	-0,17	0,87
VCL t <sub>30 min</sub> (µm/sec)	93,64±10,22	12	97,20±12,65	8	-0,70	0,50

**Tab. 3.1.1** – Confronto dei parametri misurati tra i maschi del gruppo trattato con LPS e gruppo controllo (CNT) prima del trattamento (giorno 1)

Al termine dell'esperimento sono invece emerse differenze significative tra i due gruppi relativamente alle caratteristiche della cresta cefalica (Tab. 3.1.2). La frazione di area della cresta colorata di giallo è risultata più bassa nei maschi trattati con LPS (24,69±25,56%) rispetto ai maschi controllo (53,26±28,38%) (t<sub>21</sub>=-2,53; p<0,05). Differenze sono emerse

anche riguardo all'indice di intensità della colorazione gialla, che nei trattati risulta  $1,15 \pm 0,55$ , mentre nei controlli  $2,10 \pm 1,10$  (test U Mann-Whitney:  $U=27,5$ ;  $p < 0,05$ ,  $n_{LPS}=13$ ,  $n_{CNT}=10$ ).

L'area gialla è risultata diminuire significativamente dopo il trattamento con LPS, sia in termini di dimensioni assolute (pre-trattamento:  $0,25 \pm 0,14$  cm<sup>2</sup>; post-trattamento:  $0,11 \pm 0,16$  cm<sup>2</sup>; test t per campioni dipendenti:  $t_{12}=-3,60$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 3.1.1 a), che rapportata alle dimensioni totali della cresta cefalica (pre-trattamento:  $0,61 \pm 0,24$ ; post-trattamento:  $0,25 \pm 0,26$ ; test t per campioni dipendenti:  $t_{12}=-3,78$ ;  $p < 0,01$ ). Nei maschi di controllo invece non sono state registrate variazioni significative delle dimensioni dall'area gialla, ne in termini assoluti (pre-trattamento:  $0,29 \pm 0,20$  cm<sup>2</sup>; post-trattamento:  $0,23 \pm 0,16$  cm<sup>2</sup>; test t per campioni dipendenti:  $t_9=-3,60$ ;  $p > 0,05$ ) (Fig. 3.1.1 a), ne relativi alle dimensioni complessive della cresta (pre-trattamento:  $0,68 \pm 0,28$ ; post-trattamento:  $0,53 \pm 0,28$ ; test t per campioni dipendenti:  $t_9=-2,08$ ;  $p > 0,05$ ). Variazioni dell'area gialla sono state registrate anche nell'intensità della sua colorazione, che nei maschi trattati ha subito una riduzione a seguito della somministrazione di LPS (pre-trattamento:  $3,08 \pm 0,49$ ; post-trattamento:  $1,15 \pm 0,55$ ; test per campioni appaiati di Wilcoxon:  $Z=3,88$ ;  $p < 0,01$ ), mentre nei maschi controllo non ha subito una variazione significativa (pre-trattamento:  $2,70 \pm 0,82$ ; post-trattamento:  $2,10 \pm 1,10$ ; test per campioni appaiati di Wilcoxon:  $Z=1,83$ ;  $p > 0,05$ ) (Fig. 3.1.1 b).

Il rapporto fra le dimensioni dell'area gialla della cresta dopo il trattamento e prima del trattamento è risultato significativamente diverso tra i maschi LPS e maschi CNT, sia in termini di dimensioni assolute (maschi LPS:  $0,42 \pm 0,41$  cm<sup>2</sup>; maschi CNT:  $0,78 \pm 0,40$  cm<sup>2</sup>; test t:  $t_{21}=-2,12$ ;  $p < 0,05$ ), sia rapportando le sue dimensioni all'area totale della cresta (maschi LPS:  $0,42 \pm 0,41$  cm<sup>2</sup>; maschi CNT:  $0,78 \pm 0,40$  cm<sup>2</sup>; test t:  $t_{21}=-2,12$ ;  $p < 0,05$ ), con i maschi trattati che hanno subito una riduzione maggiore della colorazione della cresta.

Una diminuzione dell'area gialla è risultata anche per quanto riguarda l'intensità del colore. In particolare il rapporto tra l'intensità della colorazione dopo il trattamento e prima è risultato significativamente più basso nei maschi LPS ( $0,39 \pm 0,18$ ) rispetto ai CNT ( $0,77 \pm 0,34$ ) (test U Mann-Whitney:  $U=19,5$ ;  $p < 0,01$ ,  $n_{LPS}=13$ ,  $n_{CNT}=10$ ), mostrando una maggiore diminuzione di colorazione nei maschi dopo la somministrazione di LPS.

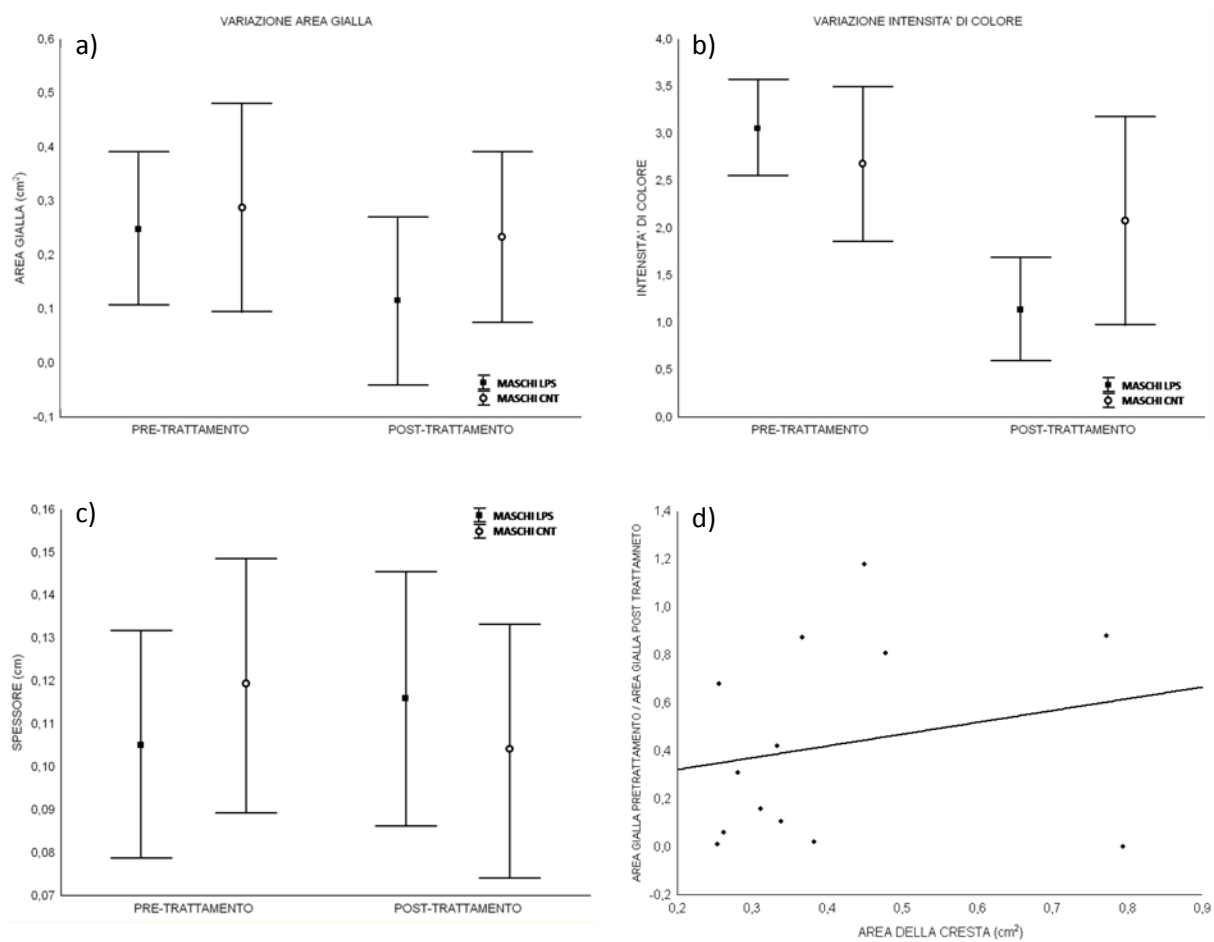
Lo spessore della cresta è risultato invece aumentare nei maschi dopo il trattamento con LPS rispetto ai maschi di controllo, in cui si è registrato un lieve assottigliamento della cresta. Il rapporto tra lo spessore dopo il trattamento e prima è risultato significativamente diverso tra i due gruppi (maschi LPS:  $1,14 \pm 0,29$ ; maschi CNT:  $0,89 \pm 0,20$ ; test t:  $t_{21}=2,32$ ;  $p < 0,05$ ) (Fig 3.1.1 c).

Nessuna variazione significativa è stata rilevata per gli altri tratti analizzati, morfologici, comportamentali e dell'eiaculato. Da notare che i maschi di entrambi i gruppi hanno mostrato in media un aumento del numero di spermatozoi, anche se non significativo, che nei maschi CNT è passato da  $5.353.220 \pm 12.471.025$  spermatozoi spremuti dopo la cattura a  $7.697.654 \pm 19.196.863$  spermatozoi spremuti a fine esperimento (test t per campioni dipendenti:  $t_9=0,31$ ;  $p > 0,05$ ), e nei maschi LPS da  $1.779.426 \pm 2.133.472$  a  $8.987.701 \pm 17.418.212$  (test t per campioni dipendenti:  $t_{12}=1,49$ ;  $p > 0,05$ ).

Inoltre non sono risultate correlazioni tra le variazioni della colorazione della cresta e gli altri caratteri rilevati, neanche con le dimensioni complessive della cresta cefalica (Fig. 3.1.1 d)

	MASCHI LPS		MASCHI CNT		t (U)	p
	Media $\pm$ Dev.st	n	Media $\pm$ Dev.st	n		
<b>Caratteristiche del maschio</b>						
Lunghezza totale (cm)	10,65 $\pm$ 0,93	13	10,26 $\pm$ 1,32	10	0,83	0,42
Peso (gr)	10,33 $\pm$ 3,19	13	9,18 $\pm$ 3,55	10	0,82	0,42
Area delle ghiandole anali (cm <sup>2</sup> )	0,08 $\pm$ 0,04	13	0,08 $\pm$ 0,03	10	-0,29	0,77
Area delle cresta (cm <sup>2</sup> )	0,38 $\pm$ 0,18	13	0,39 $\pm$ 0,17	10	-0,09	0,93
Area gialla della cresta (cm <sup>2</sup> )	0,11 $\pm$ 0,16	13	0,23 $\pm$ 0,16	10	-1,79	0,09
Area gialla della cresta/Area della cresta	0,25 $\pm$ 0,26	13	0,53 $\pm$ 0,28	10	-2,53	0,02
Intensità della colorazione della cresta	1,15 $\pm$ 0,55	13	2,10 $\pm$ 1,10	10	(U=27,5)	0,02
Spessore della cresta (cm)	0,12 $\pm$ 0,03	13	0,10 $\pm$ 0,03	10	0,95	0,35
<b>Attività in acquario (oss. di 900 sec)</b>						
Tempo dentro al nido (sec)	804,69 $\pm$ 136,79	13	708,45 $\pm$ 228,43	10	1,26	0,22
Tempo di ventilazione (sec)	52,96 $\pm$ 73,47	13	75,23 $\pm$ 97,81	10	-0,62	0,54
Tempo a nuotare fuori dal nido (sec)	52,79 $\pm$ 81,35	13	64,88 $\pm$ 93,41	10	-0,33	0,74
<b>Attività in acquario con femmina (oss. di 900 sec)</b>						
Tempo dentro al nido (sec)	744,83 $\pm$ 194,79	13	644,01 $\pm$ 313,66	10	0,95	0,35
Tempo di ventilazione (sec)	55,03 $\pm$ 86,75	13	104,76 $\pm$ 168,61	10	-0,92	0,37
Tempo in display di corteggiamento (sec)	113,03 $\pm$ 151,12	13	123,18 $\pm$ 141,78	10	-0,16	0,87
Numero di display "attacco"	11,10 $\pm$ 17,51	13	9,75 $\pm$ 12,68	10	0,20	0,84
Tempo tra inizio osservazione e primo display (sec)	142,73 $\pm$ 116,40	13	135,56 $\pm$ 122,22	10	0,14	0,89
<b>Caratteri dell'eiaculato</b>						
Numero di spermatozoi	8.987.701 $\pm$ 17.418.212	13	7.697.654 $\pm$ 19.196.863	10	0,17	0,87
Spermatozoi vivi a t <sub>0</sub> (%)	83,77 $\pm$ 25,84	13	80,15 $\pm$ 32,98	10	0,30	0,77
Spermatozoi vivi a t <sub>3h</sub> (%)	85,15 $\pm$ 20,70	13	76,73 $\pm$ 36,34	10	0,70	0,49
VAP t <sub>0</sub> (μm/sec)	77,04 $\pm$ 12,25	8	71,69 $\pm$ 9,18	6	0,89	0,39
VSL t <sub>0</sub> (μm/sec)	70,56 $\pm$ 11,92	8	68,36 $\pm$ 10,46	6	0,36	0,72
VCL t <sub>0</sub> (μm/sec)	112,66 $\pm$ 11,33	8	105,16 $\pm$ 5,96	6	1,47	0,17
VAP t <sub>30 min</sub> (μm/sec)	62,03 $\pm$ 25,11	8	54,77 $\pm$ 12,34	6	0,65	0,53
VSL t <sub>30 min</sub> (μm/sec)	56,84 $\pm$ 23,86	8	51,22 $\pm$ 13,56	6	0,51	0,62
VCL t <sub>30 min</sub> (μm/sec)	74,69 $\pm$ 19,42	8	65,75 $\pm$ 10,60	6	1,01	0,33

**Tab. 3.1.2** – Confronto dei parametri misurati tra i maschi del gruppo trattato con LPS e gruppo controllo (CNT) dopo il trattamento (giorno 9)



**Fig. 3.1.1** – confronto fra maschi trattati con LPS (maschi LPS) e i maschi controllo (maschi CNT) prima e dopo il trattamento rispetto a: dimensioni medie ( $\pm$  deviazione standard) della macchia gialla della cresta (a), intensità media ( $\pm$  deviazione standard) della colorazione gialla (b), spessore medio ( $\pm$  deviazione standard) della cresta (c). (d) Relazione fra le dimensioni della cresta (area della cresta) e la variazione nelle dimensioni della colorazione gialla (area gialla della cresta post-trattamento/ area gialla della cresta pre-trattamento).

## DISCUSSIONE

La cresta cefalica è risultato l'unico tratto maschile a subire variazioni in conseguenza della risposta immunitaria provocata da LPS. Infatti nei maschi a cui è stato somministrato questo antigene batterico la colorazione gialla della cresta ha subito una riduzione, sia rispetto alle fasi pre-trattamento che rispetto ai maschi controllo, in termini sia di estensione che di intensità del colore espresso. Questi risultati indicano che l'area gialla della cresta cefalica è un carattere collegato allo stato di salute dell'individuo e può quindi rappresentare per le femmine un segnale onesto di condizione del maschio.

L'LPS è un potente attivatore del sistema immunitario (Bonneaud *et al.*, 2003; Loyau *et al.*, 2005) che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno e di conseguenza ad un forte stress ossidativo negli individui (Wiesel *et al.*, 2000; Escames *et al.*, 2003; Torres & Velando, 2007). Lo stress evocato determina, a sua volta, la mobilitazione di composti antiossidanti a protezione dell'organismo dai danni provocati dai radicali liberi e dalle specie reattive dell'ossigeno (Torres & Velando, 2007). La mobilitazione di prodotti antiossidanti può avvenire a spese dell'espressione di caratteri sessuali secondari (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004), in particolare di quei tratti che devono le loro colorazioni al contenuto di carotenoidi (Milinski & Bakker, 1990; Brawner *et al.*, 2000; Blount *et al.*, 2001; Cote *et al.*, 2008). Anche nell'esperimento condotto su *S. pavo*, la somministrazione di LPS e il conseguente aumento di radicali liberi e di attività del sistema immunitario, potrebbe aver portato alla mobilitazione dei carotenoidi presenti nella cresta dei maschi, provocando la riduzione della sua colorazione gialla, sia in termini di estensione che di intensità. Infatti, sebbene non vi siano evidenze sperimentali che la colorazione gialla della cresta in *S. pavo* sia dovuta alla presenza di carotenoidi, questi composti sono comunemente responsabili delle colorazioni gialle/arancioni/rosse nel mondo animale, e in particolare dei Teleostei (Andersson, 1994). Sembra quindi poco probabile che la colorazione gialla della cresta in *S. pavo* sia dovuta a pigmenti diversi, sebbene per confermare l'ipotesi emersa dai risultati ottenuti la verifica sperimentale rimanga necessaria. Con queste presupposti è ragionevole supporre che la colorazione della cresta possa essere indicatore onesto della condizione del maschio, che potrebbe essere considerato dalla femmina nella scelta del compagno per valutare il suo stato di salute corrente. Sebbene siano ben noti i legami tra lo sviluppo dei CSS a carotenoidi e la resistenza ad infezioni e parassiti in molte specie, in particolare in uccelli (Dowling & Simmons, 2009), questa relazione non era mai stata dimostrata sperimentalmente nei pesci, pur essendo da tempo nota la presenza di ornamenti a carotenoidi e la relativa preferenza femminile (Andersson, 1994).

Negli individui che hanno subito il trattamento con LPS si è registrato anche un lieve aumento di spessore della cresta che, pur non essendo significativo, è risultato comunque in controtendenza rispetto alla lieve diminuzione nello spessore registrato negli animali controllo. Questo ingrossamento potrebbe essere dovuto alla formazione di un edema a livello della cresta; un ristagno di liquidi conseguenza comune della risposta infiammatoria indotta dalla somministrazione di LPS (Passos *et al.*, 2004).

Le dimensioni della cresta non hanno invece mostrato variazioni in seguito al trattamento sperimentale, e quindi non sono risultate un tratto dipendente dalla condizione attuale dell'individuo. Gli esperimenti di scelta femminile (Capitolo I) hanno evidenziato una preferenza netta delle femmine per creste di maggiori dimensioni. Purtroppo la tipologia di sagome utilizzate, con cresta interamente gialla, non permette ora di stabilire se la preferenza femminile si sia espressa per le dimensioni complessive della cresta o per dimensioni della sua macchia gialla. Le dimensioni della cresta potrebbero quindi non essere di per sè un carattere sottoposto a scelta femminile e/o indicatore di qualità maschile, sebbene anche gli esperimenti condotti sulla popolazione portoghese, con maschi vivi, abbiano dato risultati analoghi, mostrando che le femmine corteggiavano maggiormente i maschi con le creste più sviluppate (Gonçalves *et al.* 2002). Creste di maggiori dimensioni esibiscono aree gialle di maggiori dimensioni (Capitolo I). Tuttavia l'investimento proporzionale nella colorazione della cresta (cioè il rapporto tra area gialla della cresta rispetto all'estensione totale della cresta) non è significativamente diverso tra i diversi maschi, sebbene mostri ampie variazioni nelle creste di piccole dimensioni (Capitolo I). Le dimensioni della cresta potrebbero indicare di per se' la qualità del maschio, qualità su una scala temporale diversa dalla condizione indicata dall'area gialla, ad esempio su scala ontogenetica (Møller, 1998). In questo caso il loro sviluppo dovrebbe essere correlato ad una migliore risposta all'infezione (Hamilton & Zuk, 1982), con i maschi di migliore qualità, e quindi con creste più sviluppate, in grado di reagire meglio alle infezioni rispetto ai maschi meno dotati, e quindi di mostrare una riduzione significativamente inferiore della colorazione gialla. I risultati dell'esperimento condotto non hanno evidenziato una relazione di questo tipo, ma l'ipotesi non può ancora essere esclusa dato il numero limitato di individui trattati (13) e soprattutto il basso numero di maschi che presentavano una cresta di dimensioni grandi (2) e medie (2). E' tuttavia degno di nota che, nei 4 maschi con creste grandi e medie iniettati con LPS la riduzione nell'estensione della colorazione gialla della cresta è stata mediamente inferiore rispetto a quella registrata nei maschi con cresta piccola. Per la verifica del possibile ruolo dello sviluppo della cresta nella preferenza femminile e nell'eventuale segnalazione di qualità del maschio è necessario da un lato condurre esperimenti di preferenza variando l'estensione dell'area gialla e dall'altro proseguire la sperimentazione con LPS includendo un maggior numero di individui con cresta di grandi dimensioni.

Il dosaggio di LPS utilizzato in questo studio, scelto sulla base dei lavori presenti in letteratura (Bonneaud *et al.*, 2003; Loyau *et al.*, 2005) e con prove preliminari compiute durante la stagione riproduttiva 2008 (Pizzolon, osservazioni personali), è un dosaggio basso, tarato al fine di mantenere tutti gli animali vivi e in discrete condizioni di salute, alterando il meno possibile le loro condizioni. Lo scopo di questo lavoro, infatti, era valutare quale tra i diversi tratti maschili fosse il più sensibile alle variazioni dello stato di salute dei maschi e quindi l'indicatore più onesto dalle condizioni dell'individuo. Il dosaggio utilizzato ha indotto variazione infatti solo nell'area gialla della cresta senza modificare le ghiandole anali, il comportamento o l'eiaculato, e un aumento del dosaggio di antigeni potrebbe ora risultare interessante per valutare la presenza di ulteriori relazioni tra lo stato di salute e i differenti



caratteri maschili. La mancata riduzione di altre attività o di altre caratteristiche maschili potrebbe anche risiedere nell'azione stessa che esercita l'LPS sugli organismi. Questo infatti, non comportando la reale presenza di un patogeno, non costringe l'organismo ad affrontare i costi di un'infezione (Loyau *et al.*, 2005; Torres & Velando, 2007). Di conseguenza tratti come il comportamento, le ghiandole e l'eiaculato potrebbero non venire influenzati e la sola probabile mobilitazione di carotenoidi presenti nella cresta potrebbe essere sufficiente a contrastarne gli effetti.

Da notare infine che si è registrato addirittura un aumento nel numero di spermatozoi presenti nell'eiaculato ottenuto sia dagli animali controllo che da quelli trattati al termine della sperimentazione. Questo aumento potrebbe essere conseguenza dei nove giorni di cattività, durante i quali, pur avendo la possibilità di interagire con alcune femmine per brevi periodi, i maschi non si sono accoppiati, ed è quindi possibile che abbiano mantenuto e ulteriormente ripristinato le riserve di spermatozoi. Pur non avendo informazioni precise sulla storia pregressa dei singoli individui sperimentali, dato che al momento della cattura difendevano nidi con uova a stadi precoci di sviluppo (0-1 giorni dalla deposizione; Pizzolon, osservazioni personali), è ragionevole ipotizzare che essi si fossero accoppiati da relativamente poco tempo. Durante la cattività quindi, in seguito anche alla possibilità di alimentarsi giornalmente, i maschi avrebbero potuto restaurare le loro riserve di spermatozoi, spiegando così l'aumento registrato al termine del periodo di trattamento.



## CAPITOLO II B

### *Funzione delle ghiandole anali*

#### INTRODUZIONE

La difesa delle uova da possibili infezioni microbiche riveste un ruolo cruciale nei processi riproduttivi, in particolare in quelle specie il cui sviluppo avviene in acqua, ambiente in cui la concentrazione batterica è notevolmente superiore rispetto all'ambiente aereo (Reinheimer, 1992; Brodie *et al.*, 2007). Sono numerose le specie in cui è stata documentata la presenza di sostanze ad azione antimicrobica nelle uova (Brogden, 2005) ed è anche ben nota la capacità delle femmine di trasmettere fattori immunitari alle proprie uova e/o agli embrioni, soprattutto nei vertebrati (per *review* vedi: Grindstaff *et al.*, 2003), ma anche negli invertebrati (Huang & Song, 1999; Sadd *et al.*, 2005; Sadd & Schmid-Hempel, 2007). Questa azione protettiva sulle uova contro possibili patogeni avviene comunemente attraverso l'accumulo di sostanze antimicrobiche (essenzialmente lisozima, piccoli peptidi antimicrobici e immunoglobuline) nel tuorlo delle uova e, nelle specie vivipare, il loro passaggio avviene durante lo sviluppo embrionale, passaggio che si protrae nei mammiferi anche nella fase di allattamento (Grindstaff *et al.*, 2003). Tuttavia il contributo materno alla protezione dalle infezioni può portare all'accumulo di antimicrobici anche nelle membrane esterne all'uovo fecondato. Negli uccelli infatti diversi antimicrobici sono presenti nell'albume e nel guscio delle uova (Board & Fuller, 1974; 1994; Shawkey *et al.*, 2008), e anche in alcuni insetti la superficie esterna dell'uovo viene arricchita da composti antimicrobici al momento della deposizione (Marchini *et al.*, 1997; Ravi Ram & Wolfner, 2005). Il come avviene l'allocazione di risorse in sostanze ad azione antimicrobica da parte delle femmine è stata a tutt'oggi studiata solo negli uccelli, dove può variare in dipendenza di diversi fattori, quali ad esempio le condizioni ambientali, l'età della femmina oppure fattori genetici (Saino *et al.*, 2004; Shawkey *et al.*, 2008; Wellman-Labadie *et al.*, 2008). A questo si aggiunga che, come suggerito da Saino *et al.* (2007), le femmine potrebbero modulare il loro investimento in antimicrobici anche sulla base delle caratteristiche maschili, dedicando un maggior quantitativo di fattori protettivi a quelle uova/embrioni/prole frutto dell'accoppiamento con i maschi più attraenti. Questa ipotesi è di grande interesse nell'ambito dell'evoluzione dei CSS maschili e merita attenzione sperimentale. Tuttavia la possibile variazione nell'investimento femminile in antimicrobici in relazione all'attrattività del partner sembra limitata a quelle specie le cui le modalità riproduttive rendono possibile questa modulazione. Tra i candidati più probabili vi sono ad esempio i mammiferi, in cui il trasferimento differenziale potrebbe avvenire durante la gravidanza e l'allattamento, o gli uccelli, dove tra l'accoppiamento e la deposizione delle uova intercorre un certo lasso di tempo. Durante

questo periodo infatti, in cui vengono deposte attorno all'uovo fecondato sia l'albume che le membrane esterne, incluso il guscio, potrebbe venir modulato quindi proprio il contenuto totale in antibatterici dell'uovo. Più difficile immaginare che questo possa avvenire in specie quali ad esempio i pesci ovipari, dove tra l'ovulazione, la scelta del compagno e la fecondazione intercorre un tempo molto breve. In questo caso le uova ovulate non subiscono nessuna variazione né nel contenuto in tuorlo né nell'organizzazione delle membrane (Nagahama, 1983). Rimane comunque aperta la possibilità che, analogamente a quanto sopraccitato per gli insetti, la femmina possa convogliare sostanze antimicrobiche sulla superficie della uova, attraverso il fluido ovarico, e che la loro quantità possa quindi variare in relazione al gradimento suscitato dal compagno. Nel loro complesso questi studi evidenziano come la resistenza delle uova ai patogeni e la sua variabilità inter- e intra-specifica, nonostante sia di estrema rilevanza per la sopravvivenza della prole e l'evoluzione della cure parentali, e anche per la selezione intersessuale, rimanga comunque un argomento poco conosciuto, soprattutto in condizioni naturali (Giacomello *et al.*, 2006; Shawkey *et al.*, 2008; Wellman-Labadie *et al.*, 2008).

Recentemente alcuni studi hanno evidenziato come anche i maschi possano contribuire, attraverso la produzione di antimicrobici, alla sopravvivenza della prole, soprattutto nelle specie in cui sono presenti cure parentali maschili. Ad esempio, alcuni cavallucci marini producono delle C-lectine all'interno della sacca incubatrice dopo che la femmina vi ha deposto le uova, e queste sostanze sembrano proteggere le uova dalla penetrazione da parte dei patogeni (Melamed *et al.*, 2005). Le stesse sostanze sono state trovate nel muco prodotto dalla pelle dei ciclidi che hanno cure parentali compiute da entrambi i sessi, ed è stato ipotizzato che queste abbiano la funzione di proteggere sia gli individui stessi che la prole, che si nutre di questo muco, da possibili infezioni (Chong *et al.*, 2006). In molte specie caratterizzate dalla presenza di uova demerse, è stata riscontrata la presenza di diverse strutture che secernono composti che hanno azione antimicrobica. Ad esempio il secreto prodotto dalle ghiandole annesse allo spermidotto dei gobidi è risultato ricco di un composto lisozima-simile che è attivo contro alcuni batteri marini e di acqua dolce (Giacomello *et al.*, 2008). Inoltre il muco prodotto dalla pelle dei maschi di *Etheostoma crossopterum* e la secrezione collante prodotta da una porzione del rene dallo spinarello *Gasterosteus aculeatus* e impiegata nella costruzione del nido, inibiscono la crescita di funghi e batteri, e sembrano essere in grado di proteggere le uova da infezioni (Knouft *et al.*, 2003; Little *et al.*, 2008). Nei maschi di alcuni pesci e di anfibi è stata rilevata la presenza di ghiandole esterne che sono implicate nella produzione di sostanza ad azione antimicrobica (Giacomello *et al.*, 2006) o che si ipotizza ne producano (Knouft *et al.*, 2003; Gonçalves & De Brito-Gitirana, 2008). Tuttavia, nonostante il crescente numero di studi che evidenziano la produzione da parte dei maschi di sostanze antimicrobiche e ne suggeriscono il potenziale contributo alla sopravvivenza della prole, né la reale efficacia di tali sostanze né la possibile preferenza femminile per i caratteri legati alla loro produzione, sono state sperimentalmente testate.

Nei maschi dei blennidi sono presenti delle strutture peculiari, le ghiandole anali, che si originano come modificazione dei primi due raggi della pinna anale (Zander, 1975). Queste

ghiandole raggiungono il loro massimo sviluppo nei maschi maturi durante la stagione riproduttiva (Zander, 1975; Patzner & Seiwald, 1987) e sono assenti o solo rudimentali nei maschi che adottano tattiche riproduttive alternative (Gonçalves *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2001; Neat *et al.*, 2003). Gli estratti delle ghiandole anali di tre specie, *Parablennius tentacularis*, *Ophioblennius atlanticus atlanticus* e *S. pavo*, hanno mostrato essere ricchi di un composto lisozima-simile ad attività batteriolitica, ed è stato ipotizzato che i maschi, spalmando questo muco sulle uova, possano contribuire alla loro protezione dall'insorgere di infezioni (Giacomello, 2004; Giacomello *et al.*, 2006). Inoltre, nel caso di *S. pavo*, la stessa sostanza è stata rilevata anche sulla superficie esterna delle uova fecondate. Gli studi finora compiuti non consentono però di stabilire se l'attività antimicrobica presente sulle uova sia da attribuirsi ad un contributo da parte materna durante la deposizione o se sia dovuta a composti rilasciati dai maschi durante le cure parentali (Giacomello, 2004). Inoltre non può essere escluso che entrambi i contributi interagiscano nella protezione delle uova da infezioni e patologie (Giacomello, 2004; Giacomello *et al.*, 2006).

Considerato che le femmine di *S. pavo* mostrano preferenze riguardo le dimensioni delle ghiandole anali (Capitolo I) lo scopo di questa parte della ricerca è stato quello di valutare se queste ghiandole rappresentano per le femmine un segnale onesto della qualità del maschio in termini di benefici diretti per la sopravvivenza delle uova. Per questo è stata analizzata:

**I. la relazione tra le dimensioni delle ghiandole anali e la loro capacità secernente:**

attraverso analisi di quantificazione del contenuto proteico;

**II. l'azione antimicrobica del secreto delle ghiandole anali:**

attraverso una valutazione della capacità del secreto delle ghiandole anali di inibire la crescita di sette ceppi batterici responsabili di infezioni o parassitosi nei teleostei;

**III. l'influenza del secreto delle ghiandole anali nella sopravvivenza delle uova:**

confrontando i tassi di sopravvivenza di ovature curate da maschi a cui erano state rimosse le ghiandole anali con quelle di maschi di controllo.\*

\* Le sezioni I e II sono state svolte in collaborazione con E. Giacomello (post-doc, University of Azores in Faial, Portugal) e L. Marri e D. Marchini (ricercatrici presso l'Università di Siena)



## MATERIALI E METODI

Durante i mesi di luglio e agosto 2007 e 2008 sono stati raccolti in totale 82 maschi e 25 femmine di *S. pavo*. La cattura degli individui è avvenuta nei siti del Casone e di Sottomarina in subacquea, usando retini manuali. Tutti i maschi catturati difendevano un nido al cui interno erano presenti uova. Gli animali sono stati quindi immediatamente trasportati e stabulati in acquario presso la Stazione Idrobiologica dell'Università di Padova in Chioggia (Venezia). Tutti gli animali sono sopravvissuti allo studio e al termine della sperimentazione sono stati rilasciati nei siti di provenienza.

Sessantatré maschi di *S. pavo* catturati durante la stagione riproduttiva 2007 sono stati utilizzati per valutare il contenuto proteico del secreto delle ghiandole anali e la sua azione antimicrobica. I maschi sono stati anestetizzati con MS222 (Sandoz) e risciacquati con acqua marina filtrata (filtri Millipore da 0,22 $\mu$ m) al fine di minimizzare la contaminazione batterica sul corpo degli animali. I maschi sono stati pesati (con bilancia di precisione 0,01g) e fotografati con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7,2 Megapixel). Dall'analisi delle fotografie con software di analisi di immagine (ImageJ) sono state poi ricavate le misure morfologiche dei maschi come descritto nel Capitolo I. Con una piccola incisione chirurgica alla base dei primi due raggi della pinna anale, sono poi state prelevate le ghiandole anali. Dopo il prelievo, le ghiandole venivano pesate con una precisione di 0,001g e congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

### ***Contenuto proteico del secreto delle ghiandole anali***

Un sottocampione di 15 coppie di ghiandole anali scelte casualmente tra le 63 coppie prelevate è stato utilizzato per studiarne la relazione tra le dimensioni (peso e diametro) e il contenuto proteico del loro secreto. Le dimensioni delle ghiandole sono state ricavate dall'analisi delle fotografie, in particolare è stato misurato il diametro maggiore. Le ghiandole sono state liofilizzate e ripesate con precisione di 0,001g e quindi processate per ottenere l'estratto proteico del loro secreto. Dato che la maggior parte delle componenti proteiche delle ghiandole anali è idrofila (Giacomello *et al.*, 2006), è stata estratta solo la frazione solubile in acqua del secreto. L'estrazione è avvenuta sospendendo ciascuna coppia di ghiandole liofilizzate in 500  $\mu$ l di soluzione tampone Na-fosfato (PB)[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 35,814 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15,601 g/l] a pH 6,8 e mantenuto in lieve agitazione per 36 ore alla temperatura di 4°C. Successivamente il campione è stato centrifugato a 12.000 g per 90 minuti a 4°C e il soprannatante raccolto e congelato a -80°C. Il *pellet* è stato quindi risospeso in tampone PB seguendo la metodica precedentemente descritta. Il soprannatante ottenuto nella seconda estrazione è stato quindi combinato con il precedente e utilizzato per il saggio proteico. Il saggio proteico è stato eseguito con la metodica Bradford (1976) usando albumina di siero bovino come standard.

### **Attività antimicrobica del secreto delle ghiandole anali**

Quarantotto paia di ghiandole sono state utilizzate per saggiare l'attività antimicrobica del secreto. Le ghiandole sono state congelate dopo il prelievo, liofilizzate e processate come descritto sopra per l'estrazione della componente proteica idrofila del secreto. Al fine di valutare l'attività antibatterica media del secreto delle ghiandole anali, gli estratti delle 48 diverse coppie di ghiandole sono stati riuniti in un pool comune. Questo pool è stato quindi filtrato due volte attraverso un filtro di 0,22 µm (Millipore) e concentrato di circa 50 volte attraverso ultrafiltrazione con filtri Millipore Microcon YM-3.

L'attività antimicrobica di questo pool di estratti è stata quindi testata con un saggio di inibizione di crescita batterica su terreno solido (Faye & Wyatt, 1980) su 7 diversi ceppi batterici: 4 Gram-positivi (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Vagococcus salmoninarum*, *Lactococcus garviae*) e 3 Gram-negativi (*Tenacibaculum maritimum*, *Listonella anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*) (Tab. 3.2.1). I ceppi batterici scelti sono tutti patogeni di pesci marini (Toranzo *et al.*, 2005) ad eccezione di *M. luteus* e *B. subtilis* che solo occasionalmente sono risultati causa di patologie, in particolare di pesci di acqua dolce (Austin & Austin, 2007), ma che vengono comunemente utilizzati come indicatori di attività lisozimatica (Rogers & Perkins, 1968; Pellegrini *et al.*, 1997). Tutti i ceppi sono stati fatti crescere in brodo di coltura Mueller Hinton (MH) (Oxoid) alla temperatura di 30°C ad eccezione di *T. maritimum*, il quale è stato fatto crescere in brodo di coltura Bacto Marine (BM) (Difco). I saggi sono stati condotti su piastre preparate con una sospensione allo 0,1% in MH o BM – agarosio 0,7% (Sigma Aldrich) del ceppo batterico verso cui veniva testato l'estratto (densità ottica a 600 nm=0,5). Quindici microlitri di estratto concentrato di ghiandole sono stati inoculati in pozzetti di 2 mm di diametro praticati sulle piastre. Come controllo è stata usata la stessa quantità (15 µl) di tampone PB 0,1 M a pH 6,8. Le piastre sono state incubate a 30°C per 24 ore e successivamente è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione di crescita batterica. Per ogni test sono state eseguite due repliche e per le successive analisi è stato utilizzato il valore medio.

ORGANISMO	CARATTERISTICHE	CEPPO*
<i>Micrococcus luteus</i>	Gram-positivo	ATCC 4698
<i>Bacillua subtilis</i>	Gram-positivo	ATCC 6633
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	Gram-positivo	DSM 6633
<i>Lactococcus garviae</i>	Gram-positivo	DSM 6783
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Gram-negativo	DSM 17995
<i>Listonella anguillarum</i>	Gram-negativo	DSM 11323
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Gram-negativo	DSM 46293

**Tab. 3.2.1** - Ceppi batterici per i saggi di attività dell'estratto delle ghiandole anali

\*ATCC: American Type Culture Collection; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

Modificata da: Pizzolon *et al.*, 2010.



### **Esperimenti di sopravvivenza delle uova**

Per valutare l'efficacia del secreto delle ghiandole anali sulla sopravvivenza della uova, è stato confrontato il tasso di mortalità di due gruppi di ovature, curate rispettivamente da maschi normali e maschi a cui erano state rimosse chirurgicamente le ghiandole anali.

Gli esperimenti sono stati condotti su un campione di 19 maschi e 25 femmine di *S.pavo* catturati durante la stagione riproduttiva 2008. Dopo la cattura le femmine sono state suddivise in 5 acquari da 80 litri il cui fondo era stato ricoperto da uno strato di circa 2 cm di sabbia e dotati di tubi in PVC (lunghezza 15 cm, diametro 3 cm) quali nidi artificiali, ogni vasca era dotata di areazione continua e ricircolo di acqua. Subito dopo la cattura i maschi sono stati anestetizzati con MS222 (Sandoz), pesati (con bilancia di precisione 0,01g) e fotografati con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7,2 Megapixel) per ricavarne successivamente i dati morfometrici (vedi sopra). Sono stati quindi assegnati in maniera casuale (utilizzando Microsoft Excel 2007) a due diversi gruppi di trattamento (SGA e GA). Gli individui del primo gruppo (gruppo SGA, n=10) sono stati privati chirurgicamente delle ghiandole anali (secondo il metodo descritto in precedenza), mentre gli appartenenti al secondo (gruppo GA, n=9) sono stati deprivati di un paio di raggi della pinna anale scelti casualmente. Gli animali sono stati poi spostati in acquari individuali da 36 litri con fondo sabbioso, ricambio giornaliero di acqua e areazione continua. La stabulazione è avvenuta alla temperatura di  $25\pm 1$  °C e fotoperiodo naturale; gli animali venivano nutriti giornalmente con pezzi di cozza sgusciata (*Mytilus* sp.). Ogni acquario era munito di un nido artificiale costituito da un tubo in PVC (lunghezza 15 cm, diametro 3 cm) le cui pareti interne erano state ricoperte con un foglio di acetato trasparente rimovibile. Trascorsi due giorni dall'intervento, durante i quali i maschi potevano riprendersi dall'operazione e adattarsi alle condizioni di cattività, veniva introdotta nella vasca una femmina scelta casualmente tra le femmine stabulate pronte per la deposizione (che esibivano addome rigonfio e papilla genitale arrossata). Una volta avvenuta la deposizione la femmina veniva tolta dall'acquario e, dopo essere stata anestetizzata, veniva pesata (con bilancia di precisione 0,01g) e misurata (attraverso analisi della fotografia con software di analisi di immagine ImageJ). Ogni femmina è stata usata per una singola deposizione e subito liberata nello stesso sito di provenienza.

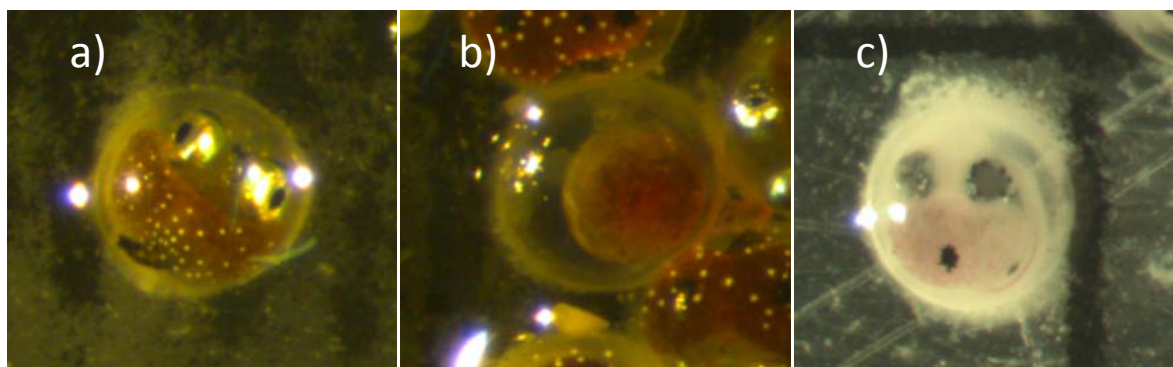
Le uova sono state lasciate sviluppare secondo un protocollo che prevedeva due fasi: una prima fase in cui le uova sono state lasciate sviluppare nell'acquario con il maschio, e una seconda in cui venivano lasciate sviluppare da sole. Entrambe le fasi avevano una durata di cinque giorni, che corrisponde a circa metà del tempo necessario per lo sviluppo sino alla schiusa delle uova, che per *S. pavo* dura poco più di dieci giorni alla temperatura di  $25\pm 1$ °C (Pizzolon, osservazioni personali). Questo metodo è stata messa a punto per minimizzare l'alta frequenza di cannibalismo maschile sulle uova che in questa specie si verifica in condizioni di cattività (Barata *et al.*, 2008; Pizzolon, osservazioni personali). Dopo la deposizione le uova venivano lasciate nell'acquario con il maschio per cinque giorni, durante i quali venivano registrati giornalmente (3 osservazioni della durata di 15 minuti distribuite in modo casuale tra le ore 10<sup>00</sup> e le ore 18<sup>00</sup>) i tassi di cure parentali maschili sulle uova. In particolare sono stati registrati: tempo trascorso all'interno del nido, tempo di ventilazione

delle uova e numero di volte in cui il maschio strofinava la regione urogenitale sull'ovatura (spalmatura). Tutti i maschi si sono accoppiati con successo e hanno apportato cure parentali alle loro uova; ciascun maschio è stato usato per una singola deposizione e, una volta concluso l'esperimento, liberato nello stesso sito di provenienza.

Al termine di questo periodo il foglio di acetato su cui era avvenuta la deposizione veniva estratto dal nido e trasferito in acquari singoli da 3 litri alla temperatura di  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e areazione continua. Le uova venivano quindi lasciate sviluppare per i restanti cinque giorni. Al fine di aumentare il possibile insorgere di infezioni delle ovature, e quindi di amplificare il possibile effetto protettivo del secreto delle ghiandole anali, l'acqua presente negli acquari in questa fase era stata arricchita nella concentrazione di batteri naturalmente presenti ( $10^5$  Unità Formanti Colonia) rispetto alla concentrazione batterica degli acquari dei maschi parentali ( $<10^3$  CFU) (analisi condotte con Coli-Parmer Bacterial Assay Kit). Al termine di questa seconda fase le ovature venivano trasferite in acquari con acqua pulita e lasciate sviluppare sino alla schiusa delle larve, che poi venivano liberate negli stessi siti di provenienza dei genitori.

Per valutarne la mortalità, le uova sono state contate e ne è stata valutata la condizione dopo sei ore dalla deposizione e due volte al giorno nella seconda fase di sviluppo (dal sesto al decimo giorno). La condizione delle uova è stata classificata in tre diverse categorie (Fig. 3.2.1) sulla base delle loro caratteristiche visibili esternamente:

- 1) uova vitali (Fig. 3.2.1 a), che mostravano corion trasparente e normale sviluppo interno;
- 2) uova abortite (Fig. 3.2.1 b), con corion normale ma embrione non sviluppato o con sviluppo anormale;
- 3) uova infette (Fig. 3.2.1 c), con corion opaco e ricoperto da un film biancastro e filamentoso (Knouft *et al.*, 2003; Treasurer *et al.*, 2005).



**Fig. 3.2.1 1:** classificazione delle uova sulla base della caratteristiche esterne: uova vitali (a); uova abortite (b); uova infette (c).

Per minimizzare l'esposizione all'aria delle uova durante la conta, le ovature venivano fotografate al microscopio binoculare ad un ingrandimento di 40x (Leica DFC420) e la conta manuale e la valutazione della condizione venivano eseguite sulle fotografie.

### ***Analisi statistiche***

Tutti i dati sono presentati come il valore minimo e il valore massimo (tra parentesi vengono indicate media  $\pm$  deviazione standard) o unicamente come media  $\pm$  deviazione standard. I test parametrici o non parametrici sono stati applicati sulla base della distribuzione dei dati e i vincoli dei test. la normalità della distribuzione dei dati è stato valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk e, se non distribuiti normalmente, i dati sono stati trasformati su base logaritmica (Sokal & Rohlf, 1997). Le differenze nelle cure parentali tra i maschi sono state valutate attraverso l'analisi della varianza per misure ripetute sui dati trasformati in base logaritmica. Per ciascun maschio è stata calcolata la media di ciascun comportamento per i 5 giorni di osservazione, e non sono emerse differenze significative tra i giorni (per tutti i comportamenti  $p > 0,05$ ). Poiché i diversi comportamenti di cure parentali sono risultati altamente correlati tra loro (coefficiente di correlazione di Pearson sui dati trasformati su base logaritmica:  $r = 0,74$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 19$ ), è stato calcolato un indice di cure parentali utilizzando un'analisi delle componenti principali sulle frequenze di ventilazione e spalmatura (dati trasformati su base logaritmica). È stato escluso da questo indice il tempo di permanenza dentro al nido in quanto tutti i maschi ad eccezione di uno hanno trascorso una media del 95 % del tempo di osservazione all'interno del nido. La componente estratta che è risultata avere l'autovalore maggiore di 1 è stata usata per valutare l'importanza relativa delle cure parentali sulla sopravvivenza delle uova rispetto alla presenza delle ghiandole anali, attraverso un'analisi multi-fattoriale della varianza. Il tasso di sopravvivenza delle uova è stato calcolato come rapporto fra il numero di uova al momento in cui sono state rimosse dall'acquario del maschio (giorno 6) e le uova a sei ore dalla deposizione (giorno 1) e tra le uova al termine dell'esperimento (giorno 10) e le uova al giorno 6. Per le successive analisi è stato usato il valore del tasso di sopravvivenza dopo trasformazione in arcoseno della radice quadrata.



## RISULTATI

### **Contenuto proteico del secreto delle ghiandole anali**

Le dimensioni (diametro maggiore) delle 15 coppie di ghiandole anali variavano tra 0,141 cm e 0,487 cm (media  $\pm$  deviazione standard:  $0,303 \pm 0,105$ ) e in peso tra 0,007 gr e 0,070 ( $0,027 \pm 0,018$ ). L'estratto proteico del secreto delle ghiandole anali è risultato variare tra 0,11 e 4,74  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , corrispondente a un contenuto proteico totale variabile fra 110 e 4740  $\mu\text{g}$  ( $1210 \pm 1140$   $\mu\text{g}$ ). Le dimensioni delle ghiandole anali sono risultate positivamente correlate con la loro massa (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,95$ ,  $p<0,01$ ,  $n=15$ ) e con il contenuto proteico della loro secrezione (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,91$ ,  $p<0,01$ ,  $n=15$ ).

### **Attività antimicrobica del secreto delle ghiandole anali**

Il secreto della ghiandole anali è risultato attivo contro 5 dei 7 ceppi batterici testati: *Vagococcus salmoninarum*, *Tenacibaculum maritimum*, *Listonella anguillarum*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* (Tab. 3.2.2). I controlli non hanno mostrato alcun effetto di inibizione della crescita batterica.

ORGANISMO	CARATTERISTICHE	AGS*
<i>Micrococcus luteus</i>	Gram-positivo	++
<i>Bacillua subtilis</i>	Gram-positivo	+++
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	Gram-positivo	+
<i>Lactococcus garviae</i>	Gram-positivo	-
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Gram-negativo	+++
<i>Listonella anguillarum</i>	Gram-negativo	+
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Gram-negativo	-

**Tab. 3.2.2** - saggi di attività antimicrobica dell'estratto delle ghiandole anali

\*test effettuato con 435  $\mu\text{g}$  di proteine totali

Il livello di attività è indicato come:

+++ altamente positivo (10-12 mm di diametro della zona di inibizione)

++ positivo (8-10 mm di diametro della zona di inibizione)

+ debolmente positivo (4-8 mm di diametro della zona di inibizione)

+++ altamente positivo (no effetto di inibizione).

Modificata da: Pizzolon *et al.*, 2010.

### **Esperimenti di sopravvivenza delle uova**

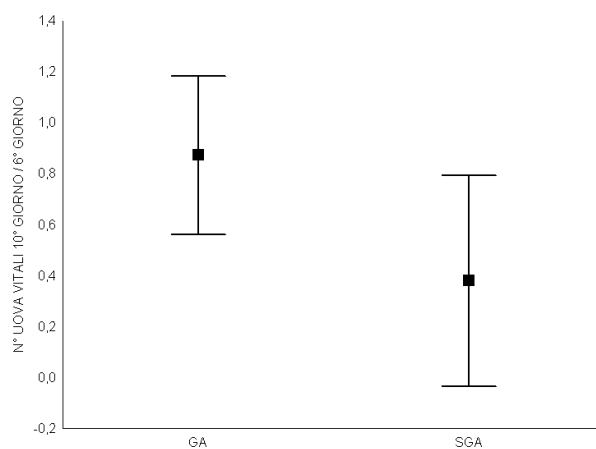
I maschi non differivano tra i due gruppi né per taglia corporea (media  $\pm$  deviazione standard: maschi GA:  $LT=11,34 \pm 0,99$  cm; maschi SGA:  $LT=11,38 \pm 1,14$  cm;  $t_{17}=0,08$ ;  $p>0,05$ ) né per le dimensioni della cresta (maschi GA:  $HC=0,54 \pm 0,23$  cm; maschi SGA:  $LT=0,57 \pm 0,31$  cm;  $t_{17}=0,36$ ;  $p>0,05$ ). Inoltre non sono risultate differenze significative tra le dimensioni delle femmine che si sono accoppiate con i maschi GA ( $LT_{femmine}=9,29 \pm 0,71$  cm) e quelle accoppiate con i maschi SGA ( $LT_{femmine}=10,15 \pm 1,34$  cm) ( $t_{17}=1,72$ ;  $p>0,05$ ). Il numero di uova

deposte dalle femmine nei nidi curati dai 10 maschi SGA variava tra 321 e 2061 ( $1175 \pm 575$ ), mentre quelle curate dai 9 maschi controllo GA tra 251 e 1445 ( $759 \pm 405$ ). Non vi erano quindi differenze significative tra i due gruppi ( $t_{17}=1,80$ ;  $p>0,05$ ).

Le osservazioni compiute dopo 6 ore dalla deposizione hanno evidenziato la presenza di alcune uova non vitali nella maggior parte delle ovature in entrambi i trattamenti ( $0,47 \pm 0,38\%$ ; range: 0-8 uova non vitali per ovatura; SGA= $3,66 \pm 2,40$  uova non vitali; GA= $3,70 \pm 2,16$  uova non vitali) e il loro numero non differiva significativamente tra i due gruppi ( $t_{17}=0,75$ ;  $p>0,05$ ). Lo stesso numero di uova abortite è stato registrato al sesto giorno, quando le uova sono state tolte al maschio. Nessun uovo infetto è stato osservato al sesto giorno mentre uova infette non vitali sono state osservate al 10° giorno, quando le uova erano pronte alla schiusa.

Non sono risultate differenze significative tra le sopravvivenze delle uova tra i due gruppi dal momento della deposizione fino al sesto giorno ( $t_{17}=0,63$ ;  $p>0,05$ ), mentre differenze significative tra i trattamenti si sono evidenziate al termine dell'esperimento ( $t_{17}=2,73$ ;  $p<0,05$ ). Le uova infatti curate dai maschi a cui erano state chirurgicamente rimosse le ghiandole (SGA) hanno mostrato una sopravvivenza media del  $37,8 \pm 43,6\%$  tra il sesto e il decimo giorno, mentre le uova curate dai maschi di controllo una sopravvivenza del  $87,1 \pm 31,1\%$  (Fig 3.2.2).

L'apporto di cure parentali maschili non è risultato significativamente diverso tra i due gruppi sperimentali, né in termini di tempo trascorso all'interno del nido (SGA= $59,29 \pm 1,08$  sec/min; GA= $56,91 \pm 8,86$  sec/min;  $F_{1,18}=0,84$ ;  $p>0,05$ ), spalmatura dell'area urogenitale sulle uova (SGA= $0,22 \pm 0,07$  sec/min; GA= $0,21 \pm 0,08$  sec/min;  $F_{1,18}=0,03$ ;  $p>0,05$ ), e tasso di ventilazione delle uova (SGA= $6,74 \pm 8,00$  sec/min; GA= $14,98 \pm 14,09$  sec/min;  $F_{1,18}=0,77$ ;  $p>0,05$ ). La prima componente estratta dall'analisi delle componenti principali spiega l'86,8% della varianza totale ed è stata considerata come un indice combinato di cure parentali. Il gruppo di appartenenza (SGA o GA) è risultato l'unico fattore che influenza la sopravvivenza delle uova in un'analisi delle covarianze (ANCOVA: indice di cure parentali:  $F_{1,18}=1,22$ ;  $p>0,05$ ; trattamento:  $F_{1,18}=6,65$ ;  $p<0,05$ ).



**Fig. 3.2.2** – confronto fra la sopravvivenza (media  $\pm$  deviazione standard) delle uova tra il sesto e il decimo giorno (n uova vitali al 10° giorno/n uova vitali al 6°giorno) curate dai maschi con ghiandole anali (GA) e maschi a cui erano state rimosse chirurgicamente (SGA).

## DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato che le ghiandole anali trasmettono alle femmine indicazioni sulla qualità dei maschi relativamente ad una importante componente delle cure parentali: la produzione di sostanze antimicrobiche. Infatti il secreto di queste ghiandole, che i maschi spalmano sulle uova, ha attività antimicrobica e svolge un ruolo fondamentale nel proteggere le uova dall'insorgere di infezioni e parassitosi. Inoltre, poiché ghiandole anali più grandi sono in grado di produrre un secreto più ricco in proteine e l'attività antimicrobica è stata rilevata proprio nella componente proteica del secreto, le loro dimensioni appaiono correlate alla capacità del maschio di conferire una maggiore protezione sulle uova e aumentare la sopravvivenza della prole.

L'estratto delle ghiandole anali è risultato attivo contro cinque dei sette ceppi batterici testati in questo studio. Tre di loro sono specie comuni nelle acque marine delle regioni temperate e causano gravi patologie nei pesci, sia nell'ambiente naturale che in situazioni di cattività e allevamento (Toranzo *et al.*, 2005). In particolare *L. anguillarum* provoca vibriosi che porta a setticemia emorragica ad una ampia varietà di specie di acque fredde e temperate; *V. salmoninarum* è un agente eziologico di streptococcosi in pesci di acque fredde, mentre *T. maritimum* è causa di flexibatteriosi, una comune patologia della mucosa orale e della pelle di molte specie marine (Toranzo *et al.*, 2005). Al contrario *M. luteus* e *B. subtilis* solo occasionalmente sono state trovate determinare patologie, in particolare in specie di acqua dolce (Austin & Austin, 2007), ma sono comunemente utilizzate come indicatrice di attività del lisozima, poiché i peptoglicani della loro parete cellulare vengono idrolizzati da questo enzima (Roger & Perkins, 1968; Pellegrini *et al.*, 1997). Quest'ultimo risultato indica che il composto ad attività lisozima simile descritto essere presente nelle ghiandole anali dei blennidi (Giacomello *et al.*, 2006) viene rilasciato nella loro secrezione mucosa, e che la sua presenza può essere responsabile dell'azione antibatterica del secreto. Infatti è noto che il lisozima mantiene la sua capacità di degradare la parete batterica anche se legato a diversi tipi di supporti solidi (Crapasi *et al.*, 1993; Wu & Daeschel, 2007). La sostanza lisozima-simile presente nel secreto delle ghiandole anali, una volta deposto sulla superficie delle uova potrebbe determinare una riduzione del numero di batteri che aderiscono alle uova e di conseguenza contribuire al mantenimento della loro funzionalità anatomica e funzionale. La possibile presenza del lisozima, che ha attività catalitica nell'idrolizzazione della parete cellulare di molti batteri (Watts *et al.*, 2001; Magnadóttir *et al.*, 2005), non esclude tuttavia la presenza di altri composti di natura proteica o non proteica (Moore *et al.*, 1993) che possono contribuire all'azione antibatterica del secreto delle ghiandole anali.

I risultati di questo studio hanno inoltre dimostrato che il secreto delle ghiandole anali è efficace nel proteggere le uova dalla colonizzazione batterica, aumentandone così le possibilità di sopravvivenza. Infatti le ovature curate dai maschi con ghiandole intatte hanno mostrato una maggiore sopravvivenza delle uova curate da maschi a cui le ghiandole erano state rimosse, le cui ovature mostravano chiari segni di infezioni batteriche. Il tasso di

sopravvivenza simile riscontrato tra i due gruppi di uova registrato nella prima parte dell'esperimento (giorni 1-6) non è in contraddizione con i risultati ottenuti al termine del trattamento, e va analizzato alla luce del tempo di incubazione delle infezioni. Infatti i batteri richiedono un certo periodo per penetrare il corion delle uova e causare quindi l'insorgere dell'infezione (Hansen & Olafsen, 1999; Verner-Jeffreys *et al.*, 2006), producendo quegli evidenti effetti sul corion che vengono comunemente adottati come criterio per stabilire la morte dell'embrione (Hansen & Olafsen, 1999; Knuft *et al.*, 2003; Treasurer *et al.*; 2005). L'importanza delle ghiandole anali nel promuovere la sopravvivenza delle uova è stata confermata anche dall'analisi multivariata della varianza che ha mostrato come, a parità di cure parentali apportate dai maschi, il tasso di sopravvivenza delle uova dipenda dal trattamento a cui sono state sottoposte. Il protocollo sperimentale usato in questo lavoro non preclude la possibilità che, come proposto per gli uccelli (Saino *et al.*, 2007; Shawkey *et al.*, 2008), la differenza osservata nella mortalità delle uova sia dipesa dalla diversa allocazione delle femmine di fattori immunitari nelle uova in relazione alla diversa attrattività dei maschi. Infatti nel protocollo sperimentale adottato alcune femmine avevano la possibilità di accoppiarsi solo con maschi deprivati delle ghiandole anali, carattere questo sottoposto a scelta femminile (Capitolo I). Tuttavia le informazioni disponibili suggeriscono che questa ipotesi sia poco probabile. Innanzitutto le femmine, nei due trattamenti sperimentali, non differivano né per dimensioni, né per numero di uova deposte o abortite. Inoltre nei Telostei, così come in altri taxa di ovipari, le femmine possono contribuire alla protezione delle uova da patogeni trasferendo fattori immunitari nel tuorlo e nella membrana delle uova durante la maturazione degli ovociti (Magnadóttir *et al.*, 2005). Negli esperimenti qui condotti, le femmine erano prossime all'ovulazione e potevano valutare le caratteristiche del maschio solo poco prima di deporre le uova; si può quindi escludere che abbiano potuto differenziare il deposito di sostanze antimicrobiche nelle uova sulla base dei tratti maschili. In alternativa le femmine che si sono accoppiate con i maschi a cui non erano state rimosse le ghiandole avrebbero potuto deporre sostanze antimicrobiche supplementari sulla superficie esterna delle uova al momento della deposizione. È questo il caso per esempio di una specie di insetto a fecondazione interna, *Ceratitis capitata*, in cui le femmine depongono sostanze antimicrobiche sulla superficie delle uova al momento della deposizione (Marchini *et al.*, 1997). Tuttavia, anche includendo questo scenario, il contributo delle femmine di *S.pavo* alla protezione esterna delle uova risulterebbe limitato rispetto a quello maschile, in quanto avverrebbe solo al momento della deposizione, mentre il trasferimento paterno di antimicrobici continuerebbe per tutta la durata dello sviluppo degli embrioni.

I risultati ottenuti in questo esperimento sono parzialmente in contraddizione con quelli ottenuti da altri autori, che in un esperimento simile non avevano registrato alcuna differenza nella sopravvivenza delle uova in relazione alla presenza o meno nei maschi delle ghiandole anali (Barata *et al.*, 2008). Tuttavia la bassa numerosità del campione e la mancanza di dati relativi all'apporto di cure parentali e alla concentrazione batterica dell'acqua in cui sono stati condotti gli studi (Barata *et al.*, 2008) rendono impossibile un pieno confronto fra i due lavori. Infatti i maschi privati delle ghiandole avrebbero potuto



sopperire al loro handicap dedicando maggiori energie alla pulizia del nido, alla ventilazione delle uova e alla rimozione delle uova infette, che in condizioni di bassa carica batterica potrebbero risultare sufficienti nel prevenire le infezioni. Nonostante la diversità di risultato con lo studio qui condotto, vale la pena di sottolineare che nel lavoro di Barata *et al.* (2008), i tassi di sopravvivenza delle ovature curate da maschi a cui erano state rimosse le ghiandole mostravano una variabilità molto ampia e superiore a quelli delle ovature curate dai maschi controllo. L'efficacia del secreto delle ghiandole anali non è quindi in discussione ma, considerando anche le modalità sperimentali e i risultati dello studio di Barata *et al.* (2008), il quadro che emerge è che gli antimicrobici rappresentano solo una componente, seppur molto importante, delle cure parentali maschili. Nella valutazione dell'efficacia delle cure parentali e della loro variabilità intra-specifica finora, nei Teleostei, sono state considerate solo le componenti legate ai comportamenti di ventilazione, pulizia, ecc. (Östlund & Ahnesjö, 1998; Oliveira *et al.*, 2000; Neat & Locatello, 2002; Marlowe, 2004 a, b; Pampoulie *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2006). Il caso di *S.pavo* evidenzia come le cure parentali stesse siano un tratto multiplo, le cui diverse componenti, comportamento e produzione di antimicrobici, meriterebbero un attento esame delle loro relazioni (covariazione o compromesso??) per evidenziarne la possibile variabilità in relazione agli altri tratti maschili e/o alle condizioni ambientali.

Il secreto prodotto dalle ghiandole anali sembra essere coinvolto anche nella segnalazione chimica, in particolare nell'attrarre le femmine (Barata *et al.*, 2008). Esso infatti conterrebbe un feromone, dato dall'insieme di composti idrofilici e idrofobici (Serrano *et al.*, 2008a). Le secrezioni di sostanze a protezione delle uova e di sostanze ad azione feromonale non sono mutualmente esclusive e sarebbe interessante verificare se siano proprio i composti ad azione antibatterica ad esercitare il potere attrattivo sulle femmine funzionando da segnale chimico, come avviene ad esempio nelle termiti, in cui il lisozima è responsabile sia della protezione delle uova che del riconoscimento delle uova stesse da parte delle operaie della colonia (Matsuura *et al.*, 2007).

Il contenuto proteico della secrezione delle ghiandole anali è risultato inoltre correlato con le dimensioni stesse delle ghiandole. Le dimensioni delle ghiandole sono quindi un indicatore onesto della qualità di genitore dei maschi. Nelle ghiandole esocrine, come sono le ghiandole anali dei blennidi, è ben noto esservi una relazione positiva tra le dimensioni dell'organo, la quantità totale di secreto prodotto e la quantità del componente peculiare di quella secrezione (Hilczer *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Fernández-Vargas *et al.*, 2008). In questo studio il contenuto in antimicrobici non è stato direttamente valutato. Tuttavia, dato che il contenuto proteico complessivo delle ghiandole di grandi dimensioni è risultato 40 volte superiore a quello delle ghiandole di piccole dimensioni, appare improbabile che il quantitativo di antimicrobici prodotto sia lo stesso, e sembra quindi ragionevole assumere che ghiandole di dimensioni diverse rilascino un diverso quantitativo di antimicrobici.

L'investimento maschile nello sviluppo delle ghiandole anali e nella produzione di sostanze antimicrobiche a protezione della uova risulta quindi un'attività fondamentale per il successo riproduttivo degli individui di questa specie, e potrebbe risultare un elemento

chiave nella capacità adattativa di questa animali. L'ampio spettro di azione antibatterica dimostrato per il secreto delle ghiandole potrebbe infatti risultare un elemento cruciale per la capacità che ha questa specie di adattarsi ad ambienti molto diversi fra loro, che variano dalle coste rocciose ad ambienti lagunari caratterizzati da substrati fangosi (Zander, 1986; Oliveira *et al.*, 1999).

## CONCLUSIONI

I risultati di questa seconda parte della ricerca hanno dimostrato che sia la cresta cefalica, sia le ghiandole anali trasmettono segnali onesti di qualità del maschio. In particolare le ghiandole anali sono informative di una qualità legata all'efficienza nelle cure parentali del maschio, cioè la produzione sostanze antimicrobiche in grado di proteggere le uova dalle infezioni batteriche. Per quanto riguarda la cresta cefalica, è la sua colorazione gialla il carattere informativo, essendo risultata, per estensione e intensità, legata allo stato di salute dell'individuo. In *S. pavo*, sono diversi i tratti che influenzano il successo di accoppiamento del maschio: il nido, le dimensioni corporee, le ghiandole anali, la cresta cefalica (Capitolo I e III) e, come evidenziato in un'altra popolazione di questa specie, anche il corteggiamento (Oliveira *et al.*, 2000). A questo si aggiunga che questi risultati mostrano come la stessa cresta cefalica possa essere a sua volta un carattere multi-segnale, con la colorazione gialla e le dimensioni totali che forse forniscono indicazioni diverse. Nonostante la numerosità dei tratti coinvolti e la conseguente difficoltà di comprensione delle loro interazioni, i risultati a disposizione consentono già di indicare che la situazione mostrata da questa specie risponde ai requisiti proposti dall'ipotesi dei messaggi multipli (Møller & Pomiankowski, 1993), per cui tratti differenti sono informativi di differenti qualità dell'individuo. A questo proposito è interessante sottolineare come, nonostante la differenze nei segnali trasmessi, questi due caratteri covarino, con individui con creste più sviluppate che presentano anche ghiandole di maggiori dimensioni. La covariazione tra caratteri sottoposti a scelta femminile è attesa dall'ipotesi dei segnali ridondanti, dato che prevede che tutti i caratteri contribuiscano a segnalare una stessa qualità maschile (Candolin, 2003). Mentre nel caso dell'ipotesi dei messaggi multipli è previsto che, segnalando qualità diverse, queste possano non essere correlate tra loro o esserlo negativamente. Il caso di *S. pavo* è un esempio chiaro di come, limitandosi alla valutazione dell'espressione dei caratteri, una covariazione tra loro possa risultare anche se questi sono indicativi di diverse qualità maschili. In realtà le dimensioni delle ghiandole anali forniscono informazioni su una delle componenti delle cure parentali ma, considerato che queste comprendono anche diversi comportamenti, la verifica della covarianza o meno tra le qualità dell'individuo dovrebbe comprendere l'intero investimento parentale. Argomento questo su cui si focalizza la terza parte del lavoro (Capitolo III).

La preferenza mostrata dalle femmine rispetto alle dimensioni delle ghiandole anali (Capitolo I) sembra rispondere all'ottenimento di benefici diretti per la prole, in termini di aumento della sopravvivenza delle uova. La scelta femminile sulla base dell'abilità o intensità delle cure parentali maschili è ampiamente diffusa tra i diversi taxa animali, e in particolare tra i Teleostei (Andersson, 1994; Jamieson; 1995), in cui spesso sono presenti cure uniparentali maschili, e l'investimento paterno diventa cruciale per il successo riproduttivo delle femmine stesse (Trivers, 1972; Blumer, 1979; Andersson, 1994). La scelta femminile per caratteri che possono garantire benefici diretti in termini di protezione antimicrobica alla prole non era comunque mai stata dimostrata. Inoltre il secreto delle ghiandole anali è il primo chiaro esempio di produzione paterna di antimicrobici allo scopo specifico di

protezione delle uova. Infatti, sebbene la produzione di composti antimicrobici sia stata dimostrata in altre specie di Teleostei, queste secrezioni hanno anche chiaramente lo scopo di proteggere gli stessi maschi dall'insorgere di infezioni (Knouft *et al.*, 2003; Melamed *et al.*, 2005; Giacomello *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2008), e spesso risulta difficile scindere le due differenti funzioni.

La colorazione gialla della cresta cefalica è invece un segnale dello stato di salute del maschio, dato che è risultata essere un tratto condizione dipendente. La possibile scelta femminile sulle dimensioni di questo tratto, che correla positivamente con le dimensioni totali della cresta (Capitolo I), potrebbe essere favorita dall'acquisizione di benefici sia diretti che indiretti. Benefici diretti potrebbero venire da un minor rischio di contrarre infezioni durante l'accoppiamento, anche se questi benefici risultano più marcati nelle specie a fecondazione interna, dove il rischio di trasmissione di malattie è più alto (Andersson, 1994). Accoppiarsi con animali più sani potrebbe comunque risultare vantaggioso se questi sono in grado di garantire un miglior apporto di cure parentali, sia per la minor probabilità di trasferire infezioni alle uova che, ad esempio, riducendo il cannibalismo parentale (Andersson, 1994). Nel caso invece in cui la resistenza ai parassiti rispecchiasse la qualità dei geni per l'immunocompetenza, la femmina potrebbe ottenere il beneficio di trasmettere queste qualità alla propria prole (Zahavi, 1975; Hamilton & Zuk, 1982). I dati in nostro possesso non chiariscono se l'area della cresta sia informativa o meno di qualità dei maschi, e sono necessari ulteriori studi per valutarne il ruolo nei processi riproduttivi. La cresta cefalica di *S. pavo* è un tratto multicomponente, e le sue dimensioni totali e l'estensione dell'area gialla potrebbero essere correlate a diverse qualità maschili. Interessante sarebbe valutare se le dimensioni complessive di questo tratto siano legate a condizioni passate o allo sviluppo ontogenetico. È stato infatti ipotizzato che caratteri diversi (o tratti diversi dello stesso carattere) possano essere segnali onesti di qualità su diverse scale temporali, con tratti più sensibili alle modificazioni immediate di condizione, e altri invece, il cui sviluppo e modificazioni sono più lente, legati a condizioni su lunga scala temporale, ad esempio ontogenetica (Møller, 1998).

Questi due tratti della cresta potrebbero essere inoltre legati tra loro da interazioni che facilitano la trasmissione del segnale verso la femmina, facilitandone la valutazione al momento della scelta del compagno (Hasson, 1989; 1990; 1997). È stato infatti ipotizzato che in alcuni casi un tratto possa funzionare come amplificatore per un secondo tratto, favorendone quindi la trasmissione del messaggio (Candolin, 2003). È così nel caso dello spinarello (*Gasterosteus aculeatus*), in cui i display di corteggiamento aumentano l'esposizione della colorazione rossa del ventre (McLennan & McPhail, 1990), oppure alcune colorazioni e macchie sulla coda di alcuni uccelli che ne evidenziano la lunghezza, carattere su cui si basa la scelta femminile (Hasson, 1991; Fitzpatrick, 1998). Inoltre, nel caso *Poecilia reticulata*, è stato dimostrato che la colorazione nera di alcune parti del corpo può amplificare la percezione delle macchie arancioni (Brooks, 1996). Nel caso della cresta di *S. pavo* le dimensioni complessive della cresta potrebbero esporre maggiormente alla vista la colorazione gialla, rendendone più facile l'individuazione da parte della femmina o, al

contrario, potrebbe essere la stessa colorazione della cresta che facilita per la femmina la valutazione delle dimensioni di questo tratto.



## **CAPITOLO III**

### ***Relazioni tra i diversi aspetti dell'investimento riproduttivo***





## INTRODUZIONE

Un'idea fondamentale nello studio degli adattamenti e del comportamento degli organismi è che lo sviluppo di ciascuna caratteristica sia limitato da compromessi (*trade-off*) tra l'investimento di risorse in un tratto rispetto all'investimento verso tutte le altre differenti strutture o attività (van Noordwijk & de Jong, 1986; Reznick *et al.*, 2000; Hunt *et al.*, 2004). La riproduzione, in particolare, rappresenta una fase cruciale nella vita di ogni organismo, e poiché comporta costi notevoli, l'investimento degli individui nella riproduzione presente deve essere ottimizzato rispetto ad altri aspetti della vita, quali la sopravvivenza (Askenmo, 1979), la riproduzione futura (Partridge & Harvey, 1985) e la fecondità (Pettifor *et al.*, 1988). Nel caso particolare in cui gli individui compiano cure parentali, l'investimento riproduttivo può comprendere due fasi: l'investimento per l'accoppiamento, definito come l'investimento in qualsiasi attività o struttura che abbia lo scopo primario di aumentare il numero o la qualità degli accoppiamenti, e l'investimento parentale, cioè le diverse attività legate alla cura di uova e al caso della prole, che ha lo scopo primario di aumentare la sopravvivenza della prole (Stiver & Alonzo, 2009). Questi due investimenti possono essere legati tra loro da *trade-off* (Burley, 1986, Andersson, 1994, Magrath & Komdeur, 2003) o, al contrario, essere tra loro positivamente correlati (Heywood, 1989; Hoelzer, 1989).

L'investimento per l'accoppiamento comprende in particolare lo sviluppo dei CSS, volti sia ad attrarre le femmine che a competere con gli altri maschi per l'accesso alla riproduzione. Questi tratti sono spesso molto costosi sia da produrre che da mantenere (Zahavi, 1975, Andersson, 1994), e la loro espressione quindi comporta l'allocazione di risorse a discapito dell'investimento in altri tratti (Kokko, 1998). In particolare l'investimento in CSS potrebbe compromettere la possibilità di compiere cure parentali adeguate, come descritto nel modello di allocazione differenziale (Burley, 1986), che prevede che maschi più attraenti investano meno nelle cure parentali sulla prole. Numerosi esempi hanno dimostrato la presenza di questi compromessi (de Lope & Möller 1993; Burley *et al.* 1996; Qvarnström, 1997; Raouf *et al.*, 1997; Griffith *et al.*, 1998), evidenziando come spesso attrattività e qualità di buoni genitori siano tra loro negativamente correlate (Andersson, 1994; Magrath & Komdeur, 2003). L'allocazione differenziale può verificarsi anche in specie in cui solo i maschi di qualità superiore e che possiedono riserve energetiche riescano a sviluppare i CSS, nel caso ad esempio in cui i comportamenti dedicati al corteggiamento e all'accoppiamento siano temporalmente in conflitto con l'investimento in cure parentali (Grafen, 1990; Andersson, 1994). Infatti, in molte specie i maschi di migliore qualità deviano le loro riserve energetiche nello sviluppo di ornamenti e/o nel corteggiamento e/o nella competizione contro gli altri maschi a discapito delle cure parentali, mentre i maschi di minor qualità investono unicamente in cure parentali, disertando l'investimento nell'accoppiamento, o limitandolo al minimo necessario per attirare le femmine (per *review* vedi: Stiver & Alonzo, 2009). Secondo invece il modello dei "buoni genitori" i CSS sarebbero

\* Questa parte della ricerca è stata svolta in collaborazione con L. Locatello (post-doc, Università degli studi di Padova).

proprio informativi della qualità come genitori, e di conseguenza ci si dovrebbe attendere una relazione diretta e positiva tra lo sviluppo degli ornamenti e l'apporto di cure parentali (Heywood, 1989; Hoelzer, 1989). Ad esempio, quando un tratto conferisce vantaggi sia in termini di attrazione verso la femmina che benefici per la prole, il maschio può allocare contemporaneamente le proprie risorse in investimento parentale e per l'accoppiamento (Gwynne, 1984; 1988). Le femmine di alcune specie, spesso proprio Teleostei a cure parentali maschili, basano infatti la scelta del compagno sulla base dei comportamenti di cure parentali (Andersson, 1994; Jamieson, 1995), attraverso l'osservazione diretta delle cure (Marlowe, 2004a, b; Pampouli *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2006), oppure su tratti che segnalano la qualità recente di genitore, come ad esempio la presenza di giovani (Jamieson, 1995) o ancora sulla base della sopravvivenza della prole (Knapp, 1993; Forsgren, 1997).

Nel caso, assai comune (Candolin, 2003), in cui sono presenti CSS multipli, compromessi potrebbero esistere tra l'investimento in un tratto rispetto all'altro. Infatti, se i tratti sono costosi e rappresentano per questo un segnale onesto di qualità del maschio, l'investimento per il loro sviluppo potrebbe generare un conflitto nell'allocazione delle risorse forte abbastanza da portare a correlazioni negative tra di essi (Andersson *et al.*, 2002). A parità di risorse disponibili, i maschi potrebbero variare l'allocazione energetica favorendo lo sviluppo di un tratto o comportamento rispetto ad altri. Questa allocazione potrebbe essere espressa in maniera differenziale tra i diversi individui, con individui che enfatizzano lo sviluppo di un carattere e altri che investono maggiormente in altri (Andersson *et al.*, 2002). Teoricamente, la contemporanea presenza di tratti costosi che vengono favoriti dalla scelta femminile sulla base della teoria dell'handicap non è evolutivamente stabile, e questi tratti verrebbero quindi velocemente sostituiti da un singolo tratto che è più efficiente nel trasmettere il segnale (Schluter & Price, 1993; Iwasa & Pomiankowski, 1994; Johnstone, 1996). È stato ipotizzato che questa allocazione differenziale possa invece diventare evolutivamente stabile, e quindi mantenersi, a causa della presenza di differenti tipologie di ricevitori (anche a livello spaziale o temporale; Marchetti, 1998). È il caso per esempio di due tratti che siano sottoposti in maniera differente alla pressione della selezione intra- e intersessuale, con un tratto che ha importanza nella competizione contro gli altri maschi, mentre il secondo acquista importanza durante la scelta femminile (Andersson *et al.*, 2002). Inoltre anche le femmine stesse potrebbero comportarsi come differenti ricevitori, nel caso scegliessero in maniera differenziale, preferendo sulla base dei diversi tratti o dei diversi benefici ad essi connessi (Candolin, 2003).

Se, nell'ambito dell'investimento nell'accoppiamento i CSS giocano un ruolo fondamentale negli eventi pre-copulatori, non è tuttavia da trascurare il peso dei cosiddetti caratteri post-copulatori, per semplicità qui esemplificati dalla qualità dell'ejaculato. Infatti, è oggi largamente condiviso che i costi per la produzione e il mantenimento degli spermatozoi, sebbene molto difficili da quantificare, non sono ininfluenti nell'investimento riproduttivo dei maschi (Wedell *et al.*, 2002). A conferma di questo, in diverse specie i maschi modulano prudentemente il rilascio dei loro gameti in relazione alle caratteristiche delle femmine, della frequenza di accoppiamento, ecc. (Nakatsuru and Kramer 1982; Shapiro *et al.* 1994;

Marconato *et al.* 1995; Marconato & Shapiro, 1996; Olsson *et al.* 1997). E' quindi possibile attendersi che si verifichino compromessi tra l'espressione di caratteri pre- e post-copulatori. Una relazione negativa tra l'attrattività dei maschi e le qualità dell'eiaculato è stata osservata in diverse specie, in particolare quelle in cui vi sono tattiche riproduttive alternative, in cui i maschi parentali che sviluppano i CSS hanno eiaculati di minor qualità rispetto ai maschi opportunisti (Petersen & Warner, 1998; Scaggiante *et al.*, 1999; Uglem *et al.*, 2001; Vladić & Järvi, 2001; Rasotto & Mazzoldi, 2002; Rudolfson *et al.*, 2006). Tuttavia una correlazione positiva tra CSS ed eiaculato è stata documentata in alcune specie sia in uccelli che pesci, dove i maschi che esibiscono i CSS più sviluppati producono anche gli eiaculati di migliore qualità (Kortet *et al.*, 2004; Masvaer *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2004).

La relazione tra l'allocatione energetica nell'investimento parentale e in quello di accoppiamento diventa ancora più complessa se si considera che sia l'espressione dei CSS, che l'investimento in cure parentali e nella produzione di spermatozoi possono essere influenzati dall'investimento nel sistema immunitario (Folstad & Skarstein, 1997; Rolff, 2002). Infatti, anche la risposta del sistema immunitario a patogeni e parassiti è costosa, e individui che sono sottoposti ad alti livelli di infezione possono subire una riduzione delle risorse da investire nelle altre attività e/o strutture (Folstad & Skarstein, 1997; Rolff, 2002). Secondo l'ipotesi dell'handicap da immunocompenza, le femmine potrebbero ottenere per la propria prole benefici in termini di resistenza ai parassiti, proprio accoppiandosi con maschi con CSS maggiormente sviluppati, in quanto questi, malgrado abbiano allocato le risorse nella produzione degli ornamenti, sono riusciti a resistere alle infezioni (Folstad & Karter, 1992). Estendendo questa teoria all'investimento nella produzione di spermatozoi, una sovraespressione del sistema immunitario potrebbe portare alla produzione di eiaculati di minore qualità, in quanto maschi che sono costretti a combattere le infezioni diventano limitati nelle risorse che possono investire nella produzione di spermatozoi (Jacot *et al.*, 2004; Skau & Folstad, 2005). Sebbene vi sia un crescente numero di evidenze, soprattutto in uccelli e insetti, della presenza nei maschi di compromessi tra l'investimento riproduttivo e la funzionalità del sistema immunitario (Blount *et al.*, 2003; Faivre *et al.*, 2003; Simmons & Roberts, 2005), le conoscenze risultano ancora scarse e necessitano di essere estese ad altri sistemi. Inoltre, sebbene spesso vengano considerati come un singolo tratto, anche la qualità dell'eiaculato e il sistema immunitario sono costituiti da differenti elementi, che, a loro volta, possono essere legati da correlazioni positive o da compromessi. Infatti la qualità dell'eiaculato è caratterizzata da diversi parametri, quali il numero di spermatozoi, le loro dimensioni, velocità e vitalità, tutte caratteristiche che possono influenzare la fertilità del maschio e possono essere legate tra loro da relazioni negative (Parker, 1993; Ball & Parker, 1996; Owen & Clayton, 2007). Anche la difesa immunitaria è rappresentata da un sistema complesso di differenti elementi, e l'investimento relativo nelle diverse componenti può essere il risultato di diversi gradi di compromesso nell'allocatione delle risorse (Schmid-Hempel, 2003).

La difesa immunitaria è composta da una difesa innata e da una difesa cosiddetta acquisita, rappresentata fondamentalmente dalla produzione di immunoglobuline (Lieschke & Trede, 2009). Nei Teleostei l'immunità acquisita è fortemente legata alla temperatura e piuttosto lenta, impiegando nella risposta, nelle specie temperate, in media 4-6 ma fino a 12

settimane, con il risultato che un'infezione può seriamente compromettere la vita di un individuo prima che questo sia in grado di produrre le appropriate immunoglobuline (Ellis 2001; Magandottir, 2006). Nei pesci è quindi l'immunità innata, fondamentale l'azione fagocitica, l'attività del lisozima e del complemento, che svolge un ruolo predominante nella difesa dalle infezioni, e mostra un grado di complessità, anche a livello dei suoi meccanismi regolativi, superiore rispetto ai mammiferi (Ellis 2001; Magandottir, 2006). Particolarmente importante nei pesci sembra essere la risposta del complemento che, in seguito all'attivazione da parte di un antigene *non self*, provoca la risposta delle cellule della linea leucocitaria. La risposta all'infezione provoca una variazione nel profilo della composizione delle cellule leucocitarie, con un aumento del numero dei granulociti e un contemporaneo abbassamento della presenza di linfociti (Ellsaesser & Clem, 1986; Bly *et al.*, 1990; Pulsford *et al.*, 1994; Harris & Bird, 2000). La risposta all'infezione è principalmente dovuta alla produzione da parte delle cellule del sistema immunitario innato di ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>), specie reattive dell'ossigeno che risultano avere azione distruttiva verso i patogeni, ma che possono anche provocare danni all'organismo stesso (Ahmad, 1995; Victor *et al.*, 2004; Vajdovich, 2008). La produzione di NO<sub>x</sub> non controllata può infatti portare alla morte cellulare e alla apoptosi delle cellule della linea leucocitaria (Guzik *et al.*, 2003). Un innalzamento dei livelli di NO<sub>x</sub> circolanti può anche risultare come conseguenza di stress non di tipo immunitario ma metabolico. Ad esempio è stato dimostrato che un alto investimento riproduttivo porta ad un innalzamento del metabolismo con un conseguente aumento di radicali liberi circolanti (von Shantz *et al.*, 1999; Nilsson, 2002; Wiersma *et al.*, 2004).

Lo scopo di questa parte della ricerca è stato valutare, in *S. pavo*, quali fossero i rapporti tra l'investimento di accoppiamento e quello parentale, in relazione anche allo stato del sistema immunitario. Per questo, in un gruppo di maschi, è stato confrontato l'investimento in cure parentali e nello sviluppo dei caratteri sessuali pre- e post-copulatori con lo stato del loro sistema immunitario. Queste caratteristiche maschili sono state messe in relazione al successo di accoppiamento, al fine di valutare se l'investimento differenziale verso i differenti tratti potesse conferire vantaggi o svantaggi nel successo riproduttivo. Per ciascun investimento considerato (parentale, caratteri pre- e post-copulatori e sistema immunitario) sono stati analizzati diversi tratti, per valutare la presenza o meno di compromessi intra-investimento. In particolare per l'eiaculato sono stati valutati il numero degli spermatozoi, la loro velocità e vitalità. Per il sistema immunitario sono stati considerati solo parametri dell'immunità innata, data la loro importanza nei pesci, quale la conta dei componenti cellulari e i livelli di ossidi di azoto.

## MATERIALI E METODI

Nei mesi di luglio e agosto 2009 sono stati marcati con un cartellino recante un codice identificativo individuale 62 nidi (15 in Sottomarina e 47 in Casone) scelti casualmente tra quelli presenti nei due siti. Su tutti i nidi marcati nel sito di Sottomarina e su un sottocampione di 17 nidi scelti casualmente tra quelli marcati nel sito del Casone, sono state compiute osservazioni per valutare l'intensità delle cure parentali dei maschi sulle proprie uova. Sono state fatte 6 osservazioni in subacquea per ogni maschio della durata di 15 minuti ciascuna, dislocate casualmente tra le ore 10<sup>00</sup> e le ore 18<sup>00</sup>. L'operatore si poneva ad una distanza di circa 50 cm dal nido e, atteso un periodo di 10 minuti per far abituare l'individuo alla sua presenza, misurava attraverso cronometro la durata dei diversi comportamenti e li registrava su una tavoletta in plastica. I comportamenti registrati sono stati:

- tempo totale trascorso all'interno del nido,
- tempo trascorso fuori dal nido per corteggiamento,
- tempo trascorso fuori dal nido per difesa da altri maschi,
- tempo trascorso fuori dal nido per altre attività,
- tempo di ventilazione delle uova,
- numero di atti di spalmatura delle uova,
- numero di atti di pulizia del nido da detriti,
- numero di femmine osservate in vicinanza del nido del maschio (distanza inferiore ai 50 cm)
- numero di femmine che effettuavano display di corteggiamento verso il maschio osservato (esibizione della pancia, rapidi movimenti respiratori e ventilazione con pinne pettorali) (Patzner *et al.*, 1986; Almada *et al.*, 1995; Pizzolon, osservazioni personali).

Per ognuno dei 47 nidi marcati nel sito del Casone, sono inoltre stati individuati i 20 nidi ad esso più vicini e quindi rilevate le rispettive distanze da esso. L'operazione è stata effettuata in subacquea attraverso l'utilizzo di una cordella metrica con precisione di 1 cm.

Al termine del periodo di osservazioni, tutti i 62 maschi occupanti i nidi marcati sono stati catturati unitamente al proprio nido. La cattura è stata eseguita in subacquea mediante l'utilizzo di retini e sacchetti di plastica trasparente. I maschi e i nidi sono stati immediatamente trasportati presso la Stazione Idrobiologica dell'Università di Padova, in Chioggia (Venezia) dove sono state eseguite tutte le analisi. I nidi sono stati fotografati con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7,2 Megapixel) e successivamente trasferiti in vasche con acqua marina a temperatura di  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e areazione continua sino alla schiusa delle uova; le larve sono state quindi liberate nell'ambiente di provenienza dei nidi stessi. Gli animali sono stati anestetizzati con MS222 (Sandoz), pesati (con bilancia di precisione 0,01 g), fotografati con fotocamera digitale (Olympus  $\mu$ 750, 7,2 Megapixel). Sui 32 maschi osservati in natura sono stati inoltre eseguiti prelievi di sperma e di sangue. L'operazione di spremitura dell'ejaculato e di prelievo del sangue in alcuni casi non è riuscita a produrre quantità di campioni sufficienti per eseguire le analisi. In particolare i campioni sono risultati

sufficienti per le analisi in: 30 individui (15 da Sottomarina, 15 dal Casone) per lo striscio di sangue e conta leucocitaria; 22 individui (11 da Sottomarina; 11 dal Casone) per l'analisi del contenuto di NO<sub>x</sub>; 29 individui (14 Sottomarina, 15 dal Casone) per l'analisi dell'eiaculato.

Sono state scattate inoltre fotografie particolareggiate della cresta di ciascun maschio posto in vaschetta trasparente durante la fase di risveglio, nella quale riemerge la colorazione nuziale gialla della cresta (Capitolo I). Attraverso l'analisi delle fotografie sono stati raccolti dati relativi alle dimensioni e caratteristiche dei maschi e dei nidi (Capitolo I). In particolare sono state raccolte le misure di:

- maschio - lunghezza totale (LT) e standard (LS), area della cresta (AC), area delle ghiandole anali (AG), area della macchia gialla della cresta (AMC);
- nido - l'area complessiva (AN), l'area ricoperta dalle uova (AU), numero di uova presenti (NU) e il numero di ovature sulla base del diverso stadio di sviluppo (NOV).

La misurazione dell'area gialla della cresta è stata possibile solo per un sottocampione di 26 individui (14 Sottomarina, 12 Casone).

Tutti gli animali sono sopravvissuti alla cattura e ai trattamenti, al termine dei quali sono stati liberati negli stessi siti di provenienza.

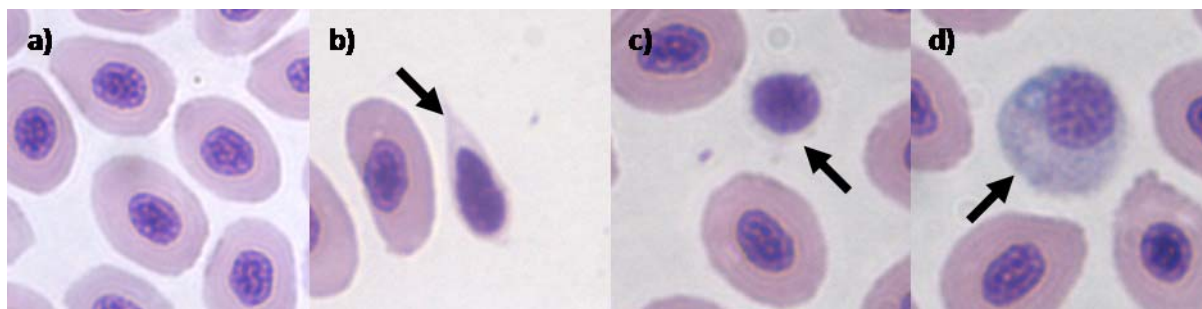
### ***Analisi del campione di sangue***

Il prelievo di sangue è stato eseguito dalla vena caudale con ago 27 G da 12 mm (Biotekne) montato su siringa da 2,50 ml (Nipro). Sono stati prelevati per ciascun maschio circa 70 µl di sangue, che sono stati utilizzati per effettuare una misura della quantità di nitriti e nitrati (NO<sub>x</sub>) circolanti e una conta delle diverse linee cellulari del sangue. Dal campione sono stati immediatamente prelevati 8 µl di sangue per eseguire due strisci di sangue, e 5 µl per fare una conta leucocitaria. Il campione di sangue rimanente è stato poi centrifugato a 2000 rpm per 5 minuti alla temperatura di 4°C. Il plasma estratto come soprannatante è stato prelevato, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C sino al momento delle analisi del NO<sub>x</sub>. Per impedire la coagulazione del sangue durante il prelievo e nelle fasi successive, sia la siringa, sia la microprovetta sono state lavate con EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) (Sigma-Aldrich) al 2% in acqua distillata.

Lo striscio di sangue è stato ottenuto depositando una goccia di sangue (4 µl) su un vetrino portaoggetti. La goccia è stata distribuita su tutta la superficie del vetrino con l'aiuto di un secondo vetrino portaoggetti in modo da creare un monostrato cellulare. Il preparato è stato quindi colorato con colorazione Wright-Giemsa (WG) modificata Accustain. Il vetrino è stato immerso in WG (Sigma-Aldrich) per 1 minuto e successivamente in tampone Na-fosfato [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,63 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,31g/l; ph 7,2] per 5 minuti. Una volta asciugato è stato montato il vetrino copri oggetto e fissato con resina sintetica (Eukitt). Il campione è stato quindi osservato con microscopio ottico ad ingrandimento 1000x con olio da immersione ed è stata effettuata la conta delle diverse componenti della linea leucocitaria, identificate sulla base della diversa colorazione e delle caratteristiche citologiche (Fig. 4.1). In particolare sono stati contati separatamente i linfociti e i granulociti. La conta è stata effettuata su un totale di

cento cellule, e per ciascun individuo sono state effettuate due repliche e per le successive analisi è stato utilizzato il valore medio.

La conta delle cellule del sangue in ematocitometro è stata eseguita attraverso una doppia colorazione (neutral red e crystal violet) secondo la metodologia proposta da Shaw (1930). Cinque microlitri di sangue sono stati addizionati di 40  $\mu\text{l}$  di soluzione A [Neutral red 0,25 g/l; NaCl 8,80 g/l] e a 200  $\mu\text{l}$  di soluzione B [Crystal violet 0,12 g/l, Na-citrato 32,00 g/l, Formaldeide 0,4%]. Sono stati dosati 7  $\mu\text{l}$  della soluzione ottenuta nella camera di conteggio dell'ematocitometro (camera Neubauer modificata; profondità 0,1 mm) e osservati a ingrandimento 400x. Sono stati identificati e contati gli eritrociti in 5 quadrati di conteggio E (area=0,04 mm<sup>2</sup>), e i trombociti e le cellule della linea leucocitaria in 4 quadrati di conteggio L (area=1 mm<sup>2</sup>). Il numero di cellule per microlitro di sangue è stato ottenuto dividendo il risultato del conteggio per il volume di sangue dell'area di conta (quadrati L=4 mm<sup>2</sup>; quadrati E=0,2 mm<sup>2</sup>) e il fattore di diluizione utilizzato.



**Fig. 4.1** – cellule del sangue colorate con doppia colorazione (*neutral red* e *crystal violet*) osservati a ingrandimento 400x: eritrociti (a), trombociti (b), linfociti (c) e granulociti (d).

Analisi NO<sub>x</sub>. Per valutare i livelli di nitriti e nitrati presenti nei campioni di sangue è stata utilizzata un saggio colorimetrico non enzimatico (Sild & Hōrak, 2009) utilizzando il kit *Colorimetric Non-enzymatic Assay for Nitric Oxide* (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, U.S.A.).

Dieci  $\mu\text{l}$  di sangue sono stati diluiti in 180  $\mu\text{l}$  di acqua distillata e quindi deproteinizzati mediante aggiunta di 10  $\mu\text{l}$  di soluzione di ZnSO<sub>4</sub> (30% gr/l) in acqua distillata e incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente. Quindi i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti, e raccolto il sopranatante. Il sopranatante è stato quindi aggiunto a 0,5 gr di granuli di Cadmio precedentemente trattato e lasciati incubare *over night* a temperatura ambiente affinché i nitrati venissero ridotti a nitriti. Il trattamento dei granuli di cadmio consisteva in 2 ripetuti lavaggi in acqua distillata, seguiti da 2 lavaggi in soluzione di HCl 0,1 M e successivamente 2 lavaggi in soluzione NaH<sub>4</sub>OH 0,1 M (Mani *et al.*, 2002).

Il giorno successivo i campioni sono stati trasferiti in provette pulite e centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti. Il sopranatante raccolto (50  $\mu\text{l}$ ) è stato trasferito in pozzetti di micropiastra e diluito con 50  $\mu\text{l}$  di acqua distillata, quindi sono stati aggiunti a 50  $\mu\text{l}$  di reagente 1 (Sulfanilamide sciolta in HCl 3 M) e 50  $\mu\text{l}$  di reagente 2 (etilenediammine

diidrocloride sciolta in H<sub>2</sub>O deionizzata) e lasciato incubare per 5 minuti a temperatura ambiente su piatto agitatore. In seguito è stata letta l'assorbanza a 540 nm dei campioni così preparati su lettore a micro piastra. Per ogni campione sono state ripetute 2 repliche e per le successive analisi è stato utilizzato il valore medio.

La concentrazione degli ossidi di azoto è stata ricavata da confronto dei dati ricavati dalla lettura con una curva di taratura costruita con le letture a 540 nm di 8 diverse diluizioni preparate a partire da uno standard di NaNO<sub>2</sub> 500pmol/μl.

### ***Analisi dell'ejaculato***

L'ejaculato è stato utilizzato per ricavare le misure di numerosità, velocità e vitalità degli spermatozoi secondo le metodiche di prelievo e analisi descritte nei Materiali e Metodi del Capitolo II A.

### ***Analisi statistiche***

Tutti i dati sono presentati come il valore minimo e il valore massimo; tra parentesi vengono indicate media ± deviazione standard. I test parametrici o non parametrici sono stati applicati sulla base della distribuzione dei dati e i vincoli dei test. La normalità della distribuzione dei dati è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk e, se non distribuiti normalmente, i dati sono stati trasformati su base logaritmica (Sokal & Rohlf, 1997).

I comportamenti dei maschi in natura sono stati calcolati come media tra i valori registrate nelle 6 osservazioni compiute. Poiché le ghiandole anali rappresentano una componente importante per la sopravvivenza delle uova, è stato calcolato un indice di investimento parentale utilizzando un'analisi delle componenti principali sulle dimensioni delle ghiandole e la frequenza di ventilazione, spalmatura, e pulizia del nido (dati trasformati su base logaritmica). La componente estratta che è risultata avere l'autovalore maggiore di 1 è stata usata per valutare le relazioni tra l'investimento parentale e le altre caratteristiche del maschio. Le correlazioni tra i parametri misurati sono state valutate attraverso un'analisi delle correlazioni di Pearson.

Per discriminare le variabili predittive importanti del numero di femmine che facevano display di corteggiamento ai maschi è stata usata una regressione multipla a migliori sottoinsiemi utilizzando l'indice Cp di Mallows come criterio per scegliere il miglior sottoinsieme di effetti predittivi

Tutti i test statistici sono stati eseguiti con il software STATISTICA 7.1 (StatSoft).



## RISULTATI

I maschi osservati in natura (n=32) hanno trascorso tra il 67,40% e il 100% del tempo totale di osservazione dentro il nido (media  $\pm$  deviazione standard:  $95,50 \pm 7,30\%$ ), ventilando le uova tra il 2,82% e il 90,00% del tempo ( $33,80 \pm 22,40\%$ ), strofinando la regione urogenitale sulle uova (spalmatura) tra le 0,01 e le 1,20 volte al minuto ( $0,18 \pm 0,18$  spalmature/min) e ripulendo il nido dai detriti con la bocca tra le 0 e le 0,60 volte al minuto ( $0,06 \pm 0,06$ ). Attorno al nido di ciascun maschio sono transitate tra le 0,02 e le 0,60 femmine al minuto ( $0,24 \pm 0,18$  fem.intorno/min) e ciascun maschio ha ricevuto tra 0 e 0,60 display di corteggiamento femminili al minuto ( $0,12 \pm 0,12$  fem.display/min).

Il numero medio di femmine che eseguivano display di corteggiamento ai maschi è risultato positivamente correlato alle dimensioni della cresta dei maschi, espressa come area totale (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,47$ ;  $p<0,05$ ;  $n=32$ ) (Fig. 4.2 a), alla frequenza di spalmatura (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,63$ ;  $p<0,01$ ;  $n=32$ ) (Fig. 4.2 b) e al numero di uova presenti all'interno dei nidi (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,63$ ;  $p<0,01$ ;  $n=32$ ). Non sono risultate correlazioni tra il numero di femmine che eseguivano display e gli altri parametri relativi al maschio o al nido considerati. La regressione multipla a miglior sottoinsieme tra il numero di femmine che esibiscono display (variabile dipendente) e l'area della cresta, il tasso di spalmatura e il numero di uova (predittori) ha indicato che il numero di femmine che fanno display è correlato positivamente con le dimensioni della cresta e il tasso di spalmatura ( $FD=0,2538*TS+0,0022*AC-0,0002$ ;  $AC: r^2=0,10$ ,  $p<0,05$ ;  $r_{multiplo}=0,70$ ;  $p<0,01$ ;  $AC: F=4,9$ ;  $p<0,05$ ;  $RR: F=14,5$ ,  $p<0,01$ ;  $n=32$ ).

Le dimensioni delle ghiandole anali sono risultate correlate al rapporto tra il numero dei granulociti e il numero dei linfociti circolanti (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,72$ ;  $p<0,01$ ;  $n=30$ ) (Fig. 4.2 c). Inoltre è emersa una correlazione positiva tra la frequenza di spalmatura del secreto delle ghiandole e la concentrazione di nitriti e nitrati nel sangue (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,48$ ;  $p<0,05$ ;  $n=22$ ). Nessuna correlazione è risultata invece essere presente tra gli altri tratti maschili analizzati e i parametri del sistema immunitario considerati.

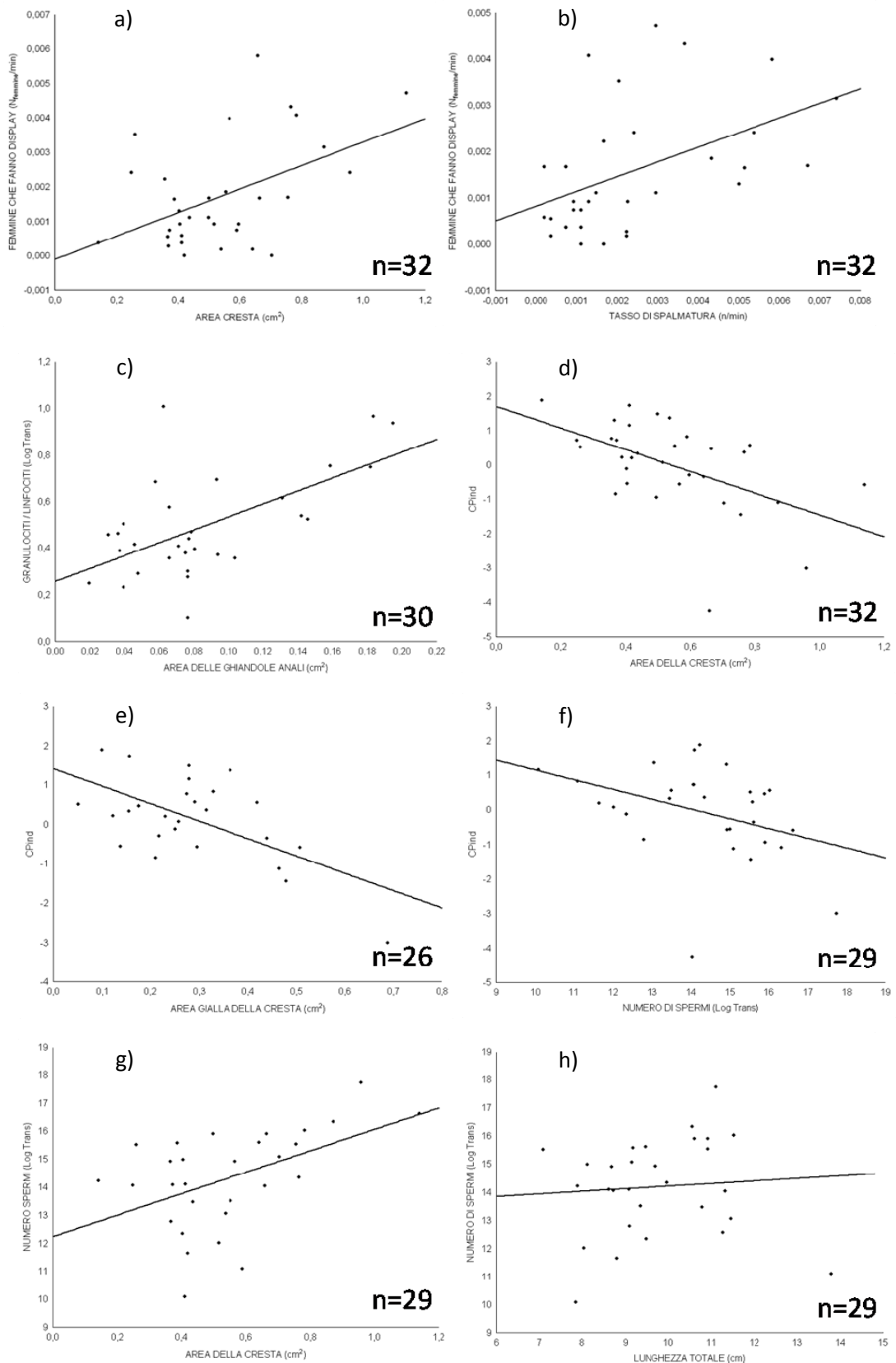
Per quanto riguarda l'indice di cure parentali, la prima componente estratta dall'analisi delle componenti principali spiega 41,75% (CPind). Il CPind è risultato negativamente correlato all'area della cresta cefalica (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=-0,53$ ,  $p<0,01$ ;  $n=32$ ) (Fig. 4.2 d) e con l'area della macchia gialla della cresta (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=-0,60$ ;  $p<0,01$ ;  $n=26$ ) (Fig. 4.2 e). L'indice di cure parentali è risultato inoltre correlato negativamente con il numero di spermatozoi presenti nell'eiaculato spremuto (coefficiente di correlazione di Spearman;  $r=-0,38$ ;  $p<0,05$ ;  $n=29$ ) (Fig. 4.2 f). Non sono risultate correlazioni significative tra l'indice di cure parentali e gli altri parametri relativi al maschio o al nido considerati.

Il numero di spermatozoi è risultato inoltre correlato positivamente con le dimensioni della cresta cefalica (AC) (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,59$ ;  $p<0,01$ ;  $n=29$ ) (Fig. 4.2

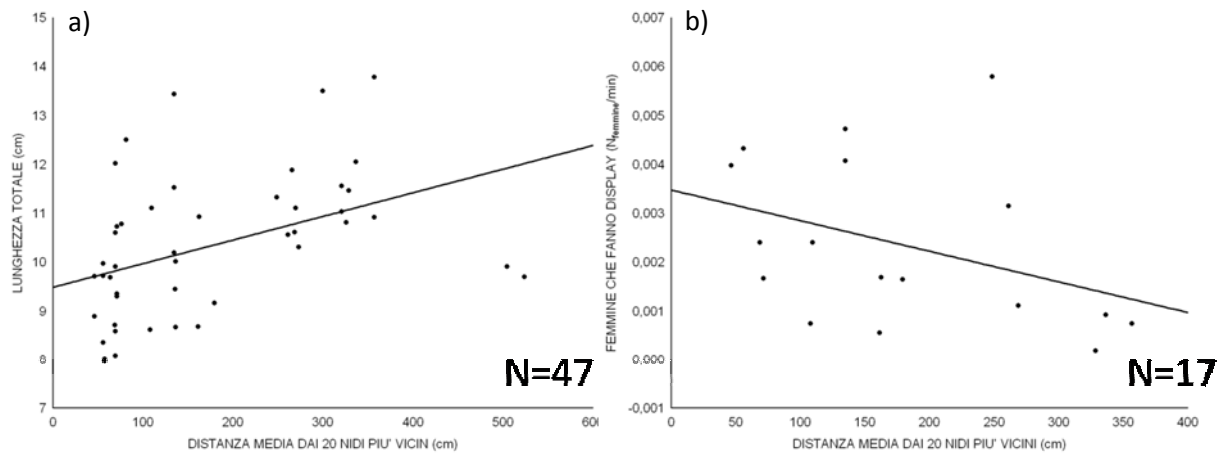
g). Le dimensioni corporee, cui lo sviluppo della cresta è positivamente correlato (Capitolo I) non sono invece risultate in relazione al numero di spermatozoi prodotti (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=0,22$ ;  $p=0,27$ ;  $n=29$ ) (Fig. 4.2 h) così come nessun altro tra i tratti considerati, inclusi i parametri del sistema immunitario.

Non sono risultate inoltre correlazioni significative, né positive, né negative, tra i diversi parametri dell'eiaculato considerate, ad eccezione delle diverse forme di velocità misurate, che sono risultate tutte altamente correlate positivamente tra loro (coefficiente di correlazione di Spearman: VAP-VSL:  $r=0,98$ ;  $p<0,01$ , VAP-VCL:  $r=0,99$ ;  $p<0,01$ ; VSL-VCL:  $r=0,98$ ;  $p<0,01$ ;  $n=29$ ).

I nidi dei maschi nel sito del Casone avevano una distanza media rispetto ai 20 nidi più vicini tra i 46 cm e i 524 cm (media  $\pm$  deviazione standard:  $174\pm 127$  cm). La distanza media dagli altri nidi è risultata correlata sia alla lunghezza del maschio, sia allo sviluppo dei CSS (coefficiente di correlazione di Spearman: LT:  $r=0,49$ ,  $p<0,01$  (Fig. 4.3 a); AC:  $r=0,34$ ;  $p<0,05$ ; AG:  $r=0,38$ ,  $p<0,01$ ;  $n=47$ ) e con le caratteristiche del nido (coefficiente di correlazione di Spearman: AN:  $r=0,41$ ,  $p<0,01$ ; NU:  $r=0,35$ ,  $p<0,05$ ;  $n=47$ ). I maschi più grandi quindi, che hanno CSS più sviluppati e difendono nidi di maggiori dimensioni al cui interno è presente un maggior numero di uova, sono risultati più isolati rispetto agli altri. Il numero di femmine medio intorno ai nidi è risultato negativamente correlato con la distanza media dagli altri nidi (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=-0,62$ ;  $p<0,01$ ;  $n=17$ ) (Fig. 4.3 b), mentre non sono risultate correlazioni significative tra la distanza dagli altri nidi e il numero di femmine che fanno display, anche se emersa una tendenza che indica che i maschi più isolati ricevano un numero minore di femmine (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r=-0,38$ ;  $p=0,13$ ;  $n=17$ ).



**Fig. 4.2** – Relazione fra il numero di display femminili ricevuti dai maschi e le dimensioni della loro cresta (AC) (a) e il tasso di spalmatura (b). Relazioni tra le dimensioni delle ghiandole anali e il rapporto granulociti/linfociti (c). Relazione tra l'indice di cure parentali calcolato considerando tutte le attività di cura sulle uova e le dimensioni della cresta (AC) (d), le dimensioni dell'area gialla della cresta cefalica (e) e il numero di spermatozoi presenti nell'eiaculato spremuto (f). Relazione tra il numero di spermatozoi presenti nell'eiaculato spremuto e le dimensioni della cresta (AC) (g) e la lunghezza totale del maschio.



**Fig. 4.3** –Relazioni tra la distanza media tra il nido del maschio e i 20 nidi più vicini e la lunghezza del maschio (a) e il numero di display di corteggiamento

## DISCUSSIONE

Questo studio ha mostrato che, in *S.pavo*, i maschi attuano un compromesso tra l'investimento parentale e l'investimento per l'accoppiamento. Infatti i maschi che sono risultati allocare maggiori risorse in attrattività, sviluppando una cresta cefalica più estesa, sia a livello della sua area complessiva che nelle dimensioni della macchia gialla, sono risultati anche i maschi che meno investono nelle cure parentali sulle uova. Un ulteriore compromesso è emerso tra l'investimento parentale dei maschi e la condizione generale dell'individuo, dato che gli individui i cui tratti coinvolti nelle cure parentali hanno espressione maggiore mostrano anche valori più elevati dei parametri coinvolti nella immunità innata e/o lo stress.

Le dimensioni delle ghiandole anali sono risultate correlate al rapporto fra il numero di granulociti e quello dei linfociti, un parametro che viene comunemente indicato come un indice di stress o di infezione degli individui (Ellsaesser & Clem, 1986; Bly *et al.*, 1990; Pulsford *et al.*, 1994; Harris & Bird, 2000). La correlazione emersa indica quindi che animali con ghiandole più sviluppate sono in peggiori condizione di salute e/o sottoposti a maggiore stress. Inoltre il tasso di spalmatura sulle uova, una componente importante delle cure parentali dato che con questo comportamento il secreto antibatterico delle ghiandole anali viene rilasciato sulle uova, è risultato correlato con la concentrazione di nitriti e nitrati circolanti nel sangue. Anche questa misura è considerata un buon indicatore di condizione nei vertebrati (Sild & Hõrak, 2009), in quanto è stato osservato come condizione di stress, sia di tipo immunitario, ma anche metabolico, portino ad una aumento dei livelli di NO<sub>x</sub> circolanti (Guzik *et al.*, 2003; Hõrak *et al.*, 2007; Alonso-Alvarez *et al.*, 2008). Sembra quindi che i maschi che hanno allocato maggiori risorse nella protezione delle uova lo hanno fatto a scapito del mantenimento generale dell'organismo con un conseguente incremento dello stato di stress. Questo risultato trova sostegno in quanto riportato per una popolazione portoghese di queste specie, in cui i maschi che svolgono cure parentali riducono il proprio peso corporeo e la crescita (Gonçalves & Almada, 1997).

I maschi che più investono in cure parentali mostrano una minor espressione della cresta cefalica (sia in dimensioni che in colorazione gialla) e producono meno spermatozoi, risultato questo che fa emergere un compromesso tra l'investimento per l'accoppiamento (sia pre- che post-copulatorio) e per la cura delle uova. Le cure parentali in questa specie infatti sottraggono tempo e opportunità ai maschi per il foraggiamento (Almada *et al.*, 1994; Gonçalves & Almada, 1998) e questo potrebbe compromettere le condizioni di salute del maschio, precludendone di fatto la possibilità di sviluppare una cresta molto colorata (Hamilton e Zuk, 1982), che, come dimostrato precedentemente, è un tratto legato alla condizione dell'individuo (Capitolo II A). Le condizioni di affaticamento degli individui porterebbero ad un conseguente aumento dello stress ossidativo (Milinski & Bakker, 1990; Belthoff *et al.*, 1994; Brawner *et al.*, 2000; Blount *et al.*, 2001; Landys *et al.*, 2006; Cote *et al.*, 2008), dimostrato in questo lavoro in particolare per l'investimento maschile nella protezione antimicrobica delle uova. Questa condizione porterebbe alla mobilitazione di

antiossidanti (Ellsaesser & Clem, 1986; Bly *et al.*, 1990; Pulsford *et al.*, 1994; Harris & Bird, 2000), in particolare dei carotenoidi a cui è probabilmente dovuta la colorazione della cresta, sia per attivare direttamente il sistema immunitario (Blount *et al.*, 2003; McGraw & Ardia, 2003; Fitze *et al.*, 2007), sia per contrastare i danni provocati dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno (Milinski & Bakker, 1990; Brawner *et al.*, 2000; Blount *et al.*, 2001; Cote *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda la cresta cefalica, le sue dimensioni non sono legate alla condizione e/o allo stato di salute dei maschi, come evidenziato dagli esperimenti di sfida immunitaria (Capitolo II A) e quindi ci si potrebbe attendere che non risultino correlate negativamente con lo sforzo in cure parentali. Se, infatti, l'allocazione energetica nella produzione di cure parentali maggiori porta ad una riduzione delle risorse verso la produzione di tratti condizione dipendenti come la colorazione della cresta (Andersson, 1994; Magrath & Komdeur, 2003), questa allocazione energetica non dovrebbe influire sulle dimensioni complessive della cresta. Invece il compromesso osservato tra l'investimento in cure parentali e l'area della cresta, suggerisce che anche le dimensioni della cresta, e non solo la sua colorazione, siano legate alla condizione del maschio. L'area della cresta cefalica, ma non la taglia degli individui a cui essa è positivamente legata (Capitolo I), risulta correlata con un parametro qualitativo dell'eiaculato, in particolare con il numero di spermatozoi. La correlazione tra espressione dei CSS e una o più qualità dell'eiaculato è prevista dalla "*phenotype-linked fertility hypothesis*" (Sheldon, 1994), secondo cui alcuni ornamenti avrebbero la funzione di segnalare direttamente alla femmina l'efficienza di fecondazione del maschio. Tuttavia perché un tratto risponda ai requisiti di questa teoria, la scelta femminile basata su questo ornamento dovrebbe conferirle il reale vantaggio di un miglior tasso di fecondazione delle proprie uova (Pilastro *et al.*, 2008). Nel caso di *S. pavo*, non conoscendo la resa di fecondazione dei maschi analizzati, non è possibile dire se gli eiaculati di miglior qualità siano realmente in grado di conferire benefici alla femmina. Un'ipotesi alternativa è che l'area della cresta sia legata ad una miglior qualità generale del maschio, derivata ad esempio da un miglior sviluppo o da un miglior foraggiamento nel corso della crescita, e che questo essere di miglior qualità sia la ragione intrinseca per cui maschi con creste più sviluppate sono in grado di produrre eiaculati di migliori (Yasui, 1997). Mentre la colorazione della cresta è dipendente dalle condizioni presenti dell'individuo, le sue dimensioni complessive potrebbero essere riconducibili ad uno sviluppo più lento ed essere quindi relazionate alle condizioni dell'individuo su una scala temporale più lunga (Møller, 1998).

Il compromesso tra l'investimento in cure parentali e le dimensioni della cresta/la qualità dell'eiaculato potrebbe essere riconducibile al fatto che gli individui che più hanno investito in cure parentali nel corso della stagione, abbiano subito una riduzione, o non siano riusciti a ben sviluppare la cresta/produrre spermatozoi. Gli animali analizzati infatti sono stati catturati ad agosto, dopo quindi almeno due mesi di stagione riproduttiva. Questa ipotesi comporta che la strategia per la scelta tra l'investimento parentale e quello per l'accoppiamento rimanga relativamente stabile nel corso di tutta la stagione, e che esistano quindi differenti tipologie di maschi, una che investe maggiormente in attrattività e fertilità,

e una che impegna maggiori risorse nelle cure parentali. Se le dimensioni della cresta sono invece determinate geneticamente, o legate ad un miglior sviluppo ontogenetico, i maschi che non sono dotati di cresta di grandi dimensioni, e risultano quindi sfavoriti nell'attrarre le femmine, potrebbero investire maggiormente in termini di cure parentali per aumentare il loro più scarso successo riproduttivo, aumentando la sopravvivenza della propria prole, come dimostrato in altre specie (per *review* vedi: Stiver & Alonzo, 2009). Anche in questo caso la tattica allocativa utilizzata dai maschi risulterebbe relativamente fissa nel corso della stagione. È interessante notare a questo proposito che le cure parentali non sono mai risultate correlate alle dimensioni dell'ovatura difesa, in nessuno dei tratti considerati, ad eccezione delle dimensioni delle ghiandole, che sono risultate correlate al numero di uova presenti all'interno del nido (Capitolo I). Questa relazione sembra però essere dovuta alla preferenza delle femmine per questo tratto, e non a un maggiore sviluppo dei maschi in seguito alla difesa di ovature più numerose. L'investimento dei maschi in cure parentali sembra quindi dovuto a caratteristiche del maschio stesso, e non un comportamento che si adatta in funzione del bisogno di cure da parte dell'ovatura. Tuttavia, non essendo a conoscenza della storia pregressa degli individui, i dati non permettono di valutare quale tra queste o eventuali altre ipotesi possa essere la più idonea a spiegare le relazioni incontrate.

L'investimento riproduttivo dei maschi di *S. pavo* sembra rispondere al modello di allocazione differenziale, in cui i maschi che investono maggiormente nello sviluppo di ornamenti compiono minori cure parentali (Burley 1986). Secondo i modelli teorici, perché questa ipotesi sia evolutivamente stabile, i benefici in termini di sopravvivenza della prole derivati dalla trasmissione genetica delle qualità paterne dovrebbero essere superiori rispetto a quelli dati da un maggior apporto di cure parentali (Kokko, 1998). Il vantaggio dato dal secreto delle ghiandole anali sembra consistente (Capitolo II B), ma non sono disponibili dati relativi alla sua importanza in natura. Infatti nel condurre i test di sopravvivenza delle uova sono state usate condizioni in cui la carica batterica era superiore a quella naturale, proprio al fine di amplificare la funzione antimicrobica delle ghiandole. Inoltre non esistono dati sull'apporto dato dalle altre componenti delle cure parentali (ventilazione e pulizia) alla sopravvivenza e al corretto sviluppo delle uova. Sembra comunque improbabile che l'apporto in termini di sopravvivenza dato alle uova dalle cure parentali sia basso, considerato anche il forte investimento (soprattutto come tempo trascorso dentro al nido) che proteggere le uova in natura comporta per i maschi. Se quindi l'aumento di sopravvivenza dato dalle cure maschili risulta importante, allora ne consegue che anche i vantaggi dati dall'accoppiarsi con maschi con ornamenti molto sviluppati dovrebbero essere elevati, o, alternativamente, tutti i maschi dovrebbero comunque investire in cure parentali un certo livello di risorse che garantisca una elevata sopravvivenza alla prole, in modo che la differenza tra i vantaggi o le cure parentali apportate da maschi che investono molto e i maschi che investono poco non risulti elevata.

È stato inoltre proposto che l'allocazione differenziale maschile possa essere mantenuta dalla presenza della scelta differenziale tra le femmine (Candolin, 2003). La variabilità nella preferenza femminile per un tratto rispetto ad un altro potrebbe infatti portare ad una diminuzione delle pressioni selettive sui diversi tratti, e permetterne quindi la

contemporanea presenza (Brooks & Endler, 2001°, b; Candolin, 2003). Vi sono evidenze che in alcune specie femmine diverse possano valutare con pesi diversi le diverse qualità dei maschi, con alcune che scelgono sulla base di benefici diretti, mentre altre basano la propria scelta su tratti legati a benefici indiretti (Searcy, 1992; Hasselquist *et al.*, 1996; Scheldon *et al.*, 1997). La preferenza femminile in *S. pavo* sembra basarsi sia su tratti legati a benefici diretti per la prole, sia a caratteri legati al potere attrattivo/fertilità dei maschi. Le femmine osservate hanno infatti cercato di accoppiarsi con maggiore frequenza sia con i maschi che avevano cresta con area maggiore, che con quelli che spalmavano maggiormente le uova con il secreto delle ghiandole anali e avevano un maggior numero di uova all'interno del nido. La preferenza femminile basata sul numero di uova è ampiamente diffusa tra i teleostei (Marconato & Bisazza, 1986; Petersen, 1989; Kraak & Videler, 1991; Petersen, 1995, Forsgren *et al.*, 1996; Goulet, 1997), ed è favorita da diversi vantaggi adattativi (Ridley, 1978; Sargent, 1988; Manica, 2003). Sebbene questa preferenza sia stata già descritta in *S. pavo* (Fagundes *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009), i dati qui raccolti indicano che nella popolazione studiata, essa, se esiste, non dovrebbe rappresentare una componente cruciale della scelta femminile. Infatti l'analisi attraverso la regressione multipla l'ha esclusa dai tratti che predicano la frequenza con cui maschi ricevono display dalle femmine. Inoltre, quando le femmine corteggiano i maschi non sono a diretta conoscenza di quante uova sono presenti nel nido, in quanto per loro risulta impossibile valutarne direttamente il numero di uova dall'esterno (Pizzolon, osservazioni personali). La correlazione tra il numero di uova e il numero di display ricevuti sembra quindi dovuta al fatto che maschi che ricevono con maggiore frequenza tentativi di accoppiamento da parte delle femmine hanno anche un maggiore successo di accoppiamento, e quindi più uova nel nido, e non ad una preferenza diretta per questa caratteristica del nido.

La scelta sulle basi di un carattere attrattivo come l'area delle creste potrebbe portare all'acquisizione di benefici indiretti per la prole, se questa caratteristica, o possibili qualità ad essa legate, possono essere trasmessa alla prole. Questa preferenza porta però come diretta conseguenza il costo di accoppiarsi con un maschio che investe meno nelle cure parentali e, potenzialmente, ad una minore sopravvivenza delle proprie uova. La scelta invece basata sul tasso di spalmatura delle uova potrebbe conferire vantaggi in termini di benefici diretti, se ad una maggiore frequenza di spalmatura corrisponde una maggiore deposizione di sostanze antimicrobiche sulle uova, e conseguentemente una maggiore protezione per questa da infezioni e parassiti (Capitolo II B). Questa scelta però va a discapito di accoppiarsi con maschi attraenti, e di acquisire quindi i benefici che possono essere legati a creste di maggiori dimensioni. Sarebbe quindi interessante poter valutare se anche nel caso di *S.pavo* esista una scelta differenziale femminile. Alternativamente la scelta basata sul tasso di spalmatura potrebbe essere dovuta alla funzione feromonale del secreto delle ghiandole anali (Laumen *et al.*, 1974; Zeek & Ide, 1996; Barata *et al.*, 2008). Infatti le femmine potrebbero essere attratte chimicamente dal muco spalmato sulle uova, e spalmando più frequentemente i maschi potrebbero attrarre maggiormente le femmine. Le ghiandole anali sono comunque risultate un tratto visivamente preferito dalle femmine, e il loro ruolo nella protezione delle uova è stato dimostrato nel capitolo precedente. La scelta



delle femmine sulla base del secreto delle ghiandole sembra quindi principalmente dovuta all'acquisizione di maggiore protezione per le proprie uova, anche se non deve essere escluso un duplice ruolo (nelle cure parentali e nella comunicazione chimica) di questi organi. Ci si potrebbe inoltre chiedere se i maschi non modulino il proprio comportamento in base alla presenza delle femmine, aumentando i tassi di cure parentali per indurle all'accoppiamento, come osservato in altre specie di Teleostei (Pampoulie *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2006). In questo modo, quindi, i maschi che hanno avuto più visite da parte delle femmine sarebbero di conseguenza quelli che hanno ventilato di più. Sebbene i dati raccolti in questo studio non permettano di documentare o meno questa possibilità, durante le osservazioni sul campo non è stato mai stato registrato un aumento di attività in conseguenza alla presenza della femmina (Pizzolon, osservazione personale). Questo potrebbe quindi indicare che i tassi di ventilazione maggiore siano da ricondurre ad un reale maggiore investimento dei maschi nelle cure parentali.

I risultati sulla preferenza femminile registrati in questa parte del lavoro sono in linea con gli esperimenti di scelta effettuati nella prima parte del lavoro ma non sembrano coincidere perfettamente con le osservazioni relative al successo di accoppiamento in natura in cui i fattori determinati sono le dimensioni del nido (influenzate dalle dimensioni dei maschi e della loro cresta e quelle delle ghiandole anali (Capitolo I). Questo può venir spiegato dal diverso parametro utilizzato come indicatore della scelta femminile e cioè il numero di uova presenti nel nido, usato (Capitolo I) o il numero di femmine che eseguono display di corteggiamento ai maschi (questa parte). Entrambi i parametri infatti soffrono di limitazioni nella capacità di rappresentare il grado di preferenza femminile. Lo spazio all'interno dei nidi è limitato, come dimostra il fatto che in molti nidi lo spazio disponibile per ulteriori deposizioni di uova fosse praticamente nullo, e in molti casi questa diventa una limitazione nel numero di uova che un maschio può acquisire. Di conseguenza basarsi esclusivamente sul numero di uova presenti nel nido può portare ad una sottostima del potere attrattivo di alcuni maschi che, pur essendo preferiti da molte femmine, possono comunque riceverne le ovature solo di un limitato numero. Per altri maschi invece si potrebbe incorrere in una sovrastima del loro successo nell'attrarre le femmine, in quanto avrebbero potuto ricevere le ovature da femmine che, essendo ormai pronte a deporre, non avevano trovato spazio nei nidi di maschi migliori. Questo parziale livellamento del numero di uova all'interno dei nidi avrebbe potuto determinare il fatto che solo i tratti più importanti per il successo riproduttivo risultassero significativi nelle nostre analisi, mentre altri, che comunque sono influenti, venissero esclusi. L'uso invece del numero di display, presenta il vantaggio di poter misurare direttamente il grado di attrazione che le femmine hanno rispetto ai diversi tratti maschili. Questa preferenza è però limitata solo alle prime fasi del corteggiamento, e non è oggi possibile stabilire se, le femmine, una volta entrate nel nido, considerino altri parametri, come ad esempio le condizioni e il numero delle uova, e regolino di conseguenza il numero delle uova da deporre. Nel caso particolare delle ghiandole anali, poiché spesso i maschi non escono per molto tempo dal nido per corteggiare, la valutazione delle loro dimensioni potrebbe avvenire proprio in una fase successiva ai display femminili da noi registrati, e per questo non risultare nei dati rilevati in questa parte del lavoro. Per

queste ragioni l'uso integrato di entrambi i parametri nella valutazione del successo di accoppiamento maschile può dare indicazioni sul possibile diverso peso dei fattori coinvolti nella scelta femminile.

Infine, è interessante notare come la disposizione spaziale dei nidi sia risultata dipendere dalle caratteristiche dei maschi stessi, con maschi più grandi che preferiscono isolarsi rispetto ai maschi più piccoli, che preferiscono invece aggregarsi, difendendo nidi vicini ad quelli di altri maschi. Questa è un'informazione preliminare, essendo il campione da noi analizzato solo un sottocampione dell'intera popolazione, ma ci permette tuttavia di proporre alcune ipotesi. Il vivere in aree più densamente popolate comporta sicuramente il costo di una maggiore competizione intrasessuale, che potrebbe gravare sugli individui riducendone il successo negli accoppiamenti. Inoltre una maggiore vicinanza di nidi di conspecifici potrebbe ridurre la possibilità di uscire e allontanarsi dal nido, ad esempio per il foraggiamento, per evitare il rischio di usurpazione del nido o predazione sulle uova (Almada *et al.*, 1994; Gonçalves & Almada, 1998). Questi costi dovrebbero essere compensati da possibili vantaggi della vicinanza ad altri nidi. I dati qui raccolti indicano che, mediamente, le zone più densamente popolate dai maschi ricevono maggiori visite da parte delle femmine, e ci sono indicazioni che ogni maschio riceve più display di corteggiamento se nidifica in una zona densamente popolata. Potrebbe quindi essere vantaggioso per i maschi più piccoli stabilirsi in aree densamente popolate perché queste hanno un maggiore potere di attrarre le femmine. Il vantaggio potrebbe essere poi incrementato dalla vicinanza a maschi grandi, a loro volta in grado di esercitare, con i loro CSS più sviluppati, un maggior potere di attrazione sulle femmine. Nel sito del Casone, le dimensioni dei maschi che vivono in zone più densamente popolate sono mediamente minori rispetto ai maschi che vivono più isolati, ma in queste zone sono sempre presenti anche maschi di grandi dimensioni. Sarebbe quindi interessante analizzare la progressione temporale con cui vengono occupati i nidi, e valutare se i maschi di grandi dimensioni occupino per primi i nidi e successivamente arrivino i maschi più piccoli a nidificare in prossimità.

## CONCLUSIONI GENERALI

I fattori che maggiormente influenzano il successo di accoppiamento in *S. pavo*, sono le dimensioni del nido e quelle delle ghiandole anali. Nidi più grandi vengono difesi da maschi di maggiori dimensioni e con cresta cefalica più sviluppata. Sia le ghiandole anali che la cresta cefalica sono risultati sottoposti a preferenza femminile e trasmettono segnali onesti di qualità del maschio. In particolare le dimensioni delle ghiandole anali sono legate alla capacità dei maschi di produrre sostanze antimicrobiche a protezione delle uova da possibili infezioni e parassitosi, e la scelta femminile su questo tratto sembra favorita dall'acquisizione di benefici diretti per la propria prole. La cresta cefalica invece si è mostrata un tratto più complesso, multi informativo. Infatti se questo carattere segnala alla femmina la taglia del maschio, data la diretta relazione con essa, trasmette anche, indipendentemente da questa, informazioni sulla fertilità del portatore (in termini di numero di spermatozoi). Inoltre, attraverso l'estensione e l'intensità della sua colorazione gialla, la cresta è un indicatore della condizione di salute dell'individuo. L'investimento dei maschi in caratteri pre-copulatori non è risultato compromettere l'investimento nei caratteri post-copulatori così come non sono risultati compromessi tra i diversi tratti dell'eiaculato. Tuttavia, alcuni aspetti dell'investimento riproduttivo sono risultati negativamente correlati tra loro, in particolare l'investimento nelle cure parentali rispetto allo sviluppo della cresta cefalica e alla fertilità, dimostrando la presenza di compromessi tra l'investimento per l'accoppiamento e l'investimento parentale.

La cresta cefalica esibita dai maschi di *S. pavo* è un carattere su cui le femmine basano la propria scelta durante la ricerca del compagno. Infatti, sia gli esperimenti di preferenza femminile, sia i dati raccolti sul campo, hanno mostrato che le femmine corteggiano più intensamente e più frequentemente i maschi che hanno creste cefaliche maggiormente sviluppate. Ancora, sono i maschi di taglia maggiore e con creste più sviluppate che mostrano il maggior successo nell'accoppiamento. Questo tratto comprende diverse componenti, essendo variabile sia nelle dimensioni complessive, misurate come area totale, sia nella sua colorazione gialla, che può variare sia in dimensioni che in intensità di colorazione. La colorazione gialla della cresta, sia per estensione che per intensità, si è dimostrata dipendente dalla condizione dell'individuo. Infatti, in seguito alla sfida immunitaria provocata dalla somministrazione di antigeni di *E. coli* (LPS) (Wiesel *et al.*, 2000; Bonneaud *et al.*, 2003; Escames *et al.*, 2003; Loyau *et al.*, 2005; Torres & Velando, 2007), la cresta ha registrato una forte diminuzione della colorazione, sia in termini di superficie che di intensità. Questo calo potrebbe essere attribuito alla mobilitazione dei carotenoidi che sono, probabilmente, responsabili della colorazione gialla della cresta. I carotenoidi infatti sono alla base delle colorazioni variabili tra il giallo e il rosso delle specie animali (Andersson, 1994) ma svolgono anche un ruolo importante nell'attività antiossidante a protezione dell'organismo e nell'attivazione del sistema immunitario (Dowling & Simmons, 2009). In ogni modo, al di là del meccanismo fisiologico coinvolto, la colorazione della cresta,

modulandosi in relazione alla condizione dell'individuo, segnala onestamente alle femmine lo stato di salute attuale del possibile partner.

Le dimensioni complessive della cresta sono indicatrici delle dimensioni dell'individuo e questo potrebbe consentire alle femmine di esercitare una preferenza per maschi di taglia maggiore anche se questi non escono frequentemente dal nido. Le preferenze verso maschi di maggiori dimensioni, osservate in diverse specie di teleostei a cure parentali maschili, sono legate a diversi fattori, quali ad esempio la qualità del nido/ territorio difeso, l'abilità nelle cure parentali o alla possibilità di trasmettere questa stessa caratteristica alla prole (Downhower & Brown, 1980; Downhower *et al.*, 1983; Sheppey & Ribbink, 1985; Colgan & Salmon, 1986; Turner, 1993; Keenleyside *et al.*, 1985). Anche in questo studio i nidi di maggiori dimensioni erano difesi dai maschi più grandi e con le creste cefaliche più sviluppate, suggerendo che la valutazione della taglia del partner, sia essa operata direttamente o indirettamente attraverso le dimensioni della cresta cefalica, fornisce alla femmine indicazioni indirette sulla qualità del nido. Nido che la femmina può valutare direttamente solo una volta entrata, cioè solo dopo aver operato una scelta. Le dimensioni corporee dei maschi sono un fattore determinante del successo nella competizione per il possesso del nido (Almada *et al.*, 1994) e, anche in *S.pavo*, i maschi competono attivamente tra loro per l'accesso ai nidi (Almada *et al.*, 1994; 1995). Non avendo condotto esperimenti mirati a valutare il possibile ruolo della cresta cefalica come segnale di dominanza o di forza nei combattimenti tra maschi, non è possibile affermare che essa sia direttamente influenzata dalla selezione intrasessuale. Tuttavia questo carattere, dato che fornisce indirettamente informazioni sulla taglia dell'individuo e direttamente informazioni sulla sua condizione di salute e fecondità, sembra avere una duplice funzione (Berglund *et al.*, 1996), come osservato, in diverse specie di Teleostei, per altri tratti che risultano essere sottoposti a selezione sia intra- che intersessuale (Kodric-Brown, 1977; 1983; Gronell, 1989; Rosenqvist, 1990; Kodric-Brown, 1993). La scelta femminile su tratti utilizzati come armamenti avrebbe il vantaggio di basarsi su tratti onesti, in quanto normalmente questi caratteri sono costosi da produrre e la loro onestà viene continuamente testata negli scontri (Berglund *et al.*, 1996).

Le dimensioni della cresta cefalica sono direttamente correlate al numero di spermatozoi prodotti dai maschi, fornendo quindi indicazioni su un importante tratto coinvolto nella fertilità (Snook, 2005). È interessante sottolineare come le dimensioni della cresta risultino correlate alla taglia corporea del maschio, ma quest'ultima non sia correlata a tratti dell'eiaculato. Questo suggerisce che le dimensioni della cresta non trasmettono solamente un'informazione sulla grandezza del maschio, informazione comunque di interesse per la femmina data la sua diretta relazione con le dimensioni del nido difeso, ma segnalano di per sé un'altra caratteristica maschile: la potenziale fertilità. Una relazione tra espressione dei CSS e fertilità è prevista dalla "*phenotype-linked fertility hypothesis*" (Sheldon, 1994), secondo cui alcuni ornamenti avrebbero la funzione di segnalare direttamente alla femmina la qualità dell'eiaculato del maschio, e la femmina, scegliendo sulla base di questi caratteri, otterrebbe vantaggi in termini diretti (Sheldon, 1994). Secondo questo modello infatti eiaculati di migliore qualità assicurerebbero alle femmine un miglior tasso di fecondazione delle uova (Pilastro *et al.*, 2008). Al momento non ci sono dati relativi ai tassi di fecondazione

in natura in questa specie e non è quindi possibile confermare o smentire questa possibilità. Alternativamente, come proposto da Yasui (1997), la cresta cefalica potrebbe essere un indice della qualità complessiva del maschio, e la correlazione tra le dimensioni di questo carattere e il numero di spermatozoi potrebbero essere la diretta conseguenza di questa qualità, con i maschi migliori che sono in grado sia di sviluppare creste di grandi dimensioni che di produrre eiaculati di migliori qualità. Il concetto di qualità complessiva del maschio rimane però in qualche modo sfuggente, insoddisfacente, di difficile quantificazione. Certo in *S. pavo* sono i maschi di maggiori dimensioni a possedere e difendere i nidi più grandi, a esibire creste più sviluppate e con aree gialle più estese. Tuttavia non è possibile collegare queste caratteristiche con una delle qualità rivelatasi importante in moltissime specie, cioè la resistenza a infezioni e parassiti, e trasmissibile alla prole. Rimane infatti in predicato, dagli esperimenti condotti con LPS, che individui con creste di maggiori dimensioni possano rispondere meglio alle infezioni, mostrando una minor riduzione nelle caratteristiche dell'area gialla. Se infatti gli esperimenti condotti non sono sufficienti per dimostrare questa relazione, tuttavia la tendenza mostrata in tal senso stimola a raccogliere ulteriori informazioni.

La cresta cefalica di *S. pavo* appare dunque un tratto molto complesso, legata sicuramente a diverse caratteristiche maschili, quali la taglia corporea, la condizione e la fertilità. Sarebbe interessante valutare se lo sviluppo delle diverse caratteristiche della cresta sia influenzato dalla condizione del maschio su diverse scale temporali (Sorenson & Derrickson, 1994; Møller *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999), dato che mentre per la colorazione gialla è evidente la sua relazione con lo stato attuale dell'individuo, per le dimensioni non è chiaro se riflettano una qualità ontogenetica e/o genetica dell'individuo. È stato ipotizzato che i tratti che hanno tempi di sviluppo più lunghi siano di conseguenza meno sensibili alle condizioni contingenti degli individui, e segnalino quindi qualità genetiche dei maschi, al contrario dei caratteri più flessibili che risulterebbero migliori segnali delle condizioni e dello stato presente degli individui (Candolin, 2003). Nel caso di *S. pavo* le dimensioni complessive della cresta potrebbero essere legate a qualità genetiche o alle sue condizioni riferite nell'arco dello sviluppo ontogenetico.

Le ghiandole anali sono risultate un altro tratto sottoposto a selezione intersessuale, come è emerso dagli esperimenti di scelta femminile e dai dati raccolti sul campo, dove i maschi che avevano ghiandole più grandi presentavano anche un numero maggiore di uova all'interno del proprio nido. Lo sviluppo delle ghiandole anali è, in un'altra popolazione di *S. pavo*, l'unico tratto maschile che risulta correlato al successo di accoppiamento (Oliveira *et al.*, 1999). Le ghiandole anali producono una sostanza dal potere antimicrobico che, spalmata sulle uova, le protegge dalle infezioni microbiche e ne aumenta la sopravvivenza. Il potere antimicrobico del muco prodotto da queste strutture sembra legato alla presenza di una sostanza lisozima-simile (Giacomello *et al.*, 2006). L'attività mostrata nei test di inibizione della crescita batterica contro *M. luteus* e *B. subtilis*, due specie comunemente usate come indicatrici di attività del lisozima (Austin & Austin, 2007), confermerebbe che una sostanza lisozima-simile venga rilasciata dalle ghiandole e che la sua presenza contribuisca alla funzione antimicrobica dimostrata per questa secrezione. Non si può

comunque escludere la presenza di altre sostanze proteiche o altri composti non proteici, che insieme possano conferirle il potere antimicrobico protettivo per le uova. È stato proposto che le ghiandole anali siano coinvolte anche nella produzione di feromoni ad azione attrattiva sulle femmine (Barata *et al.*, 2008). L'estratto delle ghiandole anali è infatti risultato attrarre le femmine in assenza di stimoli visivi, ma essere invece ininfluenza per la scelta femminile quando questa poteva valutare visivamente i maschi (Barata *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2008 a, b, c). Per questo è stato proposto che il feromone possa agire su lunga distanza spaziale, segnalando la presenza dei maschi alle femmine e aiutandone l'individuazione (Barata *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2008 a, b). Analogamente gli esperimenti condotti in questa ricerca hanno dimostrato che le femmine scelgono direttamente sulla base delle dimensioni delle ghiandole, attraverso quindi una valutazione visiva. La funzione di difesa antimicrobica e quella di comunicazione chimica non sono comunque mutualmente esclusive, e sarebbe interessante valutare se la sostanza che viene descritta avere una funzione feromonale, possa in realtà essere lo stesso lisozima-simile, o una delle altri possibili composti che conferiscono potere antimicrobico al secreto delle ghiandole anali. Il duplice ruolo (comunicativo-antimicrobico) svolto dal lisozima è già stato infatti descritto per le termiti, in cui questa sostanza è responsabile sia della protezione antimicrobica delle uova, sia del riconoscimento da parte delle operaie delle uova stesse (Matsuura *et al.*, 2007).

La scelta sulla base delle dimensioni delle ghiandole risulta quindi favorita dal beneficio diretto di un aumento della sopravvivenza delle uova che le femmine possono ottenere accoppiandosi con maschi con ghiandole più sviluppate. La protezione della uova da infezioni microbiche appare una parte cruciale nelle cure parentali, soprattutto nelle specie la cui deposizione delle uova avviene in acqua, ambiente in cui la concentrazione batterica è molte volte superiore rispetto all'ambiente aereo (Reinheimer, 1992; Brodie *et al.*, 2007). Data la loro importanza sia nell'attrarre le femmine e nell'aumentare la sopravvivenza delle uova, ci si potrebbe chiedere perché quindi tutti maschi non investano allo stesso modo le proprie risorse nello sviluppo di queste strutture. Il motivo della variabilità nell'investimento nelle ghiandole anali che abbiamo registrato nei maschi da noi analizzati potrebbe risiedere nel costo associato alla protezione antimicrobica delle uova. Infatti i maschi di *S. pavo* che hanno maggiormente investito in quest'attività, sia sviluppando ghiandole di maggiori dimensioni, sia dedicandosi maggiormente alla spalmatura del loro secreto sulle uova, sono risultati i maschi che avevano indici di stress maggiori ma anche minor sviluppo della cresta, sia in termini di dimensioni totali che rispetto all'area della macchia gialla. Questi risultati indicano quindi come le cure parentali siano un'attività molto costosa, fatto questo rilevato in moltissime specie, e come l'investimento (tempo ed energie) in esse può ridurre le risorse disponibili per altre funzioni, quali la crescita, la sopravvivenza e, in particolare, lo sviluppo di CSS (Burley, 1986; Clutton-Brock, 1991, Andersson, 1994; Magrath & Komdeur, 2003; Badyaev & Vleck, 2007). L'investimento parentale sembra in particolare indebolire i maschi, innalzando il livello di stress, a cui è sottoposto l'organismo. La riduzione della macchia gialla della cresta potrebbe infatti essere la diretta conseguenza della mobilitazione dei carotenoidi, probabilmente responsabili della colorazione, volti a contrastare l'aumento del livello di specie reattive all'ossigeno

conseguenti allo stress. La relazione inversa trovata tra le dimensioni complessive della cresta e l'investimento parentale non sembra invece spiegabile con la riduzione della condizione nei maschi che fanno maggiori cure parentali. Le dimensioni della cresta non dipendono dalla condizione attuale dell'individuo ma, come detto sopra, potrebbero segnalare una buona condizione generale, maturata su una lunga scala temporale rispetto alla colorazione, oppure la qualità genetica. Nel primo caso, i maschi che durante il corso della stagione hanno investito molte energie nelle cure parentali potrebbero quindi non essere stati in grado di sviluppare e/o mantenere una cresta cefalica di grandi dimensioni. Nel caso invece in cui la dimensione della cresta sia geneticamente determinata, maschi che non sono dotati di creste grandi, e quindi hanno un limitato potere attrattivo sulle femmine e possono ottenere meno ovature, potrebbero investire maggiormente nelle cure parentali per aumentare il successo di schiusa delle loro uova. Infatti in molte specie è stato descritto che mentre i maschi di migliore qualità investono maggiormente in strutture o comportamenti per ottenere un maggior successo di accoppiamento, i maschi di bassa qualità tentano di massimizzare il loro successo riproduttivo dedicando le proprie risorse nell'investimento parentale (per *review* vedi: Stiver & Alonzo, 2009). In entrambi i casi, l'investimento in un tratto rispetto ad un altro dovrebbe essere una "strategia" relativamente costante nel corso della stagione riproduttiva.

Questi risultati sull'investimento differenziale nell'accoppiamento (cresta e fertilità) e nelle cure parentali supportano in linea generale il modello dell'allocazione differenziale che prevede che i maschi con ornamenti più sviluppati siano anche i maschi che investono meno in cure parentali (Burley, 1986). Il caso di *S. pavo* è particolare dato che uno dei caratteri sottoposti a scelta femminile, le ghiandole anali, è coinvolto nelle cure parentali ed è positivamente correlato ad un carattere indicativo dell'investimento in accoppiamento. Quindi apparentemente il modello di Burley non sembra applicabile. Tuttavia le ghiandole anali, o per meglio dire il loro secreto, è solo una delle componenti dell'investimento parentale, e infatti non necessariamente le altre componenti sono correlate con esse. Questo comporta che la preferenza per maschi con ghiandole sviluppate da alle femmine un'informazione onesta, ma parziale, del loro reale investimento in cure parentali, lasciando di fatto spazio per il verificarsi di quanto proposto dall'allocazione differenziale. La presenza di compromessi tra l'investimento parentale e l'investimento per gli accoppiamenti è stato descritto in numerose specie (de Lope & Möller, 1993; Burley *et al.*, 1996; Qvarnström, 1997; Raouf *et al.*, 1997; Griffith *et al.*, 1998). Infatti maschi che investono molte energie nella produzione di CSS o in corteggiamenti molto costosi potrebbero non avere poi abbastanza risorse per le cure parentali, oppure, al contrario, maschi che hanno alti investimenti parentali non sono in grado di investire risorse in ornamenti molto sviluppati (Andersson, 1994; Magrath & Komdeur, 2003). Secondo alcuni modelli teorici, l'ipotesi dell'allocazione differenziale di Burley (1986) sarebbe evolutivamente stabile solo se i benefici in termini di sopravvivenza della prole conferiti dai maschi con creste più sviluppate fossero superiori ai vantaggi dati da un maggior apporto di cure parentali (Kokko, 1998), ma i dati qui raccolti non permettono di verificare queste predizioni. Sarebbero infatti necessari studi per valutare sia il vantaggio conferito dalle cure parentali in natura, sia quelli derivanti dall'accoppiarsi

con maschi più attraenti. È stato anche ipotizzato che un investimento differenziale tra le cure parentali e l'attrattività potrebbe risultare evolutivamente stabile in presenza di una attenzione differenziale rivolta dalle femmine alle diverse informazioni portate dai due caratteri (cresta e ghiandole/cure parentali) (Candolin, 2003). La presenza di una scelta femminile differenziale, in cui una parte delle femmine presta maggiore attenzione alle dimensioni della cresta mentre un'altra parte sceglie in base a quella delle ghiandole, porterebbe ad una diminuzione delle pressioni selettive sui diversi caratteri (Brooks & Endler, 2001a, b; Candolin, 2003), rendendo stabili entrambe le strategie allocative. Sebbene la scelta differenziale sia stata dimostrata in alcune specie (Searcy, 1992; Hasselquist *et al.*, 1996; Sheldon *et al.*, 1997), non è stata mai descritta nel caso di *S. pavo*. Nello studio presente sono stati condotti alcuni esperimenti, ancora preliminari, di preferenza incrociata in cui le femmine (n=14) venivano poste di fronte alla scelta tra un modellino con ghiandole grandi e cresta piccola e un altro con cresta grande e ghiandole piccole. In questi test, 7 femmine hanno preferito nettamente una tipologia di sagoma, mentre le altre 7 hanno preferito l'altra. Sebbene questi risultati siano solo preliminari, il numero di femmine testate non sia elevato, e non sia stata valutata la possibilità di scelta delle femmine basata sulla comparazione di più maschi/sagome con combinazione anche intermedia dell'espressione dei caratteri (Bateson & Healy, 2005; Reaney, 2009), l'indicazione che emerge è che anche in questa specie le femmine potrebbero esprimere una scelta differenziale. Sarebbe interessante quindi valutare, oltre alla presenza della scelta differenziale per questa specie, anche se la preferenza per un tratto rispetto ad un altro sia correlata alle caratteristiche della stessa femmine. Infatti in alcune specie è stato dimostrato che la preferenza espressa dalle femmine può dipendere dalla qualità delle femmine, età, e condizione (Burley, 1986; Soler *et al.*, 1998; Sheldon, 2000; Kodric-Brown, 2001). Inoltre è stato notato che anche fattori sociali o ambientali, come il grado gerarchico e il rischio di predazione, possono influenzare la scelta sulla base dei tratti multipli (Reid & Weatherhead, 1990; Kodric-Brown, 1993; Endler & Houde, 1995; Marchetti, 1998).

La presenza del compromesso tra investimento parentale e per l'accoppiamento risulta di fondamentale importanza per le femmine, in particolare nel momento in cui queste devono scegliere il compagno durante la riproduzione. Scegliere il padre della propria prole infatti rappresenta una delle decisioni principali per le femmine, e questa scelta diventa ancora più importante nel caso in cui il compagno può portarle dei benefici diretti (Andersson, 1994), come ad esempio nelle specie in cui le cure parentali sono a carico del maschio. Le femmine di *S. pavo* hanno mostrato di impostare la propria scelta sia sulle caratteristiche della cresta cefalica, sia sull'acquisizione di benefici diretti per la prole, preferendo i maschi che hanno ghiandole più sviluppate e che spalmano le uova più frequentemente. Mentre il vantaggio adattativo della scelta femminile sulla base delle dimensioni delle ghiandole anali appare chiaro, essendo queste strutture legate direttamente alla sopravvivenza della prole, la preferenza per la cresta cefalica potrebbe essere dovuta all'acquisizione di benefici diversi. Benefici diretti potrebbero essere legati alla dimensione della cresta, se scegliere individui con cresta più grande comporta maggior probabilità di fecondazione della proprie uova, e alla sua colorazione gialla, se questo



comporta minore probabilità di contrarre infezioni, oppure un minor tasso di cannibalismo sulle uova. Vantaggi indiretti potrebbero invece risultare, nel caso la dimensione della cresta indicasse la capacità di resistere alle infezioni e/o fosse, assieme a quella corporea, geneticamente determinata.

*S.pavo* è risultato un modello davvero ottimale e stimolante per lo studio dei caratteri maschili multipli in relazione alla scelta femminile. La ricerca svolta ha da un lato portato a risultati in parte attesi e in parte nuovi. Se infatti l'influenza del nido, e dei tratti ad esso correlati, nel successo di accoppiamento del maschio, il legame tra colorazione gialla e stato di condizione del maschio o il compromesso tra l'investimento in accoppiamento e in cure parentali potevano essere attesi sulla base delle informazioni presenti in letteratura su altre specie, non altrettanto si può completamente dire per il ruolo delle secrezioni antimicrobiche come effettivi ed efficaci componenti delle cure parentali maschili. La possibile presenza ed importanza della difesa delle uova da infezioni da parte dei maschi era infatti stata più e più volte ipotizzata in diverse specie ma l'evidenza sperimentale ancora mancava. Inoltre, l'analisi di diversi parametri, ha permesso di evidenziare la molteplicità dei segnali trasmessi da un carattere, considerato "singolo" quale la cresta cefalica. La situazione di questo tratto potrebbe non essere affatto insolita ma venir raramente rilevata per la limitatezza delle analisi condotte. Questo studio, pur nei risultati acquisiti, ha al tempo stesso sollevato una serie di domande, tra cui se vi sia scelta femminile differenziata e da quali caratteri femminili sia influenzata e ancora se i caratteri maschili trasmettano anche segnali riguardanti la qualità genetica dei maschi. Problemi questi la cui risoluzione, al di là dell'interesse per la singola specie, può contribuire alla miglior comprensione delle dinamiche che stanno alla base della scelta femminile in relazione all'espressione dei diversi caratteri maschili.



## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad S., 1995.** Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. *Chapman & Hall, New Jersey.*
- Allander K. & Bennet G.F., 1995.** Retardation of breeding onset in Great Tits (*Parus major*) by blood parasites. *Funct Ecol*; 9:677-682.
- Almada V.C., Gonçalves E.J., Santos A.J. & Baptista C., 1994.** Breeding ecology and nest aggregations in a population of *Salaria pavo* (pisces: Blenniidae) in an area where nest sites are very scarce. *J Fish Biol*; 45:819-830.
- Almada V.C., Gonçalves E.J., Oliveira R.F. & Santos A.J., 1995.** Courting females: ecological constraints affect sex roles in a natural population of the blennioid fish *Salaria pavo*. *Anim Behav*; 49:1125-1127.
- Alonso-Alvarez C., Bertrand S., Devevey G., Gaillard M., Prost J., Faivre B. & Sorci G., 2004.** An experimental test of dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *Am Nat*; 164:651-659.
- Alonso-Alvarez C., Pérez-Rodríguez L., Mateo R., Chastel O. & Viñuela J., 2008.** The oxidation handicap hypothesis and the carotenoid allocation trade-off. *J Evol Biol*; 21:1789-1797.
- Amundsen T. & Forsgren E., 2001.** Male mate choice selects for female coloration in a fish. *PNAS*; 98:13155-13160.
- Andersson M., 1982.** Female choice selects for extreme tail length in a widowbird. *Nature*; 299:818-820.
- Andersson M., 1994.** Sexual selection. *Princeton University Press.*
- Andersson M. & Iwasa Y., 1996.** Sexual selection. *Trends Ecol Evol*; 11(2):53-58.
- Andersson M. & Simmons M.L.W., 2006.** Sexual selection and mate choice. *Trends Ecol Evol*; 21(6):249-335.
- Andersson S., Pryke S.R., Örnborg J., Lawes M.J. & Andersson M., 2002.** Multiple receivers, multiple ornaments and trade-off between agonistic and epigamic signaling in a widowbird. *Am Nat*; 160:683-691.
- Askenmo C., 1979.** Reproductive effort and the return rate of male pied flycatchers. *Am Nat*; 144:748-753.
- Austin B. & Austin D.A., 2007.** Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. *Fourth Edition.* Springer Praxis Books, Chichester, Badyaev & Vleck.
- Badyaev A.V. & Vleck C.M., 2007.** Context-dependent development of sexual ornamentation: implications for a trade-off between current and future breeding efforts. *J Evol Biol*; 20:1277-1287.
- Baeta R., Faivre B., Motreuil S., Gaillard M. & Moreau J., 2008.** Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display: an experimental study in the blackbird (*Turdus merula*). *Proc R Soc Lond B*; 275:427-434.
- Bagenal T.B., 1966.** A short review of fish fecundity. In Gerking S.D (ed) The biological basis of freshwater fish production. *Blackwell scientific Publications, Oxford*; pp 89-111.
- Ball M.A. & Parker G.A., 1996.** Sperm competition games: external fertilization and "adaptive" infertility. *J Theor Biol*; 180:141-150.

- Balmford A., Rosser A.M. & Albon S.D., 1992.** Correlates of female choice in resources-defending antelope. *Behav Ecol Sociobiol*; 31:107-114.
- Balon E.K., 1975.** Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. *J Fish Res Board Ca*; 32:821-864.
- Barata E.N., Serrano R.M., Miranda A., Nogueira R., Hubbard P.C. & Canário A.V.M., 2008.** Putative pheromones from anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Anim Behav*; 75:379-389.
- Basolo A.L., 1990.** Female preference for male sword length in the green swordtail, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae). *Anim Behav*; 40:332-338.
- Bateson M. & Healy S.D., 2005.** Comparative evaluation and its implications for mate choice. *Trends Ecol Evol*; 20:659-664.
- Belthoff J.R., Dufty A.M. & Gauthreaux S.A., 1994.** Plumage variation, plasma steroids and social-dominance in male house finches. *Condor*; 96:614-625.
- Berglund A. & Rosenqvist G., 2001.** Male pipefish prefer ornamented females. *Anim Behav*; 61:345-350.
- Berglund A., Rosenqvist G. & Svensson I., 1986.** Mate choice, fecundity and sexual dimorphism in two pipefish species (Syngnathidae). *Behav Ecol Sociobiol*; 19:385-399.
- Berglund A., Bisazza A. & Pilastro A., 1996.** Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biol J Linnean Soc*; 58:385-399.
- Birkhead T.R., 2000.** Promiscuity: An Evolutionary History of Sperm Competition and Sexual Conflict. *Faber & Faber, London*.
- Birkhead T.R. & Møller A.P., 1998.** Sperm competition and sexual selection. *Academic Press, London*.
- Birkhead T.R. & Pizzari T., 2002.** Postcopulatory sexual selection. *Nat Rev Genet*; 3(4):262-273.
- Blount J.D., Møller A.P. & Houston D.C., 2001.** Antioxidants, showy males and sperm quality. *Ecol Lett*; 4:393-396.
- Blount J.D., Metcalfe N.B. & Surai P.F., 2003.** Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science*; 300:125-127.
- Blumer L.S., 1979.** Male parental care in bony fish. *Q Rev Biol*; 54:149-161.
- Bly J.E., Miller N.W. & Clem L.W., 1990.** A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed catfish. *Dev Comp Immunol*; 14:211-221.
- Board R.G. & Fuller R., 1974.** Non-specific antimicrobial defences of avian egg, embryo and neonate. *Biol Rev*; 49:15-49.
- Board R.G. & Fuller R. (Eds), 1994.** Microbiology of the avian egg. *Chapman & Hall, London*.
- Bonneaud C., Mazuc J., Gonzales G., Haussy C., Chastel O., Faivre B. & Sorci G., 2003.** Assessing the cost of mounting an immune response. *Am Nat*; 161:367-379.
- Borgia G., 1979.** Sexual selection and the evolution of mating systems. In: Blum M.S. & Blum N.A. (eds), *Sexual Selection and Reproductive Competition in the Insects*. pp. 19-80, *Academic Press*.

- Bourgeon S., Raclot T., Le Maho Y., Ricquier D. & Criscuolo F., 2007.** Innate immunity, assessed by plasma NO measurements, is not suppressed during the incubation fast eiders. *Dev Comp Immunol*; 31:720-728.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; 72:248–254.
- Brawner W.R., Hill G.E. & Sundermann C.A., 2000.** Effects of coccidial and mycoplasmal infections on carotenoid-based plumage pigmentation in male *House Finches*. *Auk*; 117:952-963.
- Breder C.M.Jr. & Rosen D.E., 1966.** Modes of reproduction in fishes. *The Natural History Press, New York*.
- Brodie E.L., De Santis T.Z., Parker J.P.M., Zubieta I.X., Piceno Y.M. & Andersen G.L., 2007.** Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *PNAS*; 104:299–304.
- Brogden K.A., 2005.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*; 3:238-250.
- Brooks R., 1996.** Melanin pigments as visual signal amplifier in male guppies. *Naturwissenschaften*; 83:39-41.
- Brooks R. & Endler J.A., 2001a.** Direct and indirect sexual selection and quantitative genetics of male traits in guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*; 55:1002–1015.
- Brooks R. & Endler J.A., 2001b.** Female guppies agree to differ: phenotypic variation in mate-choice behavior and the consequence for sexual selection. *Evolution*; 55:1644–1655.
- Burley N.T., 1986.** Sexual selection for aesthetic traits in species with biparental care. *Am Nat*; 127:415-445.
- Burley N.T., Parker P.G. & Lundy K., 1996.** Sexual selection and extrapair fertilization in a socially monogamous passerine, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Behav Ecol*; 7:218-226.
- Byers J.A., Byers A.A. & Dunn S.J., 2006.** A dry summer diminishes mate search effort by pronghorn females: evidence for a significant cost of mate search. *Ethology*; 112:74–80.
- Candolin U., 2003.** The use of multiple cues in mate choice. *Biol Rev*; 78:575-595.
- Candolin U. & Reynolds J.D., 2001.** Sexual signaling in the European bitterling: females learn the truth by direct inspection of resource. *Behav Ecol*; 12:407-411.
- Candolin U. & Voigt H.R., 2001.** Correlation between male size and territory quality: consequence of male completion or predation risk?. *Oikos*; 95:225-230.
- Chapman T., 2001.** Seminal fluid-mediated fitness traits in *Drosophila*. *Heredity*; 87:511-521.
- Chong K., Joshi S., Jin L.T. & Chong Shu-Chien A., 2006.** Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behaviour. *Proteomics*; 6:2251–2258.
- Clutton-Brock T.H., 1991.** The evolution of parental care. *Princeton University Press, Princeton*.
- Clutton-Brock T.H. & Parker G.A., 1992.** Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *Q Rev Biol*; 67:437-456.
- Clutton-Brock T.H. & Vincent A.C.J., 1991.** Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature*; 351:58-60.

- Colgan P.W. & Salmon A.B., 1986.** Breeding experience and parental behaviour in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Behav Process*; 13:101-118.
- Colombo L. & Burighel P., 1974.** Fine structure of the testicular gland of the black goby, *Gobius jozo* L.. *Cell Tissue Res.*; 154:39-49.
- Colombo L., Marconato A., Colombo Belvedere P. & Friso C., 1980.** Endocrinology of teleost reproduction: a testicular steroid pheromone in the black goby, *Gobius jozo* L.. *Boll Zool.*; 44:131-134.
- Côté I.M. & Hunte W., 1989a.** Male and female mate choice in redlip blenny: why bigger is better. *Anim Behav*; 38:78-88.
- Côté I.M. & Hunte W., 1989b.** Self-monitoring of reproductive success: nest switching in the redlip blenny (Pisces: Blennidae). *Behav Ecol Sociobiol*; 24:403-408.
- Cote J., Le Galliard J-F., Rossi J-M. & Fitze P.S., 2008.** Environmentally induced changes in carotenoid-based coloration of female lizards: a comment on Vercken *et al.*. *J Evol Biol*; 21:1165-1172.
- Crapasi A., Lante A., Pasini G. & Spettoli P., 1993.** Enhanced microbial cell lysis by the use of lysozyme immobilized on different carriers. *Process Biochem*; 28:17-21.
- Creighton E., 2001.** Mate acquisition in the European blackbird and its implication for sexual strategies. *Ethol Ecol Evol*; 13:247-260.
- Crippen T.L., Sheffield C.L., Haiqi H., Lowry V.K. & Kogut M.H., 2003.** Differential nitric oxide production by chicken immune cells. *Dev Comp Immunol*; 27:603-610.
- Darwin C., 1859.** On the origin of species by means of natural selection. *Murray, London*.
- Darwin C., 1871.** The descent of man, and selection in relation to sex. *Murray, London*.
- Dawkins M.S. & Guilford T., 1991.** The corruption of honest signaling. *Anim Behav*; 41:865-873.
- de Lope F. & Möller A.P., 1993.** Female reproductive effort depends on the degree of ornamentation of their mates. *Evolution*; 47:1152-1160.
- Deerenberg C., Arpanius V., Daan S. & Bos N., 1997.** Reproductive effort decrease antibody responsiveness. *Proc R Soc Lond B*; 264:1021-1029.
- Dewsbury D.A., 1982.** Ejaculate cost and mate choice. *Am Nat*; 119:601
- Ditchkoff S.S., Lochmiller R.L., Masters R.E., Hooper S.R. & Van Den Bussche R.A., 2001.** Major-histocompatibility-complex-associated variation in secondary sexual traits of white tailer deer (*Odocoileus virginianus*): evidences for good-genes advertisement. *Evolution*; 55:616-625.
- Doucet S. & Montgomerie R., 2003.** Multiple sexual ornaments in satin bowerbirds: ultraviolet plumage and bower signal different aspect of male quality. *Behav Ecol*; 14:503-509.
- Dowling D.K. & Simmons L.W., 2009.** Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B*; 276:1737-45.
- Downhower J.F. & Brown L., 1980.** Mate preferences of female mottled sculpins, *Cottus bairdi*. *Anim Behav*; 28:728-734.

- Downhower J.F., Brown L., Pederson R. & Staples G., 1983.** Sexual selection and dimorphism in mottled sculpins. *Evolution*; 37:96-103.
- Eberhard W.G., 1996.** Females control: sexual selection by cryptic female choice. *Princeton University Press, Princeton, New Jersey.*
- Ellis A.E., 2001.** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25:827-839.
- Ellsaesser C.F. & Clem L.W., 1986.** Hematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J Fish Biol*; 28:511-521.
- Endler J.A. & Houde A.E., 1995.** Geographic variation in female preferences for male traits in *Poecilia reticulata*. *Evolution*; 49:456-468.
- Escames G., León J., Macías M., Khaldy H. & Acuña-Castroviejo D., 2003.** Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J*; doi:10.1096/fj.02-0692fje
- Esteve E, Ricard W. & Fernández-Real J.M., 2005.** Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary mechanism. *Clin Nutr*; 24:16-31.
- Evans J.P., Zane L., Francescato S. & Pilastro A., 2003.** Directional postcopulatory sexual selection revealed by artificial insemination. *Nature*; 421:360-363.
- Fagundes T., Gonçalves D.M. & Oliveira R.F., 2007.** Female mate choice and mate search tactics in a sex role reversed population of the peacock blenny *Salaria pavo* (Risso, 1810). *J Fish Biol*; 71(1):77-89.
- Favre B., Gregoire A., Preault M., Cezilly F. & Sorci G., 2003.** Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science*; 300:103.
- Faye I. & Wyatt G.R., 1980.** The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia* silkworm pupae. *Experientia*; 36:1325-1326.
- Fernández-Vargas M., Tang-Martinez Z. & Phelps S.M., 2008.** Olfactory responses of neotropical short-tailed singing mice, *Scotinomys teguina*, to odors of the mid-ventral sebaceous gland: discrimination of conspecifics, gender, and female reproductive condition. *J Chem Ecol*; 34:429-437.
- Festa-Bianchet M., 1989.** Individual differences, parasites, and the cost of reproduction for bighorn ewes (*Ovis canadensis*). *J Anim Ecol*; 58:785-795.
- Fisher R.A., 1915.** The evolution of sexual preference, *Eugenics Review*; 7:184-192.
- Fisher R.A., 1930.** The genetical theory of natural sexual selection. *Clarendon Press, Oxford.*
- Fitze P.S., Tschirren B., Gasparini J. & Richner H., 2007.** Carotenoid-based plumage colors and immune function: is there a trade-off for rare carotenoids? *Am Nat*; 169:137-144.
- Fitze P.S., Cote J., San-Jose L.M., Meylan S., Isaksson C., Andersson S., Rossi J-M. & Clobert J., 2009.** Carotenoid-based colours reflect the stress response in the common lizard. *PlosOne*; 4(4):e5111
- Fitzpatrick S., 1998.** Birds' tails as signaling devices: markings, shape, length, and feather quality. *Am Nat*; 151:157-173.

- Fleming I.A. & Gross M.R., 1994.** Breeding competition in a pacific salmon (coho: *Oncorhynchus kisutch*): measures of natural and sexual selection. *Evolution*; 48:637-657.
- Folstad I. & Karter A.J., 1992.** Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am Nat*; 139(3):603-622.
- Folstad I. & Skarstein P., 1997.** Is male germ line control creating avenues for male choice? *Behav Ecol*; 8:109-112.
- Foote C.J., 1990.** An experimental comparison of male and female spawning territoriality in a Pacific salmon. *Behaviour*; 115:283-314
- Forsgren E., 1997.** Female sand gobies prefer good fathers over dominant males. *Proc R Soc Lond B*; 264:1283-1286.
- Forsgren E., Karlsson A. & Kvarnemo C., 1996.** Females sand gobies gain direct benefits by choosing males with eggs in their nests. *Behav Ecol Sociobiol*; 39:91-96.
- Freeman-Gallant C.R., Taff C.C., Morin D.F., Dunn P.O., Whittingham L.A. & Tsang S.M., 2009.** Sexual selection, multiple male ornaments, and age- and condition-dependent signaling in the common yellowthroat. *Evolution*; in press. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00873.x
- Gallo E., 2004.** Dinamica d'accoppiamento e fecondazione in due specie di blennidi (Blenniidae): *Salaria pavo* e *Parablennius tentacularis*. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università di Padova, Anno Accademico 2003-2004.
- Giacomello E., 2004.** Dimorfismo sessuale e successo di accoppiamento maschile in due specie di blennidi (Teleostei: Blenniidae). Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica. Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università di Padova, Ciclo XVII.
- Giacomello E. & Rasotto M.B., 2005.** Sexual dimorphism and male mating success in the tentacled blenny, *Parablennius tentacularis* (Teleostei: Blenniidae). *Mar Biol*; 147:1432-1793.
- Giacomello E., Marchini D. & Rasotto M.B., 2006.** Sexual dimorphism and male mating success in the tentacle blenny, *Parablennius tentacularis* (Teleostei: Blenniidae). *Biol Lett*; 2:330-333.
- Giacomello E., Neat F.C. & Rasotto M.B., 2008.** Mechanism enabling sperm economy in blenniid fishes. *Behav Ecol Sociobiol*; 62:671-680.
- Gibson R.N., 1969.** The biology and behavior of littoral fish. *Oceanogr Mar Biol*; 7:367-410.
- Gibson R.M. & Bachman G.C., 1992.** The costs of female choice in a lekking bird. *Behav Ecol*; 3:300-309.
- Gonçalves J.E. & Almada V.C., 1997.** Sex differences in resources utilization by the peacock blenny. *J Fish Biol*; 51:624-633.
- Gonçalves E.J. & Almada V.C., 1998.** A comparative study of territoriality in intertidal and subtidal blennioids (Teleostei, Blennioidei). *Environ Biol Fishes*; 51:257-264.
- Gonçalves F.V. & de Brito-Gitirana L., 2008.** Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *Micron*; 39:32-39
- Gonçalves E.J., Almada V.C., Oliveira R.F. & Santos A.J., 1996.** Females mimicry as a mating tactic in males of the blenniid fish *Salaria pavo*. *J Mar Biol Assoc UK*; 76:529-538.



- Gonçalves D.M., Barata E.N., Oliveira R.F. & Canario A.V.M., 2002.** The role of male visual and chemical cues on the activation of female courtship behavior in the sex-role reversed peacock blenny. *J Fish Biol*; 61:96-105.
- Gonçalves D.M., Alpedrinha J., Teles M. & Oliveira, R.F., 2007.** Endocrine control of sexual behavior in sneaker males of the peacock blenny *Salaria pavo*: effects of castration, aromatase inhibition, testosterone and estradiol. *Horm Behav*; 51:534–541.
- Goulet D., 1997.** Reproductive behavior and Spawning success of female *Amblyglyphidonon leucogaster* (Pisces, Pomacentridae) from the Red Sea. *Environ Biol Fishes*; 50:49-60.
- Gowaty P.A., Plissner J.H. & Williams T.G., 1989.** Behavioural correlates of uncertain parentage: mate guarding and nest guarding by Eastern Bluebirds: *Sialia sialis*. *Anim Behav*; 38:272-284.
- Grafen A., 1990.** Biological signals as handicaps. *J Theor Biol*; 144:517-546.
- Grenfell B.T. & Dobson A.P., 1995.** Ecology of infectious diseases in natural populations. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Griffith S.C., Owen I.P.F. & Burke T., 1998.** Sexual selection in house sparrow: the best males are the worst father. *Zoolog Sci*; 19:545-555
- Griffith S.C., Owen I.P.F. & Burke T., 1999.** Female choice and annual reproductive success favour less-ornamented house sparrow. *Proc R Soc Lond B*; 266:765-770.
- Grindstaff J.L., Brodie E.D. & Ketterson E.D., 2003.** Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc R Soc Lond B*; 270:2309-2319.
- Gronell A.M., 1989.** Visiting behaviour by females of the sexually dichromatic damselfish, *Chrysiptera cyanea* (Teleostei: Pomacentridae): a probable method of assessing male quality. *Ethology*; 81:89-122.
- Gross M.R., 1996.** Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends Ecol Evol*; 11(2):92-98.
- Gross M.R. & Sargent R.C., 1985.** The evolution of male and female parental care in fishes. *Am Zool*; 25:384-387.
- Gustafsson L., Nordling D., Andersson S., Sheldon B.C. & Qvarnstrom A., 1994.** Infectious diseases productive effort and the cost of reproduction in birds. *Philos Trans R Soc Lond B*; 346:323-331.
- Guzik T.J., Korbut R. & Adamek-Guzik T., 2003.** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*; 54:469-487.
- Gwynne D.T., 1984.** Courtship feeding increases female reproductive success in Bushcrickets. *Nature*; 307:361-363.
- Gwynne D.T., 1988.** Courtship feeding in Katydid benefits the mating males offsprings. *Behav Ecol Sociobiol*; 23:373-377.
- Hamilton W.J. & Poulin R., 1997.** The Hamilton and Zuk Hypothesis Revisited: a Meta-Analytical Approach. *Behaviour*; 134:299-320.
- Hamilton W.D. & Zuk M., 1982.** Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*; 218:384-387.

- Hansen G.H. & Olafsen J.A., 1999.** Bacterial interactions in early life stage of marine cold water fish. *Microb Ecol*; 38:1-26
- Harris J. & Bird D.J., 2000.** Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet Immunol Immunopathol*; 77:163–176.
- Hasselquist D., Bensch S. & von Schantz T., 1996.** Correlation between male song repertoire, extra-pair paternity and offspring survival in the great reed warbler. *Nature*; 381:229-232.
- Hasson O., 1989.** Amplifiers and the handicap principle in sexual selection: a different emphasis. *Proc R Soc Lond B*; 235:383-406.
- Hasson O., 1990.** The role of amplifiers in sexual selection: an integration of the amplifying and fisherian mechanisms. *Evol Ecol*; 4:277-289.
- Hasson O., 1991.** Sexual displays as amplifiers practical examples with an emphasis on feather decorations. *Behav Ecol*; 2:189-197.
- Hasson O., 1997.** Towards a general theory of biological signaling. *J Theor Biol*; 185:384-386.
- Helfman G.S., Colette B.B. & Facey D.E., 1997.** The diversity of fishes. *Blackwell Science, Boston, MA.*
- Heywood J.S., 1989.** Sexual selection by the handicap mechanism. *Evolution*; 43:1387-1397.
- Hilczner M., Szalecki M., Smyczynska J., Stawerska R., Kaniewska D. & Lewinski A., 2005.** Growth hormone (GH) secretion and pituitary size in children with short stature. Efficacy of GHtherapy in GH-deficient children, depending on the pituitary size. *Neuroendocrinol Lett*; 26:447-452.
- Hill G.E., 1991.** Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature*; 350:337-339.
- Hill G.E. & Montgomerie R., 1994.** Plumage colour signals nutritional condition in the house finch. *Proc R Soc Lond B*; 258:47-52.
- Hill J.A., Enstrom D.A., Ketterson E.D., van Nolan Jr. & Ziegenfus C., 1999.** Mate choice based on static versus dynamic secondary sexual traits in the dark-eyed Junco. *Behav Ecol*; 10:91-96.
- Hoelzer G.A., 1989.** The good parent process of sexual selection. *Anim Behav*; 38:1067-1078.
- Holland B. & Rice W.R., 1998.** Perspective: chase-away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance. *Evolution*; 52(1):1-7.
- Hörak P., Saks L., Zilmer M., Karu U. & Zilmer K., 2007.** Do dietary antioxidants alleviate the cost of immune activation? An experiment with Greenfinches. *Am Nat*; 170:625-635.
- Hosken D.J. & Stockley P., 2004.** Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol Evol*; 19(2):87-93.
- Huang C.C. & Song Y.L., 1999.** Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev Comp Immunol*; 23:545-552.
- Hunt J., Bussiere L.F., Jennions M.D. & Brooks R., 2004.** What is genetic quality? *Trends Ecol Evol*; 19(6):329-333.
- Iwasa Y. & Pomiankowski A., 1994.** The evolution of mate preference for multiple sexual ornaments. *Evolution*; 48:853-867.

- Iwasa Y., Pomiankowski A. & Nee S., 1991.** The evolution of costly mate preference II. The “handicap” principle. *Evolution*; 45:1431-1442.
- Jacot A., Scheuber H. & Brinkhof M.W.G., 2004.** Costs of an induced immune response on sexual display and longevity in field crickets. *Evolution*; 58:2280-2286.
- Jamieson I., 1995.** Female fish prefer to spawn in nests with eggs for reasons of mate choice copying or egg survival. *Am Nat*; 145:824-832.
- Jennions M.D. & Petrie M., 1997.** Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biol Rev*; 72:283-327.
- Jennions M.D. & Petrie M., 2000.** Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol Rev*; 75:21-64.
- Johnstone R.A., 1994.** Honest signaling perceptual error and the evolution of ‘all-or-nothing’ displays. *Proc R Soc Lond B*; 256:169-175.
- Johnstone R.A., 1996.** Multiple displays in animal communication: “backup signals” and “multiple messages”. *Philos Trans R Soc Lond B*; 351:329-338.
- Johnstone R.A., 1997.** The evolution of animal signals. In: Krebs J.R. & Davies N.B. (Eds). *Behavioral ecology. An Evolutionary Approach. Blackwell Science*; pp. 155-178.
- Johnstone R.A. & Grafen A., 1993.** Dishonesty and the handicap principle. *Anim Behav*; 46:759-764.
- Keenleyside M.H.A., Rangeley R.W. & Koppers B.U., 1985.** Female mate choice and male parental defense behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Can J Zool*; 63:2489-2493.
- Kennedy M.W. & Nager R.G., 2006.** The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol*; 21:653-655.
- Kirkpatrick M. & Ryan M.J., 1991.** The evolution of mating preference and the paradox of the lek. *Nature*; 350:33-38.
- Klasing K.C., 1998.** Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult Sci*; 77:1119-1125.
- Knapp R.A., 1993.** The influence of egg survivorship on the subsequent nest fidelity of female Bicolor Damselfish, *Stegastes partitus*. *Anim Behav*; 46:111-121.
- Knouft J.H., Page L.M. & Plewa M.J., 2003.** Antimicrobial egg cleaning by fringed darter (Perciformes: Percidae: *Etheostoma crossopterum*): Implications of a novel component of parental care in fishes. *Proc R Soc Lond B*; 270:2405-2411.
- Kobayashi M., Sorensen P.W. & Stacey N.E., 2002.** Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol Biochem*; 26:71-84.
- Kodric-Brown A., 1977.** Reproductive success and evolution of the breeding territories in pupfish (*Cyprinodon*). *Evolution*; 31:750-766.
- Kodric-Brown A., 1983.** Determinants of male reproductive success in pupfish (*Cyprinodon peconensis*). *Anim Behav*; 31:128-137.
- Kodric-Brown A., 1989.** Dietary carotenoids and male mating success in the guppy: an environmental component to female choice. *Behav Ecol Sociobiol*; 25:393-401.

- Kodric-Brown A., 1993.** Female choice of multiple male criteria in guppies: interacting effects of dominance, coloration and courtship. *Behav Ecol Sociobiol*; 32:415-420.
- Kodric-Brown A. & Nicoletto P.F., 2001.** Age and experience effect female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Am Nat*; 157:316-323.
- Kokko H., 1998.** Should advertising parental care honest? *Proc R Soc Lond B*; 265:1871-1878.
- Kortet R., Vainikka A., Rantala M.J. & Taskinen J., 2004.** Sperm quality, secondary sexual characters and parasitism in roach (*Rutilus rutilus* L.). *Biol J Linnean Soc*; 81:111-117.
- Kotiaho J.S., Simmons L.W. & Tomkins J.L., 2001.** Towards a resolution of the lek paradox. *Nature*; 410:684-686.
- Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C.J., 1997.** Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature*; 389:278-280.
- Kraak S.B.M., 1994.** Female mate choice in *Aidablennius sphinx* a fish with parental care for eggs in a nest. *Unpublished PhD thesis, University of Groningen*.
- Kraak S.B.M. & Videler J.J., 1991.** Mate choice in *Aidablennius sphinx* (Teleostei, Blenniidae); females prefer nests containing more eggs. *Behaviour*; 119(3-4):243-266.
- Kvarnemo C. & Ahnesjö I., 1996.** The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol Evol*; 11(10):404-408.
- Landys M.M., Ramenofsky M. & Wingfield J.C., 2006.** Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Gen Comp Endocrinol*; 148:132-149.
- Laumen J., Pern U. & Blüm V., 1974.** Investigations on the function and hormonal regulation of the anal appendices in *Blennius pavo* (Risso). *J Exp Zool*; 190:47-56.
- Lejeune P., 1985.** Le comportement social des Labridés méditerranéens: Etude écoéthologique des comportements reproducteurs et sociaux des Labridés méditerranéens des genres *Symphodus rafinesque*, 1810, et *Coris lacepede*, 1802. *Cah Ethol Appl*; 5:1-208.
- Lieschke G.J. & Trede N.S., 2009.** Fish immunology. *Curr Biol*; 19:678-682.
- Ligon J.D. & Zwartjes P.W., 1995.** Ornate plumage of male red junglefowl does not influence mate choice by females. *Anim Behav*; 49:117-125.
- Lindström K. & Lundström J., 2000.** Male greenfinches (*Carduelis chloris*) with brighter ornaments have higher virus infection clearance rate. *Behav Ecol Sociobiol*; 48:44-51.
- Lindström K., St. Mary C.M. & Pampoulie C., 2006.** Sexual selection for male parental care in the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Behav Ecol Sociobiol*; 60:46-51.
- Little T.J., Perutz M., Palmer M., Crossan C. & Braithwaite V.A., 2008.** Male three-spined sticklebacks make antibiotic nests: a novel form of parental protection? *J Fish Biol*; 73:2380-2389.
- Locatello L., Pilastro A., Deana R., Zarpellon A. & Rasotto M.B., 2007.** Variation pattern of sperm quality traits in two gobies with alternative mating tactics. *Funct. Ecol*; 21:975-981.

- Lochmiller R.L. & Deerenberg C., 2000.** Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*; 88:87-98.
- Loyau A., Saint Jalme M., Cagniant C. & Sorci G., 2005.** Multiple sexual advertisements honestly reflect health status in peacocks (*Pavo cristatus*). *Behav Ecol Sociobiol*; 58:552-557.
- Lozano G.A., 1994.** Carotenoids, parasites, and sexual selectio. *Oikos*; 70:309-311.
- Lugli M., Pavan G. & Torricelli P., 1996.** The importance of breeding vocalizations for mate attraction in a freshwater goby with a composite sound repertoire. *Ethol Ecol Evol*; 8:343-351.
- Magnadottir B., 2006.** Innate immunity of fish. *Fish Shellfish Immunol*; 20:137-151.
- Magnadóttir B., Lange S., Gudmundsdóttir S., Bogwald J. & Dalmo R.A., 2005.** Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol*; 19:429-439.
- Magrath M.J.L. & Komdeur J., 2003.** Is male care compromised by additional mating opportunity? *Trends Ecol Evol*; 18:424-430.
- Mani A.R., Nahavandi A., Moosavi M., Safarinejad R. & Dehpour A.R., 2002.** Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 29:905-908.
- Manica A., 2003.** The effect of brood size and age on partial filial cannibalism in the scissortail sergeant. *J Fish Biol*; 63(1):37-47.
- Marchetti K., 1998.** The evolution of multiple male traits in the yellow-browed leaf warbler. *Anim Behav*; 55:361-376.
- Marchini D., Marri L., Rosetto M., Manetti A.G.O. & Dallai R., 1997.** Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem Biophys Res Commun*; 240:657-663.
- Marconato A. & Bisazza A., 1986.** Males whose nests contain eggs are preferred by female *Cottus gobio* L. (Pisces, Cottidae). *Anim Behav*; 34:292-305.
- Marconato A., Tessari V. & Marin G., 1995.** The mating system of *Xyrichthys novacula*: sperm economy and fertilization success. *J Fish Biol*; 47:292-301.
- Marconato A. & Shapiro D.Y., 1996.** Sperm allocation, sperm production and fertilization rates in the bucktooth parrotfish. *Anim Behav*; 52:971-980.
- Marlowe F.W., 2004a.** When explains Hadza food sharing? *Socioecon Asp Hum Behav Ecol*; 23:69-88.
- Marlowe F.W., 2004b.** Mate preferences among Hadza hunter-gatherers. *Hum Nat Interdiscip Biosoc Perspect*; 15:365-376.
- Marshall F.H.A., 1936.** Sexual periodicity and causes which determine it. *Philos Trans R Soc Lond B*; 226:443-449.
- Masvaer M., Liljedal S. & Folstad I., 2004.** Are secondary sex traits parasites and immunity related to variation in primary sex traits in the arctic charr? *Proc R Soc Lond B*; 271(Suppl 3):s40-s42.
- Matsuura K., Tamura T., Kobayashi N., Yashiro T. & Tatsumi S., 2007.** The antibacterial protein lysozyme identified as the termite egg recognition pheromone. *PlosOne*, 2:e813.

- Mazzoldi C. & Rasotto M.B., 2002.** Alternative male mating tactics in *Gobius niger*. *J Fish Biol*; 61:157-172.
- Mazzoldi C., Scaggiante M., Ambrosin E. & Rasotto M.B., 2000.** Mating system and alternative male mating tactics in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae). *Mar Biol*; 137:1041-1048.
- McGraw K.J., 2005.** Interspecific variation in dietary carotenoid assimilation in birds: links to phylogeny and color ornamentation. *Comp Biochem Physiol B*; 142:245-250.
- McGraw K.J. & Ardia D.R., 2003.** Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. *Am Nat*; 162:704-712.
- McGraw K.J. & Hill G.E., 2000.** Differential effects of endoparasitism on the expression of carotenoid- and melanin-based ornamental coloration. *Proc R Soc Lond B*; 276:1525-1531.
- McLennan D.A. & McPhail J.D., 1990.** Experimental investigation of the evolutionary significance of sexually dimorphic nuptial coloration in *Gasterosteus aculeatus* (L.): the relationship between male colour and female behavior. *Can J Zool*; 68:482-492.
- Meffe G.K. & Snelson F.F., 1989.** An ecological overview of Poeciliid fishes. In: Meffe G.K. & Snelson F.F. (Eds) *Ecology and Evolution of Lovebearing Fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey; pp 13-31.
- Melamed P., Xue Y., Poon J.F., Wu Q., Xie H., Yeo J., Wei T., Foo J. & Chua H.K., 2005.** The male seahorse synthesizes and secretes a novel C-type lectin into the broodpouch during early pregnancy. *FEBS Lett*; 272:1221-1235.
- Milinski M. & Bakker T.C.M., 1990.** Female sticklebacks use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males. *Nature*; 344:330-333.
- Møller A. P., 1988.** Female choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature*; 332:640-642.
- Møller A.P., 1998.** Badge size in the house sparrow *Passer domesticus*: effects of intra- and intersexual selection. *Behav Ecol Sociobiol*; 22:373-378.
- Møller A.P. & Alatalo R.V., 1999.** Good-genes effects in sexual selection. *Proc R Soc Lond B*; 266:85-91.
- Møller A.P. & Pomiankowski A., 1993.** Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behav Ecol Sociobiol*; 32:167-176.
- Møller A.P., Saino N., Taramino G., Galeotti P. & Ferrario S., 1998.** Paternity and multiple signaling: effects of a secondary sexual character and song on paternity in the barn swallow. *Am Nat*; 151:236-242.
- Møller A.P., Biard C., Blount J.D., Houston D.C., Ninni P., Saino N. & Surai P.F., 2000.** Carotenoid-dependent signals: indicator of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Poult Sci*; 11:137-159.
- Moore K.S., Wehrli S., Rodert H., Rogers M., Forrest N.J.Jr., McCrimmon D. & Zasloff M., 1993.** Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *PNAS*; 90:1354-1358.
- Moret Y. & Schmid-Hempel P., 2000.** Survival for immunity: the price of immune system activation from bumblebee workers. *Science*; 290:1166-1168.
- Munehara H., Takano K. & Koya Y., 1989.** Internal gamete association and external fertilization in the elkhorn sculpin, *Alcichthys alcicornis*. *Copeia*: 1989:673-678.

- Myrberg A.A.Jr., 1981.** Sound communication and interception in fishes. In: Tavolga W.N., Popper A.N. & Fay R.R. (Eds). *Hearing and Sound Communication in Fishes*. Springer Verlag, New York. pp. 395-426.
- Myrberg A.A.Jr, Mohler M. & Catala J.D., 1986.** Sound production by males of a coral reef fish (*Pomacentrus partitus*): its significance to females. *Anim Behav*; 34:913-923.
- Nagahama Y., 1983.** The functional morphology of teleost gonads. In: Haor W.S., Randall D.J. & Donaldson (Eds). *Fish physiology vol. IX, part A*, Academic Press, New York. pp.223-275.
- Nakamura M., 1998.** Multiple mating and cooperative breeding in *Polygynandrus alpine* accentors. II. Competition among females. *Anim Behav*; 55:259-275.
- Nakatsuru K. & Kramer D.L., 1982.** Is sperm cheap? Limited male fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces, Characidae). *Science*; 216:753–755.
- Neat F.C. & Locatello L., 2002.** No reason to sneak: why males of all size can breed in the hole nesting blenny *Aidablennius sphinx*. *Behav Ecol Sociobiol*; 52:66-73.
- Neat F.C., Locatello L. & Rasotto M.B., 2003.** Reproductive morphology in relation to alternative male reproductive tactics in *Scartella cristata*. *J Fish Biol*; 62(6):1381-1391.
- Nilsson J.Å., 2002.** Metabolic consequences of hard work. *Proc R Soc Lond B*; 269:1735-1739.
- Nordling D., Andersson M., Zohari S. & Gustafsson L., 1998.** Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc R Soc Lond B*; 265:1291-1298.
- Norris K. & Evans M.R., 2000.** Ecological immunology: life history trade-off and immune defenses in birds. *Behav Ecol*; 11:19-26.
- Norris K., Anwar M. & Read A.F., 1994.** Reproductive effort influence the prevalence of haematozoan parasites in great tits. *J Anim Ecol*; 63:601-610.
- Nur N. & Hasson O., 1984.** Phenotypic plasticity and the handicap principle. *J Theor Biol*; 110:275-297.
- Oliveira R.F., Almada V.C., Forsgren E. & Gonçalves E.J., 1999.** Temporal variation in male traits, nest aggregations and mating success in the peacock blenny. *J Fish Biol*; 54:499-512.
- Oliveira R.F., Miranda J.A., Carvalho N., Gonçalves E.J., Grober M.S. & Santos R.S., 2000.** Male mating success in the Azorean rock-pool blenny: the effects of body size, male behavior, and nest characteristics. *J Fish Biol*; 57:1416-1428.
- Oliveira R.F., Carneiro L.A., Gonçalves D.M., Canário A.V. & Grober, M.S., 2001.** 11-Ketotestosterone inhibits the alternative mating tactic in sneaker males of the peacock blenny, *Salarias pavo*. *Brain Behav Evol*; 58:28–37
- Olson V. & Owens I.P.F., 1998.** Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required. *Trends Ecol Evol*; 13:14.
- Olsson M., Madsen T. & Shine R., 1997.** Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proc R Soc Lond B*; 264:455–459.
- Omland K.E., 1996a.** Females mallard mating preferences for multiple male ornaments. I. Natural variation, *Behav Ecol Sociobiol*; 36:353-360.
- Omland K.E., 1996b.** Females mallard mating preferences for multiple male ornaments. II. Experimental variation. *Behav Ecol Sociobiol*; 36:361-366.

- Östlund S. & Ahnesjö I., 1998.** Female fifteen-spined sticklebacks prefer better fathers. *Anim Behav*; 56:1177-1183.
- Owen J.P. & Clayton D.H., 2007.** Where are the parasites in the PHA response? *Trends Ecol Evol*; 22:228-229.
- Pampoulie C., Lindstrom K. & St Mary C.M., 2004.** Have your cake and eat it too: male sand gobies show more parental care in the presence of female partners. *Behav Ecol*; 15:199-204.
- Papaconstantinou C.A., 1979.** The secondary sex characteristics of blennioid fish (Pisces, Blennidae). *Thalassographica*; 3:57-75.
- Parker G.A., 1970.** Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev*; 4:525-567.
- Parker G.A., 1990 a.** Sperm competition games: raffles and roles. *Proc R Soc Lond Ser B*; 242:120-126.
- Parker G.A., 1990 b.** Sperm competition games: sneaks and extra-pair copulations. *Proc R Soc Lond B*; 242:127-133.
- Parker G.A., 1993.** Sperm completion games: sperm size and sperm number under adult control. *Proc R Soc Lond B*; 253:245-254.
- Parker G.A., Baker R.R. & Smith V.G.F., 1972.** The origin of evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *J Theor Biol*; 36:529-553.
- Partridge L. & Harvey P.H., 1985.** Costs of reproduction. *Nature*; 316:20.
- Passos G.F., Fernandes E.S., Campos M.M., Araujo J.G., Pesquero J.L., Souza G.E., Avellar M.C., Teixeira M.M. & Calixto J.B., 2004.** Kinin B<sub>1</sub> receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol*; 172:1839-1847.
- Patzner R.A. & Seiwald M., 1987.** The reproduction of *Blennius pavo* Risso (Teleostei, Blennidae). VII. Secondary sexual organs and accessory glands of the testis during the reproductive cycle. *Proc V Congr Europ Ichthyol, Stockholm 1985*; pp.293-298.
- Patzner R.A., Seiwald M., Adglasser M. & Kaurin G., 1986.** The reproduction of *Blennius pavo* (Teleostei, Blennidae): V. Reproductive behavior in natural environment. *Zool Anz*; 216:338-350.
- Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Klausner S., Hunziker P. & Fellenberg R.V., 1997.** Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J Appl Microbiol*; 82:372-378.
- Peters A., Denk A.G., Delhey K. & Kempenaers B., 2004.** Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *J Evol Biol*; 17(5):1111-1120.
- Petersen C.W., 1989.** Females prefer mating males in the carmin triplefin, *Axoclinus carminalis*. A paternal brood guarder. *Environ Biol Fishes*; 26:213-221.
- Petersen C.W., 1995.** Male mating success and female choice in permanently territorial damselfishes. *Bull Mar Sci*; 57(3):690-704.
- Petersen C.W. & Warner R.R., 1998.** Sperm competition in fishes. In: BirkHead T.R. & Møller (Eds). *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, San Diego; pp.435-463.
- Petrie M., Hall M., Halliday T., Budgey H. & Pierpoint C., 1992.** Multiple mating in a lekking bird: Why do peahens mate with more than one male and with the same more than once? *Behav Ecol Sociobiol*; 31(5):349-358.



- Pettifor R.A., Perrins C.M. & McCleery R.H., 1988.** Individual optimization of clutch size in great tits. *Nature*; 336:160-161.
- Pilastro A., Giacomello E. & Bisazza A., 1997.** Sexual selection for small size in male mosquitofish (*Gambusia Holbrooki*). *Proc R Soc Lond B*; 264:1125-1129.
- Pilastro A., Gasparini C., Boschetto C. & Evans J.P., 2008.** Colorful male guppies do not provide females with fecundity benefits. *Behav ecol.* 19:374-381.
- Pizzolon M., Rasotto M.B. & Mazzoldi C., 2008.** Male lagoon gobies, *Knipowitschia panizzae*, prefer more ornamented to larger females. *Behav Ecol Sociobiol*; 62:521-528.
- Pizzolon M., Giacomello E., Marri L., Marchini D., Pascoli F., Mazzoldi C. & Rasotto M.B., 2010.** When fathers make the difference: efficacy of male sexually selected antimicrobial glands in enhancing fish hatching success. *Funct Ecol*; 24:141-148.
- Pomiankowski A. & Møller A.P., 1995.** A resolution to the lek paradox. *Proc R Soc Lond B*; 260:21–29.
- Pulsford A.L., Lemairegony S., Tomlinson M., Collingwood N. & Glynn P.J., 1994.** Effects of acute stress on the immune system of the Dab, *Limanda limanda*. *Comp Biochem Physiol C*; 109:129-139.
- Quinn T.P. & Foote C.J., 1994.** The effects of body size and sexual dimorphism on the reproductive behavior of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Anim Behav*; 48:751-761.
- Qvarnström D.C., 1997.** Experimentally increased badge size increased male competition and reduces male parental care in the collared flycatcher. *Proc R Soc B*; 264:1225-1231.
- Raouf S.A., Parker P.G., Ketterson E.D., Nolan V. & Ziegenfus C., 1997.** Testosterone affects reproductive success by influencing extra-pair fertilizations in male dark-eyed juncos (Aves: *Junco hyemalis*). *Proc R Soc Lond B*; 264:1599-1603.
- Rasotto M.B. & Mazzoldi C., 2002.** Male traits associated with alternative reproductive tactics in *Gobius niger*. *J Fish Biol*; 61:173-184.
- Ravi Ram K. & Wolfner M.F., 2005.** Fates and targets of male accessory gland proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*; 35:1059-1071.
- Reaney L.T., 2009.** Female preference for male phenotypic traits in a fiddler crab: do females use absolute or comparative evaluation? *Anim Behav*; 77:139-143.
- Reid M.L. & Weatherhead P.J., 1990.** Mate-choice criteria of Ipswich sparrow: the importance of variability. *Anim Behav*; 40:538-544.
- Reinheimer G., 1992.** *Aquatic Microbiology*. Wiley, New York.
- Reznick D., Nunney L. & Tessier A., 2000.** Bug houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends Ecol Evol*; 15:421-425.
- Richner H., Christe P. & Opplinger A., 1995.** Paternal investment affects prevalence of malaria. *PNAS*; 92:1192-1194.
- Ridley M., 1978.** Parental care. *Anim Behav*; 26:904-932.
- Roberts M.L., Buchanan K.L. & Evans M.R., 2004.** Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Anim Behav*; 68:227-239.

- Roger H.J. & Perkins H.R., 1968.** Cell Walls and Membranes. *Spon Press. London.*
- Rohwer S., 1978.** Parental cannibalism of offspring and egg raiding as a courtship strategy. *Am Nat*; 112:429-440.
- Rolff J., 2002.** Bateman's principle and immunity. *Proc R Soc Lond B*; 269:867-872.
- Ros A.F.H., Bouton N., Santos R.S. & Oliveira R.F., 2006.** Alternative male reproductive tactics and the immunocompetence handicap in the Azorean rock-pool blenny, *Parablennius parvicornis*. *Proc R Soc B*; 273:901-909.
- Ros A.F.H., Fagundes T. & Oliveira R.F., 2009.** Adjustment of brood size and androgen levels in a teleost species with exclusive male parental care. *Anim Behav*; 78:25-33.
- Rosenqvist G., 1990.** Male mate choice and female-female competition for mates in pipefish *Nerophis ophidian*. *Anim Behav*; 39:1110-1115.
- Rudolfson G., Figenschou L., Folstad I., Tveiten H. & Figenschou M., 2006.** Rapid adjustments of sperm characteristics in relation to social status. *Proc R Soc Lond B*; 273:325-332.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. & Nash J.P., 2004.** The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*; 234:1-28.
- Ryan M.J., 1990.** Sexual selection, sensory system and sensory exploitation. *Oxford Surv Evol Biol*; 7:157-195.
- Ryan M.J. & Rand A.S., 1993.** Sexual selection and signal evolution: the ghost of biases past. *Philos Trans R Soc Lond B*; 340:187-195.
- Ryan M. J. & Wagner W. E. Jr., 1987.** Asymmetries in mating preferences between species: female swordtails prefer heterospecific males. *Science*, 236:595-597.
- Sadd B.M. & Schmid-Hempel P., 2007.** Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's eggs in bumblebees. *Curr Biol*; 17:1046-1047.
- Sadd B.M., Kleinlogel Y., Schmid-Hempel R. & Schmid-Hempel P., 2005.** Trans-generational immune priming in a social insect. *Biol Lett*; 1:386-388.
- Saino N., Bolzern A.M. & Møller A.P., 1997. Immunocompetence, ornamentation, and viability of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *PNAS* 94:549-552.
- Saino N., Romano M., Ambrosiani R., Ferrari R.P. & Moller A.P., 2004.** Timing of reproduction and egg quality covary with temperature in the insectivorous barn swallow, *Hirundo rustica*. *Funct Ecol*; 18:50-57
- Saino N., Martinelli R., Biard C., Gil D., Spottiswoode C.N., Rubolini D., Surai P.F. & Moller A.P., 2007.** Maternal immune factors and the evolution of secondary sexual characters. *Behav Ecol*; 18:513-520.
- Saraiva J.L., Barata E.N. Canário A.V.M & Oliveira R.F., 2009 a.** The effect of nest aggregation on the reproductive behaviour of the peacock blenny *Salaria pavo*. *J Fish Biol*; 74:754-762.
- Saraiva, J.L., Gonçalves D.M. & Oliveira R.F., 2009 b.** Environmental modulation of androgen levels and secondary sex characters in two populations of the peacock blenny *Salaria pavo*. *Horm Behav*; in press doi:10.1016/j.yhbeh.2009.10.013.
- Sargent R.C., 1988.** Parental care and egg survival both increase with clutch size in the fathead minnow *Pimephales promales*. *Behav Ecol Sociobiol*; 23:33-37.

- Scaggiante M., Mazzoldi C., Petersen C.W. & Rasotto M.B., 1999.** Sperm competition and mode of fertilization in the grass goby *Zosterisessorae ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae). *J Exp Zool*; 283:81-90.
- Sheldon B.C., Merila J., Qvarnström A., Gustafsson L. & Ellegren H., 1997.** Paternal genetic contribution to offspring condition predicted by size of male secondary sexual character. *Proc R Soc Lond B*; 264:297-302.
- Scheuber H., Jacot A. & Brinkhof M.W.G., 2003.** Condition-dependence of a multi-component sexual signal in the field cricket *Gryllus campestris*. *Anim Behav*; 65:721-727.
- Schluter D. & Price T., 1993.** Honesty, perception and population divergence in sexually selected traits. *Proc R Soc Lond B*; 253:117-122.
- Schmid-Hempel P., 2003.** Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc R Soc Lond B*; 270:357-366.
- Shapiro D.Y., Marconato A. & Yoshikawa T., 1994.** Sperm economy in a coral reef fish. *Ecology*; 75:1334-1344.
- Shaw A.F.B., 1930.** A direct method for counting the leukocytes, thrombocytes and erythrocytes of bird's blood. *J Pathol Bacteriol*; 33:833-835.
- Searcy W.A., 1992.** Song repertoire and mate choice in birds. *Am Zool*; 32(1):71-80.
- Segantin G.M., 1968.** I Blennidae del Litorale Veneto. *Bollettino del museo Civico di Storia Naturale di Venezia*; 18:41-68.
- Senar J.C., 1999.** Plumage coloration as a signal of social status. *Proceedings of the International Ornithological Congress*; 22:1669-1686.
- Serrano R.M., Barata E.N., Birkett M.A., Hubbard P.C., Guerreiro P.S. & Canário A.V.M., 2008a.** Behavioral and olfactory responses of female *Salaria pavo* (Pisces: Blenniidae) to a putative multi-component male pheromone. *J Chem Ecol*; 34:647-658.
- Serrano R.M., Lopes O., Hubbard P.C., Araújo J., Canário A.V.M. & Barata E.N., 2008b.** Seasonal cell differentiation and olfactory potency of secretions by the anal glands of male peacock blenny. *J Fish Biol*; 73:1790-1798.
- Serrano R.M., Lopes O., Hubbard P.C., Araújo J., Canário A.V.M. & Barata E.N., 2008c.** 11-Ketotestosterone stimulates putative sex pheromone production in the male peacock blenny, *Salaria pavo* (Risso 1810). *Biol Reprod*; 79:861-868.
- Shawkey M.D., Kosciuch K.L., Liu M., Rohwer F.C., Loos E.R., Wang J.M. & Beissinger S.R., 2008.** Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs? *Behav Ecol*; 19:920-927.
- Sheldon B.C., 1994.** Song rate and fertility in the chaffinch. *Anim Behav*; 47:986-987.
- Sheldon B.C., 2000.** Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trend Ecol Evol*; 15:397-402.
- Sheldon B.C. & Ellegren H., 1999.** Sexual selection resulting from extrapair paternity in collared flycatchers. *Anim Behav*; 57:285-298.
- Sheldon B.C. & Verhulst S., 1996.** Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol*; 11:317-321.
- Sheldon B.C., Merilä J., Qvarnström A., Gustafsson L. & Ellegren H., 1997.** Paternal genetic contribution to offspring condition predicted by size of male secondary sexual character. *Proc R Soc Lond B*; 264:297-302.

- Sheppey K. & Ribbink A.J., 1985.** Mating interruption, an alternative to sexual selection in cichlid fish. *S Afr J Sci*; 81:702.
- Sild E. & Hõrak P., 2009.** Nitric oxide production: an easily measurable condition index for vertebrates. *Behav Ecol Sociobiol*; 63:959-966.
- Simmons L.W. & Roberts B., 2005.** Bacterial immunity traded for sperm viability in male crickets. *Science*; 309:2031-2031.
- Skau P.A. & Folstad I., 2005.** Does immunity regulate ejaculate quality and fertility in humans? *Behav Ecol*; 16:410-416.
- Slagsvold T., Lifjeld J.T., Stenmark G., & Breiehagen T., 1988.** On the cost of searching for a mate in female pied flycatchers, *Ficedula hypoleuca*. *Anim Behav*; 36: 433-442.
- Snook R.R., 2005.** Sperm competition: not playing by the numbers. *Trends Ecol Evol*; 20:46-53.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J., 1997.** *Biometry, 3rd edn.* W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Soler J.J., Cuervo J.J., Møller A.P. & de Lope F., 1998.** Nest building is a sexually selected behavior in the barn swallow. *Anim Behav*; 56:1435-1442.
- Sorenson L.G. & Derrickson S.R., 1994.** Sexual selection in the northern pintail (*Anus acuta*): the importance of female choice versus male competition in the evolution of sexually selected traits. *Behav Ecol Sociobiol*; 35:389-400.
- Stacey N., 2003.** Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiol Biochem*; 28:229-235.
- Stacey N. & Sorensen P., 1999.** Pheromones, fish. In: Knobil E. & Neill J. (Eds). *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 3. Academic Press, London. pp.748-755.
- Stacey N. & Sorensen P., 2005.** Reproductive pheromones. In: Sloman K.A., Wilson R.W. & Balshine S. (eds), Behaviour and Physiology of Fish. *Academic Press, London*. pp. 293-298.
- Stiver K.A. & Alonzo S.H., 2009.** Parental and mating effort: is there necessarily a trade-off? *Ethology*; 115:1101-1126.
- Stockley P., Gage M.J.G., Parker G.A. & Møller A.P., 1997.** Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *Am Nat*, 149:933-954.
- Sunobe T., Takenobu O. & Nakazono A., 1995.** Mating system and spawning cycle in the blenny, *Istiblennius enosimae*, at Kagoshima Japan. *Environ Biol Fishes*; 43:195-199.
- Taborsky M., 1994.** Sneakers, satellites, and helpers: parasitic and cooperative behavior in fish reproduction. *Adv Study Behav*; 23:1-100.
- Taborsky M., 1998.** Sperm competition in fish: "bourgeois" male and parasitic spawning. *Trends Ecol Evol*; 13(6):222-227.
- Taborsky M., 2001.** The evolution of bourgeois, parasitic, and cooperative behaviors in fishes. *J Hered*; 92:100-110.
- Taborsky M., 2008.** Alternative reproductive tactics in fish. In: Oliveira R., Taborsky M. & Brockmann H.J. (Eds). *Alternative reproductive tactics. An integrative approach.* Cambridge University Press, Cambridge. pp.251-299.
- Taylor P.D. & Williams G.C., 1982.** The lek paradox is not resolved. *Theor Pop Biol*; 22:392-409.

- Thompson S., 1983.** Homing in a territorial reef fish. *Copeia*; 1983:832-834.
- Thresher R.E., 1984.** Reproduction in Reef Fishes. *TFH Publ.* Neptune City, New Jersey.
- Toranzo A.E., Magariños B. & Romalde J.L., 2005.** A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*; 246:31-67.
- Torres R. & Velando A., 2007.** Male reproductive senescence: the price of immune-induced oxidative damage on sexual attractiveness in the blue-footed booby. *J Anim Ecol*; 76:1161-1168.
- Treasurer J.W., Cochrane E. & Grant A. 2005.** Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. *Aquaculture*; 250:27-35.
- Tregenza T. & Wedell N., 2000.** Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage. *Mol Ecol*; 9:1013-1027.
- Tregenza T., Simmons L.W., Wedell N. & Zuk M., 2006.** Female preference for male courtship song and its role as a signal of immune function and condition. *Anim Behav*; 72:809-818.
- Trivers R.L., 1972.** Parental investment and sexual selection. In: Campbell B. (Ed.). *Sexual selection and the descent of man*. Aldine, Chicago; pp.136-179.
- Turner G.F., 1993.** Teleost mating behavior. In: Pitcher T.J. (Ed.). *The behavior of teleost fishes*, Chapman & Hall, London; pp.307-331.
- Uglem I., Golloway T.F., Rosenqvist G. & Folstad I., 2001.** Male dimorphism, sperm traits and immunology in the corkwing wrasse (*Symphodus melops* L.). *Behav Ecol Sociobiol*; 50:511-518.
- Underwood A.J. 1997.** Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. *Cambridge University Press*.
- Vajdovich P., 2008.** Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 38:31-123.
- Van Den Hurk R. & Resink J.W., 1992.** Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish. *J Exp Zool*; 261:204-213.
- van Doorn G.S. & Weissing T.J., 2004.** The evolution of female preferences for multiple indicators of quality. *Am Nat*; 168:173-186.
- van Noordwijk A.J & de Jong G., 1986.** Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *Am Nat*; 128:137-142.
- Verner-Jeffreys D.W., Nakamura I. & Shields R.J., 2006.** Egg-associated microflora of Pacific threadfin, *Polydactylus sexfilis* and amberjack, *Seriola rivoliana*, eggs. Characterisation and properties. *Aquaculture*; 253:184-196.
- Victor V.M., Rocha M. & De la Fuente M., 2004.** Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol*; 4:327-347.
- Vladić T.C. & Järvi T., 2001.** Sperm quality in the alternative reproductive tactics of Atlantic salmon: the importance of the loaded raffle mechanism. *Proc R Soc Lond B*; 268:2375-2381.
- von Schantz T., Bensch S., Grahn M., Hasselquist D. & Wittzell H., 1999.** Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc R Soc Lond B*; 266:1-12.

- Warner R.R., 1984.** Mating behavior and hermaphroditism in coral reef fishes. *Am Sci*; 72:128-136.
- Warner R.R & Robertson D.R., 1978.** Sexual pattern in the laborid fishes of the Western Caribbean, I: the wrasses (Labridae). *Smiths Cont Zool*; 254:1-27.
- Watts M., Munday B.L. & Burke C.M., 2001.** Immune responses of teleost fish. *Aust Vet J*; 79:570-574.
- Webster J.P. & Woolhouse E.J., 1999.** Cost of resistance: relationship between reduced fertility and increased resistance in a snail-schistome host-parasite system. *Proc R Soc Lond B*; 266:391-396.
- Wedekind C., 1992.** Detailed information about parasites revealed by sexual ornamentation. *Proc R Soc Lond B*; 247:169-174.
- Wedekind C. & Folstad I., 1994.** Adaptive or nonadaptive immunosuppression by sex hormones? *Am Nat*; 143(5):936-938.
- Wedell N., 1997.** Ejaculate size in bushcrickets: The importance of being large. *J Evol Biol*; 10(3):315-139.
- Wedell N., Gage M.J.G. & Parker G.A., 2002.** Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends Ecol Evol*; 17(7):313-320.
- Wellman-Labadie O., Picman J. & Hincke M.T., 2008.** Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. *Comp Biochem Physiol B*; 149, 640–649.
- West-Eberhard M.J., 1979.** Sexual selection, social competition, and evolution. *Proc Am Phil Soc*; 123:222-234.
- Westneat D.F. & Sherman P.W., 1997.** Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behav Ecol Sociobiol*; 41:205-215.
- Weatherhead P.J., Metz K.J., Bennett G.F. & Irwin R.E., 1993.** Parasites fauna, testosterone and secondary sexual traits in male red-winged blackbirds. *Behav Ecol Sociobiol*; 33:13-23-
- Widemo F. & Saether S.A., 1999.** Beauty is in the eye of the beholder: comparing method performance with congruence. *Biol J Linnean Soc*; 70:613-632.
- Wiersma P., Selman C., Speakman J.R. & Verhulst S., 2004.** Bird sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc R Soc Lond B*; 271:360-363.
- Wiesel P., Patel A.P., Di Fronzo N., Marria P.B, Sim C.U., Pellacani A., Maemura K., Le Blanc B.W., Marino K., Doershuk C.M., Yet S.F., Lee M.E. & Perrella M.A., 2000.** Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and and-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*; 192:3015-3022.
- Wong B.B. & Candolin U., 2005.** How is female mate choice affected by male competition? *Biol Rev*; 80:559-571.
- Wu Y. & Daeschel M.A., 2007.** Lytic antimicrobial activity of hen egg white lysozyme immobilized to polystyrene beads. *J Food Sci*; 72:369-374.
- Yasui Y., 1997.** A 'good sperm' model can explain the evolution of costly multiple mating by females. *Am Nat*; 149:573-584.
- Zahavi A., 1975.** Mate selection-A selection for a handicap. *J Theor Biol*; 53:205-214.
- Zander C.D., 1975.** Secondary sex characteristics of Blennoid fishes (Perciformes). *Pubbl Stn Zool Napoli*; 39(Suppl):717-727.

**Zander C.D., 1986.** Blenniidae. In: Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J. & Tortonese E. (Eds). *Fishes of North-eastern Atlantic and the Mediterranean, Vol 3. UNESCO, Paris*; pp.1096-1112.

**Zeeck E & Ide V., 1995.** The role of sex pheromones in the reproductive behavior of *Blennius pavo* (Risso). In: Canário A.V.M. & Power D.M., *Fish Pheromones. Origins and modes of action, Faro, Portugal: Centre of Marine Science, University of Algave*; pp.33-38.

**Zhang J.X., Rao X.P., Sun L., Zhao C.H. & Qin X.W., 2007.** Putative chemical signals about sex, individual and genetic background in the preputial gland and urine of the housemouse (*Mus musculus*). *Chemical Senses*; 32, 293-303.

**Zuk M., Thornhill R., Ligon J.D., Johnson K., Austad S., Ligon S.H., Thornhill N.W. & Costin C., 1990.** The role of male ornaments and courtship behavior in female mate choice of red jungle fowl. *Am Nat*; 136:459-473.