



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova - Dipartimento di Biologia

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
CICLO XX

**MECCANISMI DELLA SELEZIONE SESSUALE POSTCOPULATORIA IN
GUPPY (*Poecilia reticulata*), UN PESCE TELEOSTEO A FECONDAZIONE
INTERNA.**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.mo Prof. Andrea A. Pilastro

Dottoranda: Chiara Boschetto

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

*“... chi ha contemplato una volta
con i propri occhi la bellezza della natura,
non è destinato alla morte, come pensa Platen,
bensì alla natura stessa,
di cui ha intravisto le meraviglie.
E se ha davvero degli occhi per vedere,
costui diverrà inevitabilmente un naturalista.”*

*- Konrad Lorenz,
L'anello di Re Salomone -*

INDICE

RIASSUNTO	- 8 -
------------------	--------------

ABSTRACT	- 13 -
-----------------	---------------

INTRODUZIONE GENERALE	- 17 -
------------------------------	---------------

1.	SELEZIONE SESSUALE	- 17 -
1.1.	MODELLI FISHERIANI O RUNAWAY SELECTION	- 18 -
1.2.	MODELLI GENETICI	- 18 -
2.	EVOLUZIONE DELL'ANISOGAMIA	- 19 -
3.	ACCOPPIAMENTI MULTIPLI DA PARTE DELLE FEMMINE	- 21 -
4.	COMPETIZIONE SPERMATICA	- 23 -
4.1.	MECCANISMI DELLA COMPETIZIONE SPERMATICA	- 24 -
4.2.	ADATTAMENTI ALLA COMPETIZIONE SPERMATICA	- 25 -
4.2.1.	ADATTAMENTI A LIVELLO DI EIACULATO E SPERMI	- 25 -
4.2.2.	ADATTAMENTI COMPORTAMENTALI	- 27 -
4.2.3.	ADATTAMENTI MORFOLOGICI	- 27 -
4.2.4.	ADATTAMENTI FISIOLOGICI	- 28 -
5.	SCELTA CRIPTICA FEMMINILE	- 29 -
5.1.	MECCANISMI DELLA SCELTA CRIPTICA FEMMINILE	- 30 -
5.2.	ADATTAMENTI ALLA SCELTA CRIPTICA FEMMINILE	- 31 -
6.	BENEFICI DELLA POLIANDRIA	- 33 -
6.1.	BENEFICI DIRETTI	- 34 -
6.2.	BENEFICI INDIRETTI	- 34 -
6.2.1.	MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEL PARTNER (TRADING-UP HYPOTHESIS)	- 35 -
6.2.2.	AUMENTO DELLA DIVERSITÀ GENETICA DELLA PROLE	- 35 -
6.2.3.	EVITARE L'INCOMPATIBILITÀ GENETICA (GENETIC COMPATIBILITY HYPOTHESIS)	- 36 -
6.2.4.	MAGGIOR SUCCESSO RIPRODUTTIVO (DI COMPETIZIONE SPERMATICA) DEI FIGLI MASCHI (SEXY SPERM HYPOTHESIS)	- 37 -
6.2.5.	MAGGIOR PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA DEI FIGLI (GOOD SPERM HYPOTHESIS)	- 37 -

SCOPO DELLA TESI	- 40 -
-------------------------	---------------

BIOLOGIA DI <i>POECILIA RETICULATA</i>	- 42 -
---	---------------

1.	CARATTERISTICHE GENERALI	- 42 -
2.	BIOLOGIA RIPRODUTTIVA	- 43 -
3.	COMPORTAMENTO SESSUALE	- 45 -
4.	SELEZIONE SESSUALE POSTCOPULATORIA IN <i>POECILIA RETICULATA</i>	- 50 -

MATERIALI E METODI COMUNI - 53 -

1.	SPECIE OGGETTO DI STUDIO	- 53 -
2.	ESTRAZIONE MANUALE DEGLI SPERMI	- 54 -
3.	INSEMINAZIONE ARTIFICIALE	- 55 -
4.	MISURAZIONE DELLE CARATTERISTICHE FENOTIPICHE DEI MASCHI	- 56 -
5.	ANALISI DI PATERNITÀ MEDIANTE MICROSATELLITI	- 58 -
5.1.	ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TESSUTO	- 60 -
5.2.	AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO ESTRATTO	- 60 -
5.3.	ANALISI DEI PRODOTTI DI PCR	- 61 -

EXP.#1. BENEFICI DIRETTI DELLA PROMISCUITÀ FEMMINILE: QUALITÀ DELL'EIACULATO E FECONDITÀ FEMMINILE - 62 -

1.	INTRODUZIONE	- 62 -
2.	MATERIALI E METODI	- 64 -
3.	RISULTATI	- 65 -
4.	DISCUSSIONE	- 70 -

EXP.#2. IMPORTANZA RELATIVA DEL NUMERO E DELLA QUALITÀ DEGLI SPERMI NEL SUCCESSO DI COMPETIZIONE SPERMATICA - 73 -

1.	INTRODUZIONE	- 73 -
2.	MATERIALI E METODI	- 74 -
2.1.	ANALISI DEGLI SPERMI	- 75 -
2.1.1.	CONTEGGIO DEL NUMERO DI SPERMI PER BUNDLES	- 75 -
2.1.2.	MORFOLOGIA DEGLI SPERMI	- 76 -
2.1.3.	VITALITÀ DEGLI SPERMI	- 77 -
2.1.4.	VELOCITÀ <i>IN VITRO</i> DEGLI SPERMI	- 77 -
3.	RISULTATI	- 79 -
4.	DISCUSSIONE	- 84 -

EXP.#3: STUDIO DELLA RIPETIBILITÀ DEL SUCCESSO DI COMPETIZIONE SPERMATICA - 86 -

1.	INTRODUZIONE	- 86 -
2.	MATERIALI E METODI	- 88 -
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	- 88 -

EXP.#4: RUOLO DEI GENI MHC NELLA SCELTA CRIPTICA FEMMINILE NON DIREZIONALE - 91 -

1	INTRODUZIONE	- 91 -
1.1.	IL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ	- 91 -
1.1.1.	MOLECOLE MHC CLASSE I	- 92 -
1.1.2.	MOLECOLE CLASSE II	- 93 -
1.2.	MHC E SCELTA FEMMINILE	- 94 -
2.	MATERIALI E METODI	- 98 -
2.1.	ANALISI GENOTIPO MHC	- 99 -
2.1.1.	ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO	- 99 -
2.1.2.	AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR	- 100 -

2.1.3.	CLONAGGIO DEI PRODOTTI DI PCR E SCREENING DEI CLONI	- 100 -
2.1.4.	SEQUENZIAMENTO DEI CLONI POSITIVI E ANALISI DELLE SEQUENZE OTTENUTE	- 101 -
3.	RISULTATI	- 102 -
4.	DISCUSSIONE	- 106 -

CONCLUSIONI GENERALI **- 108 -**

BIBLIOGRAFIA **- 111 -**

RIASSUNTO

In conseguenza della promiscuità sessuale, una parte del successo riproduttivo di un individuo è determinata da fenomeni che avvengono dopo il rilascio dei gameti (dopo l'inseminazione per quanto riguarda gli organismi a fecondazione interna) e le classiche forme di selezione sessuale quali la competizione maschile e la scelta femminile, continuano a livello postcopulatorio rispettivamente in forma di competizione spermatica e scelta criptica femminile. La competizione spermatica è stata definita come la competizione fra gli spermatozoi di più maschi per fecondare le uova di una femmina, mentre la scelta criptica femminile comprende i meccanismi che consentono alla femmina di esercitare controllo sulla fecondazione delle uova a favore di un maschio rispetto ad un altro. La scelta criptica femminile può essere direzionale, se favorisce gli stessi criteri su cui si basa la scelta femminile precopulatoria, oppure può essere non direzionale, se il successo di fecondazione di un maschio è dovuto a processi di interazione fra il genotipo maschile e femminile. Il successo riproduttivo di un individuo, pertanto, è dovuto a tutti questi aspetti, anche se la loro relativa importanza è poco conosciuta. In questa tesi mi sono riproposta di valutare il relativo ruolo dei processi sotto controllo maschile (qualità degli spermatozoi) e sotto controllo femminile (scelta criptica) nel successo di competizione spermatica.

La specie oggetto di studio è *Poecilia reticulata*, un piccolo teleosteo d'acqua dolce, ovoviviparo, a fecondazione interna, in cui il trasferimento degli spermatozoi avviene tramite un organo copulatore (detto gonopodio) che si forma nei maschi per modificazione della pinna anale. Questa specie è caratterizzata da un sistema nuziale non basato su risorse materiali, cioè i maschi contribuiscono alla riproduzione solamente con i loro spermatozoi. La promiscuità sessuale è alta e durante la fase recettiva (lunga circa 3-4 giorni) le femmine si accoppiano con numerosi maschi, preferendo quelli che manifestano una colorazione a carotenoidi più estesa. Di norma, esse tendono ad accoppiarsi con il primo maschio che incontrano, verosimilmente per assicurarsi una quantità di spermatozoi sufficiente a fecondare tutte le loro uova, e si riaccoppiano se il secondo partner è di qualità migliore del primo. È stato infatti dimostrato che la disponibilità della femmina a riaccoppiarsi aumenta in funzione della colorazione del maschio: la percentuale di carotenoidi di un maschio è un buon indice della sua qualità genetica e maschi con una maggiore estensione delle macchie a carotenoidi sembrano essere portatori di geni in grado di conferire una maggior probabilità di sopravvivenza alla prole. Dato pertanto che gli accoppiamenti multipli in guppy non sono simultanei ma sequenziali, la poliandria può essere un mezzo per migliorare la qualità del maschio che feconderà le uova della femmina senza pagare il costo di ritardare l'inizio della riproduzione.

In questa specie, le femmine immagazzinano gli spermatozoi di precedenti accoppiamenti in pliche della mucosa ovarica e possono produrre numerose figlie successive utilizzando questi spermatozoi.

Ogni maschio può adottare due tattiche riproduttive: può corteggiare la femmina (*sigmoid display*) oppure può tentare di inseminarla forzatamente (*gonopodial thrust*). L'efficienza di inseminazione delle due tattiche è notevolmente diversa e il successo di inseminazione del *gonopodial thrust* è circa tre volte inferiore a quello delle copule sollecitate, anche se il numero di spermatozoi trasferiti durante copule coercitive può essere occasionalmente alto.

L'estensione delle macchie a carotenoidi è associata anche ad aspetti postcopulatori della riproduzione. Essa correla positivamente, infatti, sia con le dimensioni delle riserve spermatiche sia con aspetti qualitativi (vitalità e velocità) degli spermatozoi prodotti. Maschi con colorazione a carotenoidi relativamente più estesa hanno anche tassi di produzione di spermatozoi maggiori e trasferiscono più spermatozoi durante le copule cooperative (ma non durante le copule forzate). Maschi più attraenti hanno un maggior successo nella competizione spermatica rispetto a rivali meno attraenti, sia in accoppiamenti naturali, sia quando il numero di spermatozoi inseminati viene mantenuto costante sperimentalmente, attraverso l'inseminazione artificiale. Quest'ultimo risultato, in particolare, dimostra che in questa specie la preferenza femminile precopulatoria può essere rinforzata attraverso meccanismi postcopulatori che agiscono esclusivamente a livello fisiologico. Lo stesso risultato potrebbe essere determinato da una maggior mortalità degli embrioni fecondati dai maschi meno colorati. Per escludere questo tipo di effetto, ho condotto il primo esperimento di questa tesi (Benefici diretti della promiscuità femminile: qualità dell'eiaculato e fecondità femminile). I caratteri sessuali secondari (CSS) evolvono in molte specie in conseguenza della scelta femminile precopulatoria verso maschi con CSS più sviluppati. E' stato proposto che da tali accoppiamenti le femmine ottengano dei benefici, che possono essere di tipo diretto (materiale) o di tipo indiretto (genetici). In specie con sistemi di accoppiamento non basati su risorse materiali (come *Poecilia reticulata*), in cui i maschi contribuiscono alla riproduzione esclusivamente mediante gli spermatozoi, la preferenza femminile si pensa sia guidata dall'ottenimento di benefici di tipo genetico, che si manifestano in una maggiore sopravvivenza della prole o nel maggior successo riproduttivo dei figli maschi. Un'alternativa è costituita dalla *Phenotype-linked fertility hypothesis* (PLFH): se i CSS elaborati correlano positivamente con l'efficienza di fecondazione di un maschio, le femmine che si accoppiano con maschi con ornamenti più sviluppati beneficiano di una maggior fecondità. Per testare questa ipotesi, ho inseminato artificialmente delle femmine vergini con gli spermatozoi di maschi con diverse percentuali di carotenoidi sulla livrea. Inoltre, ho formato gruppi sperimentali in cui le femmine venivano inseminate con numeri diversi di spermatozoi di maschio, in modo da verificare l'effetto delle dimensioni dell'eiaculato sulla fecondità della femmina. L'inseminazione artificiale è una tecnica che permette di controllare per possibili variabili confondenti, come eventuali effetti di allocazione differenziale materna, ordine di accoppiamento, numero di spermatozoi inseminati, scelta criptica femminile direzionale. In questa specie, gli spermatozoi sono anche impacchettati in spermatozeugme (bundles) che contengono un numero relativamente costante di spermatozoi. Questo permette di controllare il numero di spermatozoi da inseminare nella femmina semplicemente contando le bundles che si prelevano. Dopo il parto, sono stati registrati il numero di piccoli prodotti e il tempo trascorso dal momento dell'inseminazione al parto. Nessuna di queste due variabili, e nemmeno la probabilità che una femmina partorisce, risultano influenzate significativamente dalla percentuale di carotenoidi del maschio. Questi risultati suggeriscono che le femmine non ottengono una maggior fecondità dall'accoppiamento con maschi più colorati. Nemmeno il numero di spermatozoi inseminati ha effetto sulle variabili misurate, neppure a concentrazioni di spermatozoi pari al numero trasferito durante copule coercitive, suggerendo che, in media, le riserve di spermatozoi di un maschio sono sostanzialmente più grandi del minimo numero di spermatozoi necessario a garantire la fecondità della femmina. Se si considerano i numerosi tentativi di copula coercitiva

che la femmina subisce durante la vita, e che essa si accoppia in modo consensuale con numerosi maschi per ogni ciclo riproduttivo, risulta anche improbabile che le riserve di spermatozoi di una femmina siano insufficienti a garantire la fecondazione delle sue uova. Pertanto, nonostante questi maschi producano eiaculati di qualità superiore, i caratteri sessuali secondari non sembrano segnalare alle femmine la maggior efficienza di fecondazione di un maschio più colorato, come era stato invece proposto dalla PLFH. Inoltre, si può escludere che vi sia mortalità differenziale degli embrioni fecondati da maschi con diversa colorazione a carotenoidi, confermando che alcuni maschi producono eiaculati più competitivi di altri e che li favoriscono in termini di competizione spermatica.

In *Poecilia reticulata*, la scelta femminile precopulatoria può essere rinforzata anche attraverso meccanismi di scelta criptica femminile: le femmine, durante le copule cooperative, accettano un numero maggiore di spermatozoi da maschi percepiti come relativamente più attraenti. Un successivo studio ha dimostrato che il meccanismo (o uno dei meccanismi) attraverso cui le femmine esercitano tale controllo è la modulazione della durata dell'accoppiamento: il numero di spermatozoi trovati nel gonodotto femminile è, infatti, proporzionale alla durata della copula. Questo meccanismo potrebbe rappresentare un controadattamento delle femmine alle continue copule coercitive a cui sono sottoposte: accettando un maggior numero di spermatozoi dal maschio più attraente con cui si accoppia, le femmine potrebbero favorire tale maschio nella competizione spermatica. Condizione fondamentale per il verificarsi di tale scenario è che il numero degli spermatozoi trasferiti/accettati sia un fattore più importante per il successo di competizione spermatica rispetto alle caratteristiche qualitative degli spermatozoi (velocità, longevità e morfologia). Questo è stato lo scopo del secondo esperimento di questa tesi (Importanza relativa del numero e della qualità degli spermatozoi nel successo di competizione spermatica). Ho condotto dei test di competizione spermatica in cui due gruppi di femmine venivano inseminate artificialmente con gli spermatozoi di due maschi diversi: nel primo gruppo, le femmine venivano inseminate con numeri uguali di spermatozoi di ciascuno dei due maschi, mentre nel secondo gruppo esse venivano inseminate con numeri diversi di spermatozoi dei due maschi. Tramite marcatori microsatellite, è stato poi determinato il relativo successo di fecondazione dei due maschi, attribuendo la paternità alla prole. Dai risultati, è emerso un significativo ruolo del numero degli spermatozoi inseminati nel successo di competizione spermatica: all'interno della coppia il maschio che insemina un maggior numero di spermatozoi feconda anche una proporzione maggiore di uova. Questo risultato conferma che la manipolazione della durata della copula, e quindi del numero di spermatozoi inseminati da un maschio, sia un meccanismo adottato dalla femmina per sbilanciare la paternità delle sue uova a favore del maschio preferito. Un secondo risultato di questo esperimento consiste nell'effetto positivo della colorazione iridescente del maschio sul suo successo nella competizione spermatica. Non si sono però rilevate correlazioni fra questa componente della livrea maschile e nessuna caratteristica degli spermatozoi; pertanto, questo esperimento ha messo in luce un aspetto prima non conosciuto della colorazione iridescente nella selezione sessuale postcopulatoria in questa specie, anche se i meccanismi attraverso cui questo si verifica sono ancora da chiarire e rappresentano un obiettivo futuro della ricerca in questo campo.

In questa specie poco è finora noto riguardo la selezione sessuale postcopulatoria non direzionale. I principali modelli teorici riguardanti la competizione spermatica hanno come assunto che la competitività dell'eiaculato non

dipenda dall'ambiente in cui si trova e che pertanto il successo riproduttivo di un maschio rimanga costante in accoppiamenti con femmine diverse. Questa assunzione è tanto più improbabile nelle specie a fecondazione interna, nelle quali l'ambiente dove si svolge la competizione spermatica è rappresentato dal tratto riproduttivo femminile, e l'interazione fra i gameti dei due partner maschili o fra il gonodotto femminile e i gameti maschili è probabilmente molto importante. Se questo è vero l'assunto che da accoppiamenti con femmine diverse risulti vincitore sempre lo stesso maschio, grazie alle qualità intrinseche del suo eiaculato e dei suoi spermatozoi, potrebbe non essere valido. Inoltre, spesso gli effetti di caratteri maschili quali il numero degli spermatozoi o la loro qualità può mascherare gli effetti della compatibilità genetica, più difficili da individuare ed isolare, e di conseguenza la relativa importanza dei processi postcopulatori nel determinare il successo di competizione spermatica può essere difficile da individuare. Il confronto del successo di competizione spermatica di un maschio dopo accoppiamento con due femmine diverse può fornire informazioni sull'importanza dell'interazione maschio-femmina nel determinare il successo di competizione spermatica. A questo scopo ho inseminato artificialmente due diverse femmine con numeri uguali di spermatozoi di due maschi (esperimento 3: studio della ripetibilità del successo di competizione spermatica): se il successo di fecondazione di un maschio è ripetibile, cioè se il successo di competizione spermatica di un maschio non dipende dalla femmina con cui si accoppia, il calcolo della ripetibilità risulterà significativo. In caso contrario, se l'interazione fra i genotipi risulta essere più importante delle caratteristiche dell'eiaculato e degli spermatozoi nel determinare quale maschio feconda le uova della femmina, il calcolo della ripetibilità restituirà un valore non significativo. Dal confronto del successo dei due maschi per le due femmine della "famiglia" è risultato che, in *Poecilia reticulata*, il successo di fecondazione è significativamente ripetibile, anche se piuttosto basso. Questo suggerisce che una parte importante, anche se non significativa, del successo di un maschio dipende dalla femmina con cui si accoppia, e quindi dai processi non direzionali.

Uno degli aspetti più considerati riguardo alla scelta criptica femminile non direzionale è il ruolo della compatibilità genetica fra i partner. La teoria prevede che meccanismi postcopulatori di valutazione della compatibilità genetica evolvano in specie in cui non vi sono elementi precopulatori che segnalano il genotipo di un individuo o se la scelta femminile è in qualche modo impossibile, come nel caso di alti tassi di coercizione sessuale (ad esempio, *Poecilia reticulata*). Il meccanismo tramite cui una femmina può valutare il genotipo del partner in relazione al proprio non è ancora chiaro, ma fra i possibili candidati vi sono regioni ipervariabili del genoma come i geni MHC (*Major Histocompatibility Complex*), un complesso genico coinvolto nella resistenza ai parassiti e nella scelta femminile. Quest'ultima sembra favorire i genotipi che portano ad una maggiore eterozigosità della prole (e pertanto la scelta di partner geneticamente dissimili dalla femmina) e quelli che comprendono alleli rari, entrambi perché forniscono un vantaggio alla prole a livello di resistenza ai parassiti. Inoltre, i geni MHC sembrano avere un ruolo anche nei processi postcopulatori, come dimostrato in topo (*Mus musculus*) e nel salmerino (*Salvelinus alpinus*). Nel quarto esperimento di questa tesi (Ruolo dei geni MHC nella scelta criptica femminile non direzionale) ho valutato l'effetto della variabilità agli MHC sul successo di fecondazione. In questo esperimento ho genotipizzato una parte delle famiglie dell'esperimento precedente (esperimento 3) ed ho messo in relazione il genotipo MHC di un maschio con il suo successo di competizione

spermatociti. Il disegno sperimentale utilizzato prevedeva l'inseminazione di due femmine per coppia, pertanto nell'analisi dei dati è stata considerata la differenza di successo di un maschio fra le due femmine. Vi è un effetto negativo della proporzione di alleli MHC condivisi (una misura della similarità genetica) sul successo di un maschio. In altre parole, all'interno della coppia, più un maschio è simile alla femmina per gli MHC e minore è il numero di uova che feconda. Rimane, tuttavia, da chiarire se l'effetto rilevato sia dovuto alla singola regione MHC o se sia il risultato della valutazione basata su più loci genici.

In conclusione, da questa tesi emerge la maggior importanza dei meccanismi direzionali rispetto a quelli non direzionali nel successo di competizione spermatica in *Poecilia reticulata*. Una parte della varianza nel successo di competizione spermatica di un maschio è però spiegata dalla proporzione di alleli MHC condivisi (similarità) fra quel maschio e la femmina.

ABSTRACT

Female polyandry has important biological implications: it means that sexual selection persists after copulation and that a male reproductive success is due to processes involved after gametes release (insemination for internally fertilizing species). Thus, the two main types of sexual selection (male competition and female choice) continue respectively as sperm competition and cryptic female choice. Sperm competition is the competition of the sperm of two or more males for the fertilization of the same batch of eggs, whereas the term cryptic female choice include all the mechanisms under female control that occur after insemination and that can bias paternity in favour of certain males. There are two main forms of cryptic female choice: directional (if the traits favoured are the same favoured in precopulatory female choice) and non directional (if the fertilization of eggs is driven by compatibility of the two partners or of their gametes). The reproductive success of a male is given by the interaction of all the processes described, and the relative weight of these in determining fertilization success has not been explored yet. So, the aim of the present thesis is to determine the relative role of processes under male (quality of sperm) and female (cryptic female choice) control.

The study species is the guppy (*Poecilia reticulata*), a small freshwater fish, ovoviviparous, with internal fertilization and a non resource based mating system, in which the males contribute to reproduction only with sperm. Female promiscuity is widespread and, during the receptive phase (3-4 days long), females usually copulate with more than one male, preferring males with an higher percentage of carotenoid colouration in their body. Females in general use to copulate with the first male they meet, and they try to trade-up the genetic quality of their offspring mating subsequently with more colourful males. There is good evidence that more ornamented males produce also offspring with better schooling and antipredatory abilities. Thus, in this species multiple matings seems to be a way for females to improve the genetic quality of the male that will sire their offspring, without to postpone the beginning of reproduction. Moreover, in this species females can store sperm for months and they can produce many consecutive broods without further matings.

On the other hand, the males can adopt two reproductive tactics: the can court females (a behaviour called *sigmoid display*) or they can coerce them to mate (*gonopodial thrust*). Insemination efficiency of sigmoid display is much higher of that of gonopodial thrusts, with the latter that inseminate more or less three times less sperm. Sometime, however, coercive copulations may result in the transfer of high numbers of sperm.

The relative area of carotenoid colouration is associated with female precopulatory preference but also with postcopulatory aspects of reproduction. They show a positive correlation with both the number and the quality (viability and velocity) of sperm produced. Males with more carotenoid also have higher sperm production rates, and they can transfer an higher proportion of their reserves into females during solicited copulations (but not during gonopodial thrusts). More attractive males also sire a higher proportion of offspring than their less ornamented counterparts, both during natural copulations and when the number of sperm

inseminated were held constant using artificial insemination. This second case, particularly, demonstrate that female choice may be reinforced through postcopulatory processes that occur only at a physiological level, representing the first demonstration of directional postcopulatory sexual selection in the guppy. This result, however, can be due to differential embryo mortality in relation to different ornamentation of the males. To investigate this, I conducted a first experiment (Direct benefits of female promiscuity: ejaculate quality and female fecundity), using artificial insemination. Secondary sexual characters (SSC) in many species evolve as a consequence of female precopulatory choice for more ornamented males. It has been proposed that from multiple mating females may obtain direct (material) or indirect (genetics) benefits. In species, as the guppy, where males contribute to reproduction are limited only to sperm, female preference is probably driven by genetic benefits, in terms of enhanced viability of offspring or attractiveness of sons. Another possibility is that SSC correlate with males fertilization efficiency, and that females that mate with more ornamented males obtain higher fecundity (the so-called *Phenotype-linked fertility hypothesis*, PLFH).

I artificially inseminated virgin females with sperm of males with different percentage of carotenoid spots in their body. Moreover, I also investigated the influence of ejaculate size for female fecundity. Artificial insemination is a powerful technique that allows to control for many possible confounding variables, as differential allocation effects, order of mating, cryptic female choice and number of sperm. Moreover, in the guppy sperm are packaged in spermatozuogmata (called *bundles*) that contain a relatively constant number of sperm: this permits to control the number of sperm inseminated just counting the number of bundles collected. After birth, I recorded brood size (number of offspring) and time to parturition (time from insemination to birth). None of these variables, and also the probability of parturition, are significantly influenced by the extent of carotenoid colouration. These results suggest that females do not obtain fecundity benefits from matings with more colourful males. Not even the number of sperm inseminated has any effect on the measured variables, suggesting that the mean ejaculate size of a male is bigger than the minimum number of sperm required by the female to fertilize all her eggs. If we consider all the male mating attempts a female undergo during the whole life, that females usually copulate with more than one male for each reproductive cycle, and, at last, that females can store sperm for months, it is unlikely that females sperm reserves are insufficient to fertilize their eggs. So, even if certain males produce superior quality ejaculates, SSC do not seem to signal to females the fertilization efficiency of more ornamented males, as proposed by the PLFH. Moreover, these results show that differential embryo mortality in relation to male phenotype is not involved in the higher fertilization success of colourful males, and confirm that certain males produce better quality ejaculate.

In *Poecilia reticulata*, female precopulatory choice can be reinforced also through cryptic female choice: during solicited copulations, females accept an higher number of sperm from males perceived as more attractive. A recent study demonstrated that they adjust the number of sperm transferred by males manipulating the copula duration. This mechanism can be a female counteradaptation to coercive mating: by accepting an higher proportion of sperm from the most attractive males they copulate with, females could favour them during sperm competition. This shall be true if the number of sperm (under female control) is a better predictor of paternity than sperm quality (velocity, viability and morphology), traits known to be

important for sperm competition success (and that are under male control). This is the aim of the second experiment of this thesis (Relative importance of number and quality of sperm in sperm competition success). I conducted sperm competition tests, in which I artificially inseminated two groups of females with the sperm of two different males: in the first group, I used equal numbers of sperm from the males, whereas in the second I used different proportion of sperm of the competing males (4:16 bundles and 8:12 bundles). Using three microsatellite markers I determined paternity of offspring and a male relative sperm competition success. A significant role of the number of sperm inseminated on fertilization success emerges: for each dyad of males, in mean, the male that transfers a higher proportion of sperm fertilizes most of the eggs. This result confirms that manipulation of copula duration may be a mechanism with which females bias paternity in favour of preferred males. Moreover, the percentage of iridescent colouration expressed in the male body does also influence a male sperm competition success, showing a previously unknown effect of this component of a male colour pattern on postcopulatory mechanisms. I haven't found any association between the relative extension of iridescent colouration and sperm traits, so the mechanism by which this structural colouration can influence a male fertilization ability is still unknown and needs further investigations.

In this species few is known about non directional postcopulatory sexual selection. The main theoretical models of sperm competition assume that an ejaculate competitiveness do not depend from the environment where sperm competition occurs, and, therefore, a male reproductive success is supposed to be similar even after copulation with different females. In internally fertilizing species (as the guppy) this environment is the female reproductive tract, and the interaction between male-female gametes or sperm-female gonoduct may be very important. In this case, the assumption that a male is always the winner of sperm competition even with different females, for the better quality of his ejaculate and sperm, could not be true anymore. Moreover, often effects of male traits as sperm number and quality can mask genetic compatibility effects, that are more difficult to disentangle. Consequently, the relative role of postcopulatory mechanisms for fertilization success can be hard to determine. Comparing sperm competition success of a male after copulation with two different females can give interesting information about the importance of male-female interaction. I artificially inseminated two females with equal numbers of sperm of two males (experiment 3: Study of repeatability of sperm competition success): the repeatability of paternity shall be significant if the interaction between the partner is an important cue in determining fertilization success, that is if non directional processes are important. After determining paternity of offspring, a male sperm competition success is shown to be repeatable, that is a male wins during sperm competition because of his intrinsic ejaculate and sperm qualities. Nevertheless, repeatability has a low value, suggesting that an important, although not significant, part of a male reproductive success depend by a female reproductive biology and by non directional processes.

One of the most studied aspects of non directional cryptic female choice is the role of genetic compatibility of partners. How females identify the genotype of their partners from their sperm is already unknown. Prime candidate are high polymorphic regions of the genome, as the MHC (*Major Histocompatibility Complex*), a multigenic family involved in both parasite resistance and female choice. The latter seems to favour more dissimilar genotypes, that conduct to a higher degree of heterozygosis of

offspring, and genotypes with rare alleles, both because they can confer a better immunocompetence to the offspring. Members of the MHC family also have a role during postcopulatory processes, as demonstrated for the mice (*Mus musculus*) and for the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). In the fourth experiment, I analyzed the role of MHC variability in non directional cryptic female choice. I characterized some of the families considered in the third experiment for the MHC class II region of genome, and I put in relation a male MHC genotype with his sperm competition success. The proportion of MHC alleles shared between a male and the female predicts his fertilization success: for each dyad of males, the more similar a male is with a female for MHC genes and the few offspring he sires. It is not already clear if this effect is due to general similarity of the two partners, obtained from the interaction and evaluation for many loci, or if it is a specific effect of MHC genes. However, a role of MHC genotype on cryptic female choice seems to exist.

In conclusion, directional mechanisms of postcopulatory sexual selection have a more important role on fertilization success in this species, even if a part of variance in a male success is due to his genetic compatibility with the female.

INTRODUZIONE GENERALE

1. SELEZIONE SESSUALE

La selezione sessuale è quel processo evolutivo, proposto da Darwin fra il 1859 e il 1871, che favorisce l'aumento della frequenza dei geni che conferiscono un vantaggio riproduttivo all'individuo che li porta (Birkhead and Pizzari, 2002). Darwin fece una chiara distinzione fra selezione naturale e selezione sessuale: se, da un lato, la prima favorisce i caratteri che aumentano la probabilità di sopravvivenza, la seconda, invece, agisce sui caratteri che portano ad un maggior successo riproduttivo di un individuo. La selezione naturale, infatti, non può dar ragione dell'esistenza di caratteri particolarmente appariscenti e a prima vista svantaggiosi per l'individuo che li porta, come ad esempio le corna di molte specie di animali, il palco dei cervi o le enormi dimensioni dei maschi di alcune specie di animali. Per la loro natura, questi caratteri (definiti **caratteri sessuali secondari**, cioè quei caratteri non strettamente coinvolti nella riproduzione che differiscono fra maschi e femmine.) sono svantaggiosi per l'individuo che li porta e dovrebbero venire eliminati dalla selezione naturale. Per spiegare la loro evoluzione, Darwin ha proposto la teoria della **selezione sessuale**, che prevede che gli individui che portano questi caratteri abbiano un vantaggio rispetto agli altri in termini di un maggior successo riproduttivo (Darwin, 1871).

La selezione sessuale può operare attraverso due meccanismi diversi, ma non mutualmente esclusivi. Da una parte la selezione può favorire i caratteri che aumentano il successo di un individuo nella competizione intrasessuale (la competizione fra i membri di un sesso per la conquista dei membri del sesso opposto) e quindi la probabilità di riprodursi. Questo meccanismo porta all'evoluzione di caratteri, detti **armamenti**, che favoriscano l'individuo nella lotta, come ad esempio corna, zanne, ecc. Il secondo meccanismo della selezione sessuale avvantaggia gli individui più attraenti agli occhi dei membri dell'altro sesso (Andersson, 1994) e viene detto **scelta femminile**. Questa forma di selezione intersessuale porta alla comparsa di caratteri puramente ornamentali, detti appunto **ornamenti**, che non hanno un ruolo diretto nella lotta per la conquista per le femmine, sulla base dei quali le femmine scelgono i maschi con cui accoppiarsi. Esempi classici di ornamenti comprendono piumaggi colorati, canti elaborati, ecc. In genere, il sesso che sceglie è quello femminile, mentre quello che compete per l'accesso all'altro sesso è quello maschile. In natura sono presenti anche casi in cui il ruolo dei due sessi è invertito, ma sono in numero estremamente limitato (Andersson, 1994).

Mentre il meccanismo della competizione intrasessuale venne subito accettato dal mondo scientifico, riguardo alla scelta femminile vi fu un ben più lungo e acceso dibattito. Questo meccanismo, infatti, lasciava aperta la domanda sul perché le femmine dovrebbero scegliere i maschi basandosi solamente sugli ornamenti da questi esibiti. La scelta femminile, infatti, comporta dei costi, fra cui il maggior rischio di predazione a cui le femmine vanno incontro, la spesa energetica per trovare un compagno, il rischio di contrarre parassiti o di essere ferite. Nonostante questo la scelta femminile è un processo diffuso e ampiamente dimostrato (Andersson, 1994). Il comportamento di scelta evolve se vi sono dei benefici a compensare i costi pagati

dalla femmina. Le femmine possono ottenere benefici materiali, come un miglior territorio (associato poi ad una maggior reperibilità di cibo), migliori cure parentali da parte del maschio o doni nuziali. La scelta femminile per benefici materiali non costituisce un grande problema teorico ed è facilmente spiegabile dal punto di vista evolutivistico. In molti sistemi nuziali, però, i maschi non difendono territori, e non contribuiscono all'allevamento della prole tramite cure parentali. In questi casi, la spiegazione della scelta femminile è più complicata ed esistono due modelli principali per spiegarne l'evoluzione e il mantenimento: il modello di Fisher (o runaway selection), che prevede che la scelta femminile sia un processo non adattativo e arbitrario, e il modello genetico dei "good genes" o dei buoni geni, che invece prevede che le femmine ottengano dei benefici di tipo genetico dall'accoppiamento con maschi con caratteri sessuali secondari maggiormente sviluppati.

1.1. MODELLI FISHERIANI O RUNAWAY SELECTION

Il modello di Fisher, detto anche **teoria dei "sexy sons"** o Runaway Selection (Fisher, 1915) prevede che inizialmente vi fosse una variazione nel grado di preferenza delle femmine per i caratteri sessuali secondari dei maschi. Accoppiandosi con i maschi con gli ornamenti più sviluppati, le femmine produrranno figli maschi che portano i caratteri preferiti, e che quindi avranno a loro volta un maggior successo riproduttivo, e figlie femmine con la preferenza per l'ornamento in questione. Questo genera un *linkage disequilibrium* fra i geni che codificano per la preferenza nelle femmine e i geni per gli ornamenti maschili. Il processo che ne deriva è auto-rinforzante, e i caratteri maschili diverranno sempre più esagerati, fino ad un livello massimo in cui saranno sottoposti alla selezione naturale.

Questo modello, in realtà, spiega solo come la scelta femminile può venire mantenuta, e non come essa si sia evoluta, dato che vari modelli hanno dimostrato che i geni per la scelta femminile possono diffondersi in una popolazione solo se legati all'ottenimento di qualche tipo di beneficio.

1.2. MODELLI GENETICI

I cosiddetti modelli dei buoni geni per la scelta femminile propongono che l'espressione dei caratteri sessuali secondari sia un segnale della qualità genetica generale del maschio che li porta e che le femmine, accoppiandosi con i maschi con ornamenti più sviluppati, producano prole con una maggior probabilità di sopravvivenza (Andersson, 1986; Zahavi, 1975). Questo modello, però, prevede che vi debbano essere dei costi per i maschi associati all'espressione degli ornamenti che garantiscono l'onestà del segnale. Il primo modello che ha cercato di chiarire il mantenimento dell'onestà del segnale è la **teoria dell'Handicap** (Zahavi, 1975): se tratti più elaborati costituiscono un handicap per il maschio, ad esempio perché aumentano la visibilità del maschio ai predatori o perché ne limitano la capacità di fuga, i maschi che sono in grado di sopravvivere nonostante tale svantaggio sono i più adattati e hanno maggiori probabilità di sopravvivenza. Si viene quindi a creare un *linkage disequilibrium* fra i geni responsabili della sopravvivenza dell'individuo e quelli responsabili degli ornamenti; se questi geni sono ereditabili, scegliendo maschi

con ornamenti più sviluppati, pertanto, le femmine producono prole con migliori probabilità di sopravvivenza. Una riformulazione della teoria dell'handicap è stata la **teoria dell'immunocompetenza**, che prevede che l'espressione dei caratteri sessuali secondari sia condizione dipendente e rifletta le generali condizioni di salute e nutrizionali del maschio: scegliendo maschi con ornamenti più sviluppati, le femmine garantiscono alla prole un miglior sistema immunitario o migliori condizioni generali, e queste condizioni si riflettono poi in una maggiore fitness della prole (Hamilton and Zuck, 1982). Il legame fra caratteri sessuali secondari ed immunocompetenza è garantito da meccanismi fisiologici, quali ad esempio l'allocazione di pigmenti legati anche al sistema immunitario negli ornamenti. E' questo il caso dei carotenoidi (pigmenti giallo-arancione) e del testosterone (ormone legato alle colorazioni melaniche). I carotenoidi sono pigmenti antiossidanti coinvolti nella risposta immunitaria, che non possono essere sintetizzati dall'organismo, ma vengono ottenuti esclusivamente con la dieta, rappresentando pertanto una risorsa limitata per l'organismo. Per allocare i carotenoidi nelle colorazioni degli ornamenti, l'individuo deve sottrarne una parte al sistema immunitario e solamente individui in buone condizioni generali e con un buon sistema immunitario di base possono permettersi una tale operazione. Il testosterone è un ormone maschile che ha anche funzione immunosoppressiva: un alto livello di testosterone nei caratteri sessuali secondari porta ad una riduzione della qualità del sistema immunitario e ad una maggior probabilità di contrarre parassiti e malattie (Faivre et al., 2003). Di conseguenza, solamente individui con una buona immunocompetenza possono produrre caratteri sessuali secondari con forti colorazioni melaniche (associate pertanto ad alti livelli di testosterone e ad una ridotta capacità immunosoppressiva) e non subire l'attacco di parassiti e malattie.

2. EVOLUZIONE DELL'ANISOGAMIA

Il ruolo dei due sessi nella riproduzione è dovuto al diverso investimento nella produzione di gameti (Williams, 1966) (Bateman, 1948): a parità di riserve energetiche, i maschi possono produrre un numero maggiore di gameti rispetto alle femmine. Infatti, per definizione i maschi producono gameti piccoli, mobili e in grande numero chiamati **spermatozoi** o **spermi**, mentre le femmine producono gameti grandi, immobili e ricchi di sostanze nutritive (tuorlo) e organelli che serviranno al successivo sviluppo dell'embrione. Questo secondo tipo di gamete viene definito **ovulo** o **uovo**. La differenza di dimensioni dei gameti prodotti dai due sessi prende il nome di **anisogamia** ed è la causa delle diverse strategie riproduttive dei due sessi: dato che il costo di produzione di uno spermio è pressoché irrilevante in confronto alla produzione di un ovulo, i maschi massimizzeranno il loro successo riproduttivo tentando di accoppiarsi con quante più femmine possibile. Le femmine, invece, producono un numero fisso di uova per ogni ciclo riproduttivo, e tale numero dipende dalla quantità di riserve energetiche che hanno potuto immagazzinare. Dato che, in genere, un solo maschio è potenzialmente in grado di produrre abbastanza spermatozoi da fecondare tutte le uova di tutte le femmine della sua popolazione, il successo riproduttivo delle femmine non dipende dal numero di maschi con cui si accoppia, ma dal numero di uova che essa ha prodotto. Pertanto, ci si aspetta che i maschi tentino di accoppiarsi con quante più femmine possibile, mentre le femmine

tenderanno a scegliere il maschio che permetta loro di avere figli di miglior qualità, in termini o di sopravvivenza o di successo riproduttivo (Bateman, 1948).

Questa condizione di anisogamia sembra essersi evoluta da una ancestrale condizione di isogamia, in cui cioè veniva prodotto un solo tipo di gamete, probabilmente di dimensioni intermedie (Parker et al., 1972). Nel loro modello di evoluzione dell'anisogamia, Parker e colleghi (1972) prevedono due diverse pressioni selettive associate alle dimensioni dei gameti: la produttività numerica (il numero di gameti prodotti per unità di tempo) e la fitness dello zigote che deriva dall'unione di due gameti (la probabilità che lo zigote sopravviva fino allo stadio adulto e si riproduca). La produttività numerica viene favorita dalla selezione se essa aumenta il tasso riproduttivo dell'individuo. Comunque, un aumento delle dimensioni dei gameti viene favorito se l'aggiunta di risorse addizionali al gamete aumenta la probabilità di sopravvivenza dello zigote.

Se queste assunzioni vengono inserite in un modello su di una ipotetica popolazione ancestrale di organismi a fecondazione esterna in cui la fusione dei gameti avviene in modo casuale. Essi hanno assunto che vi sia variabilità naturale nelle dimensioni dei gameti e che tutti i gameti si potessero fondere: in pratica non esistono ancora gameti "maschili" e gameti "femminili". Gli individui con la più alta produttività verranno favoriti dalla selezione per il loro maggior tasso riproduttivo, portando all'evoluzione di gameti sempre più piccoli. Dall'altro lato, però, verranno favoriti anche gameti sempre più grandi, perché aumentano la probabilità di sopravvivenza dello zigote. Se esiste un trade-off fra dimensioni e numero di gameti che un individuo può produrre, in questo secondo caso gli individui che producono gameti grandi ne producono anche in numero minore. Una volta che nella popolazione si sono diffusi sia gli individui che producono gameti grandi sia individui che producono gameti piccoli, la selezione favorirà gli accoppiamenti disassortativi: un gamete piccolo e uno grande. Infatti, questa combinazione produrrà zigoti con una fitness maggiore rispetto alle altre combinazioni. Se si uniscono due gameti grandi, lo zigote risultante dovrebbe avere una fitness maggiore (grazie ai doppi nutrienti), ma in realtà aumenta anche il rischio di incorrere in incompatibilità citoplasmatica, dovuta ai doppi organelli cellulari che si troverebbero nello zigote. Se, invece, si fondono due gameti piccoli, dato che questi hanno perso tutto il materiale nutritivo e hanno mantenuto solamente quello genetico, lo zigote avrebbe minor (se non nulla) possibilità di sopravvivenza. Inoltre, dato il numero molto maggiore di gameti piccoli che si trovano nella popolazione, anche la probabilità di fusioni disassortative è maggiore, facilitando così il processo di evoluzione dell'anisogamia.

Una volta che questa si è stabilita in una popolazione sorgono pressioni selettive addizionali che mantengono e promuovono l'anisogamia. La predominanza numerica dei gameti piccoli accoppiata con la selezione per fusioni disassortative risulta in una intensa competizione fra i gameti piccoli per l'accesso ai pochi gameti grandi disponibili (un processo simile alla competizione spermatica, si veda in seguito). Questa competizione favorirà l'evoluzione di caratteri nei gameti piccoli che aumentino la loro capacità di incontrare e penetrare i gameti più grandi., come ad esempio un flagello per una miglior capacità di spostamento, o reazioni acrosomiche che permettano una più facile penetrazione della parete esterna dei gameti grandi. Inoltre, gli individui che producono più gameti piccoli degli altri avranno anche una maggior probabilità di incontrare i gameti grandi e quindi avranno un maggior successo riproduttivo. Per quanto riguarda la motilità nei gameti grandi, invece,

Parker e colleghi (1972) ipotizzano che essa possa essere stata abbandonata in quanto carattere ridondante, una volta acquisita la motilità da parte dei gameti piccoli.

3. ACCOPPIAMENTI MULTIPLI DA PARTE DELLE FEMMINE

Darwin considerava le femmine sostanzialmente monogame. Nel corso del secolo successivo, comunque, non solo si è dimostrato che le femmine hanno un ruolo fondamentale nell'evoluzione e nel mantenimento dei caratteri sessuali secondari mediante la scelta del partner (Andersson, 1994), ma si è raggiunta la consapevolezza che le femmine si accoppiano (spesso dopo attiva ricerca e sollecitazione) con più di un maschio per stagione riproduttiva (condizione detta **poliandria**). Questa osservazione ha aperto nuovi confini per lo studio della selezione sessuale: se più maschi si accoppiano con una stessa femmina, e se, come avviene in molte specie, vi è una separazione temporale fra inseminazione degli spermatozoi e fecondazione delle uova, la logica conseguenza è che si venga a creare una coesistenza spaziale e temporale degli spermatozoi di più maschi e che questi competano per la fecondazione delle uova (Parker, 1970). In pratica, la selezione sessuale non si esaurisce più con la copula, ma continua anche successivamente nella cosiddetta **selezione sessuale postcopulatoria** (così chiamata per distinguerla dalla classica selezione sessuale, detta anche **precopulatoria**) (Birkhead and Pizzari, 2002). I meccanismi che agiscono in fase postcopulatoria sono la competizione spermatica (selezione intrasessuale) e la scelta criptica femminile (selezione intersessuale). La **competizione spermatica** è definita come la competizione degli spermatozoi di due o più maschi per la fecondazione dello stesso set di uova (Parker, 1970), mentre la **scelta criptica femminile** comprende tutti i meccanismi che avvengono dopo la copula e che sono sotto controllo femminile che possono influenzare l'esito della competizione spermatica e sbilanciare la paternità delle uova in favore di un determinato maschio (Eberhard, 1996).

La competizione spermatica è ormai considerata una potente pressione selettiva nell'evoluzione delle caratteristiche riproduttive di un maschio, e può agire a vari livelli, generando adattamenti comportamentali, fisiologici, biochimici e morfologici. Essa agisce principalmente in due direzioni, spesso in opposizione fra loro: in primo luogo essa può favorire la comparsa di caratteri che permettano al maschio che li porta di vincere la competizione spermatica. D'altra parte, però, la competizione spermatica favorirà anche gli adattamenti che permettono di prevenire la competizione postcopulatoria con gli altri maschi: saranno così favoriti dei meccanismi, detti di difesa (mentre il primo tipo viene detto di offesa), che riducono la probabilità che la femmina si riaccoppi, o che altri maschi possano introdurre i loro spermatozoi nel tratto riproduttivo femminile (Birkhead and Moller, 1998; Birkhead and Pizzari, 2002; Simmons, 2001b). Risulta pertanto chiaro come in realtà il processo generato da un contesto di competizione spermatica sia ciclico e virtualmente infinito, dato che quando compare e si diffonde nella popolazione un adattamento che permette di "difendersi" dalla competizione con gli altri maschi, questo immediatamente genera una forte pressione selettiva per la comparsa di caratteri che permettano di bypassare tali difese. Ad esempio, se da un lato vengono favoriti i maschi che producono tappi spermatici che impediscano o rendano meno probabile che nuovi maschi si accoppino con la femmina, saranno anche favorite strutture che permettano di rimuovere tali ostruzioni del tratto riproduttivo femminile

(Parker, 1984). Difesa e offesa sono esemplificati molto bene nelle specie del genere *Drosophila*: quando i maschi di moscerino della frutta inseminano una femmina essi trasferiscono gli spermatozoi in un miscuglio di sostanze che includono feromoni, peptidi ed enzimi modificati, prodotti dalle ghiandole accessorie dei maschi. Queste sostanze, fra le altre, hanno la funzione di disattivare gli spermatozoi già immagazzinati nel tratto riproduttivo femminile (offesa), e allo stesso tempo agiscono come antiafrodisiaci, scoraggiando le femmine dal riaccoppiarsi con altri maschi (difesa). Pertanto, la competizione spermatica ha come risultato un'intensa competizione fra maschi ed una forte selezione per le abilità di fecondazione dei maschi.

Parker (1984) ha usato un approccio matematico per determinare se vi potesse essere un livello evolutivamente stabile di adattamenti di offesa e difesa nella competizione spermatica. Egli concluse che l'unica strategia evolutivamente stabile (ESS: *Evolutionary Stable Strategy*) è quella in cui i maschi investono in entrambi i tipi di adattamento, e in cui l'entità dell'investimento nelle due tipologie di adattamenti dipende dal relativo rapporto fra costi e benefici (Parker, 1984).

Anche se originariamente la competizione spermatica è stata definita per organismi a fecondazione interna, tale meccanismo gioca un ruolo fondamentale anche nelle specie a fecondazione esterna, sia in specie a rilascio sincrono sia asincrono dei gameti.

La competizione spermatica agisce anche a livello degli eiaculati e degli spermatozoi, che diventano dei veri e propri "armamenti". Questo ha portato negli ultimi 30 anni allo sviluppo di modelli teorici che permettessero di spiegare gli effetti della competizione spermatica sulle caratteristiche dell'eiaculato, dal numero di spermatozoi eiaculati alla morfologia degli organi riproduttori e degli stessi spermatozoi, nonché il comportamento di questi ultimi (Parker, 1998; Wedell et al., 2002). I modelli precedentemente citati, però, considerano la femmina come un mero "contenitore" di uova e non considerano che essa possa svolgere un ruolo importante per l'esito della competizione spermatica. Negli ultimi 10 anni è aumentata la consapevolezza del ruolo della scelta criptica femminile nei processi postcopulatori, che sta ricevendo sempre maggiori conferme anche a livello empirico, nonostante le grandi difficoltà tecniche che rendono difficile creare disegni sperimentali che permettano di separare in modo affidabile gli effetti della scelta criptica femminile da quelli della competizione spermatica (Eberhard, 1996; Thornhill, 1983). I pattern di fecondazione non casuale delle uova vengono individuati sempre più di frequente e spesso i meccanismi di competizione spermatica non ne possono totalmente spiegare l'esistenza. In realtà, la stessa competizione spermatica crea le basi per l'evoluzione della scelta criptica femminile: dato che gli interessi riproduttivi dei due sessi non sempre coincidono, gli adattamenti maschili alla competizione spermatica possono creare il potenziale per l'evoluzione di controadattamenti femminili che permettano alla femmina di ristabilire un controllo (almeno parziale) sulla paternità delle proprie uova.

Di seguito verranno descritti più in dettaglio i meccanismi della competizione spermatica e della scelta criptica femminile.

4. COMPETIZIONE SPERMATICA

Inizialmente, la competizione spermatica fu definita come “la competizione all’interno del tratto riproduttivo femminile fra gli spermatozoi di due o più maschi per la fecondazione delle uova”, ma con la successiva realizzazione che questo processo è diffuso anche in specie a fecondazione esterna, la definizione fu cambiata in “competizione fra gli spermatozoi di due o più maschi per la fecondazione di un dato set di uova” (Parker, 1970) (si vedano Birkhead and Moller, 1998 e Simmons, 2001 per una review completa).

I prerequisiti essenziali per la competizione spermatica sono che la femmina si accoppi con almeno due maschi diversi e che gli spermatozoi di questi maschi coesistano spazialmente e temporalmente. Queste due assunzioni, in realtà, non conducono necessariamente alla competizione spermatica: ad esempio, le femmine possono riaccoppiarsi solo in caso di esaurimento delle scorte di spermatozoi, minimizzando in questo modo la compresenza degli spermi nello stesso sito. Inoltre, esistono un grande numero di possibili modi in cui gli spermi di maschi diversi possono coesistere all’interno della femmina senza necessariamente mescolarsi. Ad esempio, in specie che immagazzinano gli spermatozoi in spermateche, gli spermatozoi di maschi diversi possono venire immagazzinati in siti diversi, oppure gli spermatozoi provenienti da accoppiamenti precedenti della femmina possono venire spazzati via dall’inserimento dell’ejaculato di un nuovo partner. Pertanto, la competizione spermatica *sensu strictu* avviene solamente quando gli spermatozoi di maschi diversi si trovano in diretto contatto gli uni con gli altri (Birkhead and Moller, 1998).

In genere, il successo di un maschio in un contesto di competizione spermatica viene misurato facendo accoppiare (o in certi casi inseminando artificialmente) una femmina con più maschi in successione e poi determinando la paternità della prole da lei prodotta. Per convenzione, il successo di competizione spermatica viene espresso come la proporzione di figli dell’ultimo maschio che si è accoppiato con la femmina; dato che sperimentalmente i maschi competitori sono in genere due, la paternità si calcola prendendo come riferimento il secondo maschio, con un indice definito p_2 (Parker, 1998). Il pattern di distribuzione della paternità in una specie può fornire indicazioni sul metodo di utilizzo degli spermatozoi in quella specie, e quindi sul meccanismo in atto che porta ad un maggior successo di un maschio sugli altri. p_2 è un indice numerico compreso fra 0 e 1: p_2 è pari a 0 quando tutti i piccoli della figliata sono stati attribuiti al primo maschio, è pari a 1 quando sono stati attribuiti tutti al secondo maschio ed è pari a 0.5 quando vi è un utilizzo casuale degli spermatozoi dei due maschi e questi hanno una uguale probabilità di fecondare le uova. Quest’ultima condizione si verifica ad esempio quando si è in presenza di mescolamento degli spermi (lo **sperm mixing**) all’interno del tratto riproduttivo femminile, o degli organi di accumulo degli spermi presenti in alcune specie. Il valore di p_2 riscontrato è molto utile perché indica se vi è o meno competizione spermatica in una specie e con che intensità: essa è massima quando il valore di p_2 è intermedio e vi è completa sovrapposizione degli spermi. p_2 , tuttavia, non dà informazioni sullo specifico meccanismo che agisce dopo la copula e prima della fecondazione. Infatti, meccanismi diversi della competizione spermatica possono riflettersi in pattern di utilizzazione degli spermi molto simili: ad esempio, sia la perdita passiva degli spermi dal tratto riproduttore (fenomeno molto comune) sia il mancato immagazzinamento degli spermi di uno dei due maschi portano ad un

valore di p_2 vicino ad 1. Va comunque ricordato che in alcune specie i pattern di paternità osservati possono cambiare in funzione del numero di maschi in competizione, e che quindi esperimenti in cui viene utilizzata una coppia di maschi possono fornire informazioni parziali (Zeh and Zeh, 1994). Ad esempio, negli pseudoscorpioni la precedenza dell'ultimo maschio (cioè quel meccanismo per cui l'ultimo maschio che si accoppia feconda un maggior numero di uova) viene a mancare se le femmine si accoppiano con un terzo maschio. Questo, invece, non è valido per gli insetti, in cui il pattern di utilizzazione degli spermatozoi non varia in funzione del numero di maschi competitori (Simmons, 2001b).

4.1. MECCANISMI DELLA COMPETIZIONE SPERMATICA

La competizione spermatica ha portato alla comparsa di numerosi e diversificati meccanismi tramite cui i maschi possono cercare di ottenere un successo riproduttivo maggiore. Alcuni dei più comuni verranno descritti qui di seguito.

Se si assume che i meccanismi di competizione spermatica possibili formino una specie di continuum, agli estremi di esso si troveranno i meccanismi dello sperm mixing (in cui gli spermatozoi si mescolano all'interno del tratto riproduttivo femminile e i maschi a parità di numero di spermatozoi insemiati hanno una uguale probabilità di fecondare le uova) e la completa rimozione da parte di un maschio degli spermatozoi già presenti nel gonodotto femminile o nelle spermateche e derivanti da precedenti accoppiamenti della femmina, un meccanismo detto **sperm displacement**. La completa rimozione degli spermatozoi precedentemente immagazzinati dalla femmina può essere ottenuto attraverso adattamenti morfologici negli organi copulatori dei maschi (che spesso presentano spine, con l'effetto collaterale di produrre ferite alla femmina che ne possono ridurre la durata della vita, come nel caso di *Callosobruchus maculatus* (Crudginton and Siva-Jothy, 2000)) oppure può essere ottenuto attraverso una forte immissione di eiaculato allo scopo di spazzare letteralmente via gli spermatozoi (un meccanismo detto **sperm flushing**). Questo può essere facilitato dall'anatomia e dalle dimensioni del tratto riproduttivo femminile: se un'unica eiaculazione è sufficiente a riempire l'apparato femminile, una successiva intromissione di spermatozoi forzerà gli spermatozoi preesistenti ad uscire.

In realtà, fra questi due estremi sono presenti diverse tipologie di meccanismi. In genere, comunque, si definisce precedenza o predominanza degli spermatozoi di un maschio (o **sperm precedence**) l'uso non casuale degli spermatozoi di un particolare maschio, in condizioni di compresenza degli spermatozoi dei diversi maschi nel tratto genitale femminile. Se vengono preferiti gli spermatozoi del secondo maschio, questo si traduce in valori di p_2 prossimi ad 1, mentre se vengono preferiti gli spermatozoi del primo maschio il valore di p_2 si approssima a 0. Questo risultato può essere ottenuto in diversi modi: gli spermatozoi di alcuni maschi possono ottenere una posizione vantaggiosa all'interno del gonodotto o della spermateca della femmina, e questo può riflettersi nell'utilizzazione preferenziale di questi spermatozoi rispetto agli altri al momento della fecondazione delle uova. L'ottenimento di queste posizioni migliori può essere la conseguenza di un riposizionamento degli spermatozoi da parte di un maschio, dopo aver rimosso o spostato quelli precedentemente collocati in quella posizione, oppure può semplicemente riflettere l'ordine di accoppiamento. Affinché vi sia stratificazione degli spermatozoi, tuttavia, non vi può essere mescolamento degli stessi, altrimenti il vantaggio ottenuto dal posizionamento ottimale andrebbe vanificato.

Un secondo modo attraverso cui può essere ottenuto un pattern di precedenza dell'ultimo maschio è quello in cui i maschi uccidono o inibiscono gli spermatozoi di un accoppiamento precedente. Questo si pensa possa avvenire attraverso adattamenti nel liquido seminale, anche se questi dovrebbero essere selettivi verso gli spermatozoi di altri maschi lasciando intatti gli spermatozoi del maschio focale, oppure dovrebbero avere breve durata, in modo che l'azione spermicida sia terminata prima dell'effettivo trasferimento dei propri spermatozoi da parte del maschio.

Il meccanismo più frequente della competizione spermatica consiste nell'aumento del numero degli spermatozoi trasferiti dal maschio (detto **sperm loading**), in modo da avere un vantaggio numerico sui maschi competitori (si veda il paragrafo relativo agli adattamenti alla competizione spermatica).

4.2. ADATTAMENTI ALLA COMPETIZIONE SPERMATICA

Come già introdotto, la competizione spermatica può agire da pressione selettiva a vari livelli, fra cui adattamenti comportamentali, morfologici, fisiologici e a livello degli stessi spermatozoi, che diventano dei veri e propri "armamenti" per vincere la competizione spermatica.

4.2.1. ADATTAMENTI A LIVELLO DI EIACULATO E SPERMI

Vi sono due diversi parametri quando si parla di parametri di competizione spermatica basati sul riaccoppiamento delle femmine: il rischio e l'intensità della competizione spermatica. Il **rischio** di competizione spermatica è la probabilità che la femmina si riaccoppi con altri maschi per un dato ciclo riproduttivo; l'**intensità**, invece, è il numero assoluto di maschi con cui una femmina si accoppia in un ciclo riproduttivo. A seconda del meccanismo di precedenza caratteristico della specie la competizione spermatica può essere paragonata ad una lotteria ("raffle" in inglese) in cui più biglietti (gli spermatozoi) un maschio ha e maggiore è la sua probabilità di vincere la lotteria (fecondare un maggior numero di uova rispetto ai maschi competitori). I modelli teorici sviluppati per l'argomento hanno evidenziato come all'aumentare del rischio di competizione spermatica, i maschi hanno un vantaggio nell'aumentare il numero di spermatozoi allocati per singolo eiaculato (Parker, 1998). Se si assume che la quantità di energia disponibile per la riproduzione sia fissa, e che questa debba essere suddivisa fra attività di corteggiamento, produzione degli spermatozoi e altre attività, i maschi di taxa in cui il rischio di competizione spermatica è alto dovrebbero investire relativamente di più nei loro eiaculati rispetto ai taxa a loro vicini in cui il rischio invece è basso. La misura che normalmente si usa come indice dell'investimento nella produzione di spermatozoi è l'indice gonadosomatico, cioè le dimensioni dei testicoli corrette per le dimensioni del corpo. Studi comparativi sull'argomento che hanno preso in considerazione un grande numero di specie appartenente a vari taxa animali hanno mostrato che esiste una relazione positiva fra questo indice e il rischio di competizione spermatica (Birkhead and Moller, 1998). Questo è particolarmente evidente per alcune specie di pesci a fecondazione esterna, che mostrano strategie riproduttive alternative: alcuni maschi, in genere più grandi degli altri maschi della popolazione, difendono dei territori in cui le femmine costruiscono il nido.; altri maschi, invece, sono di dimensioni inferiori e si comportano da maschi sneaker. I maschi sneaker subiscono un rischio e un'intensità

di competizione spermatica maggiore rispetto ai maschi parentali, dato che non difendono un territorio ma cercano di rilasciare non visti i loro spermatozoi vicino alle uova nel nido del maschio parentale e “rubare” alcune fecondazioni. In questo secondo tipo di maschi, infatti, il relativo investimento nella produzione di spermatozoi è molto maggiore rispetto a quello dei maschi parentali (Peterson and Warner, 1998), come atteso sulla base dei modelli teorici.

Gli eiaculati sono anche sotto pressione selettiva per un’allocazione strategica degli spermatozoi fra le diverse femmine con cui il maschio si accoppia. Storicamente, la produzione di spermatozoi è sempre stata considerata poco costosa in confronto alla spesa necessaria alla produzione di un gamete femminile e gli spermatozoi sono sempre stati trattati come una risorsa pressoché infinita. In realtà, se sono necessarie grosse quantità di spermatozoi o se vengono prodotte anche sostanze accessorie inserite nell’eiaculato (come nutrienti o altro) l’eiaculato può essere costoso da produrre, e i maschi subiscono una pressione selettiva anche per una strategica allocazione degli spermatozoi per massimizzare il loro successo riproduttivo. I maschi di molti taxa allocano in modo oculato i loro eiaculati o modificano la produzione di spermatozoi in relazione sia al rischio sia all’intensità della competizione spermatica in accordo con la teoria della competizione spermatica (Wedell et al., 2002).

Oltre al numero degli spermatozoi, anche la loro qualità è selezionata sotto la pressione selettiva della competizione spermatica, come è stato di recente messo in luce (Snook, 2005). La qualità spermatica è definita come l’efficienza di fecondazione dell’eiaculato di un dato maschio dopo controllo statistico per il numero degli spermatozoi inseminati (Birkhead and Moller, 1998). I caratteri spermatici che influenzano il successo di competizione spermatica sono la morfologia, la velocità, la vitalità (longevità). Spermatozoi più lunghi o più grandi possono essere favoriti se sono associati ad una maggior velocità di nuoto (Gomendio and Roldan, 1991), una maggior vitalità (Parker, 1998) (Ball and Parker, 1996; Parker, 1993), una miglior abilità nel rimuovere gli spermatozoi più piccoli di altri maschi dal tratto riproduttivo femminile (LaMunyon and Ward, 1998) o se servono da indicatori per le femmine della qualità maschile (Eberhard, 1996). Se spermatozoi più grandi conferiscono un vantaggio nella competizione spermatica, all’interno di una specie, maschi con spermatozoi relativamente più grandi dovrebbero fecondare un maggior numero di uova rispetto a maschi con spermatozoi più piccoli. Questa predizione è supportata dai dati di due specie con spermatozoi ameboidi, il nematode *Caenorhabditis elegans* (LaMunyon and Ward, 1998) e l’acaro *Rhizoglyphus robini* (Radwan, 1996). Al contrario, in *Onthophagus taurus* sembrano essere avvantaggiati gli spermatozoi più corti (Garcia-Gonzalez and Simmons, 2007).

In specie sessualmente promiscue, invece, i maschi producono spermatozoi più longevi rispetto a specie monogame, indicando che i processi postcopulatori agiscono sulla vitalità spermatica (Hunter and Birkhead, 2002). Inoltre, in alcune specie è stato rilevato un trade-off fra longevità e dimensioni degli spermatozoi, come nel Salmone atlantico *Salmo salar* (Gage et al., 1998; Gage et al., 2002).

La velocità degli spermatozoi può influenzare anche essa il successo di fecondità: spermatozoi più veloci potrebbero essere più competitivi perché raggiungono le uova più velocemente rispetto a spermatozoi più lenti. Un ruolo della velocità spermatica è stato individuato in ricci di mare (Levitan, 2000), uccelli (Birkhead et al., 1999), insetti (Bressac et al., 1991), pesci (Gage et al., 2004) e mammiferi (Malo et al., 2005a).

4.2.2. ADATTAMENTI COMPORTAMENTALI

A livello comportamentale, la competizione spermatica favorirà quegli adattamenti che diminuiscono la probabilità che la femmina si accoppi con altri maschi, come nel caso delle associazioni postcopulatorie in cui il maschio si attacca alla femmina. In questo modo, esso può aumentare il numero degli spermatozoi o massimizzare l'azione del liquido seminale sulla spermateca della femmina, come nel caso del cosiddetto *sperm flushing*. Durante il tempo necessario agli spermatozoi per arrivare alla spermateca o al tratto riproduttivo femminile, i maschi possono formare associazioni postcopulatorie con le femmine in modo che esse non possano venire intercettate da altri maschi. Esse possono anche indicare che i maschi inseminano più volte la stessa femmina, aumentando la probabilità di fecondare le sue uova.

Considerazioni simili a quelle appena descritte possono essere fatte per il mate guarding postcopulatorio: attraverso questa strategia, i maschi cercano di evitare che le femmine si riaccoppino o che esse espellano gli spermatozoi inseminati (Simmons, 2001b)

4.2.3. ADATTAMENTI MORFOLOGICI

La selezione sessuale sembra essere una forza promotrice della diversificazione della morfologia dei genitali in molte specie animali. In particolare, essa può agire sulla morfologia degli organi copulatori tramite la competizione spermatica, che può favorire i genitali che permettono un miglior posizionamento degli spermatozoi o la rimozione degli spermatozoi di maschi precedenti. Questo sembra essere il meccanismo che avviene nella damigella *Calopteryx haemorrhoidalis*, in cui i maschi, stimolando una particolare regione del tratto riproduttivo femminile attraverso il loro organo copulatore provocano l'espulsione da parte della femmina degli spermatozoi dei maschi con cui si era precedentemente accoppiata (Cordoba-Aguilar, 2002). La diversità morfologica dei genitali può essere anche promossa dalla scelta criptica femminile, se le femmine favoriscono in fase postcopulatoria gli spermatozoi di maschi in grado di stimolare in modo più efficace alcune zone del tratto riproduttivo femminile. In entrambi questi casi (competizione spermatica e scelta criptica femminile) le femmine, accoppiandosi con maschi che hanno un organo copulatore con una forma tale da permettere una miglior stimolazione, ottengono benefici indiretti attraverso un meccanismo di tipo "sexy sperm", in quanto produrranno figli maschi in grado di stimolare le femmine e ottenere così un maggior successo riproduttivo (Hosken and Stockley, 2004). Evidenze di un'associazione fra morfologia dei genitali e successo di fecondazione dei maschi si sono ottenute per varie specie di insetti, fra due membri della famiglia dei Gerridi, *Gerris lateralis* (Arnqvist and Danielsson, 1999) e *Gerris lacustris* (Danielsson and Askenmo, 1999), nel coleottero *Onthophagus taurus* (House and Simmons, 2002), in *Dryomyza anilis* (Otronen, 1998) e in *Lygaeus simulans* (Tadler, 1999). In terzo luogo, genitali elaborati possono derivare da un processo di coevoluzione antagonista fra i sessi, come nel caso di *Callosobruchus maculatus* (Crudgington and Siva-Jothy, 2000), *Sepsis cynipsea* (Blanckenhorn et al., 2002; Hosken et al., 2003) e *Cimex lectularius* (Stutt and Siva-Jothy, 2001). In queste specie, i genitali maschili possono infliggere delle ferite alla femmina, ed è stato proposto che questo comportamento possa

portare ad una riallocazione delle risorse della femmina nella riproduzione attuale, beneficiando anche il maschio con cui la femmina si era appena accoppiata, oppure possa ridurre la probabilità che la femmina si riaccoppi. Anche se queste ipotesi hanno validità dal punto di vista teorico, non vi sono evidenze sperimentali che le supportino. Rimane, inoltre, da chiarire se il provocare ferite alla femmina sia la causa o una conseguenza della comparsa nei genitali maschili di certi tipi di strutture (Hosken and Stockley, 2004).

4.2.4. ADATTAMENTI FISIOLGICI

I maschi hanno evoluto adattamenti fisiologici alla competizione spermatica che includono principalmente tappi spermatici e prodotti delle ghiandole seminali, che in genere funzionano sia come offesa sia come difesa.

I **tappi spermatici** sono formati dalla coagulazione dell'eiaculato nel tratto riproduttivo femminile, e prevengono o ritardano fisicamente l'inseminazione da parte di altri maschi o il loro accesso alla spermateca. Tali tappi riducono il rischio di competizione spermatica, in quanto forma una barriera fisica che impedisce ad altri maschi di introdurre i loro spermatozoi all'interno della femmina. D'altra parte, lo stesso tappo impedisce anche la fuoriuscita dal tratto genitale femminile degli spermatozoi inseminati dal maschio. Pertanto, attraverso i tappi spermatici, i maschi riescono temporaneamente ad evitare la competizione spermatica. E' anche stato proposto che possano servire per indirizzare e localizzare i nuovi spermatozoi nelle corrette zone della spermateca, in modo da assicurarsi un immagazzinamento efficace dei propri spermatozoi. I tappi spermatici, però, sono barriere temporanee contro l'inseminazione da parte di altri maschi: la femmina, infatti, può rigettare il tappo spermatico al momento della deposizione delle uova, e lo stesso tappo può essere rimosso da altri maschi, facilitati da adattamenti morfologici nei genitali. Il costo per le femmine, associato all'aver il tratto riproduttivo bloccato da un tappo, può inoltre portare all'evoluzione di adattamenti nella femmina che le consentano di rigettare il tappo prima della deposizione delle uova, aggirando anche il controllo del maschio sulla paternità delle uova. I tappi spermatici sono frequenti nei roditori, nei rettili e in alcuni taxa di insetti (Simmons, 2001b).

La produzione di tappi spermatici, comunque, comporta un notevole costo energetico per i maschi. In alcune specie di lepidotteri, ad esempio, c'è un trade-off fra l'allocazione delle riserve nella produzione di spermatofore e di tappi spermatici. Esiste una dicotomia fra le specie che investono maggiormente nella produzione di tappi spermatici e specie che investono maggiormente nella produzione di spermatofore, cioè nella qualità degli spermatozoi trasferiti. (Simmons, 2001b). Le energie allocate per la produzione di tappi spermatici, inoltre, cala con l'aumentare del numero degli accoppiamenti di un maschio (Simmons, 2001b). La presenza di tappi spermatici in una femmina non ha influenza sul numero di tentativi di copula che questa riceve: i tappi spermatici non funzionano come deterrenti visivi, ma solamente come barriere fisiche all'inseminazione degli spermatozoi. Anche le dimensioni dei tappi spermatici hanno la loro importanza nell'efficienza della protezione: quest'ultima cala al diminuire delle dimensioni del tappo. Inoltre, esiste una correlazione positiva fra le dimensioni del maschio e le dimensioni del tappo che esso produce.

Le femmine riescono ugualmente a riaccoppiarsi nonostante la presenza di tappi spermatici: riaccoppiamenti sono possibili durante il periodo di tempo

necessario al tappo per solidificarsi. I tappi potrebbero anche servire per prevenire la perdita passiva o attiva di spermatozoi dal tratto riproduttivo femminile.

I **prodotti delle ghiandole seminali** inseriti nell'eiaculato, invece, agiscono influenzando la fisiologia e il comportamento della femmina, inducendola a deporre le uova o riducendone la recettività. Inoltre, essi sono anche coinvolti nell'immagazzinamento e nell'utilizzo degli spermatozoi. Un esempio classico sono i diversi prodotti seminali (Acp, *accessory gland proteins*) che i maschi di *Drosophila* trasferiscono assieme all'eiaculato durante l'accoppiamento e che hanno ciascuno un diverso effetto sull'utilizzo degli spermatozoi da parte delle femmine (Wolfner, 2002). Ad esempio, Acp 36DE agisce a livello del rilascio e trattenimento degli spermatozoi. Maschi che non producono questi prodotti seminali hanno un ridotto successo nella competizione spermatica perché i loro spermatozoi non vengono immagazzinati dalla femmina. Invece, maschi con determinate varianti di questi prodotti seminali ottengono un maggior successo di maschi con altre varianti.

Queste sostanze, però, spesso hanno ripercussioni negative sulla fitness della femmina, visto che vanno ad agire spesso sul suo sistema nervoso o endocrino. Inoltre, le risposte a tali prodotti sono dose dipendenti: le femmine mostrano risposte graduali in relazione sia alla quantità sia alla qualità delle sostanze presenti nell'eiaculato. Il tipo e gli effetti di questi prodotti sono molteplici e specie specifici.

5. SCELTA CRIPTICA FEMMINILE

La competizione spermatica è sempre stata considerata come una logica estensione della competizione inter-sessuale. Più recentemente, però, si è diffusa la concezione di un ruolo femminile nell'esito della competizione spermatica, cioè che le femmine non siano solo un'arena inerte in cui avviene la competizione spermatica, ma che in qualche misura il luogo in cui questa competizione avviene (il tratto riproduttivo femminile in specie a fecondazione interna, o le caratteristiche del sito di fecondazione nelle specie a fecondazione esterna) permetta una qualche forma di scelta femminile.

Il termine "**scelta criptica femminile**" si riferisce proprio a questo processo e comprende tutti i processi influenzati dalla femmina prima e/o dopo la fecondazione, che possono in qualche modo favorire gli spermatozoi di un maschio a spese di quelli di un altro. Questo include l'idea che mescolare gli spermatozoi di più maschi all'interno della spermateca in qualche modo permetta alla femmina di scegliere gli spermatozoi migliori fra quelli disponibili (Eberhard, 1996).

Il termine "criptica" riferito alla scelta femminile sta ad intendere che tale processo non è manifesto, ma avviene all'interno del tratto femminile, e che esso non viene riconosciuto se si usano i criteri classici della selezione sessuale darwiniana. Per questo motivo, è particolarmente difficile dimostrare che la scelta criptica femminile abbia un ruolo nel successo di competizione spermatica di un maschio.

Vi è comunque un certo dibattito sulla definizione di scelta criptica femminile da adottare. Alcuni autori non sono d'accordo sul grado di influenza che può avere la femmina nei processi di fecondazione. Altri autori, ad esempio, considerano come scelta femminile solamente quei processi che non possono essere spiegati con la competizione spermatica: secondo questa visione, i processi indotti dalla femmina o dalla morfologia del suo apparato riproduttore determinano la forma in cui agirà la competizione spermatica, ma non vengono considerati parte della scelta criptica

femminile (Telford and Jennions, 1998). La visione di Eberhard è molto più estremistica e, come precisa in un lavoro successivo, egli sostiene che la competizione spermatica non può esistere senza l'influenza della femmina, anche solo perché la morfologia dei suoi organi riproduttori determina quanti spermatozoi possono venire immagazzinati e il loro grado di accessibilità alla manipolazione da parte dei maschi che si accoppiano in seguito con la femmina. Secondo questa visione, la competizione spermatica *sensu strictu* non avviene mai, ma è la scelta criptica femminile l'unico fattore da considerare (Eberhard, 1998).

Ad ogni modo, vi è uno scarso supporto empirico alla scelta criptica femminile, in larga parte per la difficoltà tecnica nell'individuare e dimostrarne i meccanismi e perché non sempre è possibile distinguere gli effetti della competizione spermatica da quelli dell'influenza femminile.

5.1. MECCANISMI DELLA SCELTA CRIPTICA FEMMINILE

Sono stati individuati numerosi meccanismi attraverso cui la femmina può manipolare la paternità a favore di un determinato maschio (Eberhard, 1996), e i più importanti comprendono:

- Prevenzione della penetrazione profonda dell'organo copulatore maschile e dell'eiaculazione
- Interruzione precoce della copula
- Mancato trasporto degli spermatozoi nella spermateca
- Espulsione degli spermatozoi
- Digestione degli spermatozoi
- Mancato nutrimento degli spermatozoi immagazzinati
- Mancato trasferimento degli spermatozoi di un maschio precedente in un sito in cui possono essere rimossi o disattivati dal maschio focale
- Rimozione di spermatozoi prima che il trasferimento degli spermatozoi da questi all'interno del tratto femminile sia completato
- Mancata ovulazione
- Mancata preparazione dell'impianto nell'utero
- Aborto selettivo
- Mancata ovoposizione
- Mancato investimento nella prole
- Rigetto dei tappi spermatici

- Prevenzione della rimozione dei tappi spermatici di maschi precedenti da parte del maschio focale
- Accoppiamento con altri maschi
- Uso differenziale degli spermatozoi immagazzinati
- Ritenzione degli spermatozoi di maschi precedenti
- Fusione selettiva delle uova con determinati spermatozoi

Se questi processi sono in grado di aumentare la probabilità che particolari tipi di maschi ottengano un maggior successo di fecondazione in femmine promiscue, queste, secondo la definizione di Eberhardt (1996), stanno esercitando la scelta criptica femminile. Le caratteristiche maschili sotto selezione sono quelle che permettono alle femmine di distinguere fra i vari maschi.

5.2. ADATTAMENTI ALLA SCELTA CRIPTICA FEMMINILE

La scelta criptica femminile si contrappone spesso alla competizione spermatica e crea inevitabilmente un conflitto fra i sessi per il controllo della paternità delle uova. Nei sistemi in cui le femmine possono venire costrette all'accoppiamento, la maggior parte delle femmine vengono inseminate da molti maschi, impedendo qualsiasi forma di scelta femminile precopulatoria "esplicita" e favorendo in questo modo le femmine che sono in grado di discriminare fra i maschi e manipolare i loro eiaculati. D'altra parte, però, appena le femmine hanno potuto stabilire una qualche forma di controllo sulla fecondazione delle uova, questo creerà una forte pressione selettiva sui maschi per l'evoluzione di controadattamenti che ripristinino il loro controllo dei sistemi di fecondazione, e così via in un ciclo potenzialmente infinito. Inoltre, la competizione spermatica può portare all'evoluzione di caratteri che aumentano l'efficienza di fecondazione dei maschi a scapito della fitness delle femmine, creando in questo modo un conflitto evolutivo fra i sessi.

Un buon esempio viene da individui appartenenti a diverse specie del genere *Drosophila*: in *D. melanogaster* e *D. simulans*, sono stati identificati parecchi dei prodotti delle ghiandole accessorie dei maschi, che vanno sotto il nome di Acp. Uno di questi Acps (Acp26Aa) stimola l'ovulazione da parte delle femmine: aumentando il numero di uova prodotte aumenta il successo riproduttivo di un maschio diluendo l'intensità di competizione spermatica (Swanson et al., 2001). D'altro canto, aumentare la produzione di uova oltre una certa soglia diminuisce la longevità della femmina e in ultimo diminuisce la sua fitness complessiva (Chapman et al., 1995).

Molti tratti di tipo comportamentale, fisiologico o anatomico prima inspiegabili acquistano senso se visti in luce del conflitto evolutivo fra i sessi: ad esempio la specie promiscua *Chelymorpha alternans* ha un pene molto lungo, e la femmina ha una spermateca estremamente lunga e circonvolta. È stato proposto che questi caratteri si siano evoluti in risposta a conflitti sessuali continui, in cui entrambi i sessi cercano di ottenere il controllo della fecondazione delle uova. Questa coevoluzione fra i sessi porta ad un'evoluzione estremamente rapida di caratteri estremi (Palumbi, 1999; Swanson and Vaquier, 1998) e può portare alla

specializzazione nei sessi, con conseguente isolamento riproduttivo e infine speciazione.

In generale, le condizioni per l'evoluzione della scelta femminile a livello postcopulatorio sono favorevoli quando la scelta del partner è costosa o non è possibile (come in specie con alti tassi di coercizione sessuale) o quando la scelta femminile non si basa solamente su caratteri fenotipici, ma anche sulla compatibilità genetica dei due partner (Birkhead and Pizzari, 2002).

La scelta criptica femminile può essere direzionale o non direzionale. Si definisce scelta criptica **direzionale** il caso in cui i criteri con cui la femmina sceglie i partner a livello postcopulatorio sono gli stessi della scelta femminile precopulatoria. Sono cioè favoriti aspetti "assoluti" del maschio, che non dipendono dalla femmina con cui esso si accoppia. Esistono pochi esempi a sostegno di una scelta criptica femminile direzionale. Uno di questi viene dal gallo (*Gallus gallus domesticus*) in cui le femmine preferiscono accoppiarsi con partner socialmente dominanti, ma sono continuamente soggetti a copule coercitive da parte degli altri maschi del gruppo. In questa specie, tuttavia, le femmine sono in grado di espellere l'eiaculato di un maschio subito dopo l'inseminazione, e la probabilità che esse espellano gli spermatozoi è inversamente proporzionale al rango sociale del maschio con cui hanno copulato (Pizzari and Birkhead, 2000). Un secondo esempio è quello del grillo *Teleogryllus commodus*, in cui le femmine rimuovono le spermatofore trasferite da maschi percepiti come meno attraenti con maggior frequenza rispetto a quelle di maschi considerati attraenti. Inoltre, in questa specie, i maschi controllano le femmine dopo la copula in modo che queste non rimuovano le spermatofore, e il mate guarding è più frequente da parte di maschi non attraenti, suggerendo che in questa specie il mate guarding postcopulatorio si sia evoluto come controadattamento alla rimozione degli spermatozoi da parte delle femmine via conflitto sessuale (Bussiere et al., 2006). La manipolazione del numero di spermatozoi trasferiti dal maschio in base della percezione del suo fenotipo da parte della femmina è stata dimostrata di recente anche nel coleottero *Tribolium castaneum* (Fedina, 2007), e in guppy (*Poecilia reticulata*) (Pilastro et al., 2007b; Pilastro et al., 2004).

Si definisce, invece, scelta criptica **non direzionale** il caso in cui le femmine favoriscono gli spermatozoi di maschi con genotipi compatibili, a discapito delle loro caratteristiche fenotipiche: in questo caso sono selezionati aspetti "relativi" di un maschio. Un "gene compatibile" è stato definito come un allele che porti un aumento della fitness dell'individuo che lo porta quando inserito in uno specifico genotipo (Neff, 2005).

Molti dei meccanismi che risultano in una scelta criptica femminile non direzionale sono stati descritti in organismi ermafroditi sessili, in cui il rischio di autofecondazione è molto alto (Bishop et al., 1996). Uno di questi esempi è quello di *Beroe ovata*, in cui le femmine mostrano un'attiva scelta del pronucleo degli spermatozoi (Carrè and Sardet, 1984). La scelta criptica femminile non direzionale, comunque, è stata dimostrata come un fenomeno molto diffuso (Prout and Clark, 1996; Wilson et al., 1997) anche se non è stato dimostrato per tutte le specie (Cunningham and Cheng, 1999; Stockley, 1997a). Come la femmina valuti il genotipo dei partner, però rimane sconosciuto. Un buon candidato sono i geni della regione MHC (*Major Histocompatibility Complex*), geni coinvolti nella resistenza ai parassiti, in molte altre funzioni immunitarie e nel riconoscimento fra conspecifici in molte specie. Alcuni di questi geni sembrano essere espressi anche a livello della superficie di membrana degli spermatozoi (Martin-Villa et al., 1999), cosa che faciliterebbe il

riconoscimento dei genotipi compatibili da parte del tratto riproduttivo femminile o delle stesse uova (si veda il paragrafo dedicato ai geni MHC).

6. BENEFICI DELLA POLIANDRIA

I biologi evolucionisti hanno sempre considerato la poliandria da un punto di vista adattativo, chiedendosi quale fosse il vantaggio per i due sessi dell'accoppiarsi con più partner per ogni stagione riproduttiva. Per i maschi la risposta è ovvia, come mostrato dagli esperimenti di Bateman (1948): il successo riproduttivo di un maschio aumenta con il numero di femmine che riesce a inseminare e con il numero di uova che riesce a fecondare. La risposta non è così chiara per le femmine. Con l'incremento delle tecniche biomolecolari disponibili e il loro utilizzo in biologia evolucionistica, si è dimostrato che la promiscuità femminile è diffusa in vari taxa animali e che si riflette nella paternità multipla della prole all'interno di una stessa covata (Birkhead and Moller, 1998). Osservazioni comportamentali hanno, inoltre, dimostrato che questa è spesso dovuta ad una ricerca attiva da parte delle femmine dell'accoppiamento con partner diversi, piuttosto che all'alta frequenza di copule coercitive (Kempnaers et al., 1997). Anche se estremamente diffusa, la poliandria è associata a dei costi, che possono riguardare sia l'atto di ricerca dei numerosi compagni sia il vero e proprio atto dell'accoppiamento. Fra i più comuni si annoverano

- la spesa energetica richiesta per la ricerca del partner;
- un aumento del rischio di predazione: le femmine devono cercare partner in zone rischiose, ed inoltre durante l'accoppiamento la vigilanza e la mobilità della femmina vengono diminuite;
- un aumento del rischio di contrarre parassiti e malattie;
- un aumento del rischio di procurarsi ferite;
- una diminuzione del tempo dedicato al foraggiamento;

Vanno, inoltre, ricordati i costi imposti dai maschi alle femmine poliandriche per prevenire che esse si riaccoppino (Stockley, 1997b), come ad esempio i prodotti delle ghiandole seminali di *Drosophila melanogaster*, che diminuiscono la recettività ad accoppiamenti futuri, a discapito però della durata della vita delle femmine (Chapman et al., 1995; Eberhard, 1998).

Nonostante i costi appena descritti, la poliandria rimane diffusa nelle popolazioni naturali, e l'evoluzione e il mantenimento di tale comportamento possono essere attribuiti al conseguimento di benefici di tipo diretto (materiali) e di tipo indiretto (genetico). I primi si riferiscono a benefici ottenuti dalla femmina per se stessa e che aumentano la sua fecondità, mentre i secondi sono vantaggi che la femmina ottiene per la sua prole, in termini ad esempio di maggior sopravvivenza o di maggior successo riproduttivo.

6.1. BENEFICI DIRETTI

Evidenze empiriche dimostrano che i costi relativi alla poliandria possono essere bilanciati dall'ottenimento di benefici materiali da parte della femmina ad ogni accoppiamento, attraverso il trasferimento di sostanze da parte del maschio prima, durante o subito dopo la copula (ex. doni nuziali, vedi (Arnqvist and Nilsson, 2000)). Fra i benefici diretti della poliandria (come poi della scelta sessuale) ci sono:

- a. un aumento delle cure parentali (Nakamura, 1998)
- b. l'accesso a risorse materiali, come terreni con accesso a riserve di cibo (Birkhead and Moller, 1992)
- c. la diminuzione del rischio di infanticidio da parte dei maschi (Smuts and Smuts, 1993)

Inoltre, le femmine possono utilizzare l'accoppiamento come metodo per evitare l'*harrasment* sessuale da parte dei maschi, un comportamento definito anche "*convenience polyandry*" (Rowe et al., 1994; Stone, 1995). I maschi, a volte, trasferiscono sostanze attraverso l'eiaculato che possono costituire un vantaggio per la femmina, come nel caso di trasferimento di nutrienti o doni nuziali che aumentano la fecondità della femmina (McLain, 1998; Wedell, 1997) o sostanze che promuovono la maturazione e la deposizione delle uova (Cordero, 1995). La poliandria può anche essere un modo per assicurarsi contro l'infertilità del maschio, come proposto dalla *Phenotype-linked fertility hypothesis* (Sheldon, 1994): secondo questa ipotesi i caratteri sessuali secondari dei maschi segnalano la loro efficienza di fertilizzazione, e pertanto la promiscuità femminile si sarebbe evoluta per evitare i costi per le femmine associati alla mancanza di spermatozoi e alla mancata fecondazione di tutte le loro uova (Olsson and Shine, 1997; Sheldon, 1994). I motivi dell'infertilità maschile possono essere molti, tra i quali un investimento in termine di numero di spermatozoi non sufficiente da parte del maschio a seguito di molti accoppiamenti (Pitnick and Markow, 1994) o una perdita passiva di spermatozoi dalla spermateca o dal tratto riproduttivo femminile (Barnett et al., 1995; Yamagishi et al., 1992).

6.2. BENEFICI INDIRETTI

Anche se l'importanza dei benefici di tipo materiale nel mantenimento della promiscuità femminile è ampiamente sostenuta da dati teorici e sperimentali (Jennions and Petrie, 2000), non va tuttavia sottovalutata l'importanza dei vantaggi di tipo genetico: mentre i primi possono essere ottenuti in uguale quantità anche da femmine monandriche che si accoppiano più volte con lo stesso maschio, solo le femmine poliandriche possono ottenere sia benefici materiali sia i benefici genetici. Le femmine poliandriche, infatti, accoppiandosi con maschi diversi, possono beneficiare dei benefici derivanti dalle caratteristiche di quei maschi, siano esse relative ad un'intrinseca qualità dei maschi, al loro maggior o minor successo riproduttivo, o ad una maggior compatibilità genetica fra la femmina ed un determinato maschio.

I benefici indiretti sono benefici che una femmina ottiene per la sua prole accoppiandosi con numerosi (almeno due) maschi diversi dal punto di vista genetico (Yasui, 1998). I principali benefici indiretti che una femmina può ottenere dall'accoppiamento con maschi diversi riguardano la prevenzione dell'incompatibilità genetica del partner, l'aumento della diversità genetica della prole o un aumento della sopravvivenza e del successo riproduttivo della prole. Questi tipi di benefici non sono fra loro mutualmente esclusivi, per cui la femmina può adottare un criterio per la scelta del partner e "sfruttare" i processi postcopulatori derivanti dall'accoppiamento con più maschi per selezionare gli spermatozoi più competitivi o maggiormente compatibili, soprattutto se non vi sono caratteri fenotipici del maschio che segnalano questi aspetti. I benefici possono, pertanto, essere ottenuti sia attraverso i processi precopulatori sia quelli postcopulatori e non dipendono dal meccanismo postcopulatorio che entra in gioco, sia esso competizione spermatica o scelta criptica femminile (Jennions and Petrie, 2000).

Sono state proposte molte teorie per spiegare quali siano i benefici indiretti che la femmina può ottenere tramite la poliandria. I principali sono:

6.2.1. MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEL PARTNER (TRADING-UP HYPOTHESIS)

Secondo la "**trading-up hypothesis**", tramite gli accoppiamenti con più partner, le femmine cercano di migliorare la qualità genetica della loro prole: le femmine si accoppiano con il primo maschio che incontrano per evitare il rischio di non avere sufficienti spermatozoi per fecondare tutte le loro uova, e successivamente si riaccoppiano con altri maschi se questi sono di qualità migliore del precedente (Kempnaers, 1992). Questa strategia può essere accoppiata a meccanismi postcopulatori che favoriscono gli spermatozoi dei maschi di miglior qualità rispetto ai primi: maschi di miglior qualità possono avere spermatozoi più competitivi, o possono entrare in gioco meccanismi di scelta criptica femminile che favoriscono gli spermatozoi di questi maschi. Questo meccanismo è favorito se i costi associati alla ricerca del partner e all'accoppiamento sono alti o se la stagione riproduttiva è breve, e il rischio per la femmina di non poter fecondare le uova è alto. Può essere vantaggioso anche nei casi in cui la prole prodotta in un secondo momento è di qualità inferiore, a causa ad esempio delle caratteristiche ambientali mutevoli. Tuttavia, il trading-up è diffuso soprattutto in specie in cui siano presenti limiti iniziali alla scelta del partner da parte della femmina, come in caso di alti livelli di coercizione sessuale (Pitcher et al., 2003), o se il primo accoppiamento è avvenuto per ottenere benefici di tipo diretto, come in molte specie di uccelli (Jennions and Petrie, 2000). Si può pertanto affermare che in questo caso la poliandria è stata selezionata indirettamente, come conseguenza di accoppiamenti iniziali con maschi di scarsa qualità.

6.2.2. AUMENTO DELLA DIVERSITÀ GENETICA DELLA PROLE

L'accoppiamento con maschi geneticamente diversi può essere un mezzo per aumentare la diversità genetica della prole, in modo che almeno una parte di essa riesca a sopravvivere a condizioni ambientali variabili (Yasui, 1998). Questa strategia è comune negli insetti sociali (Keller, 1995; Keller and Reeve, 1994).

6.2.3. EVITARE L'INCOMPATIBILITÀ GENETICA (GENETIC COMPATIBILITY HYPOTHESIS)

La “**genetic compatibility hypothesis**” prevede che le femmine si accoppino con più maschi per evitare il rischio di incompatibilità genetica con i partner (Zeh and Zeh, 1996, 1997). Pertanto, non tutte le femmine di una popolazione ottengono questo tipo di benefici dall'accoppiamento con lo stesso maschio.

La scelta femminile basata sulla compatibilità genetica del partner può aver luogo sia a livello precopulatorio (se esistono segnali che permettono alla femmina di valutare tale aspetto di un maschio) sia postcopulatorio (se invece mancano tali segnali) (Zeh and Zeh, 1997). In questo secondo caso, i segnali di compatibilità genetica sarebbero da cercarsi a livello gametico, ed i meccanismi più probabili sono l'interazione spermio-soma femminile o spermio-uovo (Vaquier, 1998): le proteine espresse sulla superficie dello spermatozoo vengono usate come antigeni che vengono riconosciuti dai leucociti del tratto riproduttivo femminile (Birkhead et al., 1993). Il riconoscimento degli spermatozoi potrebbe poi portare alla selezione diretta degli spermatozoi (Eberhard, 1996; Rulicke et al., 1998), al maggior successo di spermatozoi conspecifici (Howard et al., 1998; Markow, 1997; Wade and Chang, 1995) o alla distruzione degli spermatozoi di maschi geneticamente più simili alla femmina, come nel caso della fagocitosi degli spermatozoi prima che raggiungano il sito di fecondazione dimostrato nell'ascidia *Diplosoma listerianum* (Bishop, 1996; Bishop et al., 1996) e probabile meccanismo per evitare l'autofecondazione.

Possibili incompatibilità genetiche derivano dalla combinazione di aplotipi materni e paterni che possono portare alla produzione di prole di qualità genetica scarsa o alla diretta morte precoce degli embrioni (Zeh and Zeh, 1996). Le cause principali di incompatibilità genetica sono :

- La similarità genetica fra i partner: essa può derivare da alti livelli di inbreeding nella popolazione, ad esempio in seguito a vari tipi di eventi demografici, e può portare ad una diminuzione dell'eterozigosità nella popolazione, con conseguente aumento dell'espressione di geni letali recessivi o di interazioni epistatiche negative fra loci omozigoti. Queste a loro volta possono portare ad una diminuita qualità della prole, come supportato da numerose evidenze empiriche (Keller and Waller, 2002).
- L'esistenza di un conflitto intragenomico e la presenza di “elementi egoisti” nel genoma: esistono geni nucleari in grado di influire sulla produzione di spermatozoi e sulla sex ratio della covata, oppure di influenzare direttamente la qualità genetica della prole. Un esempio è quello dei distorsori della segregazione, elementi che agiscono in modo da aumentare la loro presenza nei gameti inibendo o uccidendo i gameti con alleli diversi o manipolando la meiosi con conseguente sovrarappresentazione nei gameti di questi alleli distorsori. Se questi elementi si trovano su un cromosoma sessuale possono agire anche da distorsori della sex ratio. Essi sono frequenti in molti taxa, dalle piante ai funghi, dagli artropodi ai mammiferi (Lenington, 1991; Wilkinson et al., 1998).
- La presenza di endosimbionti cellulari: questi agiscono come distorsori della sex ratio e vengono trasmessi per linea materna. Agiscono aumentando il numero di

figlie femmine (in quanto portatrici) attraverso l'uccisione degli embrioni maschili (e conseguente riallocazione delle risorse negli embrioni femminili) oppure attraverso la femminizzazione degli embrioni maschili (Charnov, 1982; Godfray, 1994). Esistono anche simbionti cellulari in grado di provocare incompatibilità citoplasmatica nell'embrione, causando la morte o lo sviluppo anormale di questo. Uno degli esempi più noti è il batterio *Wolbachia* ad eredità materna, che può portare alla completa morte dell'embrione (Stouthamer et al., 1999).

- Effetti epistatici e antagonismo genetico

Un probabile meccanismo attraverso cui può venire valutata la compatibilità di un partner sfrutta i geni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC *Major Histocompatibility Complex*), una componente del sistema immunitario dei Vertebrati.

6.2.4. MAGGIOR SUCCESSO RIPRODUTTIVO (DI COMPETIZIONE SPERMATICA) DEI FIGLI MASCHI (SEXY SPERM HYPOTHESIS)

La promiscuità femminile e la competizione spermatica creano le condizioni affinché a fecondare le uova siano gli spermatozoi con migliori abilità competitive. In questo modo, se queste caratteristiche degli spermatozoi sono ereditabili, verranno prodotti dei figli maschi a loro volta in grado di produrre spermatozoi maggiormente competitivi e con un maggior successo riproduttivo rispetto agli altri maschi (Keller and Reeve, 1995). Questo meccanismo, definito dalla "sexually selected sperm hypothesis" o "**sexy sperm hypothesis**", rappresenta il corrispettivo postcopulatorio della teoria dei "sexy sons" e necessita di due assunzioni fondamentali: le caratteristiche degli spermatozoi che li avvantaggiano nella competizione spermatica devono essere ereditabili (per via paterna) e deve esistere una consistente variabilità individuale per questi caratteri. In secondo luogo, deve esistere una correlazione genetica fra i geni responsabili del comportamento poliandrico e le caratteristiche degli spermatozoi. I caratteri maschili implicati nel successo di fecondazione considerati dalla teoria dei "sexy sperm" riguardano tutti gli adattamenti alla competizione spermatica, come la morfologia dei genitali, la qualità e il numero degli spermatozoi, i tappi spermatici e i prodotti delle ghiandole seminali, ecc.

6.2.5. MAGGIOR PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA DEI FIGLI (GOOD SPERM HYPOTHESIS)

Se maschi di qualità migliore producono anche spermatozoi più competitivi, accoppiandosi con più maschi le femmine creando le condizioni necessarie affinché gli spermatozoi di questi maschi fecondino le uova. In questo caso, i figli ereditano le caratteristiche dei padri ed hanno una maggior probabilità di sopravvivenza (Olsson and Madsen, 1995; Yasui, 1997, 1998). Le assunzioni di questo modello, detto "**good sperm hypothesis**" e corrispettivo postcopulatorio della "good genes hypothesis", sono le stesse del modello "sexy sperm", con l'aggiunta che le caratteristiche spermatiche devono essere geneticamente correlate anche ai geni responsabili della

qualità del maschio. Secondo questa ipotesi, anche i caratteri postcopulatori responsabili del successo di competizione spermatica di un maschio (allo stesso modo dei caratteri sessuali secondari) dovrebbero essere condizione dipendenti: il successo di fecondazione di un maschio potrebbe dipendere dalla sua abilità nell'ottenere le risorse necessarie alla produzione di grandi numeri di spermatozoi o prodotti contenuti nel liquido seminale. Questo potrebbe essere la causa del coinvolgimento di un grande numero di loci, che pertanto determinerebbero la generale sopravvivenza dell'individuo (Yasui, 1997).

Vi sono molte prove empiriche che dimostrano che femmine poliandriche hanno benefici maggiori rispetto a femmine monandriche: in guppy (*Poecilia reticulata*), ad esempio, femmine poliandriche (accoppiate con quattro maschi diversi) producono più piccoli, di dimensioni maggiori e con migliori capacità antipredatorie, e hanno tempi di gestazione significativamente minori rispetto a femmine monandriche (fatte accoppiare quattro volte con un unico maschio) (Evans and Magurran, 2000; Ojanguren et al., 2005). In *Vipera berus* la proporzione di piccoli non vitali che nascono è inversamente proporzionale al numero di maschi con cui si è accoppiata la femmina (Madsen et al., 1992) e nello pseudoscorpione *Cordylochernes scorpioides* femmine poliandriche hanno una maggior fitness rispetto a femmine che si accoppiano con un maschio solo, e in particolare hanno una probabilità maggiore che le loro uova si schiudano (Zeh, 1997). Molti altri studi su insetti e aracnidi (Arnqvist and Nilsson, 2000; Konior et al., 2001; Moya-Larano and Fox, 2006; Pai and Yan, 2002; Watson, 1991), rettili (Eizaguirre et al., 2007; Olsson et al., 1994), uccelli (Kempnaers et al., 1999) e mammiferi (Fisher et al., 2006; Hooglund, 1998; Keil and Sachser, 1998) hanno riportato una correlazione positiva fra il grado di poliandria femminile e il successo di schiusa delle uova o le performance dei piccoli. In tutti questi casi, le femmine non ottengono benefici di tipo materiale dagli accoppiamenti. Quale sia il tipo di beneficio indiretto ottenuto dalle femmine, tuttavia, è ancora dubbio. In molti lavori, gli autori suggeriscono che la maggior vitalità degli embrioni di femmine poliandriche possa essere dovuta alla maggior probabilità che tali femmine incontrino partner geneticamente compatibili rispetto a femmine che si accoppiano con un solo maschio.

Esistono molte prove sperimentali a sostegno della “genetic compatibility hypothesis” (Evans and Marshall, 2005; House and Simmons, 2005; Nilsson et al., 2003; Palumbi, 1999; Simmons et al., 2006; Ward, 2000). La prima dimostrazione diretta che femmine poliandriche ottengono una fitness maggiore perché evitano i costi associati all'inbreeding deriva dal grillo *Gryllyus bimaculatus*. Sono stati formati tre gruppi sperimentali, in cui le femmine venivano fatte accoppiare o con due maschi loro fratelli, o con due maschi non imparentati con la femmina o con un fratello e un maschio non imparentato. Le femmine del primo gruppo sperimentale hanno prodotto uova con un successo di schiusa significativamente inferiore rispetto alle femmine degli altri due gruppi (Tregenza and Wedell, 2002). Un maggior successo di competizione spermatica di maschi non imparentati con una femmina quando in competizione con maschi imparentati, anche se non significativo, è stato trovato anche in un'altra specie di grillo, *Grylodes supplicans* (Stockley, 1999). Alcuni studi in *Callosobruchus maculatus* (Wilson et al., 1997) e in *Drosophila melanogaster* (Clark et al., 1999; Clark et al., 2000) hanno poi dimostrato che il successo di competizione spermatica di un maschio varia a seconda della femmina con cui si accoppia e del suo grado di similarità con essa. Ci sono poi molti lavori

che testimoniano un aumento nella fitness della prole di femmine poliandriche in vari taxa, e che vanno a supportare, anche se in modo indiretto la “genetic compatibility hypothesis” (Stockley, 1997a) (Kempnaers et al., 1999; Newcomer et al., 1999; Olsson et al., 1994; Simmons, 2001a; Stockley, 1997a; Tregenza and Wedell, 1998; Watson, 1998).

Gli altri due modelli principali sui benefici genetici della poliandria prevedono entrambi che vi sia una correlazione genetica fra caratteri coinvolti nel successo di competizione spermatica e la poliandria. La promiscuità femminile e la frequenza con cui le femmine si riaccoppiano mostra una considerevole variabilità intraspecifica (Miyatake and Matsumura, 2004) e numerosi studi ne hanno identificato le basi genetiche (Gromko and Newport, 1988; Harano and Miyatake, 2005; Kraus et al., 2005; Pyle and Gromko, 1979; Shuker et al., 2007; Solymar and Wade, 1990; Wedell, 2001). Non vi è tuttavia evidenza che la frequenza di accoppiamento delle femmine sia geneticamente correlata con il successo di fecondazione maschile, uno dei prerequisiti richiesti sia dal modello dei “sexy sperm” sia dal modello dei “good sperm”. Inoltre, l’unico studio che aveva lo scopo di verificare tale assunzione non ha trovato un’associazione significativa fra la frequenza di accoppiamento femminile e il successo di competizione spermatica nell’unica specie studiata, *Teleogryllus oceanicus* (Simmons et al., 2003). Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che i caratteri postcopulatori responsabili del successo di fecondazione di un maschio sono significativamente ereditabili per via paterna (Konior et al., 2005; Radwan, 1998), un’altra condizione necessaria per il modello dei “sexy sperm”.

Evidenze che la varianza nella produzione di spermatozoi dipenda dalla condizione del maschio derivano dalle correlazioni fenotipiche che legano le dimensioni relative degli spermatozoi alle condizioni del corpo. Ad esempio, le dimensioni dei testicoli sono positivamente associate con la massa corporea in molti mammiferi (Schulte-Hostedde and Millar, 2004; Schulte-Hostedde et al., 2005) e nella mosca *Drosophila grimshawi* (Droney, 1998). Evidenze indirette che i caratteri coinvolti nella competizione spermatica riflettono le condizioni del maschio derivano da studi correlativi che collegano le dimensioni dell’ejaculato, la qualità degli spermatozoi e le dimensioni dei testicoli all’espressione di caratteri sessuali secondari. Ad esempio, nel cervo rosso (*Cervus elaphus*), le dimensioni e la complessità del palco dei maschi è associato con le dimensioni delle gonadi maschili e con la velocità spermatica (Malo et al., 2005b). Una delle prove più convincenti dell’espressione condizione dipendente dei caratteri coinvolti nella competizione spermatica proviene dall’associazione genetica positiva fra condizione del maschio e fenotipo degli spermatozoi in *Onthophagus taurus*: in questa specie è stato dimostrato che la lunghezza degli spermatozoi ha ereditabilità paterna e che il peso e le dimensioni corporee del maschio sono correlate negativamente con la lunghezza degli spermatozoi. Ricerche seguenti hanno inoltre dimostrato che la produzione spermatozoi più corti conferisce un vantaggio nella competizione spermatica (Garcia-Gonzalez and Simmons, 2007).

Al contrario, la dipendenza dalla condizione dei caratteri postcopulatori non è stata trovata in *Nerodia sipedon* (Schulte-Hostedde and Montgomerie, 2006), nel pesce *Lepomis macrochirus* (Casselman and Montgomerie, 2004) né nella cavalletta *Chorthippus parallelus* (Reinhardt, 2001).

In conclusione, nonostante sia ormai assodato che le femmine ottengono benefici di tipo genetico dagli accoppiamenti con più partner, non vi sono ancora evidenze risolutive che possano chiarire il tipo di benefici che entra in gioco.

SCOPO DELLA TESI

Dal quadro fornito nell'Introduzione emerge che, in specie sessualmente promiscue, le due forme di selezione sessuale postcopulatoria (competizione spermatica e scelta criptica femminile) generano differenze nel successo riproduttivo dei maschi (Birkhead and Pizzari, 2002; Snook, 2005). Questi due meccanismi spesso si sovrappongono, nonostante la relativa importanza e il relativo contributo dei due al successo riproduttivo di un individuo non siano ben compresi (Snook, 2005).

La maggior parte degli studi riguardanti la selezione sessuale postcopulatoria si è focalizzata sulla competizione spermatica, che ha come conseguenza principale la comparsa di adattamenti di vario genere in ambito comportamentale, morfologico e fisiologico che possono da un lato aumentare il successo degli spermatozoi di un maschio rispetto a quelli dei maschi rivali (Birkhead and Pizzari, 2002; Parker, 1970) e dall'altro lato possono prevenire la competizione spermatica limitando la probabilità che una femmina si riaccoppi con altri maschi o che questi altri maschi riescano a fecondare le uova (Birkhead and Pizzari, 2002). Esempi di adattamenti degli spermatozoi alla competizione spermatica possono riguardare il numero degli spermatozoi inseminati, ma anche aspetti qualitativi. Nonostante ci siano molte prove teoriche ed empiriche a sostegno del ruolo decisivo del numero degli spermatozoi nel successo di competizione spermatica (Birkhead and Moller, 1998; Stoltz and Neff, 2006), di recente è stato proposto (Snook, 2005) che anche altri caratteri spermatici (considerati tutti insieme nel termine "qualità spermatica") siano di comparabile importanza per questo processo. Il termine "qualità spermatica" si riferisce all'efficienza di fecondazione dell'eiaculato di un dato maschio contro quello di un altro maschio dopo aver controllato statisticamente per il numero degli spermatozoi (Birkhead and Moller, 1998) ed include caratteri come le dimensioni degli spermatozoi (LaMunyon and Ward, 1998; Simmons et al., 2003), la loro longevità (Gage et al., 2004), vitalità (Hunter and Birkhead, 2002) e velocità (Birkhead et al., 1999; Hunter and Birkhead, 2002). Tutte queste caratteristiche si sono rivelate importanti per il successo di fecondazione in molte specie (Birkhead et al., 1999; Burness et al., 2004; Gage et al., 2004; Levitan, 2000; Malo et al., 2005a; Rurangwa et al., 2004).

È anche importante da dire, che spesso gli interessi dei due sessi riguardo la fecondazione delle uova non coincidono e le femmine possono evolvere contro adattamenti che permettano loro di controllare (almeno in parte) la paternità dei loro piccoli (Birkhead and Pizzari, 2002; Eberhard, 1996). Di conseguenza, la scelta criptica femminile ha più probabilità di essersi evoluta in specie con alti livelli di coercizione sessuale, in cui la scelta femminile precopulatoria è impossibile (ad esempio, se vi è un'alta frequenza di copule coercitive) rendendo la scelta criptica femminile l'unico mezzo per discriminare fra i maschi (Birkhead and Pizzari, 2002). Anche se l'importanza di scelta criptica femminile e competizione spermatica per i processi riproduttivi è stata completamente riconosciuta, la maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla competizione spermatica (Birkhead and Pizzari, 2002), in gran parte perché le difficoltà sperimentali rendono molto complicato dimostrare la scelta criptica femminile, distinguendone gli effetti da quelli della competizione spermatica (Eberhard, 1996). In conseguenza, la relativa importanza di questi due

processi nel diverso successo di fecondazione dei vari maschi è stata poco approfondita. Questo è lo scopo di questa tesi.

La specie su cui mi sono concentrata è *Poecilia reticulata*, un piccolo teleosteo d'acqua dolce a fecondazione interna, che viene considerato una specie modello per lo studio della selezione sessuale e dell'evoluzione dei caratteri sessuali secondari (Houde, 1997). Gli studi finora condotti si sono, tuttavia, concentrati sulla funzione delle caratteristiche degli spermatozoi nella determinazione degli esiti della competizione spermatica, e relativamente poco è noto riguardo all'influenza che la femmina può avere nell'influire sul successo di fecondazione di un individuo. Lo scopo di questa tesi è quello di valutare il ruolo relativo dei meccanismi sotto il controllo maschile (qualità degli spermatozoi) e sotto il controllo femminile (scelta criptica femminile basata sul numero degli spermatozoi e sulle loro caratteristiche genetiche) nei processi postcopulatori. Ho pertanto, condotto un primo esperimento per valutare se la scelta femminile per maschi più colorati si sia evoluta via benefici di fecondità. In un secondo esperimento, ho poi, valutato il ruolo relativo di numero e qualità degli spermatozoi nel successo di competizione spermatica. Mi sono poi concentrata su aspetti non direzionali della scelta criptica femminile: ho pertanto calcolato la ripetibilità del successo di fecondazione di un maschio in un esperimento di inseminazione artificiale in cui due femmine venivano inseminate con gli spermatozoi della stessa coppia di maschi, per poter meglio valutare quale potesse essere l'importanza di meccanismi non direzionali in questa specie. Ho poi approfondito un aspetto legato alla scelta femminile per compatibilità genetica, e cioè la variabilità ai loci MHC (*Major Histocompatibility Complex*) e il suo ruolo nella scelta criptica femminile non direzionale.

BIOLOGIA DI *POECILIA RETICULATA*

TASSONOMIA:

ORDINE: Ciprinodontiformes

FAMIGLIA: Poeciliidae

GENERE: *Poecilia*

SPECIE. *Poecilia reticulata*

1. CARATTERISTICHE GENERALI

Gli animali utilizzati negli esperimenti descritti in seguito appartengono alla specie *Poecilia reticulata* (Peters), un piccolo pesce teleosteo appartenente alla famiglia Poeciliidae (ordine Cyprinodontiformes). La famiglia Poeciliidae è un piccolo gruppo di pesci caratterizzati da fecondazione interna, viviparità e dalla presenza di un organo copulatore maschile intromittente (gonopodio). Questa famiglia comprende 22 generi (ex. *Poecilia*, *Xiphophorus*, *Gambusia*, *Girardinus*,...) e più di 190 specie. Il genere *Poecilia* contiene 43 specie (Parenti and Rauchenberger, 1989) ed il suo areale di distribuzione si estende dal sud degli Stati Uniti al sud del Brasile, in un vario range di habitat acquatici.

Poecilia reticulata è caratteristica di Trinidad e Tobago, Venezuela, Guyana e Surinam; la popolazione presa in considerazione in questa tesi è caratteristica del fiume Tacarigua, nell'isola di Trinidad. La specie è stata introdotta in tutto il mondo come controllo per la diffusione delle zanzare e delle malattie ad essa legate, dato che questo pesce si nutre delle larve di questo insetto. Il nome comunemente usato per questi animali è “guppy” o “pesce milione” poiché hanno un'elevata prolificità che permette loro di colonizzare rapidamente diversi tipi di ambiente.

L'habitat tipico di questa specie comprende corsi d'acqua dolce (anche se tollera acque salmastre) calma e poco profonda, con fondale costituito da ghiaio multicolore, vegetazione e acqua per lo più limpida. I pesci di questa specie occupano prevalentemente la zona prossima alla riva, dove il flusso d'acqua è più lento e vi sono meno predatori (Meffe and Snelson, 1989). È una specie sostanzialmente onnivora: la sua dieta comprende larve di insetti e di altri invertebrati, vegetali (come alghe o piccole bacche cadute in acqua) e a volte i loro stessi avannotti e quelli di altri pesci (Dussault and Kramer, 1981).

La pressione predatoria influisce profondamente su molti aspetti della biologia di *P. reticulata*, relativi al comportamento sessuale nei maschi e alla scelta del partner da parte delle femmine e, in modo particolare, allo sviluppo delle livree negli individui maschi (Magurran, 2005). I predatori di questa specie variano per distribuzione geografica e per tipologia di prede; all'interno di uno stesso fiume è possibile riconoscere zone diverse con regimi predatori diversi, divisi da barriere geografiche come piccole cascate che impediscono il movimento di grossi pesci (potenzialmente predatori dei guppy) fra una zona e l'altra. Nella parte alta dei fiumi *P. reticulata* condivide l'habitat con predatori meno pericolosi, come *Rivulus hartii*,

mentre nella parte bassa dei fiumi i predatori sono più abbondanti e pericolosi. La popolazione utilizzata negli esperimenti effettuati e di seguito descritti proviene dalla parte inferiore del fiume Tacarigua, caratterizzata da un'elevata pressione predatoria, dovuta alla presenza di uccelli, pesci ciclidi (*Crenicichla alta*) e ciprinodontiformi, e il crostaceo *Macrobrachium crenulatum*.

Poecilia reticulata mostra un marcato dimorfismo sessuale: le femmine sono caratterizzate da una colorazione mimetica grigio-verde, che permette loro di confondersi con i fondali dei corsi d'acqua in cui vivono, con un annerimento a livello del bordo delle squame che conferisce loro il tipico aspetto "a rete" da cui deriva il nome della specie. Sono più grandi dei maschi e presentano una macchia scura a livello della regione anale. Il sesso femminile, a differenza di quello maschile, è anche caratterizzato da crescita indefinita, cioè un aumento di dimensioni costante lungo tutta la vita dell'animale.

I maschi sono più piccoli e presentano una livrea fortemente colorata con macchie di numero, forma e dimensioni variabili, classificabili in tre tipologie principali: macchie a carotenoidi (arancio, rosso e giallo), macchie melaniche (nere) e macchie iridescenti (verde, blu e viola). Il pattern di colorazione è espresso esclusivamente nei maschi ed ha un'elevata variabilità fra individui diversi. I geni responsabili del colour pattern di un individuo (o almeno buona parte di essi) sono localizzati nel cromosoma Y e mostrano una forte ereditabilità paterna. L'intensità della colorazione, invece, è variabile e dipende dalle condizioni di salute del maschio (Houde, 1997). E' stata anche osservata una spiccata variabilità fenotipica a livello di popolazione, legata soprattutto alla diversa pressione predatoria locale (Endler, 1980, 1983, 1987, 1991): una colorazione più intensa rende il maschio più visibile ai predatori nelle popolazioni ad alto livello di predazione. Questa osservazione, insieme al diverso colour pattern di maschi e femmine, si oppone all'ipotesi secondo cui l'unica funzione delle macchie colorate è quella di rendere gli individui mimetici rispetto al letto dei fiumi (Endler, 1978).



Figura 1: Fotografia rappresentante una femmina (in basso) e due maschi di *Poecilia reticulata*. La femmina ha dimensioni maggiori dei maschi ed è priva di colorazione. I maschi, invece, sono leggermente più piccoli e presentano nella livrea macchie a carotenoidi, melaniche e iridescenti

2. BIOLOGIA RIPRODUTTIVA

Poecilia reticulata è una specie ovovivipara, lecitotrofica e a fecondazione interna, in cui gli individui si riproducono potenzialmente tutto l'anno (Constantz, 1989). L'assetto cromosomico della specie comprende ventitrè cromosomi e il sesso eterogametico (XY) è quello maschile (Magurran, 2005).

I maschi sono dotati di una struttura per la riproduzione chiamata **gonopodio**, formata dalla modificazione della pinna anale: gli ultimi tre raggi di questa pinna subiscono un ispessimento, per poi allungarsi e formare un canale attraverso cui, durante la copula, viene trasferito l'eiaculato direttamente nel gonoporo della femmina. Generalmente, la pinna anale dei maschi comincia a differenziarsi a cinque o sei settimane di età, quando iniziano anche a comparire le prime macchie colorate a livello della livrea (Constantz, 1989; Rosen and Bailey, 1963). Il gonopodio è provvisto di strutture accessorie: è presente una protuberanza sul lato ventrale del gonopodio, chiamata "**hood**", che si sviluppa da un piccolo rigonfiamento, per estendersi oltre l'estremità del gonopodio stesso una volta raggiunta la completa maturità sessuale; questa protuberanza sembra avere una funzione sensoriale (Clark and Aronson, 1951; Constantz, 1989). Anche se l'hood non sembra essere necessario per il buon fine delle inseminazioni, la sua formazione accompagna lo sviluppo dei maschi e solamente quando l'hood supera la fine del gonopodio vero e proprio i maschi sono effettivamente in grado di trasferire con successo gli spermatozoi alla femmina (Houde 1997). E' anche presente una serie di piccoli uncini ("**hook**") nella parte mediana distale dell'organo copulatore, che hanno la probabile funzione di facilitare l'aggancio del maschio alla femmina durante la copula (figura 2) (Houde, 1997).

Gli spermatozoi sono raggruppati in pacchetti spermatici, detti spermatozeugmata (o **bundles**). Questi sono inizialmente prodotti nelle gonadi del maschio e vengono poi immagazzinati nel canale testicolare fino al termine della maturazione, uniti da una matrice gelatinosa composta principalmente da mucine. Le sperm bundles hanno una misura di circa 135 e 235 μm e comprendono circa 27,000 sperm ciascuna (tra 10,000 e 35,000) (Billard, 1969), con le teste rivolte all'esterno e le code all'interno della spermatozeugmata (Kuckuck and Greven, 1997).

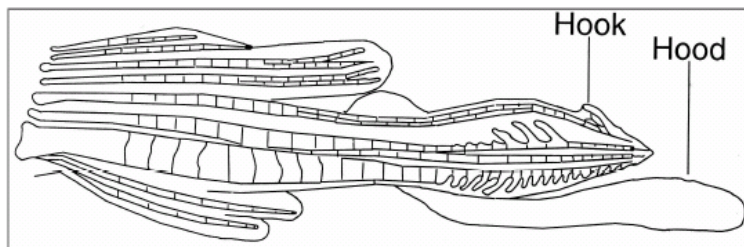


Figura 2: Rappresentazione schematica del gonopodio (organo copulatore) di un maschio sessualmente maturo. Nella foto si possono apprezzare bene la struttura ad uncino, detta "hook" e l'"hood", struttura con ipotizzata funzione sensoriale.



Figura 3: Fotografia al microscopio ottico di due sperm bundles in dissolvenza.

Le femmine iniziano a distinguersi dai maschi a circa quattro settimane dalla nascita grazie alla presenza di una macchia nera all'altezza della regione anale: questa caratteristica è utilizzata per distinguere e separare i piccoli dei due sessi prima che i maschi siano sessualmente maturi. L'apparato urogenitale femminile termina all'esterno con una papilla carnosa, che viene spostata dal gonopodio al momento dell'accoppiamento. Al di sotto di questa papilla è presente il **poro genitale**, da cui si diparte un gonodotto che sfocia in un paio di ovari fusi a formare un unico organo che, dopo la fecondazione, cresce fino ad occupare gran parte della cavità peritoneale. Le femmine sono sessualmente recettive quando sono vergini oppure nei pochi giorni successivi al parto: durante questo periodo si accoppiano con numerosi partner. Durante la gestazione, che ha una durata di circa un mese (con una forte variabilità individuale), gli embrioni si sviluppano all'interno del corpo materno fino al momento del parto, in corrispondenza del quale giunge a maturazione un nuovo set di uova, pronte ad essere fecondate. I follicoli ovarici sono connessi con la cavità ovarica da un breve tratto. Questi microtratti diventano sempre più distinti con il procedere della maturazione degli oociti, fino al momento in cui essi sono pronti per la fecondazione. Il diametro della base di questa struttura, chiamata *sperm storage micropocket* (SSP) (Kobayashi and Iwamatsu, 2002) correla con il diametro dell'oocita. Quando le SSP si allargano (in parallelo allo sviluppo dell'oocita) esse cominciano a popolarsi di spermatozoi. Non è ancora però chiaro se questi siano spermatozoi precedentemente immagazzinati o se derivino da recenti inseminazioni. Quando il follicolo è maturo gli spermatozoi si posizionano nelle SSP, che sono costituiti da un sottile strato di epitelio. Non sembrano esserci strutture speciali per l'ingresso degli spermatozoi: la membrana dell'SSP, quella del follicolo e il chorion sono penetrate dallo spermio al momento dell'inseminazione (Kobayashi and Iwamatsu, 2002).

Dopo l'accoppiamento gli spermatozoi possono essere conservati per lunghi periodi tra le pliche dell'ovario o nel gonodotto, con la possibilità per la femmina di partorire numerose figlie anche in assenza di maschi; in genere, però, gli spermatozoi inseminati più di recente hanno un maggiore successo di fecondazione rispetto a quelli conservati (Houde, 1997). Inoltre, il numero dei piccoli che possono essere prodotti solamente sulla base degli spermatozoi immagazzinati declina con il passare del tempo. Se durante il periodo fertile la femmina si accoppia con più di un maschio, la prole prodotta avrà paternità multipla, suddivisa in genere fra due maschi (Becher and Magurran, 2004, situazione molto comune in questa specie; Winge, 1937). La prole partorita può essere molto numerosa (da 1 a 50 avannotti) e il tempo intercorso fra due gravidanze spesso è molto breve, suggerendo che gli individui di questa specie hanno un grande potenziale riproduttivo.

3. COMPORTAMENTO SESSUALE

Poecilia reticulata è caratterizzata da un alto livello di promiscuità sessuale, sia maschile sia femminile. Inoltre, essa ha un sistema nuziale non basato su risorse materiali (doni nuziali o cure parentali) e in cui i maschi contribuiscono alla riproduzione solamente con il trasferimento degli spermatozoi.

Ciononostante, le femmine mostrano di preferire alcuni maschi rispetto ad altri. Poiché non ottengono nessun beneficio diretto, è plausibile che esse ottengano benefici di tipo indiretto dalla scelta del partner (si veda l'introduzione) tali da

superare i costi associati agli accoppiamenti multipli. In questa specie, i costi della poliandria sono: un maggior rischio di predazione (le femmine non possono contemporaneamente prestare attenzione ai predatori e ai numerosi tentativi di copula dei maschi) (Magurran and Nowak, 1991), ed una riduzione del tasso di foraggiamento, dato l'evidente trade-off fra tempo dedicato alla ricerca di cibo e tempo dedicato alla ricerca di partner sessuali (Magurran and Seghers, 1994).

La scelta femminile si basa su diversi criteri, il più importante dei quali sembra essere la colorazione della livrea dei maschi: una preferenza particolare va ai maschi che presentano una livrea caratterizzata da un maggior numero ed una maggior estensione delle macchie a carotenoidi (Endler and Houde, 1995). La colorazione a carotenoidi è considerata un buon indice dello stato di salute, nutrizione e della capacità di foraggiamento dei maschi: i carotenoidi non sono sintetizzabili dall'organismo e devono essere assunti attraverso la dieta (Kodric-Brown, 1985). Si è anche dimostrato che la prole dei maschi più intensamente colorati ha una miglior abilità antipredatoria (Evans et al., 2004); inoltre, data l'elevata ereditabilità paterna dei geni associati al color pattern di un maschio, i figli di maschi attraenti saranno a loro volta scelti con maggior frequenza dalle femmine, ottenendo un maggior successo riproduttivo (Brooks, 2000).

Sono preferiti anche maschi di dimensioni maggiori (Reynolds and Gross, 1992) e/o con le code più lunghe (Bischoff et al., 1985). Inoltre, maschi con fenotipo raro all'interno della popolazione hanno un maggior successo, probabilmente perché accoppiarsi con un maschio raro diminuisce la probabilità che questo sia imparentato con la femmina (Hughes et al., 1999) e aiuta a mantenere una maggior variabilità genetica. La frequenza di display da parte di un maschio è indice di migliore qualità, considerata la spesa energetica che richiede: più la frequenza con cui un maschio compie display è alta, più elevata è la risposta sessuale da parte delle femmine (Nicoletto, 1993). Infine, nelle femmine più giovani la scelta femminile è influenzata dalle conspecifiche più anziane, che hanno accumulato una maggior esperienza (Dugatkin and Godin, 1993). Va comunque precisato che, in *Poecilia reticulata*, le femmine tendono ad accoppiarsi con il primo maschio che incontrano per ogni ciclo riproduttivo (presumibilmente per ottenere una quantità di spermatozoi sufficiente a fecondare tutte le loro uova), e diventano poi più selettive in accoppiamenti successivi: la probabilità che una femmina si riaccoppi, dopo una prima copula, è direttamente proporzionale alla colorazione a carotenoidi del maschio (Pitcher et al., 2003). Dato pertanto che gli accoppiamenti multipli in guppy non sono simultanei ma sequenziali, la poliandria può essere un mezzo per migliorare la qualità del maschio che feconderà le uova della femmina senza pagare il costo di ritardare l'inizio della riproduzione (Pitcher et al., 2003).

In genere, anche i maschi preferiscono accoppiarsi con femmine di dimensioni maggiori, probabilmente perché nei pesci la fecondità è spesso funzione delle dimensioni del corpo (Charnov, 1993; Wootton, 1990). Di recente, è stato anche dimostrato che femmine più grandi (cioè più vecchie) producono piccoli di miglior qualità (Berkeley et al., 2004). A conferma della preferenza maschile per femmine di maggiori dimensioni, è stato dimostrato anche che femmine più grandi producono piccoli di più maschi (Herdman et al., 2004). In ultima, sia maschi che femmine preferiscono accoppiarsi con partner non familiari, che hanno cioè una probabilità maggiore di non aver copulato prima con quel maschio/femmina (Magurran, 2005).

I maschi investono la maggior parte del loro tempo in tentativi di accoppiamento con le femmine. In questa specie esistono due tattiche riproduttive alternative che possono essere praticate entrambe da tutti i maschi: corteggiamento e copule coercitive.

- Corteggiamento della femmina:

Il maschio si porta in posizione ben visibile dalla femmina, inarca il proprio corpo ed assume una tipica forma ad “S” (da cui prende il nome di “**sigmoid display**”), in modo da mettere ben in mostra la colorazione della propria livrea. Nel corso di questa esibizione le dimensioni delle macchie nere possono aumentare, ed in corrispondenza delle macchie a carotenoidi compaiono delle strisce nere (Baerends et al., 1955): che fanno risaltare maggiormente le macchie giallo-arancio del maschio (l'estensione delle macchie a carotenoidi è il carattere sessuale secondario preferito dalle femmine nella scelta del partner con cui accoppiarsi). Se la femmina a cui è rivolto il corteggiamento è sessualmente recettiva (cioè se è vergine, se ha appena partorito o se è stata tenuta deprivata di maschi per diverse settimane) e accetta di accoppiarsi con il maschio, essa risponde al corteggiamento con un particolare comportamento: essa inarca il corpo prima della copula, si accosta leggermente al maschio e si dispone parallelamente a lui. Il maschio apre a ventaglio anche le pinne caudale e dorsale (che erano finora rimaste chiuse) e nuota in cerchio intorno alla femmina per due o tre volte. A questo punto seguono rapide rotazioni dei partner l'uno intorno all'altro per favorire l'ingresso del gonopodio nel gonoporo femminile, dopodichè la coppia si separa bruscamente (figura 4). Quanto appena descritto avviene in un tempo molto breve (da 0.08 a 1.60 secondi), inoltre la durata della copula, e di conseguenza la quantità di spermatozoi trasferita dal maschio, è controllata (al meno in parte) dalla femmina (Pilastro et al., 2007b). Se non è recettiva, invece, la femmina cerca di ignorare il maschio o di spaventarlo, e il tentativo di corteggiamento si conclude.

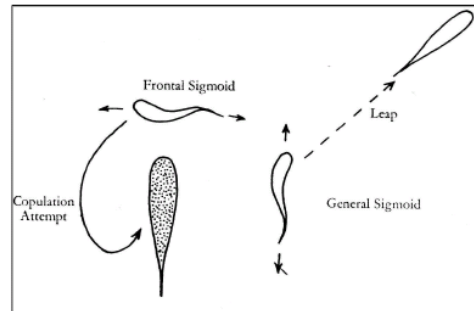


Figura 4: Rappresentazione schematizzata del *sigmoid display*, il display di corteggiamento tipico delle copule cooperative in questa specie (da Liley 1966).

Se la copula è andata a buon fine (anche nel caso di copule coercitive), il maschio esegue una serie di bruschi saltelli in avanti (detti **jerks**, in quanto assomigliano a dei singhiozzi), la cui frequenza cala nel tempo e correla con il numero di spermatozoi trasferiti (Pilastro et al., 2007b). Il jerking è un comportamento caratteristico di guppy (non è presente infatti in altre specie appartenenti alla famiglia Poeciliidae) e il suo ruolo è tuttora poco chiaro, se si considera che è un comportamento molto vistoso che può, di conseguenza, aumentare la visibilità del maschio ai predatori (Pocklington and Dill, 1995). Sono state proposte numerose teorie per spiegare la funzione dei jerks: essi possono servire a riempire il gonopodio con nuovi spermatozoi in seguito alla copula (Constantz, 1989) o a togliere eventuali ectoparassiti dal gonopodio (Houde, 1997). Un'ultima ipotesi è che possano servire da segnale per gli altri individui (maschi e femmine) l'avvenuta copula (Houde, 1997). Può, infatti, essere vantaggioso per il maschio

segnalare in modo onesto alla femmina il numero di spermatozoi che ha inseminato: in situazioni in cui i maschi trasferiscono relativamente pochi spermatozoi segnalare l'esatta dimensione dell'eiaculato alla femmina può portare ad un beneficio, perché la femmina potrebbe decidere di accoppiarsi nuovamente con lo stesso maschio. Nella situazione opposta, il maschio può segnalare di aver trasferito un grande eiaculato di modo che la femmina sia meno disposta a copulare con un successivo maschio, riducendo la probabilità che la paternità sia sbilanciata a favore del secondo maschio (Pilastro et al., 2007b). E' noto che il jerking è legato al trasferimento degli spermatozoi, perché accoppiamenti non seguiti da jerks non portano a nascite successive, mentre tutte le copule seguite da questo comportamento portano poi a parti (Liley, 1966).

Un curioso comportamento femminile post-copula è il “wobble” (letteralmente, traballare): le femmine “traballano” con grandi movimenti laterali del corpo, e a volte inarcano marcatamente il corpo. A volte, tale comportamento è accompagnato dall'estrusione degli spermatozoi recentemente inseminati (Liley, 1966).

- Copula coercitiva o “sneaky”:

Quando le femmine non sono nella fase recettiva del ciclo riproduttivo o quando esse non accettano il corteggiamento, il maschio tenta comunque di inseminarle forzatamente, avvicinandosi da dietro e cercando di inserire il gonopodio nel gonoporo (**gonopodial thrust**) (figura 5). Questo comportamento ha successo quando, per esempio, la femmina è impegnata a procurarsi il cibo, è spaventata o addirittura mentre risponde al corteggiamento di un altro maschio (Houde, 1997). Molti tentativi di accoppiamento coercitivo non si concludono con il trasferimento di spermatozoi, ma quelli che vanno a buon fine sono identificabili in base ai jerks da parte del maschio. L'efficienza di inseminazione delle due tattiche è notevolmente diversa e il successo di inseminazione del gonopodial thrust è circa tre volte inferiore a quello delle copule sollecitate (Matthews and Magurran, 2000; Pilastro and Bisazza, 1999), anche se il numero di spermatozoi trasferiti durante copule coercitive può essere occasionalmente alto (Pilastro and Bisazza, 1999). Il gonopodial thrust di solito comporta il rifiuto da parte della femmina che in genere tenta di evitare questa tattica sia scappando che minacciando attivamente il maschio. Ciononostante, è piuttosto frequente.

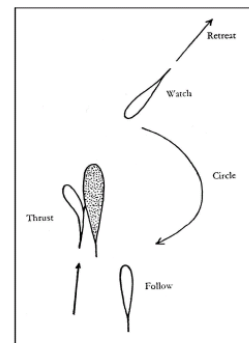


Figura 5:
Schematizzazione delle copule coercitive (gonopodial thrust) in *Poecilia reticulata*.

Nella scelta di quale tattica adottare sono coinvolti diversi e molteplici motivi che coinvolgono sia fattori comportamentali che ambientali:

- la recettività della femmina,
- il fenotipo del maschio: individui di piccole dimensioni e/o poco attraenti adottano più di frequente il gonopodial thrust. E' stato, infatti, dimostrato un maggiore vantaggio nelle copule per i maschi che appartengono a questa categoria (Bisazza et al., 1997; Pilastro and Bisazza, 1999).
- la pressione predatoria: in popolazioni caratterizzate da pressione predatoria elevata, i maschi adottano più di frequente le copule coercitive, dato il

costo pagato in termini di visibilità ai predatori. Inoltre, le femmine occupano anche una porzione maggiore di tempo ad evitare di essere predate, piuttosto che ad evitare i tentativi di copula di un maschio (Houde, 1997).

- intensità della luce e torbidità dell'acqua: diminuendo la visibilità aumenta la frequenza degli accoppiamenti coercitivi poiché i colori risultano meno visibili, e diminuisce la probabilità di una buona riuscita del display (Luyten and Liley, 1991).

- scarsa disponibilità di cibo: in questo caso il gonopodial thrust è favorito poiché è meno costoso sia in termini di tempo sia energia (Abrahams, 1993).

- sex ratio operativa: se è molto sbilanciata verso i maschi, l'accoppiamento coercitivo è preferito perché meno costoso e più vantaggioso in questo tipo di situazione (Evans and Magurran, 1999).

Va comunque ricordato che un qualsiasi maschio può adottare entrambe le tattiche, a volte anche in rapida successione, anche se vi sono marcate differenze individuali sia nella frequenza sia nel relativo utilizzo dei due comportamenti (Magurran and Seghers, 1990), oltre alle già accennate differenze fra popolazioni (Luyten and Liley, 1985). I maschi che incontrano una femmina recettiva, soprattutto in assenza di altri individui, solo raramente non adottano la tattica del corteggiamento. Ma la presenza di maschi rivali causa l'adozione di copule forzate con maggior frequenza (Matthews, 1998). In natura, o in acquari in cui siano presenti femmine non recettive, è stato stimato che una femmina subisce un tentativo di copula al minuto per tutta la sua vita (Magurran and Seghers, 1994)

In *Poecilia reticulata* comportamenti di lotta maschile non sono frequenti e in condizioni naturali raramente si mostrano aggressivi. Tuttavia possono presentarsi casi di comportamento aggressivo quando, per esempio, un maschio disturba e tenta di corteggiare una femmina già corteggiata da un altro maschio. In questo caso, il secondo maschio può reagire minacciando o attaccando l'intruso. Un'altra situazione di manifesta aggressività può essere rappresentata dall'introduzione di un individuo maschio in un acquario (quindi in condizioni di laboratorio) dove un maschio è già ben stabilito. In questo caso il maschio può eseguire una sorta di display laterale di minaccia che include lo "sparring" (sferzate di coda), ed un eventuale attacco (Liley, 1966). Una volta che la dominanza è eventualmente stabilita, il maschio inferiore tende a scappare all'avvicinarsi dell'avversario che è risultato più forte. Tuttavia, in generale, è difficile osservare comportamenti aggressivi: in questa specie la competizione è più che altro di tipo indiretto, nella quale i singoli individui tendono ad aumentare la frequenza di incontri con femmine recettive, privilegiando adattamenti che favoriscono l'aumento del numero di accoppiamenti, come il tasso di corteggiamento o la velocità di nuoto.

SPERMATOZOI ED EIACULATO IN *POECILIA RETICULATA*

Come accennato in precedenza, in questa specie gli spermatozoi sono impacchettati in spermatozeugmata o bundles, contenenti ciascuna circa 27,000 spermatozoi (Billard, 1969).

Le dimensioni medie degli eiaculati maschili naturali sono dell'ordine di 500,000 spermatozoi (Evans et al., 2003b) e i maschi producono circa 750,000 spermatozoi al giorno (Billard, 1986). La presenza delle femmine produce un

aumento significativo della produzione di spermatozoi (Bozynski and Liley, 2003): i maschi che avevano potuto osservare una femmina gravida per circa una settimana producevano in media 3.4×10^6 spermatozoi contro i 1.3×10^6 dei maschi controllo (che non avevano visto le femmine). In media più del 92% delle riserve spermatiche di un maschio viene trasferito durante una copula sollecitata (sigmoid display) (Pilastro and Bisazza, 1999). In questo lavoro, si è anche stimato che nonostante il numero di spermatozoi trasferiti durante le copule consensuali sia circa 3 volte maggiore di quello delle copule sneaky, la distribuzione delle dimensioni dell'eiaculato trasferito mostra un'ampia sovrapposizione. In circa il 70% delle copule forzate vi è stato trasferimento di spermatozoi, nonostante fino a quel momento fosse ritenuto che l'efficienza di inseminazione delle copule forzate fosse nulla. Pertanto, nonostante l'efficienza di inseminazione delle due tattiche normalmente sia così diversa, a volte le copule forzate possono risultare nel trasferimento di grandi numeri di spermatozoi. Comunque, sia nelle coppie cooperative sia nelle copule forzate il numero di spermatozoi in seminati correla con il numero di spermatozoi disponibili. Un risultato interessante è quello che mostra come i maschi di dimensioni minori inseminano in realtà una proporzione maggiore delle loro riserve spermatiche durante le copule sneaky, rispetto ai maschi più grandi (Pilastro and Bisazza, 1999).

4. SELEZIONE SESSUALE POSTCOPULATORIA IN *POECILIA RETICULATA*

Poecilia reticulata è una specie caratterizzata da un elevato tasso di promiscuità sessuale e le femmine sollecitano attivamente accoppiamenti da parte di più partner durante il periodo recettivo. Gli accoppiamenti multipli, di conseguenza, sono molto frequenti, in particolare nelle popolazioni soggette ad un'elevata pressione predatoria, e si riflettono nella paternità multipla della prole di una stessa figliata (Becher and Magurran, 2004). Ne deriva che in questa specie la competizione spermatica è intensa. (Magurran, 2005)

Come si sia evoluta e venga mantenuta la promiscuità femminile in questa specie è ancora poco chiaro. In un esperimento in cui si sono misurati i benefici della poliandria in guppy, si è confrontato il successo di femmine che sono state fatte accoppiare con quattro diversi maschi (assegnati casualmente) e di femmine che si sono accoppiate lo stesso numero di volte ma con un solo maschio. Le femmine del primo gruppo hanno prodotto più piccoli e hanno avuto tempi di gestazione (dall'accoppiamento al parto) minori. Inoltre, dall'analisi delle fotografie dei piccoli è anche emerso che questi sono significativamente più grandi dei piccoli delle femmine "monandriche" (cioè che si sono accoppiate con un solo maschio), e inoltre questi hanno una maggior capacità antipredatoria (Evans and Magurran, 2000; Ojanguren et al., 2005). Una possibile interpretazione di questi risultati è che le femmine si accoppino indiscriminatamente con il primo maschio che incontrano, per poi diventare più selettive con i successivi, probabilmente per aumentare la qualità della prole. Una prova a favore di questa interpretazione proviene da un recente lavoro: a delle femmine vergini sono stati presentati sequenzialmente dei maschi con fenotipi diversi. La probabilità che la femmina si accoppiasse con un secondo maschio è risultata essere direttamente proporzionale al fenotipo del maschio e in particolare all'area relativa di carotenoidi espressa nella livrea. Inoltre, il secondo maschio che si accoppiava con la femmina fecondeva anche una proporzione

maggiore di uova e tale vantaggio è anch'esso direttamente proporzionale all'area di macchie a carotenoidi del maschio (Pitcher et al., 2003).

Un recente esperimento ha anche dimostrato che l'identità dei padri dei piccoli di una femmina varia in cicli riproduttivi successivi. Attraverso l'uso di marcatori microsatellite, Becher and Magurran (2004) hanno determinato la paternità dei piccoli prodotti in un periodo di 3 mesi. La maggior parte delle femmine (ciascuna delle quali era tenuta in un acquario con 10 maschi) ha dato luogo a 3 figliate: è stato identificato un sostanziale turnover dell'identità dei padri, nonostante questo fosse comunque minore di quella attesa se si assume che tutti i maschi abbiano uguale probabilità di fecondare le uova.

Questi livelli di poliandria creano le condizioni perché vi siano anche alti livelli di competizione spermatica. Le prime ricerche sulla competizione spermatica risalgono al 1920, quando si scoprì che le femmine sono in grado di conservare gli spermatozoi di precedenti accoppiamenti in pliche della mucosa ovarica, dove gli spermatozoi vengono nutriti da zuccheri extracellulari (Constantz, 1989; Gardiner, 1978), conferendo alla femmina la capacità di generare prole anche diversi mesi dopo l'ultima copula. La prole, di conseguenza, ha spesso paternità multipla (Becher and Magurran, 2004). Inoltre si sa che spermatozoi derivanti da accoppiamenti più recenti hanno la precedenza e ciò non è dovuto solo al ripristino delle riserve spermatiche di femmine *post partum* (Magurran, 2005). Per esempio, l'ultimo accoppiamento consensuale di una femmina durante una fase recettiva sembra contribuire in maniera maggiore alla prole in seguito generata (Evans and Magurran, 2001). La distribuzione di paternità nella prole è bimodale, indipendentemente dalla modalità di accoppiamento, sia esso in condizioni naturali o controllato e sequenziale (Evans and Magurran, 2001): questi risultati contrastano l'ipotesi secondo cui la paternità è proporzionale alla quantità di spermatozoi trasferiti (Parker, 1970), e ciò è vero anche quando sono inseminati artificialmente spermatozoi in numero uguale. Studi recenti hanno dimostrato che le femmine sono in grado di esercitare una scelta criptica durante e dopo la copula determinando l'esito di un accoppiamento in maniera più ampia di quanto si pensi. Per esempio, durante un accoppiamento, la precedenza data agli spermatozoi di un secondo maschio è legata al tempo che intercorre tra un accoppiamento e l'altro: più gli intervalli sono brevi più è probabile che la paternità sia nettamente a favore del secondo maschio (Evans and Magurran, 2001). Ad ogni modo, è stato stimato che in media in natura le uova di una femmina sono fecondate da due maschi (Becher and Magurran, 2004).

L'estensione delle macchie a carotenoidi (il carattere favorito in fase precopulatoria) è associata anche a parametri relativi ad aspetti postcopulatori della riproduzione. Essa correla positivamente, infatti, sia con le dimensioni delle riserve spermatiche (Matthews et al., 1997; Pilastro and Bisazza, 1999) sia con aspetti qualitativi (vitalità e velocità) degli spermatozoi prodotti (Locatello et al., 2006). Maschi con colorazione a carotenoidi relativamente più estesa hanno anche tassi di produzione di spermatozoi maggiori: nello specifico, dopo rimozione manuale delle riserve di spermatozoi del maschio, il numero di spermatozoi prodotti nei successivi sette giorni correla positivamente con l'area relativa delle macchie arancio (A. Pilastro, risultati non pubblicati). Inoltre i maschi più colorati trasferiscono più spermatozoi durante le copule cooperative, ma non durante le copule forzate (Pilastro et al., 2002). Maschi più attraenti hanno maggior successo durante la competizione spermatica rispetto a rivali meno attraenti sia in accoppiamenti naturali (Evans and Magurran, 2001; Pitcher et al., 2003) sia quando il numero di spermatozoi inseminati viene

sperimentalmente mantenuto costante attraverso l'inseminazione artificiale (Evans et al., 2003b). Quest'ultimo risultato, in particolare, dimostra che in questa specie la preferenza femminile precopulatoria può essere rinforzata attraverso meccanismi postcopulatori che agiscono esclusivamente a livello fisiologico. Questo porta a pensare che i maschi con macchie a carotenoidi più estese producono spermatozoi più competitivi. Tuttavia, lo stesso risultato potrebbe essere determinato da una maggior mortalità degli embrioni fecondati dai maschi meno colorati. Dato che questa specie è ovovivipara un effetto di questo tipo potrebbe non risultare evidente. Per escludere questo secondo tipo di effetto, ho condotto un esperimento volto a verificare se femmine che si accoppiano con maschi più colorati un maggior numero di piccoli rispetto a femmine accoppiate con maschi meno colorati (EXP1: Benefici diretti della promiscuità femminile: qualità dell'eiaculato e fecondità femminile).

In *Poecilia reticulata*, la scelta femminile precopulatoria può essere rinforzata anche attraverso meccanismi di scelta criptica femminile: il numero di spermatozoi trasferiti in seguito ad accoppiamenti cooperativi è influenzato dalla percezione che le femmine hanno della colorazione del maschio (Pilastro et al., 2004). In questo esperimento i maschi focali sono stati resi relativamente attraenti semplicemente in base al paragone con maschi stimolo più o meno colorati. Le femmine vergini sono state messe in condizione di osservare entrambi i soggetti sperimentali e poi è stato consentito loro di accoppiarsi con il maschio focale: se questo era percepito come più attraente, cioè era messo a paragone con un maschio stimolo meno colorato, riusciva ad inseminare una quantità di sperma maggiore. Dato che il maschio focale non poteva vedere il maschio stimolo, è chiaro che sono le femmine a regolare la quantità di spermatozoi trasferita in favore del maschio preferito. Questo esperimento dimostra che le femmine hanno un ruolo attivo nel trasferimento degli spermatozoi e che la preferenza in fase pre-copulatoria di maschi particolarmente colorati è rinforzata, in fase postcopulatoria, dalla scelta criptica. Un successivo studio ha dimostrato che il meccanismo (o uno dei meccanismi) attraverso cui le femmine potrebbero esercitare tale controllo è la modulazione della durata dell'accoppiamento: il numero di spermatozoi trovati nel gonodotto femminile è proporzionale alla durata della copula (Pilastro et al., 2007b). Manipolando la durata della copula una femmina può sbilanciare la paternità della prole accettando un maggior numero di spermatozoi dal maschio più attraente con cui si accoppia, indipendentemente dall'ordine di accoppiamento (Evans and Magurran, 2000). Condizione fondamentale per il verificarsi di tale scenario è che il numero degli spermatozoi trasferiti/accettati sia un fattore più importante per il successo di competizione spermatica rispetto alle caratteristiche qualitative degli spermatozoi (velocità, longevità e morfologia) che sono importanti per il successo di competizione spermatica (Snook, 2005) e che sono sotto il controllo del maschio. Tale problematica è oggetto del terzo esperimento descritto in questa tesi, dal titolo "Importanza relativa del numero e della qualità degli spermatozoi nella competizione spermatica in guppy".

In questa specie poco è finora noto riguardo la selezione sessuale postcopulatoria non direzionale. Per affrontare questo argomento, in primo luogo è necessario conoscere quale porzione della varianza nel successo di fecondazione sia attribuibile alle intrinseche caratteristiche dell'eiaculato maschile e quale parte all'interazione fra i due partner. Inoltre, ho cercato di valutare l'eventuale importanza della variabilità ai geni MHC (Major Histocompatibility Complex) nella scelta criptica femminile non direzionale in questa specie.

MATERIALI E METODI COMUNI

1. SPECIE OGGETTO DI STUDIO

Gli esemplari di *Poecilia reticulata* utilizzati negli esperimenti discendono da pesci catturati nel 2001 nella parte inferiore del corso del fiume Tacarigua, presso l'isola di Trinidad (figura 6). Gli adulti sono stati allevati all'interno di acquari di diverse dimensioni con una capienza compresa tra 25 e 125 litri, mentre gli avannotti venivano tenuti in vasche di dimensioni inferiori, con un volume non superiore ai 18 litri. Ciascun acquario era dotato di un aeratore e di un filtro biologico e meccanico facilmente sostituibile per facilitare le operazioni di pulizia e presentava sul fondo un ghiaio multicolore al fine di ricreare un ambiente il più possibile simile a quello naturale. Erano inoltre presenti vegetazione naturale e artificiale, in modo da contribuire alla ricostituzione dell'ambiente e in modo che gli avannotti subito dopo la nascita potessero trovarvi rifugio dagli adulti, che spesso tentano di predarli. La temperatura dell'acqua veniva costantemente monitorata e mantenuta intorno a valori di $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. Veniva inoltre fornita un'illuminazione con lampade al neon, programmata secondo un fotoperiodo di 12 ore (dalle 7 alle 19). La dieta di mantenimento prevedeva un mangime granulare (Duplarin S) e nauplii vivi di *Artemia salina*, fatti schiudere poco prima della somministrazione. I pesci venivano nutriti due volte al giorno, alternando cibo secco a prede vive. Avannotti e giovani venivano tenuti in vasche separate in modo tale da permettere una più rapida crescita, non dovendo competere con gli adulti per il cibo. In questo modo, inoltre, è più facile mantenere separati gli individui dei due sessi, selezionando le femmine vergini non appena riconoscibili e spostandole in altre vasche in modo tale da impedire ogni contatto (sia fisico che visivo) con maschi adulti. Utilizzando femmine vergini si può evitare che le femmine abbiano immagazzinato spermatozoi da accoppiamenti precedenti e si ha la certezza della paternità nelle inseminazioni artificiali: si sa infatti che le femmine di guppy possono immagazzinare gli spermatozoi ricevuti da una singola copula e utilizzarli per fecondare numerosi gruppi di uova nei mesi successivi (Constantz, 1989). Nonostante sia noto che gli spermatozoi iniettati di recente hanno un maggior successo di fecondazione rispetto agli spermatozoi immagazzinati (Hildemann and Wagner, 1954) si è preferito evitare rischi di paternità non certa ed utilizzare femmine vergini.

I maschi invece, sono allevati in vasche stock di grandi dimensioni in cui viene mantenuta una sex ratio approssimativamente di 1: 1.

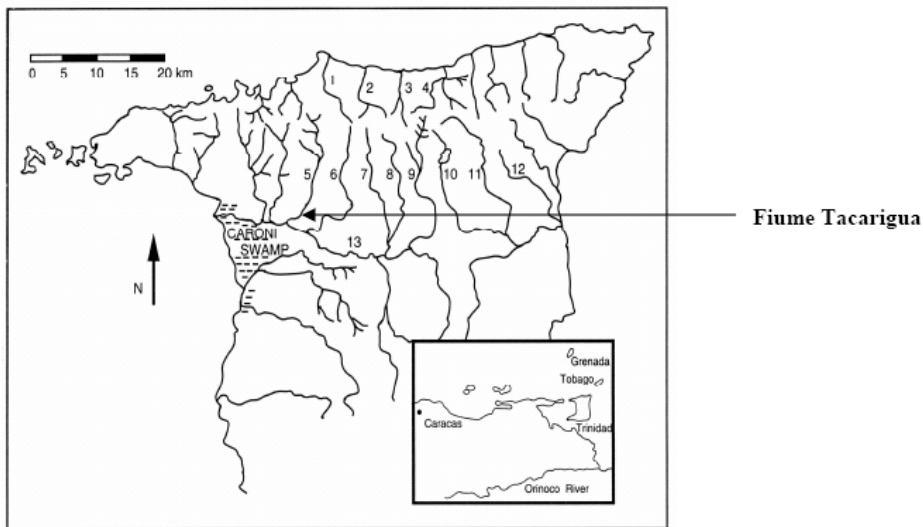


Figura 6: Collocazione geografica e idrografia dell'isola di Trinidad, con indicazione dell'ubicazione del fiume Tacarigua

2. ESTRAZIONE MANUALE DEGLI SPERMI

I maschi utilizzati per gli esperimenti avevano un'età compresa fra i 4 e i 6 mesi e, prima della loro utilizzazione in un esperimento, l'effettivo raggiungimento della maturità sessuale veniva verificata valutando lo stadio di maturazione del gonopodio: per la completa funzionalità di quest'ultimo, infatti, è necessario che l'hood superi in lunghezza la punta del gonopodio (Houde, 1997).

Prima dell'estrazione degli spermatozoi, i maschi venivano isolati per 3-5 giorni per assicurare la completa ricostituzione delle riserve spermatiche (Kuckuck and Greven, 1997). Ciascun maschio veniva catturato e posto in un contenitore con poca acqua e anestetico (MS222). Una volta addormentato, esso veniva prelevato con l'ausilio di una pinzetta, sciacquato con acqua deionizzata, asciugato delicatamente e appoggiato su un vetrino apposito con uno sfondo scuro. A questo punto, veniva posto sotto la lente di un microscopio da dissezione (3X) con una goccia di soluzione fisiologica alla base del gonopodio (per ridurre la probabilità che le spermatozeugmata aderissero al vetrino che fungeva da base), messo in posizione quasi perpendicolare alla base del corpo, in modo da poter facilmente operare su di esso per l'estrazione degli spermi. Per questa operazione è necessario applicare una leggera pressione alla base del gonopodio (dove sono localizzati i testicoli) con l'ausilio di un bastoncino metallico dotato di punta arrotondata. In questo modo si provoca la fuoriuscita delle spermatozeugmata, facilmente visibili sullo sfondo nero del vetrino per il loro aspetto traslucido. Successivamente, grazie ad una micropipetta Drummond da 3 µl 203 G-2 con punta di plastica flessibile (203 G-2) è stato possibile raccogliere (e contare) il numero di spermatozeugmata necessarie per le diverse analisi (per le quantità e i protocolli specifici si vedano i vari capitoli), che venivano poste in provette eppendorf appositamente contrassegnate, in cui era stata già messa qualche goccia di soluzione fisiologica (o di soluzione inattivante, quando richiesta da uno specifico protocollo).

Dopo l'estrazione degli spermi, ogni maschio è stato rapidamente fotografato per mezzo di una fotocamera digitale Nikon Coolpix 4300 per l'analisi dei caratteri

morfologici, dopodichè ogni soggetto veniva posto in una vaschetta di rianimazione contenente acqua fresca e veniva poi rilasciato in vasche apposite post esperimento per evitarne il successivo riutilizzo.

Nel caso in cui per il disegno sperimentale adottato fosse richiesta anche l'analisi della qualità degli spermatozoi (nell'esperimento 2), per motivi tecnici questa non poteva essere eseguita immediatamente dopo l'estrazione ed è stato pertanto necessario inattivare gli spermi fino al momento in cui veniva eseguita l'analisi e poi riattivarli, seguendo un protocollo già consolidato (si vedano Locatello et al. 2006; Gardiner 1978). In particolare sono state utilizzate due diverse soluzioni così composte:

- soluzione **inattivante** composta da: NaCl (207 mM), KCl (5.4 mM), MgCl₂ (0.49 mM), CaCl₂ (1.3 mM), MgSO₄ (0.41 mM), Tris (Cl) (10 mM);
- soluzione **attivante** composta da: KCl (150 mM) e albumina (2 mg/ml).

Maggiori dettagli sulle analisi qualitative degli spermatozoi sono descritti nel capitolo relativo all'esperimento 2 (Importanza relativa del numero e della qualità degli spermi nel successo di competizione spermatica).

3. INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

L'utilizzo della tecnica di inseminazione artificiale permette di controllare gli eventuali effetti della preferenza femminile che potrebbero influenzare la qualità o la paternità della prole. Infatti la femmina potrebbe regolare i suoi sforzi riproduttivi (come durata della gestazione e il nutrimento degli embrioni) a seconda del fenotipo del maschio con cui si accoppia, come previsto dalla teoria della "allocazione differenziale materna" (Burley 1986). La tecnica dell'inseminazione artificiale ci ha quindi permesso di escludere un eventuale contributo differenziale materno in base al fenotipo del partner. Consente, inoltre, di controllare alcuni parametri della selezione sessuale (Evans et al. 2003) quali la scelta pre-copulatoria femminile e il numero di spermi utilizzati per ogni inseminazione (Pilastro & Bisazza 1999; Pilastro et al. 2002), oltre alla durata (che correla con il numero di spermi trasferiti (Pilastro et al. 2007)) e l'ordine di accoppiamento.

Le inseminazioni artificiali possono essere **omospermiche**, cioè le femmine vengono inseminate con gli spermatozoi di un solo maschio, oppure **eterospermiche**, cioè gli spermi utilizzati per l'inseminazione provengono da più di un maschio. Quest'ultimo tipo viene utilizzato nei test di competizione spermatica in cui più maschi (in questo caso due) competono per fecondare le uova di una femmina. Negli esperimenti di seguito descritti sono stati utilizzati entrambi questi tipi di inseminazione: inseminazioni omospermiche nell'esperimento 1 (Benefici diretti della promiscuità femminile: qualità dell'ejaculato e fecondità femminile) e inseminazioni eterospermiche negli esperimenti 2 (Importanza relativa del numero e della qualità degli spermi nel successo di competizione spermatica), 3 (Studio della ripetibilità del successo di competizione spermatica) e 4 (Ruolo dei geni MHC nella scelta criptica femminile non direzionale).

Come già accennato in precedenza, in questa popolazione le bundles contengono approssimativamente 27,000 spermi ciascuna (Evans et al., 2004) ed esperimenti precedenti hanno confermato che il numero di spermatozoi per ciascuna

bundles non correla né con le dimensioni del corpo né con l'estensione della colorazione a carotenoidi. Inoltre, da analisi condotte in lavori precedenti, è stato dimostrato che la varianza fra maschi nel numero di sperm per bundles non è maggiore della varianza osservata entro maschio (Evans et al., 2003b). E' pertanto possibile controllare il numero di sperm da utilizzare nell'inseminazione artificiale contando le singole sperm bundles. Il numero di bundles inseminate variava a seconda dell'esperimento per motivi sperimentali e sarà indicato nei capitoli dedicati a ciascun esperimento.

Le femmine sono state scelte in base alle dimensioni e all'età, in modo sia da facilitare il procedimento di inseminazione (più sono grandi e più facile è portare a buon fine l'operazione, mentre per femmine piccole o troppo giovani questo risulta notevolmente complicato) sia da massimizzare la probabilità che la gravidanza giungesse a buon fine e che venissero prodotti un numero sufficiente di piccoli da garantire un buon potere di risoluzione per le analisi di paternità (dove richieste dal disegno sperimentale adottato). Si sono inoltre valutate le generali condizioni di salute sia dei maschi sia delle femmine prima di procedere all'estrazione degli sperm e all'inseminazione artificiale.

Le femmine venivano anestetizzate (il procedimento era lo stesso seguito per i maschi) e appoggiate su un supporto di polistirolo, posizionate in modo da rivolgere il ventre (e il poro genitale) verso l'alto, e quindi verso lo sperimentatore. Il poro genitale veniva quindi delicatamente aperto con l'aiuto della punta della micropipetta Drummond 3 µl 203 G-2. A questo punto venivano introdotte delicatamente con l'ausilio della micropipetta le spermatozeugmata (sospese in 10µl di soluzione fisiologica NaCl 0.9%), precedentemente prelevate dallo sperimentatore dalle eppendorf in cui erano state messe dopo l'estrazione. Dopo l'operazione ogni femmina veniva riposta in una bottiglia allestita con ghiaino multicolore, aeratore e vegetazione artificiale dove rimaneva fino al momento del parto. Esse venivano tenute sotto quotidiano controllo (più volte al giorno, con frequenza crescente verso la fine del periodo di gestazione) per essere sicuri di registrare l'esatto momento del parto e il corretto numero di piccoli partoriti (e salvandoli da eventuali, e frequenti, episodi di cannibalismo da parte delle loro madri). Inoltre, per tutto il periodo della gestazione, oltre ai due normali pasti alle femmine inseminate veniva fornito un pasto aggiuntivo a base di *Artemia salina*.

Al momento del parto, venivano registrati la data del parto e il numero di piccoli partoriti da ciascuna femmina.

In base all'esperimento di appartenenza, i piccoli seguivano poi un destino diverso: nell'esperimento 1 essi venivano liberati nelle vasche stock assieme agli altri piccoli, negli esperimenti 2, 3 e 4 i piccoli venivano umanamente sacrificati, congelati e posti in eppendorf (al massimo 3 per provetta) per le analisi di paternità. Nel caso di questi ultimi tre esperimenti, al momento dell'estrazione degli sperm e del parto veniva anche prelevato un piccolo campione di tessuto dai genitori (pari a circa mezza pinna caudale) da utilizzare poi per l'estrazione del DNA per l'analisi di paternità.

4. MISURAZIONE DELLE CARATTERISTICHE FENOTIPICHE DEI MASCHI

Subito dopo il prelievo delle sperm bundles i maschi venivano sistemati sopra un supporto di plastica dotato di un riferimento in carta millimetrata. A questo punto,

essi venivano fotografati con una fotocamera digitale (Nikon Coolpix 4300) fissata su un cavalletto ad una distanza fissa di circa dieci centimetri sopra il soggetto. Le immagini sono state in seguito trasferite su computer ed analizzate tramite il programma UTHSCSA Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX)(scaricabile da <http://dds.uthsca.edu/download.html>) mediante il quale sono state misurate, per ogni soggetto, le seguenti caratteristiche morfologiche (figura 7):

- Lunghezza standard (SL, *standard length*): lunghezza del maschio dalla punta del muso alla base della pinna caudale;
- Lunghezza totale (TL, *total length*): lunghezza del maschio dalla punta del muso all'estremità della coda;
- Area totale: area del corpo, compresa la pinna caudale (ma non la pinna dorsale);
- Estensione (area) e numero delle macchie colorate presenti sul corpo: macchie nere, iridescenti (blu, verdi, viola e argentate) e a carotenoidi (gialle, arancio e rosse). È stata considerata sia la dimensione effettiva, sia quella relativa all'area totale del soggetto esaminato (proporzione), in modo da poter controllare per le dimensioni del corpo. Per quanto riguarda le macchie nere, dato che dipendono dai livelli di testosterone dell'animale, esse possono subire mutamenti di dimensione. Inoltre, sono presenti nel corpo del maschi delle linee nere che sono in relazione allo stato emotivo del maschio. Risulta pertanto importante definire dei criteri per la misurazione dell'area delle macchie nere: nello specifico, non si sono considerate le linee nere, ma solo le macchie nere, di forma rotondeggiante e definita.

Nella popolazione considerata negli esperimenti, la proporzione della colorazione a carotenoidi di un maschio correla positivamente con il successo nella competizione spermatica e la qualità degli spermatozoi prodotti (Evans et al., 2003b; Locatello et al., 2006). Ho considerato nelle analisi anche le macchie nere e iridescenti perché in alcune popolazioni è stato dimostrato che esse influenzano la scelta femminile precopulatoria (Brooks, 1996; Kodric-Brown and Nicoletto, 1996).

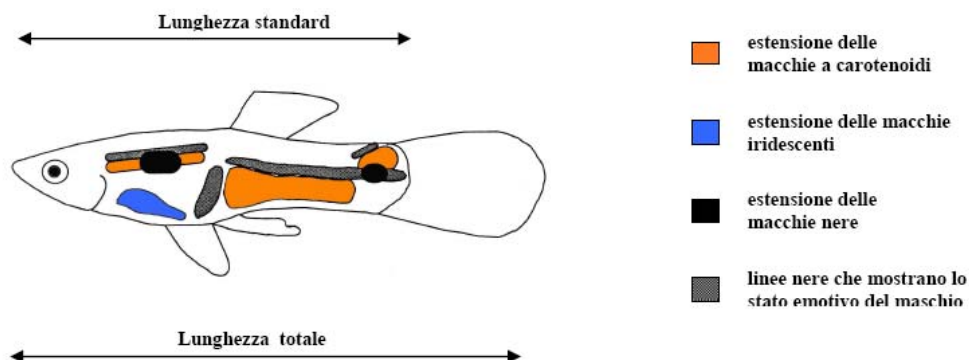


Figura 7: disegno raffigurante la livrea di un maschio adulto e i caratteri morfologici misurati

5. ANALISI DI PATERNITÀ MEDIANTE MICROSATELLITI

Negli ultimi trent'anni le ricerche nel campo della competizione spermatica si sono moltiplicate e sono state messe a punto numerose tecniche per poterla misurare sperimentalmente. Alcune di queste tecniche vengono tuttora utilizzate, mentre altre hanno lasciato spazio a metodologie più accurate. In genere, il successo di un maschio in un contesto di competizione spermatica viene misurato facendo accoppiare (o in certi casi inseminando artificialmente) una femmina con più maschi in successione e poi determinando la paternità della prole da lei prodotta. Per convenzione, il successo di competizione spermatica viene espresso come la proporzione di figli dell'ultimo maschio che si è accoppiato con la femmina; dato che sperimentalmente i maschi competitori in genere sono due, la paternità si calcola prendendo come riferimento il secondo maschio, con un indice definito p_2 (si veda l'introduzione).

Una metodologia per determinare la paternità dei piccoli è quello di utilizzare, ove possibile, dei marcatori genetici, come ad esempio il colore del corpo. Il marcatore scelto deve seguire le leggi della genetica mendeliana. In genere, in questo tipo di esperimenti, una femmina omozigote recessiva per il carattere scelto viene fatta accoppiare con un maschio omozigote recessivo e un maschio omozigote dominante. A seguito dell'osservazione delle frequenze fenotipiche della prole è possibile attribuire a ciascun maschio competitore la paternità di ogni figlio. Tuttavia, questo metodo implica che l'osservazione della prole venga fatta su esemplari adulti, ma corredi genetici diversi possono essere associati a diverse probabilità di sviluppo e sopravvivenza degli embrioni e degli individui. Pertanto, apparenti differenze nelle frequenze fenotipiche possono non essere dovute ad un reale maggior successo di fecondazione di un maschio, ma piuttosto ad una diversa sopravvivenza della prole (Simmons, 2001b).

Per evitare di incorrere in tali complicazioni è preferibile utilizzare marcatori per l'analisi di paternità che permettano la determinazione della distribuzione dei diversi fenotipi nei piccoli senza aspettare che questi raggiungano la maturità. È possibile, ad esempio, utilizzare degli allozimi come marcatori: gli allozimi sono enzimi geneticamente polimorfici responsabili della catalisi di vie metaboliche. Le varianti naturali possono essere separate mediante elettroforesi sfruttando la diversa velocità di migrazione delle varie isoforme.

Un'altra tecnica ampiamente utilizzata è quella detta del "maschio sterile": questa metodologia prevede che una femmina venga fatta accoppiare con due maschi, uno dei quali è stato sterilizzato artificialmente per esposizione a dosi di radiazioni non letali, ma sufficienti per provocare la comparsa di mutazioni negli spermatozoi che si riflettono nella morte precoce degli embrioni. Di conseguenza, la stima del successo di fecondazione un maschio avviene attraverso l'osservazione della prole sopravvissuta: questa deriva dalle uova fecondate dal maschio normale, mentre la prole che è andata incontro a morte precoce deriva da uova fecondate dal maschio sterilizzato.

Di recente, tuttavia, si è cominciato ad utilizzare dei tipi diversi di marcatore: i marcatori microsatellite. I microsatelliti sono caratterizzati da un modulo di 2-5 nucleotidi, definito *core*, ripetuto in tandem per un'estensione massima di circa 200 paia di basi: tali regioni sono anche indicate con il termine VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*, (Nakamura et al., 1987). Questi marcatori sembrano essere distribuiti omogeneamente nel DNA nucleare, prevalentemente in regioni non

codificanti ma talvolta anche a livello degli esoni. Nei Vertebrati, le sequenze più rappresentate sono quello con un modulo AC o GA, mentre i tetranucleotidi, come GATA o GACA, sono più rari. Per un singolo *locus* microsatellite, si possono individuare polimorfismi di lunghezza tra i diversi alleli mediante elettroforesi, dovuti a differenze nel numero di ripetizioni della sequenza *core*; inoltre, dal momento che i microsatelliti sono codominanti è possibile evidenziare diversi alleli di un singolo individuo.

Gli studi condotti hanno dimostrato che la trasmissione è di tipo mendeliano. Si ritiene inoltre che siano neutrali, non soggetti a selezione, e, dato l'elevato livello di variazione, adatti a studi di variabilità intraspecifica su scala microgeografica e di analisi di parentela. Tali marcatori nucleari sono estremamente variabili a causa dell'elevato tasso di mutazione che li caratterizza, fino a 1×10^{-2} eventi mutazionali (aggiunta o perdita di *repeat*) per generazione (Amos et al., 1996). Parallelamente, le regioni fiancheggianti tendono a mantenersi costanti, in quanto i tassi di mutazione puntiforme ($10^{-9} - 10^{-10}$ mutazioni per *locus* per generazione, (Hancock, 1999)) sono molto più bassi di quelli del microsatellite vero e proprio. Ciò permette di disegnare dei primer specifici che permettono l'amplificazione mediante PCR (*Polymerase chain reaction*) del *locus* da diversi individui e funzionano spesso anche in specie filogeneticamente vicine (Goldstein et al., 1995).

Il polimorfismo sembra derivare da errori della DNA polimerasi, durante la replicazione dei filamenti, che conducono ad inserzioni o delezioni di *repeat* (Schlötterer et al., 1997): secondo questa ipotesi, le mutazioni osservate sarebbero quelle che sfuggono al sistema di correzione che opera *in vivo*. Un secondo meccanismo, che potrebbe spiegare l'elevata variabilità dei microsatelliti, consiste nella possibilità che, durante l'appaiamento dei cromosomi omologhi in meiosi, avvengano dei fenomeni di *crossing over* diseguale che possono generare nuovi alleli (Eisen, 1999).

Le metodologie di analisi che si basano sull'impiego di microsatelliti possono presentare alcuni inconvenienti, che portano a sottostimare le differenze genetiche: il fenomeno dell'omoplasia, ad esempio, non permette di distinguere, mediante elettroforesi, due alleli non omologhi, perché di discendenza diversa, ma di uguale lunghezza. Un altro caso è quello degli alleli nulli che si presentano quando una mutazione, nella regione di appaiamento di primer, impedisce il corretto posizionamento dell'oligonucleotide per l'amplificazione, la quale non può più avvenire. La presenza di alleli nulli porta di conseguenza ad una sottostima del numero di eterozigoti.

Negli esperimenti descritti in questa tesi che prevedevano l'analisi di paternità è stata adottata la metodologia dell'analisi mediante marcatori microsatellite. Sono stati utilizzati tre marcatori microsatellite recentemente isolati in modo specifico per poecilidi. È stato seguito il protocollo descritto in Evans et al (2003), con l'aggiunta però di un terzo marcatore: dato che quest'ultimo è risultato poco informativo è stato utilizzato in casi in cui la paternità risultasse di ambigua attribuzione. I marcatori erano: Pooc-G49 (accession numbers: AF164205 (Parker et al., 1998)); "Breden" (accession number: AF026459 (Taylor et al., 1999)) e Pr92 (accession number: AF467906 (Becher et al., 2002)).

Il protocollo prevedeva l'estrazione del DNA dai singoli individui (madri, padri putativi e piccoli), amplificazione mediante PCR dei tre loci appena citati e assegnazione della paternità ai singoli avannotti sulla base della condivisione degli

alleli fra madre, padri putativi e piccoli. Il successo relativo di ciascun maschio, poi, è stato calcolato come proporzione dei figli del secondo maschio della coppia (p2).

5.1. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TESSUTO

Per l'estrazione del DNA si è adottato un protocollo di estrazione rapida in cui si utilizza una resina chelante cationi, il Chelex 100 (Walsh et al., 1991). Il DNA è stato estratto per gli adulti da una porzione di pinna caudale (circa metà), mentre per i piccoli dalla parte cefalica o terminale del corpo. Il tessuto veniva poi incubato in una provetta eppendorf da 0.5 ml contenente una soluzione composta da circa 100 µl di Chelex 100 e 400 µl di acqua BDH per ottenere un rapporto approssimativo Chelex/Acqua del 5%. In ciascuna eppendorf, appositamente contrassegnata, sono stati aggiunti 8 µl di Proteinasi K, un enzima in grado di digerire efficacemente le proteine presenti.

A questo punto le provette contenenti i campioni sono state incubate a 54°C e lasciate ad incubare per circa due ore: per favorire il mescolamento dei reagenti e la digestione stessa del tessuto, tutte le provette venivano agitate tramite vortex ogni mezz'ora circa.

I campioni sono stati poi riscaldati a 96°C per 15 minuti allo scopo di inattivare la Proteinasi K e sono stati poi centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti, in modo da chiarificare il surnatante. Infine, le soluzioni di DNA così ottenute sono state conservate a -80°C oppure utilizzate subito nella fase di amplificazione.

5.2. AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO ESTRATTO

Sono state utilizzate tre coppie di primer, disegnate specificamente per tre loci microsatelliti di pecilidi (tabella 1).

Il primo *locus*, da noi chiamato "Breden" ed isolato da (Taylor et al., 1999) ha un *core* (TTA)_n ripetuto; il secondo *locus* Pooc-G49, isolato da (Parker et al., 1998), ha una sequenza ripetuta (GT)₆, GC, (GT)₄, GC, (GT)₇; il terzo *locus* Pr92, isolato da (Becher et al., 2002) ha un motivo ripetuto (GT)₂, (GC)₂, (GT)₈.

Per ogni coppia di oligonucleotidi, inoltre, il primer forward è stato marcato con un fluoroforo appropriato che ne ha permesso la visualizzazione su un sequenziatore automatico *ABI* (tabella 1).

L'amplificazione ha avuto luogo in un volume totale di 15 µl, comprendenti dNTPs 70 µM, 10% del volume finale di Taq buffer (GE Healthcare, buffer già comprensivo di MgCl₂), 0.5 µM di ciascun primer e Taq polimerasi (GE Healthcare, dosi come indicate dal produttore). Il profilo di PCR utilizzato prevedeva 95°C per 1 minuto, 27 cicli di 95°C per 10 secondi, T_M (si veda tabella 1) per 30 secondi, 72°C per 30 secondi, e un passaggio finale di 72°C per 5 minuti.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati poi risolti in un gel di agarosio 1,8% in tampone TAE 0.5x (Tris Base 20 mM, acido acetico 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.0)

5.3. ANALISI DEI PRODOTTI DI PCR

Dopo aver controllato i risultati di PCR, gli amplificati di ogni individuo sono stati riuniti in un solo pozzetto di una piastra da PCR (96 pozzetti da 0.2 ml ciascuno): grazie al fatto che le coppie di primer sono state marcate con fluorofori diversi è stato possibile analizzare contemporaneamente tutti e tre i loci. Per ciascun campione è stata utilizzata una quantità variabile di DNA amplificato con i tre primer, determinata di volta in volta in base all'intensità della banda in questione dal gel di agarosio. Le piastre così preparate sono state analizzate mediante elettroforesi denaturante su capillare dal servizio di *genotyping* del BMR genomics, che utilizza sequenziatori *ABI PRISM DNA Analyzer 3100/3700*.

Il dimensionamento dei singoli alleli è stato ottenuto tramite l'aggiunta di uno standard interno (*GS 400 Hd ROX*) ed effettuato dal BMR. E' stato così possibile usufruire di un file (con estensione .fsa) contenente l'informazione sulla dimensione e sull'intensità dei singoli frammenti amplificati.

I files sono stati analizzati con il software *Genotyper v.3.7* (Applied Biosystems) che ha permesso di ricavare l'informazione sui genotipi dei diversi individui. Nonostante i padri putativi e le madri condividessero, nella maggior parte dei casi alcuni alleli, è stato comunque possibile assegnare con relativa semplicità ogni figlio ad uno solo dei due padri.

Nome	Sequenza 5'-3'	TM	Dimensione	Modificazione
Breden F	5'GTCACCGAACGAAAGGATA3'	52°C	19	5'FAM
Breden R	5'CCCCAAAGGAACACTGTAT3'	52°C	19	
Pooc-G49 F	5'CATAGATTCTGCAGGCAGTG3'	60°C	20	5'HEX
Pooc-G49 R	5'CTCAGTGACTATAAGGCCAA3'	60°C	21	
Pr92 F	5'ACCCTGTGCAGAGCAAAGAC3'	52°C	20	5'TAMRA
P92 R	5'TGGGCTGCTTTGTGAAGT3'	52°C	18	

Tabella 1: oligonucleotidi utilizzati nell'amplificazione del DNA. Sono indicati la sequenza dei *primers*, l'estensione, la temperatura di *annealing* in °C, la marcatura con fluoroforo abbinata al *primer forward*.

EXP.#1. BENEFICI DIRETTI DELLA PROMISCUITÀ FEMMINILE: QUALITÀ DELL'EIACULATO E FECONDITÀ FEMMINILE

1. INTRODUZIONE

I caratteri sessuali secondari (CSS) evolvono in molte specie in conseguenza della scelta femminile precopulatoria verso maschi con ornamenti più sviluppati (Andersson, 1994). E' stato proposto che da tali accoppiamenti le femmine ottengano dei benefici, che possono essere di tipo diretto (materiale) o di tipo indiretto. Nel caso in cui i CSS segnalino l'abilità di un maschio di ottenere risorse che influenzino direttamente la fitness della femmina in questione si parla di benefici diretti, mentre nel caso in cui i CSS segnalino la qualità genetica del maschio che li porta si parla di benefici indiretti (Jennions and Petrie, 2000). In specie con sistemi di accoppiamento non basati su risorse materiali (come *Poecilia reticulata*) e in cui i maschi contribuiscono alla riproduzione esclusivamente mediante il trasferimento gli spermatozoi, la preferenza femminile si pensa sia guidata dall'ottenimento di benefici di tipo genetico, che si manifestano in una maggiore sopravvivenza della prole o nel maggior successo riproduttivo dei figli maschi (Jennions and Petrie, 2000) (si veda l'introduzione per una più ampia trattazione). Un'alternativa è costituita dalla *Phenotype-linked fertility hypothesis* (PLFH) (Sheldon, 1994): se CSS elaborati correlano positivamente con l'efficienza di fecondazione di un maschio, le femmine che si accoppiano con maschi con ornamenti più sviluppati ottengono una maggior fecondità, rispetto alle femmine che si accoppiano con maschi meno attraenti. Per dare supporto a questa ipotesi è necessario dimostrare sia che esiste una correlazione fenotipica fra i caratteri sessuali secondari di un maschio e la sua abilità di fertilizzazione delle uova, sia che femmine che si accoppiano con maschi con CSS elaborati hanno fecondità maggiore rispetto a femmine che si accoppiano con maschi meno ornamentati. Nonostante alcuni studi abbiano dimostrato che maschi più attraenti producono un numero maggiore di spermatozoi, o spermatozoi di qualità maggiore (si veda Sheldon, 1994 per una review), esistono evidenze empiriche limitate che le femmine ottengano benefici diretti di fecondità dall'accoppiamento con maschi più attraenti.

Per dimostrare la PLFH è necessario dimostrare sia che esiste una correlazione fenotipica fra ornamenti maschili e fecondità (dovuta o ad una correlazione genetica fra i due caratteri o dal fatto che entrambi sono condizione dipendenti) sia che le femmine che si accoppiano con maschi più ornamentati ottengono una maggior fecondità. La PLFH ha ricevuto una considerevole attenzione sperimentale anche se la maggior parte del lavoro sperimentale svolto si è concentrato sull'associazione fra le misure dell'efficienza di fertilizzazione (dimensioni dei testicoli, dimensioni dell'ejaculato, numero e qualità degli spermatozoi prodotti) e il fenotipo del maschio (ornamenti o corteggiamento) (si vedano Birkhead and Pizzari 2002; Pizzari et al. 2002 per una review). Sono stati proposti molti meccanismi fisiologici per spiegare la covarianza positiva fra l'espressione degli ornamenti e l'efficienza di fertilizzazione. Ad esempio, i caratteri sessuali secondari

associati agli androgeni possono essere collegati con la qualità degli spermatozoi (Folstad and Skarstein, 1997; Hillgarth et al., 1997). Secondo questa ipotesi, gli ornamenti sono correlati con i livelli di ormoni gonadici (androgeni): l'effetto immunosoppressivo di questi androgeni, anche se è potenzialmente pericoloso per il maschio perché porta ad un aumento della suscettibilità all'attacco di parassiti, potrebbe ridurre anche le risposte auto-immuni agli antigeni spermatici, risultando in una covarianza fra la qualità dell'eiaculato e i caratteri sessuali secondari. Un secondo meccanismo che potrebbe spiegare la possibile relazione fra qualità degli spermatozoi ed ornamenti maschili assume che, in specie in cui i maschi posseggono CSS basati su pigmenti antiossidanti (come ad esempio i carotenoidi) (Blount et al., 2001), sia la qualità degli spermatozoi sia i substrati responsabili della colorazione maschile siano vulnerabili all'attacco dei radicali liberi, che può essere limitato dagli antiossidanti. Se gli antiossidanti rappresentano il fattore limitante e i maschi più colorati producono eiaculati di migliore qualità, ci si aspetta che si venga a creare una correlazione positiva fra ornamenti e qualità degli spermatozoi (Peters et al., 2004). Come è stato fatto notare (Birkhead and Pizzari, 2002), nonostante si assumano spesso correlazioni positive fra i caratteri legati alla fitness, non ci sono ragioni a priori per cui questo sia necessariamente vero in tutti i casi. Infatti, i caratteri associati alla *life-history* sono spesso legati da *trade-off*: nel caso in cui le risorse disponibili per la riproduzione siano costanti, i maschi potrebbero non essere in grado di aumentare il loro investimento nei caratteri postcopulatori senza ridurre l'investimento in quelli precopulatori (Parker et al., 1998).

Studi che si sono riproposti di testare le correlazioni fenotipiche fra gli ornamenti di un maschio e la sua efficienza di fertilizzazione hanno dato risultati contrastanti. Ad esempio, nel verdone (*Carduelis chloris*) esiste una correlazione positiva fra la brillantezza del piumaggio e le dimensioni degli spermatozoi (Merila and Sheldon, 1999), e nei maschi di germano (*Anas platyrhynchos*) gli ornamenti a carotenoidi covariano positivamente con la qualità dell'eiaculato (Peters et al., 2004). Nel cervo rosso (*Cervus elaphus*) l'estensione dei caratteri sessuali secondari di un maschio correla positivamente con le dimensioni degli spermatozoi e la qualità degli spermatozoi (Malo et al., 2005b). D'altra parte, altri studi non hanno riportato alcuna relazione fra il fenotipo maschile e le caratteristiche dell'eiaculato (Birkhead and Fletcher, 1995; Birkhead and Petrie, 1995); inoltre, è stata trovata un'associazione negativa fra qualità degli spermatozoi e caratteri sessuali secondari del maschio nel salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*) (Liljedal et al., 1999; Masvaer et al., 2004), nel salmone (Vladic et al., 2002; Vladic and Jarvi, 2001) e in *Symphodus melops* (Uglem et al., 2001).

Risultati discordanti per quanto riguarda la PLFH non sono inaspettati, specialmente in studi condotti su animali provenienti da popolazioni naturali, in cui i fattori confondenti che possono influenzare l'efficienza di fertilizzazione (ad esempio, la condizione del maschio, l'età, recenti accoppiamenti, effetti differenziali materni) sono difficili da controllare. Anche quando l'associazione fra fenotipo maschile ed efficienza di fertilizzazione è testata in condizioni sperimentali controllate i risultati possono essere contraddittori. Ad esempio, in uno studio dettagliato e ben controllato sul gallo (*Gallus gallus*), l'espressione di un ornamento (la cresta), ma non di un altro (lo sperone), predice la massa dei testicoli, ma non covaria significativamente con la velocità spermatica, un'altra importante componente dell'efficienza di fertilizzazione (Pizzari et al., 2004). Tutti questi studi hanno stimato le correlazioni fenotipiche fra caratteri spermatici e ornamenti

maschili. Una correlazione positiva fra efficienza di fertilizzazione e ornamenti maschili non è, però, sufficiente a dimostrare che le preferenze femminili per i maschi ornamentati sono guidate da benefici di fecondità (o, in altre parole, che femmine che si accoppiano con maschi con caratteri sessuali secondari poco sviluppati soffrono costi in termini di scarsa fecondità). Per dimostrare la PLFH è necessario dimostrare anche che le femmine che si accoppiano con maschi ornamentati hanno una fecondità maggiore.

Poecilia reticulata rappresenta una specie ideale in cui testare la PLFH: le femmine preferiscono accoppiarsi con maschi con grandi macchie colorate, che sono messe in evidenza dal maschio durante il display di corteggiamento (Houde, 1997). Molti studi hanno rivelato che maschi fenotipicamente più attraenti producono eiaculati più grandi e di miglior qualità. Ad esempio, il display di corteggiamento dei maschi e, in alcune popolazioni, le dimensioni delle macchie della livrea, sono positivamente associate con la produzione di spermatozoi (Matthews et al., 1997; Pitcher and Evans, 2001; Skinner and Watt, 2007). Inoltre, i maschi più colorati inseminano un numero maggiore di spermatozoi rispetto a maschi meno colorati (Pilastro et al., 2002), anche se le femmine possono influenzare tale trasferimento in base alla loro percezione del fenotipo maschile (Pilastro et al., 2004). Ciononostante, quando il numero di spermatozoi inseminati viene tenuto sperimentalmente costante, maschi relativamente più attraenti fecondano una percentuale maggiore di uova rispetto a maschi meno colorati (Evans et al., 2003b), probabilmente a causa della forte associazione positiva fra qualità degli spermatozoi (velocità e vitalità degli spermatozoi) e caratteri sessuali secondari maschili (Locatello et al., 2006; Pitcher et al., 2007). La preferenza delle femmine di *Poecilia reticulata* per i maschi più colorati che producono eiaculati più grandi e di miglior qualità è stata considerata come una delle prove più forti a supporto della PLFH (Birkhead and Pizzari, 2002; Matthews et al., 1997). Ad ogni modo, manca tuttora qualsiasi evidenza che le femmine ottengono benefici diretti di fecondità accoppiandosi con maschi più colorati. Questo è lo scopo di questo esperimento: tramite l'inseminazione artificiale omospermica di femmine vergini e l'analisi del numero di piccoli da loro prodotti e del tempo trascorso prima del parto, si è verificato l'effetto per la fecondità femminile di accoppiamenti con maschi con diversi fenotipi.

2. MATERIALI E METODI

Ho proceduto all'inseminazione artificiale omospermica di femmine vergini con un numero noto di spermatozoi di maschi caratterizzati da un diverso fenotipo (in particolare, una diversa estensione delle macchie a carotenoidi). Tramite questa tecnica è stato possibile controllare il numero di spermatozoi inseminati (Pilastro et al., 2002; Pilastro et al., 2004). Come già detto in precedenza, in questa specie gli spermatozoi sono impacchettati in spermatozeugmata (bundles), che nella popolazione da me considerata hanno circa 27,000 spermatozoi ciascuna (Evans et al., 2004). Lavori precedenti hanno confermato che il numero di spermatozoi contenuti in ciascuna bundle non correla né con le dimensioni del corpo né con l'estensione della colorazione a carotenoidi (Evans et al., 2003b). E' pertanto possibile controllare il numero degli spermatozoi inseminati contando le sperm bundles. Il numero di bundles utilizzate in questo esperimento corrisponde alla naturale variazione nelle dimensioni dell'eiaculato trasferito durante copule forzate (*sneaky*) (dimensione

media dell'eiaculato = $52.1 \pm 174.4 \times 10^3$ sperm, corrispondenti a 2 bundles, n=18) e cooperative ($0.91 \pm 0.83 \times 10^6$ sperm, n=27, corrispondenti approssimativamente a 33 bundles, Pilastro et al. 2004). Per i protocolli dettagliati si vedano i materiali e metodi comuni a tutti gli esperimenti.

Subito dopo l'inseminazione, le femmine sono state isolate ed allevate in condizioni standardizzate fino al momento del parto; dopodichè il numero di piccoli partoriti da ciascuna femmina e il tempo trascorso dall'inseminazione e il parto sono stati registrati ed utilizzati come variabili nelle successive analisi statistiche.

In un lavoro che si proponeva di testare l'associazione fra fenotipo del padre e performance dei figli, Evans e colleghi (2004b) non hanno trovato evidenza che il fenotipo del maschio fosse in qualche modo associato al numero di piccoli prodotti o il tempo di gestazione. In questo esperimento ho esteso tale analisi esaminando l'effetto combinato di fenotipo paterno e dimensioni dell'eiaculato manipolate sperimentalmente sul successo delle inseminazioni artificiali (cioè la probabilità che la femmina partorisca). In totale ho inseminato artificialmente 100 femmine vergini (SL media delle femmine: media \pm dev. standard = 21.56 ± 1.93 , range = 18-26.0 mm, n=100; SL media dei maschi: media \pm dev. standard = 18.35 ± 1.26 , range = 15.7-22.1 mm, n=99; per uno dei maschi non è stato possibile ottenere le misure del fenotipo). L'area relativa delle macchie della livrea (%) era (media \pm dev. standard) 11.72 ± 6.14 per i carotenoidi, 3.67 ± 1.62 per le macchie melaniche (nere) e 5.07 ± 2.63 per le macchie iridescenti (n=99).

Per valutare l'effetto della manipolazione sperimentale delle dimensioni dell'eiaculato sulla fecondità della femmina ho inseminato 2 (n=30), 15 (n=35) e 30 (n=35) bundles. Per aumentare il potere statistico e poter individuare un eventuale effetto del fenotipo paterno sulla probabilità che la femmina partorisca ho inserito nel dataset anche i dati relativi all'inseminazione artificiale di altre 118 femmine provenienti da altri esperimenti, precedentemente condotti nel laboratorio dove ho lavorato. In totale, il campione era di 218 femmine inseminate con 2 (n=30), 5 (n=20), 15 (n=35), 20 (n=68) e 30 (n=65) bundles (SL media delle femmine per il campione allargato: 22.49 ± 2.20 dev. standard, range = 18-29.5 mm, n=216; SL media dei maschi: 18.21 ± 1.22 dev. standard, range = 15.4-22.1 mm, n=217; area relativa della colorazione a carotenoidi (%): 11.19 ± 5.81 dev. standard; macchie melaniche (%): 3.37 ± 1.65 dev. standard; macchie iridescenti (%): 4.64 ± 3.12 dev. standard).

Per i protocolli dettagliati relativi al mantenimento dei soggetti sperimentali in laboratorio, all'estrazione degli sperm e all'inseminazione artificiale si veda la sezione dedicata ai materiali e metodi comuni a tutti gli esperimenti dell'introduzione.

3. RISULTATI

L'associazione fra il fenotipo maschile e probabilità che la femmina inseminata partorisca è stata testata usando una regressione logistica, in cui il successo delle inseminazioni (probabilità che la femmina partorisca) è stato introdotto nel modello come variabile dipendente binomiale, mentre numero di bundles inseminate, SL femmina e fenotipo del maschio (SL e area relativa delle macchie a carotenoidi) come variabili indipendenti. Per testare se vi fosse un effetto del fenotipo del maschio sul numero di piccoli prodotti e sul tempo trascorso fra l'inseminazione e il parto ho usato un Modello Lineare Generalizzato, in cui il tempo

fra inseminazione e parto (in giorni) e il numero di piccoli prodotti erano le variabili dipendenti, mentre il numero di bundles, la SL della femmina e il fenotipo del maschio (SL e area relativa delle macchie a carotenoidi) sono state inserite come covariate. I dati sono stati testati per la normalità (Kolmogorov-Smirnov test) e per l'omogeneità della varianza (test di Levene). Le proporzioni (area relativa delle macchie della livrea) sono state trasformate secondo la trasformazione arcseno. Tutte le probabilità sono a doppia coda. Se non indicato altrimenti nel testo, le medie riportate sono da considerarsi media \pm dev. standard.

Il 78.0% delle femmine inseminate hanno prodotto piccoli nel dataset ristretto (tempo medio fra inseminazione e parto: 34.4 ± 7.18 , range=25–54, n=78) e il 78.9% nel dataset totale (tempo medio fra inseminazione e parto= 34.1 ± 8.56 , range=18–68, n=172). Il fenotipo dei maschi e il numero di bundles utilizzate per le inseminazioni non hanno effetto sulla probabilità di partorire, né nel modello iniziale completo (tabella 2), né in quello ristretto, in cui sono state rimosse le interazioni non significative (tutti i $P > 0.10$). Risultati simili sono stati ottenuti quando è stato considerato il dataset completo (modello completo, tutti $P > 0.062$; dopo rimozione delle interazioni, tutti $P > 0.10$). L'effetto del colour pattern del maschio sulla probabilità di partorire non è significativo nemmeno a basse concentrazioni di spermatozoi, come risulta evidente dalle interazioni non significative fra le misurazioni del colour pattern e il numero di bundles inseminate (tabella 2, figura 8).

Il numero medio di piccoli per femmina è 7.53 ± 4.38 piccoli (dataset ristretto: range=1–20, n=78; dataset completo, 8.66 ± 5.95 , range=1–28, n=172). Ho considerato solo i casi in cui il tempo fra inseminazione e parto era inferiore a 50 giorni: la gestazione in questa specie dura circa 3-4 settimane (Houde, 1997) e quindi i piccoli prodotti dopo più di 50 giorni potrebbero essere il prodotto di una seconda generazione. In questo caso, il tempo medio fra inseminazione e parto è di 33.8 ± 6.55 (range=25–50) e il numero medio di piccoli è 7.36 ± 4.30 (range=1–20, n=76). Risultati simili sono stati ottenuti usando il dataset totale: il tempo medio dall'inseminazione al parto è 33.2 ± 6.55 (range=18–50) e il numero medio di piccoli è 8.70 ± 5.99 (range=1–28, n=165). Nell'analisi dell'effetto del fenotipo maschile sul tempo fra inseminazione e parto, ho escluso le femmine che hanno superato i 50 giorni dopo l'inseminazione artificiale. Comunque, includendo questi dati i risultati non cambiavano significativamente. I modelli iniziali includevano il tempo fra inseminazione e parto e il numero di bundles inseminate come variabili dipendenti. Nessuno dei caratteri fenotipici maschili è significativamente associato con il tempo fra inseminazione e parto né con il numero di piccoli partoriti (tabella 3, figura 9). In particolare, queste due variabili non correlano significativamente con l'area di carotenoidi né con la SL dei maschi (dataset ristretto, SL maschio: numero di piccoli partoriti, $r = -0.11$, $P = 0.35$, tempo dall'inseminazione al parto, $r = -0.06$, $P = 0.59$; macchie a carotenoidi: numero di piccoli partoriti, $r = 0.16$, $P = 0.18$, tempo dall'inseminazione al parto, $r = -0.03$, $P = 0.78$; macchie melaniche: numero di piccoli, $r = -0.06$, $P = 0.61$, tempo dall'inseminazione al parto, $r = 0.17$, $P = 0.15$; macchie iridescenti: numero di piccoli partoriti, $r = -0.03$, $P = 0.79$, tempo dall'inseminazione al parto, $r = 0.06$, $P = 0.59$, n=76; dataset completo, figura 9).

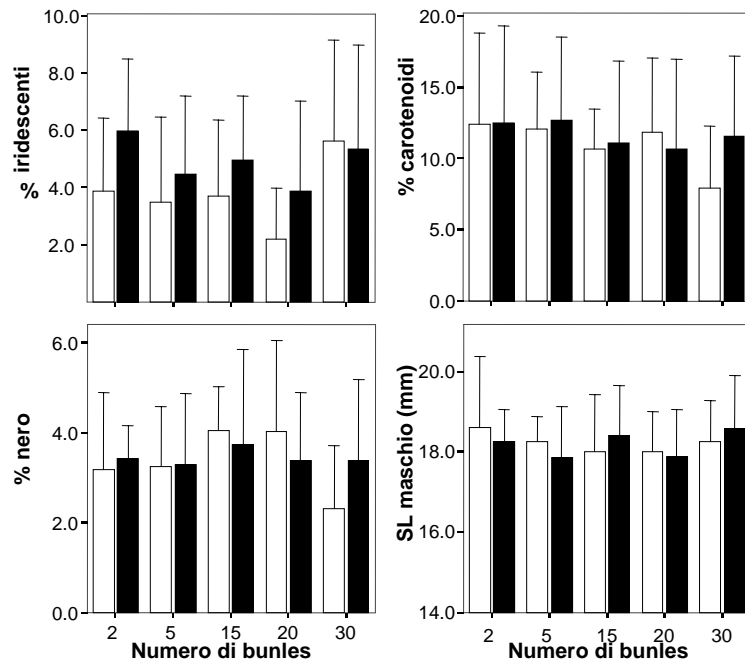


Figura 8. Caratteri fenotipici (media \pm dev. standard) dei maschi in relazione alla probabilità che la femmina partorisca (barre bianche = nessun piccolo partorito; barre nere = la femmina ha partorito) e il numero di sperm bundles usate per l'inseminazione artificiale.

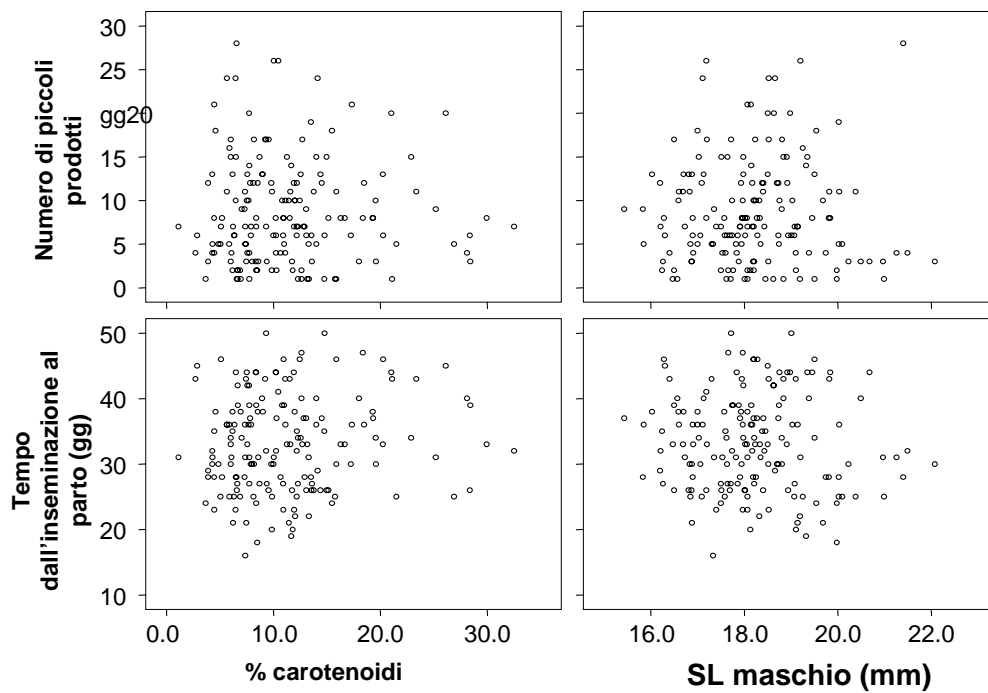


Figura 9. Il tempo in giorni fra inseminazione delle femmine e parto e il numero di piccoli partoriti in relazione alla proporzione di carotenoidi di un maschio (%) e dimensioni del corpo (standard length, SL).

	d.f.	Devianza media	Rapporto fra le devianze	P
Regressione	15	1.3223	1.33	0.203
Residui	83	0.9938		
Totale	98	1.0441		
Modello completo				
	b	ES	t₍₉₈₎	P
Costante	-6.5	12.4	-0.53	0.600
Numero di bundles	-0.054	0.509	-0.11	0.916
Carotenoidi	-14.60	8.68	-1.68	0.096
Nero	-9.0	16.5	-0.55	0.587
Iridescente	16.6	11.6	1.44	0.155
SL maschio	0.393	0.618	0.64	0.526
SL femmina	0.162	0.174	0.93	0.356
Bundles*carotenoidi	0.685	0.373	1.84	0.070
Bundles*nero	0.201	0.852	0.24	0.814
Bundles*iridescenti	-0.373	0.421	-0.89	0.378
Bundles*SL	-			
maschio	0.0055	0.0234	-0.24	0.814

Tabella 2. Risultati della regressione logistica utilizzata per testare l'influenza delle dimensioni della femmina (SL), del fenotipo maschile (SL, area delle macchie a carotenoidi relativa all'area corporea) e il numero di bundles inseminate sulla probabilità che la femmina partorisca, cioè la variabile dipendente con distribuzione binomiale.

	Tempo dall'inseminazione al parto			Numero di piccoli	
	d.f.	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Modello	1	4.303	<0.001	2.320	0.012
Intercetta	1	82.290	<0.001	0.338	0.562
SL femmina	1	1.458	0.229	3.185	0.076
SL maschio	1	0.013	0.910	0.476	0.491
Carotenoidi (area)	1	0.360	0.549	0.547	0.461
Nero (area)	1	0.159	0.691	0.003	0.957
Iridescenti (area)	1	0.205	0.651	0.000	0.990
Numero di bundles	1	0.073	0.788	0.028	0.868
Errore	152				

Tabella 3. Modelli generali linearizzati utilizzati per testare l'effetto del fenotipo maschile e femminile, del numero di bundles inseminate (covariate) sul numero di piccoli partoriti e il tempo fra l'inseminazione e il parto (dopo trasformazione logaritmica, n = 171).

4. DISCUSSIONE

Le analisi hanno dimostrato che il fenotipo del maschio non è associato con un aumento della fecondità della femmina nella popolazione di *Poecilia reticulata* considerata in questo studio: il numero di piccoli, la durata dello sviluppo dei piccoli e la probabilità di partorire non sono influenzati dal fenotipo del maschio, inclusi i caratteri sessuali secondari. Non ho trovato un effetto del numero di bundles inseminate, nemmeno alle più basse concentrazioni di spermatozoi, nonostante vi fosse un apparente riduzione della probabilità di partorire nel caso di femmine inseminate con solo due sperm bundles. L'effetto generale, comunque, non è significativo.

È stato proposto che i maschi più colorati siano in grado di conferire alle femmine una maggior fecondità dato che essi producono un maggior numero di spermatozoi (Pitcher and Evans, 2001) di qualità superiore (Locatello et al., 2006; Pitcher et al., 2007; Skinner and Watt, 2007) e trasferiscono eiaculati maggiori alle femmine durante copule controllate sperimentalmente (Pilastro et al., 2002). Dato che, in media, hanno anche riserve più grandi (questo fattore, però, dipende dalla popolazione in esame e dal bilancio fra tasso di accoppiamento e produzione di spermatozoi), maschi più colorati dovrebbero avere una minor probabilità di esaurire le riserve spermatiche e ci si aspetta che trasferiscano una maggior quantità di spermatozoi alle femmine. La fecondità femminile potrebbe essere in principio limitata perché i maschi non forniscono loro abbastanza spermatozoi o spermatozoi di qualità sufficiente (o una combinazione di questi due fattori). Nei prossimi paragrafi discuterò questi due punti e porrò in risalto come questi rischi di insufficienza di spermatozoi siano improbabili per le femmine di *Poecilia reticulata*.

In primo luogo, in questo esperimento è stato dimostrato che la fecondità delle femmine non è limitata dalle dimensioni dell'eiaculato, anche alle concentrazioni più basse di spermatozoi utilizzate durante l'inseminazione artificiale. Le inseminazioni effettuate con solo due bundles corrispondono al numero medio di spermatozoi trasferiti dai maschi durante le copule coercitive, e rappresentano anche circa 1/100 delle riserve medie di un maschio (Pitcher and Evans, 2001) e circa 1/10 del numero medio di spermatozoi inseminati durante copule cooperative (Pilastro et al., 2004). Pertanto, in media, le riserve di spermatozoi di un maschio e le dimensioni dell'eiaculato trasferito sono maggiori del numero minimo di spermatozoi necessari a garantire la fecondità della femmina. Questo suggerisce che in natura sia improbabile che le femmine soffrano i costi legati all'insufficienza di spermatozoi.

In secondo luogo, durante la fase sessualmente recettiva, le femmine tipicamente si accoppiano cooperativamente con più di un maschio (Evans and Magurran, 2000; Pitcher et al., 2003) e la probabilità che tutti i maschi siano senza spermatozoi è bassa. In più, osservazioni comportamentali hanno dimostrato che fuori dal periodo di recettività sessuale, le femmine tipicamente ricevono circa un tentativo di copula coercitiva al minuto (Magurran and Seghers, 1994) e da esperimenti di laboratorio è noto che tali tentativi spesso risultano nel trasferimento di spermatozoi (Pilastro and Bisazza, 1999; Pilastro et al., 2002). Inoltre, studi su campo hanno mostrato che circa il 45% delle femmine non recettive ha nel gonodotto spermatozoi derivanti da copule coercitive (Evans et al., 2003a; Matthews and Magurran, 2000; Russell and Magurran, 2006).

In terzo luogo, le femmine possono immagazzinare spermatozoi per diversi mesi e produrre piccoli per diversi cicli riproduttivi consecutivi dopo una singola copula (Constantz, 1989). In fine, durante le copule cooperative le femmine limitano

attivamente il numero di spermatozoi trasferiti dai maschi che esse percepiscono come i meno attraenti (Pilastro et al., 2004), oltre al fatto che i maschi spesso tentano di riaccoppiarsi con la femmina dopo la prima copula (Pilastro and Bisazza, 1999). Questo non è atteso se le femmine soffrono di carenza di spermi, o se le femmine selezionano i maschi sulla base della loro produzione di spermi. Ad ogni modo, questo esperimento limita la sua analisi ad un solo ciclo riproduttivo e si potrebbe pensare che differenze nella qualità degli spermi fra i maschi possano avere effetti sulla probabilità che una femmina partorisca in cicli riproduttivi successivi al primo. Comunque, dato che le femmine di *Poecilia reticulata* sono altamente promiscue (Kelly et al., 1999; Pitcher et al., 2003), sembra plausibile che questi eventuali effetti in cicli riproduttivi successivi abbiano un'importanza minore, anche se non possono essere completamente scartati sulla base dei risultati di questo esperimento.

È stato recentemente dimostrato che i maschi colorati producono eiaculati di qualità superiore (Locatello et al., 2006; Pitcher et al., 2007; Skinner and Watt, 2007) e che questo probabilmente rende ragione del loro tanto maggiore successo nella competizione spermatica quando numeri costanti di spermi sono stati usati per l'inseminazione artificiale (Evans et al., 2003b). In principio pertanto, è possibile che la fecondità delle femmine sia limitata dalla qualità degli spermi (ad esempio la vitalità o la velocità di nuoto degli spermi) e non dal numero di spermi. Comunque, dall'analisi dei dati di questo esperimento non risultano interazioni statistiche del fenotipo del maschio e delle dimensioni dell'eiaculato sulla probabilità di partorire, suggerendo che accoppiarsi con maschi più colorati non aumenta la fecondità della femmina, anche quando le riserve spermatiche del maschio sono limitate.

La mancanza di associazione fra fenotipo del maschio e fecondità della femmina, in particolar modo con il numero di piccoli prodotti, suggerisce che la sopravvivenza "intrauterina" degli embrioni non è influenzata dal fenotipo del maschio, confermando precedenti evidenze indirette (Evans et al., 2003b). Pertanto, la vitalità degli embrioni non sembra essere un fattore importante a sostegno dei benefici della scelta femminile e probabilmente, del comportamento poliandrico delle femmine (Garcia-Gonzalez and Simmons, 2005) in *Poecilia reticulata*.

Un forte supporto all'idea che accoppiamenti con maschi attraenti risulti in benefici di fecondità per le femmine deriva da due studi condotti sul cervo rosso spagnolo (*Cervus elaphus hispanicus*) (Malo et al., 2005a; Malo et al., 2005b). In un esperimento che utilizzava la tecnica dell'inseminazione artificiale, Malo e collaboratori (2005a) hanno riportato una sostanziale variabilità nella fertilità maschile, e che tali differenze nella fertilità sono determinate prevalentemente dalla velocità di nuoto degli spermatozoi e dalla proporzione di spermi morfologicamente normali. In congiunzione con i risultati di un esperimento parallelo che ha rivelato un'associazione positiva fra dimensioni delle corna e velocità di nuoto degli spermi nel cervo rosso (Malo et al., 2005b), questi risultati suggeriscono fortemente che in questa specie le preferenze femminili per i maschi più ornamentati potrebbe essere guidata da benefici di fecondità. Va notato, comunque, che il disegno sperimentale di Malo e colleghi (2005a) prevedeva la ripartizione dell'eiaculato maschile fra diverse femmine. Non sono a conoscenza di studi che riportino la naturale variabilità delle dimensioni dell'eiaculato in questa specie, ma se il numero di spermatozoi inseminati durante la copula è maggiore di quello usato in questo esperimento di inseminazione artificiale, è possibile che i costi di limitata fecondità trovati per accoppiamenti con maschi con ornamenti meno sviluppati siano in realtà più piccoli di quanto suggeriscano i risultati di questo studio.

In conclusione, nonostante la covarianza positiva trovata in alcune popolazioni di *Poecilia reticulata* fra l'espressione dei caratteri sessuali secondari maschili e la produzione di spermatozoi (Matthews et al., 1997; Pitcher and Evans, 2001) e fra questa e la qualità/competitività dell'eiaculato (Evans et al., 2003a; Locatello et al., 2006; Pitcher et al., 2007), i risultati di questo esperimento indicano che la fecondità femminile non è influenzata dalla preferenza femminile per maschi più ornamentati. Quindi, anche se i benefici di fecondità inizialmente hanno rinforzato la coevoluzione fra scelta femminile e ornamenti maschili in questa specie, sembra improbabile che tali benefici attualmente mantengano tale preferenza. Il campione esaminato è grande e la mancanza di correlazione fra colorazione maschile e fecondità femminile suggerisce che, almeno in questa popolazione mantenuta in cattività, qualsiasi beneficio di fecondità derivante dall'accoppiamento con maschi più attraenti sia piccolo. Invece, i benefici riportati precedentemente per questa specie, inclusa la ridotta probabilità di contrarre parassiti o malattie (Grether et al., 2004; Kennedy et al., 1987), le aumentate performance della prole (Evans et al., 2004; Reynolds and Gross, 1992) e l'aumentata performance riproduttiva dei figli maschi (Brooks, 2000; Houde, 1992), molto più probabilmente spiegano il mantenimento della preferenza femminile per maschi vistosi in *Poecilia reticulata*.

EXP.#2. IMPORTANZA RELATIVA DEL NUMERO E DELLA QUALITÀ DEGLI SPERMI NEL SUCCESSO DI COMPETIZIONE SPERMATICA

1. INTRODUZIONE

Nelle specie sessualmente promiscue, le due forme di selezione sessuale postcopulatoria (competizione spermatica e scelta criptica femminile) generano differenze nel successo riproduttivo dei maschi (Birkhead and Pizzari, 2002; Snook, 2005). Spesso, tuttavia, risulta estremamente difficile distinguere fra gli effetti dei due meccanismi, e di conseguenza la relativa importanza e il relativo contributo dei due al successo riproduttivo di un individuo non sono ben compresi (Snook, 2005). La maggior parte degli studi svolti su questo argomento si è focalizzata sulla competizione spermatica, mentre molto meno numerosi sono i tentativi di dimostrare la scelta criptica femminile sono gli esempi di esperimenti sulla scelta criptica femminile.

Gli studi sulla competizione spermatica hanno fornito un ampio quadro di adattamenti, che possono riguardare il numero degli spermatozoi inseminati, ma anche aspetti qualitativi. Nonostante ci siano molte prove teoriche ed empiriche a sostegno del ruolo decisivo del numero degli spermatozoi nel successo di competizione spermatica (Birkhead and Moller, 1998; Stoltz and Neff, 2006), di recente è stato proposto (Snook, 2005) che anche altri caratteri spermatici (considerati tutti insieme nel termine “qualità spermatica”) siano di comparabile importanza per questo processo. Il termine “qualità spermatica” si riferisce all’efficienza di fecondazione dell’ejacolato di un dato maschio contro quello di un altro maschio dopo aver controllato statisticamente per il numero degli spermatozoi (Birkhead and Moller, 1998) ed include caratteri come le dimensioni degli spermatozoi (LaMunyon and Ward, 1998; Simmons et al., 2003), la loro longevità (Gage et al., 2004), vitalità (Hunter and Birkhead, 2002) e velocità (Birkhead et al., 1999; Hunter and Birkhead, 2002). Tutte queste caratteristiche si sono rivelate importanti per il successo di fecondazione in molte specie. La velocità degli spermatozoi è associata con il successo di fecondazione nei ricci di mare (Levitan, 2000), pesci (Burness et al., 2004; Gage et al., 2004; Rurangwa et al., 2004), uccelli (Birkhead et al., 1999) e mammiferi (Malo et al., 2005a). Evidenze che la morfologia degli spermatozoi influiscano sul successo di fecondazione sono controverse (si veda Snook 2005), ma alcuni lavori hanno mostrato che la lunghezza degli spermatozoi è spesso correlata con la competizione spermatica nelle specie a fecondazione interna (Andersson, 2005; Briskie and Montgomerie, 1992; Garcia-Gonzalez and Simmons, 2007).

È anche importante da dire, che spesso gli interessi dei due sessi riguardo la fecondazione delle uova non coincidono e le femmine possono evolvere contro adattamenti che permettano loro di controllare (almeno in parte) la paternità dei loro piccoli (Birkhead and Pizzari, 2002; Eberhard, 1996). Di conseguenza, la scelta criptica femminile ha più probabilità di essersi evoluta in specie con alti livelli di coercizione sessuale, in cui la scelta femminile precopulatoria è impossibile (ad esempio, se vi è un’alta frequenza di copule coercitive) rendendo la scelta criptica

femminile l'unico mezzo per discriminare fra i maschi (Birkhead and Pizzari, 2002). Anche se l'importanza di scelta criptica femminile e competizione spermatica per i processi riproduttivi è stata completamente riconosciuta, la maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla competizione spermatica (Birkhead and Pizzari, 2002), in gran parte perché le difficoltà sperimentali rendono molto complicato dimostrare la scelta criptica femminile, distinguendone gli effetti da quelli della competizione spermatica (Eberhard, 1996). In conseguenza, la relativa importanza di questi due processi nel diverso successo di fecondazione dei vari maschi è stata poco approfondita. In questo esperimento, ho voluto valutare la relativa importanza dei due processi direzionali (competizione spermatica e scelta criptica femminile) nel determinare il successo di fecondazione.

Per *Poecilia reticulata* molto è noto a proposito della competizione spermatica: esiste una correlazione positiva fra percentuale di carotenoidi di un maschio e il numero (Pilastro et al., 2002) e la qualità degli spermatozoi che produce (Locatello et al., 2006). Questa correlazione fra caratteristiche fenotipiche e qualità dell'ejaculato si riflette poi nel maggior successo di fertilizzazione di maschi con di macchie a carotenoidi più estese, come dimostrato da esperimenti di inseminazione artificiale in cui il numero degli spermatozoi inseminati è stato controllato sperimentalmente (Evans et al., 2003b). D'altra parte, le femmine preferiscono accoppiarsi con maschi con una percentuale di carotenoidi maggiore (Houde, 1997) e sono in grado di controllare il numero di spermatozoi che accettano da un maschio, favorendo i maschi più colorati (Pilastro et al., 2007b; Pilastro et al., 2004). D'altro canto, i maschi possono bypassare la scelta femminile attraverso copule coercitive (Houde, 1997; Pilastro and Bisazza, 1999).

Ho condotto dei test di competizione spermatica in cui una femmina veniva inseminata artificialmente con diversi numeri di spermatozoi di due maschi e dopo aver misurato, in vitro, le caratteristiche di qualità degli spermatozoi. Attraverso l'inseminazione artificiale si può controllare effetti confondenti relativi all'ordine e alla durata della copula e controllare gli effetti della scelta criptica femminile direzionale. Inoltre, l'inseminazione artificiale permette di separare la scelta precopulatoria dai processi postcopulatori e di distinguere fra le capacità di fertilizzazione di maschi diversi (Evans et al., 2003b). Ho misurato le caratteristiche qualitative degli spermatozoi importanti per il successo in competizione spermatica (Snook, 2005) e ho messo queste variabili in relazione al successo di competizione spermatica dei maschi della coppia.

In letteratura, vi sono altri due studi che si sono proposti di valutare il relativo ruolo di numero e qualità degli spermatozoi in pesci e che hanno avuto esiti diversi: nel salmone atlantico (*Salmo salar*) il principale predittore della paternità è risultato essere la velocità degli spermatozoi (Gage et al., 2004), mentre in *Lepomis macrochirus* il fattore principale è il numero degli spermatozoi inseminati (Stoltz and Neff, 2006).

2. MATERIALI E METODI

Ho condotto dei test di competizione spermatica, in cui femmine vergini venivano inseminate con diversi numeri di spermatozoi di due maschi. In particolare, sono stati formati due gruppi sperimentali: un gruppo in cui ciascuna femmina veniva inseminata artificialmente con uguali numeri di spermatozoi di due maschi (10 bundles da

ciascun maschio) ed un gruppo in cui i due maschi della coppia contribuivano con numeri diversi di spermatozoi. In particolare, in questo secondo gruppo una parte delle femmine è stata inseminata con 4 bundles di un maschio e 16 dell'altro, mentre altre femmine venivano inseminate con 8 bundles di un maschio e 12 dell'altro. In questo modo, il numero totale delle sperm bundles inseminate per ciascuna femmina era costante, ma variava il relativo contributo dei due maschi della coppia. Ho poi calcolato il successo di competizione spermatica dei due maschi tramite analisi di paternità.

Per i protocolli dettagliati relativi al mantenimento dei soggetti sperimentali in laboratorio, all'estrazione degli sperm, all'inseminazione artificiale e delle analisi di paternità si veda la sezione dedicata ai materiali e metodi comuni a tutti gli esperimenti dell'introduzione.

2.1. ANALISI DEGLI SPERMI

2.1.1. CONTEGGIO DEL NUMERO DI SPERMI PER BUNDLES

Per misurare il numero medio di sperm contenuti in una bundles per ciascun maschio ho seguito il protocollo descritto in (Evans and Magurran, 2001): è stato usato un ematocitometro (camera "Neubauer"; figura 10) per contare i singoli spermatozoi. Dopo diluizione di 20 sperm bundles in 100 μ l di soluzione salina 0.9% NaCl e rottura delle cellule mediante vortex per circa 1 minuto, 7 μ l della soluzione così ottenuta sono stati introdotti nell'ematocitometro e le cellule spermatiche sono state contate ad un ingrandimento di 400x. Il conteggio veniva effettuato per cinque diversi campi per ciascun campione e la procedura appena illustrata veniva ripetuta due volte per ciascun maschio. In ogni quadratino sono stati contati solamente gli sperm che si trovavano all'interno e quelli situati sui bordi sinistro e superiore del quadratino stesso. Inoltre, il conteggio era cieco, cioè senza che lo sperimentatore conoscesse l'identità del maschio e a che gruppo sperimentale appartenesse. Il numero medio di spermatozoi contenuti in ciascuna bundles è stato calcolato moltiplicando il numero medio di sperm contati (per cinque diversi campi) per il fattore di diluizione e dividendo per il numero di sperm bundles contenute nella soluzione iniziale.

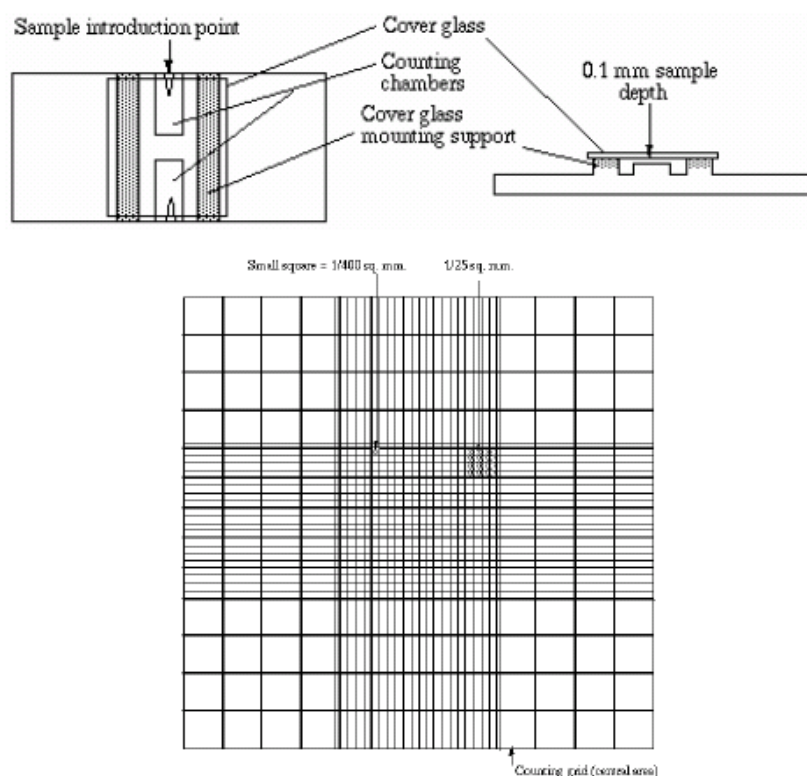


Figura 10: Rappresentazione schematica di una camera Neubauer

2.1.2. MORFOLOGIA DEGLI SPERMI

Per analizzare la morfologia degli spermatozoi è stato usato il colorante vitale Rose Bengal 1%. 20 sperm bundles sono state poste in 50 μ l di soluzione inattivante (207 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.41 mM MgSO₄, 10 mM Tris, pH 7.5) (Gardiner, 1978) e ciascuna aliquota è stata incubata con Rose Bengal 1% per almeno 30 minuti. Successivamente, gli spermatozoi sono stati osservati e fotografati al microscopio ottico ad un ingrandimento di 1000x. La fotografia degli spermatozoi è stata effettuata mediante la fotocamera digitale Olympus DP10. Da queste fotografie, sono state poi determinate le dimensioni di testa, collo e coda di 20 spermatozoi per ciascun individuo, mediante il software per analisi di immagine Image Tool.



Figura 11: Disegno schematizzato e fotografia al microscopio ottico di uno spermatozoo di guppy.

2.1.3. VITALITÀ DEGLI SPERMI

La vitalità spermatica è stata misurata 5 ore dopo l'estrazione degli spermatozoi ed è espressa come percentuale relativa di spermatozoi vivi e morti presenti nell'eiaculato di ciascun soggetto sperimentale. 50 sperm bundles sono state poste in 10 μl di soluzione inattivante (207 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.41 mM MgSO₄, 10 mM Tris, pH 7.5) (Gardiner, 1978) e 5 ore prima dell'analisi μl di soluzione attivante (150 mM KCl e 2 mg L⁻¹ di albumina di siero bovino) (Billard and Cosson, 1990) sono stati aggiunti al campione, per un volume totale di 50 μl . Subito dopo l'attivazione delle cellule spermatiche, ma prima della colorazione, si è proceduto alla rottura delle sperm bundles mediante vortex per almeno 1 minuto per ciascuna aliquota. È stato poi utilizzato lo Sperm Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) per marcare gli spermatozoi mediante colorazione fluorescente. Per tale colorazione si sono seguite le istruzioni del produttore. SYBR-14 green e propidio ioduro sono marcatori nucleari fluorescenti che colorano in modo selettivo gli spermatozoi vivi (in verde) e morti (rosso) rispettivamente. SYBR-14 green colora gli acidi nucleici, in quanto è in grado di permeare la membrana cellulare, mentre il propidio ioduro colora le cellule con membrana cellulare danneggiata, considerate pertanto morte. I campioni sono stati osservati ad un ingrandimento di 400x con un microscopio ottico Leica CTR 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) utilizzando il filtro standard per l'eccitazione della fluoresceina. Sono stati fotografati almeno 10 campi casuali per ciascun campione. Le fotografie sono state scorse manualmente, e il numero totale di spermatozoi colorati in verde (spermatozoi vivi) e in rosso (spermatozoi morti) è stato determinato, insieme al numero di spermatozoi che presentavano entrambe le colorazioni. Secondo le convenzioni (si veda (Bernasconi et al., 2002)), quest'ultima tipologia di spermatozoi (quelli che presentano sia colorazione verde sia rossa) è da considerarsi come non più vitale, dato che queste cellule spermatiche hanno perso la capacità di resistere al propidio ioduro. La vitalità spermatica è stata poi calcolata come la proporzione (%) di spermatozoi verdi (vivi) sul numero totale di spermatozoi contati nel campione.

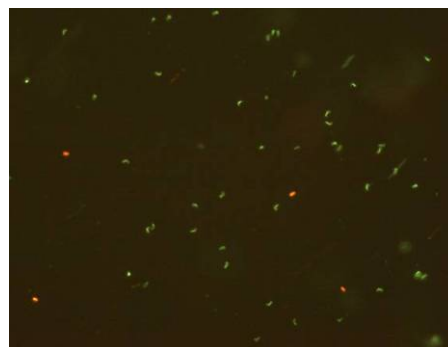


Figura 12: fotografia al microscopio a fluorescenza. Si possono notare gli spermatozoi vivi (verde) e quelli morti (rosso)

2.1.4. VELOCITÀ *IN VITRO* DEGLI SPERMI

Per la valutazione delle caratteristiche qualitative dei campioni degli spermatozoi sono state condotte delle analisi computerizzate attraverso il sistema CASA (*Computer Aided Sperm Analyser*), gentilmente messo a disposizione dall'azienda ospedaliera di Padova, presso il Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana. Tale strumento prevede l'utilizzo di specifiche camere monouso, dello spessore di 12 μm (Microcell), in grado di fornire risultati ottimali per l'analisi della velocità degli spermatozoi. Per ogni campione sono stati esaminati venti

campi ottici per un numero totale di circa 500 spermatozoi per ciascun settore. Poco prima dell'analisi, gli spermatozoi in ognuna delle due provette, sospesi inizialmente in 10 μl di soluzione inattivante, sono stati attivati con 40 μl di soluzione attivante. Le spermatozeugmata sono quindi state rotte meccanicamente con l'aiuto di una pipetta. Infine da ogni provetta è stata prelevata un'aliquota della soluzione contenente gli spermatozoi ed introdotta per capillarità in una Microcell e si è proceduto all'analisi e attraverso il sistema automatizzato a nostra disposizione è stato possibile valutare sette parametri (figura 13) della motilità spermatica:

Il protocollo sperimentale per la misurazione della velocità spermatica (si veda (Locatello et al., 2006)) prevede una procedura in due passaggi, in modo da assicurare l'attivazione simultanea di tutte le cellule spermatiche (Billard and Cosson, 1992): in primo luogo, 15 sperm bundles sono state messe in 10 μl di soluzione inattivante (207 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.41 mM MgSO₄, 10 mM Tris, pH 7.5) in cui gli spermatozoi rimangono quiescenti (Gardiner, 1978). Il campione è stato mantenuto alla temperatura di 3-5°C fino al momento dell'analisi (che avveniva comunque entro 2 ore dal prelievo degli spermatozoi). A questo punto, il campione veniva scaldato a 26°C e attivato con 40 μl di soluzione attivante (150 mM KCl e 2 mg L⁻¹ di albumina di siero bovino) (Billard and Cosson, 1990). Subito dopo l'aggiunta della soluzione attivante, le sperm bundles sono state rotte delicatamente in modo da indurre la motilità spermatica. 3 μl del campione risultante venivano posti in camerette microcell individuali, ciascuna con profondità di 12 μm e analizzati attraverso uno Sperm Tracker modello IVOS (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA).

Le misure di velocità sono basate su una media di 123.8 ± 83.0 tracce spermatiche per campione (range 10-339, n $\frac{1}{4}$ 105). Esse includono sette parametri di velocità. In dettaglio questi sono:

1. **VAP** –velocità intermedia ($\mu\text{m}/\text{sec}$), intesa come velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua traiettoria intermedia, dedotta per interpolazione di quella reale per mezzo di algoritmi inseriti nel sistema CASA. Per il parametro in questione, il limite minimo fissato era di 20 $\mu\text{m}/\text{sec}$.
2. **VSL** –velocità rettilinea ($\mu\text{m}/\text{sec}$), pari alla velocità media di una testa di spermatozoo lungo la linea retta che unisce la sua posizione iniziale con quella finale. Per questo parametro è stato fissato un valore minimo di 15 $\mu\text{m}/\text{sec}$.
3. **VCL** –velocità curvilinea ($\mu\text{m}/\text{sec}$), corrispondente alla velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua traiettoria curvilinea, così com'era rilevata bidimensionalmente al microscopio.
4. **ALH** –ampiezza dello spostamento laterale della testa (μm) nella sua traiettoria media. In particolare per ogni testa il valore può essere espresso come valore massimo o medio dello spostamento: diversi strumenti CASA calcolano questo parametro mediante differenti algoritmi, così che i valori ottenuti non sono del tutto comparabili.
5. **BCF** –frequenza del battito (battiti/sec), cioè il numero di volte nell'unità di tempo con cui la traiettoria curvilinea della testa dello spermatozoo incrocia quella intermedia.

6. **STR** –rettilinearità, definita come rapporto tra velocità rettilinea e velocità intermedia (VSL/VAP).

7. **LIN** –linearità di una traiettoria curvilinea, definita come rapporto tra velocità rettilinea e velocità intermedia (VSL/VCL).

Queste misure della motilità correlano con il tasso di fecondazione in varie specie (Birkhead et al., 1999; Levitan, 2000; Malo et al., 2005a), fra cui specie di pesci (Burness et al., 2004; Gage et al., 2004; Snook, 2005). Inoltre, precedenti lavori hanno dimostrato che queste misure di velocità *in vitro* sono significativamente ripetibili (Locatello et al., 2006).

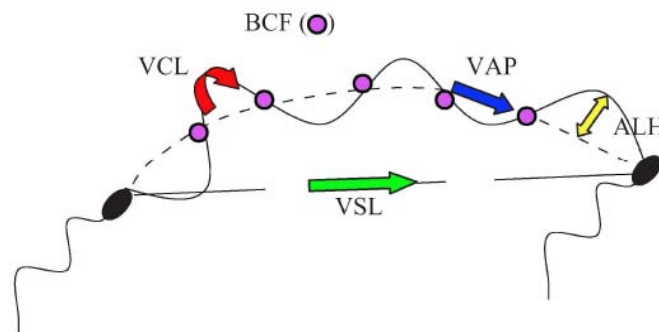


Figura 13: Disegno schematico dei parametri di motilità spermatica considerati. Non sono rappresentati STR e LIN, in quanto si tratta di rapporti

3. RISULTATI

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS v.15 per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I dati sono stati controllati per la distribuzione normale e per l'omogeneità della varianza. In caso queste assunzioni non fossero rispettati i dati sono stati opportunamente trasformati (trasformazione arcseno) prima delle analisi. Tutte le probabilità indicate sono da considerarsi a due code. L'associazione fra il numero di spermatozoi inseminati, i caratteri della qualità dell'eiaculato (vitalità, morfologia e velocità degli spermatozoi) ed il successo di competizione spermatica (p_2) è stata testata usando una regressione logistica, in cui la proporzione di figli del secondo maschio della coppia (p_2) è stata introdotta come variabile dipendente con distribuzione binomiale e le altre come covariate.

Le statistiche descrittive relative ai maschi di questo esperimento sono riportate nella tabelle 4 e 5.

Dalle inseminazioni artificiali si sono ottenute 17 famiglie, suddivise in 5 famiglie per il gruppo 10:10, 7 famiglie per il gruppo 4:16 e 5 famiglie per il gruppo 8:12. Sono risultate quindi 51 adulti e 182 piccoli (numero medio di piccoli per famiglia, media \pm dev. standard=10.71 \pm 4.57; range 4-19). Il numero di spermatozoi per bundles non differisce significativamente fra i due maschi delle coppie ($t_{16}=0.481$; $P=0.637$), come nemmeno la colorazione della livrea maschile (macchie a carotenoidi: $t_{16}=1.621$, $P=0.125$; macchie melaniche: $t_{16}=-0.688$, $P=0.501$; macchie iridescenti: $t_{16}=1.016$, $P=0.325$) né altre componenti fenotipiche maschili (SL

maschio: $t_{16}=0.715$, $P=0.485$). Nemmeno le variabili relative alla qualità degli spermatozoi differiscono in modo significativo fra i maschi dei due gruppi (vitalità spermatica $t_{12}=1.089$, $P=0.298$; VAP: $t_{16}=0-1.440$, $P=0.169$; VSL: $t_{16}=-1.555$, $P=0.139$; VCL: $t_{16}=-1,274$, $P=0.221$; ALH: $t_{16}=0.548$, $P=0.592$; BCF: $t_{16}=1.553$, $P=0.140$; STR: $t_{16}=-1.605$, $P=0.128$; LIN: $t_{16}=-1,272$, $P=0.222$; lunghezza della testa: $t_{16}=0.550$, $P=0.590$; lunghezza colletto: $t_{16}=-0.932$, $P=0.365$; lunghezza coda: $t_{16}=-1.279$, $P=0.219$). Inoltre, queste non variano nemmeno fra gruppi di inseminazione diversi (10:10; 4:16; 8:12) (ANOVA univariata: macchie a carotenoidi: $F_{2,14}=0.866$, $P=0.442$; macchie melaniche: $F_{2,14}=0.099$, $P=0.906$; macchie iridescenti: $F_{2,14}=1.267$, $P=0.312$; numero di spermatozoi per bundles: $F_{2,14}=0.911$, $P=0.425$; VAP: $F_{2,14}=1.112$, $P=0.356$; VSL: $F_{2,14}=1.051$, $P=0.376$; VCL: $F_{2,14}=0.804$, $P=0.467$; ALH: $F_{2,14}=2.135$, $P=0.155$; BCF: $F_{2,14}=0.699$, $P=0.513$; STR: $F_{2,14}=0.079$, $P=0.924$; LIN: $F_{2,14}=1,255$, $P=0.315$; lunghezza testa: $F_{2,14}=0.183$, $P=0.835$; lunghezza colletto: $F_{2,14}=0.018$, $P=0.982$; lunghezza coda: $F_{2,14}=0.668$, $P=0.528$; vitalità spermatica: $F_{2,10}=3.381$, $P=0.76$).

A questo campione sono stati aggiunti i dati relativi all'inseminazione artificiale di altre 34 femmine di un precedente esperimento (A. Pilastro, dati non pubblicati), inseminate con uguali numeri di spermatozoi. Il campione totale, pertanto, risulta essere di 51 famiglie (153 adulti e 719 piccoli). Anche con il dataset ampliato, il numero di spermatozoi per bundles ($t_{50}=0.066$, $P=0.948$), le caratteristiche del fenotipo maschile (macchie a carotenoidi: $t_{50}=2,346$, $P=0.06$; macchie nere: $t_{50}=-2.745$, $P=0.05$; macchie iridescenti: $t_{50}=0.081$, $P=0.936$) né le caratteristiche degli spermatozoi (VAP: $t_{50}=1.015$, $P=0.315$; VSL: $t_{50}=0.997$, $P=0.323$; VCL: $t_{50}=0.720$, $P=0.475$; ALH: $t_{50}=0.517$, $P=0.607$; BCF: $t_{50}=-0.329$, $P=0.744$; STR: $t_{50}=0.493$, $P=0.624$; LIN: $t_{50}=0.644$, $P=0.523$; lunghezza testa: $t_{49}=0.588$, $P=0.559$; lunghezza colletto: $t_{50}=-0.403$, $P=0.689$; lunghezza coda: $t_{49}=-2.985$, $P=0.05$; vitalità spermatica: $t_{50}=0.661$, $P=0.512$) differiscono significativamente fra i due maschi delle coppie. E anche nel dataset ampliato queste variabili non differiscono fra gruppi sperimentali (per tutte le variabili $P>0.05$).

I sette parametri di velocità spermatica analizzata correlano significativamente fra loro (tabelle 6 e 7), pertanto si è utilizzato solamente la VAP nelle analisi successive.

Il successo di competizione spermatica (espresso come proporzione di figli del secondo maschio della coppia, p2) va da 0% a 100% (dataset ristretto: media \pm dev. standard= $54,27\pm 38,37$, $N=17$; dataset completo: media \pm dev. standard= 50.35 ± 27.54 ; $N=51$) e la varianza nel successo di competizione spermatica è maggiore dell'atteso binomiale, che è assunto sotto l'ipotesi nulla H_0 che i due maschi della coppia abbiano uguali probabilità di fecondare le uova, il cosiddetto modello "fair-raffle" della competizione spermatica (si veda Evans et al 2003 nature). I risultati della regressione logistica mostrano un effetto positivo significativo del numero di bundles (e cioè del numero di spermatozoi) inseminate ($P=0.037$) e della proporzione di macchie iridescenti presenti sulla livrea ($P=0.040$) sul successo di fecondazione di un maschio (tabella 8). In altre parole, all'interno di ciascuna coppia il maschio con più iridescenti e il maschio che insemina un numero maggiore di bundles ottiene una proporzione di piccoli maggiore dell'atteso. Nessuna delle caratteristiche degli spermatozoi risulta influire sul successo di competizione spermatica del maschio (in tutti i casi $P>0.05$; tabella 7). Non risulta nemmeno una correlazione fra colorazione iridescente e caratteristiche degli spermatozoi (Correlazione di Pearson, VAP: $r^2=0.175$, $P=0.219$, $N=102$; testa degli spermatozoi: $r^2=0.82$, $P=0.574$,

N=100; colpetto degli spermi: $r^2=-1.09$, $P=0.451$, N=100; coda degli spermi: $r^2=0.131$, $P=0.364$, N=100; numero di spermi per bundles: $r^2=0.131$, $P=0.364$, N=102).

Statistiche descrittive

	N	Minimo	Massimo	Media	Dev. standard
SL (mm)	34	16.94	21.16	18.71	1.16
% carotenoidi	34	2.60	20.22	9.29	3.89
% nero	34	.00	3.82	1.74	1.13
% iridescenti	34	.00	14.65	4.00	3.85
numero spermi per bundles	34	5750	33500	20228	7751
VAP	34	35.60	97.30	60.22	17.22
VSL	34	32.50	94.30	57.07	17.14
VCL	34	61.30	106.30	83.29	10.90
ALH	34	2.10	3.10	2.61	.27
BCF	34	23.40	38.60	30.48	3.89
STR	34	80.00	97.00	92.79	3.62
LIN	34	46.00	88.00	67.38	12.15
% spermi vivi	29	.00	99.38	85.85	18.96
testa	20	3.95	4.24	4.09	.08
colpetto	20	1.75	4.06	3.03	.71
coda	20	45.00	49.16	46.85	1.26

Tabella 4: Statistiche descrittive relative ai maschi del dataset ridotto.

Statistiche descrittive

	N	Minimo	Massimo	Media	Dev. standard
SL (mm)	102	15.95	22.90	18.79	1.40
% carotenoidi	102	2.60	22.88	10.91	3.79
% nero	102	.00	21.21	1.51	5.27
% iridescenti	102	.00	18.84	5.83	4.39
numero spermi per bundles	102	5750	33500	19936	7122
VAP	102	25.99	97.40	50.58	17.57
VSL	102	19.90	94.30	46.71	18.02
VCL	102	53.60	127.80	84.01	12.52
ALH	102	1.70	6.10	2.77	.44
BCF	102	18.75	51.80	34.87	6.59
STR	102	71.00	97.00	89.30	5.12
LIN	102	20.00	88.00	85.50	10.48
% spermi vivi	97	.00	99.38	64.65	15.27
testa	101	3.92	4.79	4.36	.22
colpetto	101	1.75	6.88	4.55	1.34
coda	101	40.31	51.50	45.86	2.05

Tabella 5: Statistiche descrittive dei maschi nel dataset completo (compresi i dati delle ulteriori 34 famiglie).

Correlazioni

		VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
VAP	Correlaz. di Pearson	1	.999**	.708**	.115	-.553*	.752**	.954**
	Sig. (2 code)		.000	.001	.660	.021	.000	.000
	N	34	34	34	34	34	34	34
VSL	Correlaz. di Pearson	.999**	1	.717**	.126	-.547*	.753**	.951**
	Sig. (2 code)	.000		.001	.631	.023	.000	.000
	N	34	34	34	34	34	34	34
VCL	Correlaz. di Pearson	.708**	.717**	1	.610**	-.019	.461	.483*
	Sig. (2 code)	.001	.001		.009	.943	.062	.050
	N	34	34	34	34	34	34	34
ALH	Correlaz. di Pearson	.115	.126	.610**	1	.333	.153	-.055
	Sig. (2 code)	.660	.631	.009		.192	.558	.834
	N	34	34	34	34	34	34	34
BCF	Correlaz. di Pearson	-.553*	-.547*	-.019	.333	1	-.265	-.706**
	Sig. (2 code)	.021	.023	.943	.192		.304	.002
	N	34	34	34	34	34	34	34
STR	Correlaz. di Pearson	.752**	.753**	.461	.153	-.265	1	.748**
	Sig. (2 code)	.000	.000	.062	.558	.304		.001
	N	34	34	34	34	34	34	34
LIN	Correlaz. di Pearson	.954**	.951**	.483*	-.055	-.706**	.748**	1
	Sig. (2 code)	.000	.000	.050	.834	.002	.001	
	N	34	34	34	34	34	34	34

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabella 6: Correlazioni fra i sette parametri di velocità spermatica considerati. Dataset ristretto.

Correlazioni

		VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
VAP	Correlaz. di Pearson	1	.995**	.549**	-.011	-.450**	.692**	.876**
	Sig. (2 code)		.000	.000	.937	.001	.000	.000
	N	102	102	102	102	102	102	102
VSL	Correlaz. di Pearson	.995**	1	.512**	-.048	-.480**	.733**	.901**
	Sig. (2 code)	.000		.000	.739	.000	.000	.000
	N	102	102	102	102	102	102	102
VCL	Correlaz. di Pearson	.549**	.512**	1	.608**	.325*	-.068	.114
	Sig. (2 code)	.000	.000		.000	.020	.633	.424
	N	102	102	102	102	102	102	102
ALH	Correlaz. di Pearson	-.011	-.048	.608**	1	.451**	-.328*	-.289*
	Sig. (2 code)	.937	.739	.000		.001	.019	.040
	N	102	102	102	102	102	102	102
BCF	Correlaz. di Pearson	-.450**	-.480**	.325*	.451**	1	-.678**	-.704**
	Sig. (2 code)	.001	.000	.020	.001		.000	.000
	N	102	102	102	102	102	102	102
STR	Correlaz. di Pearson	.692**	.733**	-.068	-.328*	-.678**	1	.897**
	Sig. (2 code)	.000	.000	.633	.019	.000		.000
	N	102	102	102	102	102	102	102
LIN	Correlaz. di Pearson	.876**	.901**	.114	-.289*	-.704**	.897**	1
	Sig. (2 code)	.000	.000	.424	.040	.000	.000	
	N	102	102	102	102	102	102	102

** La correlazione è significativa allo 0.01 (2 code).

* La correlazione è significativa allo 0.05 (2 code).

Tabella 7: Correlazioni fra i sette parametri di velocità spermatica analizzati. Dataset completo.

Stime dei parametri

Parametro	B	Errore standard	95% Intervallo di confidenza di Wald		Test dell'ipotesi		
			Inferiore	Superiore	Chi-quadrato di Wald	df	Correzione per confronti multipli
(Intercetta)	,002	,1688	-,329	,332	,000	1	,993
differenza bundles insem.	,082	,0394	,005	,159	4,338	1	,037
differenza % carotenoidi	-,044	,0269	-,097	,009	2,690	1	,101
differenza % nero	-,027	,0446	-,115	,060	,376	1	,540
differenza % iridescenti	,088	,0432	,004	,173	4,200	1	,040
differenza VAP	-,012	,0077	-,027	,003	2,358	1	,125
differenza lunghezza testa spermi	1,351	,8065	-,230	2,931	2,805	1	,094
differenza lunghezza coda spermi	-,061	,0634	-,186	,063	,940	1	,332
differenza lunghezza colletto spermi	-,290	,1769	-,637	,057	2,688	1	,101
(Scala)	3,006 ^a						

a. Calcolo basato sul chi-quadrato di Pearson.

Tabella 8: Risultati della regressione logistica. Il numero di piccoli attribuiti al maschio 2 è la variabile dipendente con distribuzione bimodale, la differenza fra i due maschi nella colorazione a carotenoidi, melanica e iridescente, nella dimensione di testa, colletto e coda degli spermi e nella VAP sono state introdotte nel modello come covariate. Tutte le differenze sono state calcolate come valore relativo al maschio 1 sottratto al valore relativo al maschio 2 (maschio 2- maschio 1).

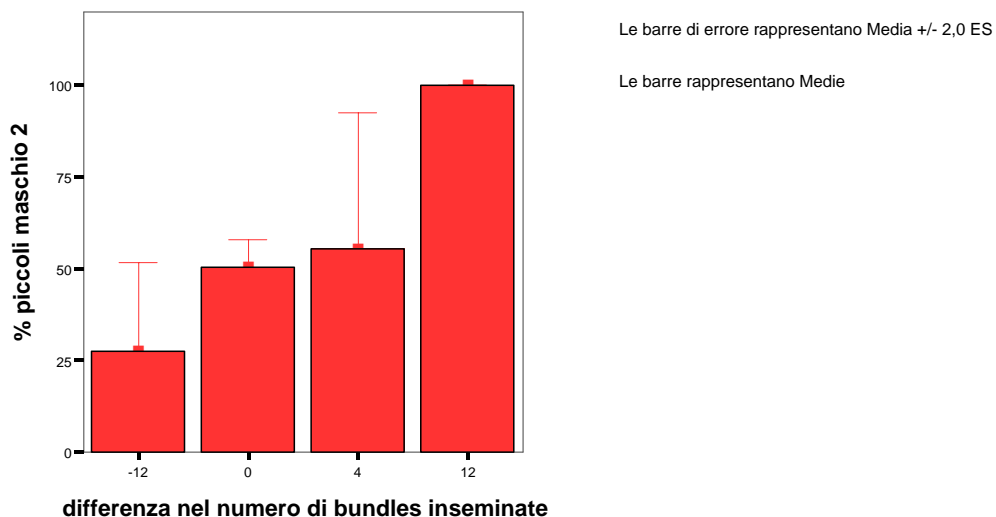


Figura 14: Il numero di bundles inseminate dal maschio 2 influisce significativamente sul suo successo di competizione spermatica: quando un maschio insemina un numero maggiore di spermi feconda anche un numero maggiore di uova. In figura il successo di competizione del maschio 2 è rappresentato dalla percentuale di piccoli attribuitigli, mentre il numero di bundles inseminate è rappresentato dalla differenza di bundles inseminate fra il maschio 2 e il maschio 1 della coppia. Dato che l'ordine era casuale, e che il maschio 2 non necessariamente inseminava un numero maggiore di spermi del maschio 1, il valore della differenza nel numero di bundles può assumere valori negativi.

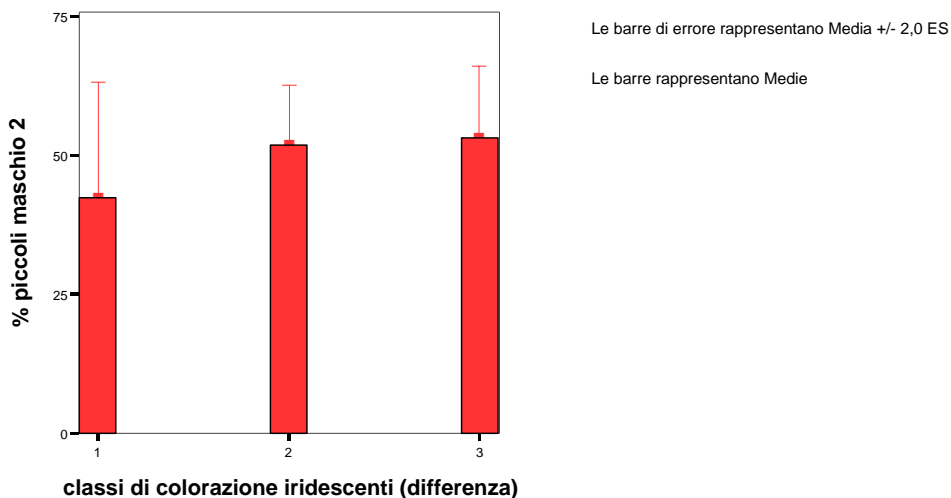


Figura 45: La proporzione di colorazione iridescente presente sulla livrea di un maschio influenza significativamente il suo successo di competizione spermatica: all'interno della coppia, il maschio con una proporzione maggiore di iridescenti feconda un numero maggiore di uova. In figura, la percentuale di macchie iridescenti dei maschi è stata suddivisa in tre categorie, per una miglior visualizzazione del grafico (classi 1, 2 e 3). Il successo di fecondazione è rappresentato dalla percentuale di figli attribuiti al secondo maschio della coppia.

4. DISCUSSIONE

Pilastro e collaboratori (2004) hanno dimostrato che il numero di spermatozoi trasferiti durante le copule consensuali dipende dalla percezione della femmina del fenotipo del maschio, ed è pertanto (almeno in parte) sotto controllo femminile. Un successivo lavoro, inoltre, ha individuato che il meccanismo (o almeno uno dei meccanismi) attraverso cui le femmine riescono ad accettare numeri diversi di spermatozoi da maschi diversi è la modulazione della durata della copula: infatti, il numero di spermatozoi trovati nel gonodotto femminile dopo la copula è direttamente proporzionale alla durata dell'accoppiamento (Pilastro et al., 2007b). Dai dati in mio possesso emerge che, almeno in questa popolazione, il numero degli spermatozoi che un maschio trasferisce è più importante della qualità degli spermatozoi stessi nel suo successo di competizione spermatica. Pertanto, l'abilità delle femmine di controllare il numero di spermatozoi trasferiti da un maschio durante la copula rappresenta una controstrategia femminile alle copule coercitive a cui esse sono continuamente esposte (Magurran, 1998): in questo modo le femmine possono minimizzare i costi in termini di paternità derivanti dall'accoppiamento con maschi non preferiti. Controllando il numero di spermatozoi inseminati durante la copula, una femmina che si accoppia con un maschio sub-ottimale si assicura sufficienti spermatozoi per fecondare tutte le sue uova; ma accettando un maggiore numero di spermatozoi da un maschio preferito, e avvantaggiandolo così in un contesto di competizione spermatica, la femmina può esercitare un controllo sulla paternità delle uova e favorire il maschio di migliore qualità fra quelli con cui si è accoppiata.

durante la fase recettiva, indipendentemente dall'ordine di accoppiamento (Evans and Magurran, 2001). Questo è anche in accordo con i risultati di Pitcher e colleghi (2003), e cioè che la probabilità che una femmina si riaccoppi dopo la prima copula è proporzionale alla percentuale di carotenoidi del secondo maschio.

In secondo luogo, questo esperimento ha individuato un effetto positivo della colorazione iridescente della livrea maschile sul successo di competizione spermatica. Precedentemente, era stato dimostrato che esiste una relazione fra la percentuale di colorazione a carotenoidi del maschio e il suo successo di fecondazione. Infatti, maschi con area relativa di macchie a carotenoidi nella livrea maggiore ottengono un numero maggiore di figli in copule naturali (Evans and Magurran, 2001; Pitcher et al., 2003) e in esperimenti di inseminazione artificiale in cui il numero di spermatozoi inseminati dai due maschi era mantenuto costante (Evans et al., 2003b). Tali risultati sono probabilmente imputabili alla forte correlazione esistente fra percentuale di carotenoidi di un maschio e qualità degli spermatozoi che produce: maschi con più carotenoidi producono spermatozoi più veloci e più longevi (Locatello et al., 2006; Pitcher et al., 2007), oltre ad avere maggiori scorte di spermatozoi (Pilastro et al., 2002) e tassi di rifornimento di tali riserve maggiori (A. Pilastro, dati non pubblicati). Nulla però era noto per quanto riguarda la colorazione ad iridescenti, almeno a livello postcopulatorio: in alcune popolazioni di *Poecilia reticulata*, ma non in quella considerata in questa tesi, si è riscontrato un ruolo degli iridescenti nella scelta femminile precopulatoria (Endler and Houde, 1995). Inoltre, non sembra esserci alcuna associazione fra la colorazione ad iridescenti e le caratteristiche qualitative degli spermatozoi da me prese in considerazione in questo esperimento (velocità, morfologia e vitalità). Ad ogni modo, di recente l'interesse per il ruolo delle colorazioni iridescenti nella selezione sessuale è andato via via crescendo: colorazioni strutturali (come quelle iridescenti) mostrano una certa variabilità individuale (Doucet et al., 2006) e sono usate come segnale di qualità del maschio in uccelli (Doucet and Montgomerie, 2003; Loyau et al., 2007) e insetti (Kemp, 2007), e sembrano indicare lo stato nutrizionale e di salute del maschio (Kemp and Rutowski, 2007; McGraw et al., 2002). Non vi sono, però, lavori a me noti che dimostrino una qualche relazione fra colorazioni strutturali e selezione sessuale postcopulatoria. L'esistenza di un ruolo degli iridescenti nel successo di competizione spermatica è confermato dai risultati del gruppo di ricerca del prof. Jonathan Evans dell'Università di Perth, Australia, che mostrano un effetto postcopulatorio degli iridescenti anche per quanto riguarda la popolazione australiana di *Poecilia reticulata* da loro presa in esame. Pertanto, con questo esperimento è emersa una nuova componente del successo di competizione spermatica precedentemente non considerata, anche se il meccanismo che lega la percentuale di iridescenti di un maschio e la fecondazione di un maggior numero di uova rimane da chiarire.

In conclusione, dai dati di questo esperimento emergono un effetto positivo del numero di spermatozoi inseminati e della colorazione iridescente di un maschio nel successo di competizione spermatica: in altre parole, all'interno della coppia, maschi che inseminano una maggior quantità di spermatozoi e maschi con una percentuale maggiore di colorazione iridescente fecondano un numero maggiore di uova rispetto all'altro maschio della coppia.

EXP.#3: STUDIO DELLA RIPETIBILITÀ DEL SUCCESSO DI COMPETIZIONE SPERMATICA

1. INTRODUZIONE

In molte specie animali le femmine sono sessualmente promiscue e il successo riproduttivo di un maschio è determinato dopo la copula attraverso la competizione spermatica e la scelta criptica femminile, oltre che attraverso meccanismi postzigotici, come la mortalità degli embrioni ed eventuali effetti materni (Birkhead, 2000; Parker, 1970). I modelli teorici tradizionali della selezione sessuale assumono che il successo riproduttivo sia costante per un maschio indipendentemente dalla femmina con cui esso si accoppia, perché l'efficienza riproduttiva del maschio e le preferenze femminili sono considerate misure ripetibili (Andersson, 1994). In altre parole, se il successo riproduttivo di un maschio è determinato in larga parte dalle sue caratteristiche fenotipiche o da quelle del suo eiaculato e dei suoi spermatozoi, ci si aspetta che il suo successo, come pure il risultato della competizione spermatica (e cioè il pattern di paternità riscontrato per una determinata specie), non dipenda dalla femmina con cui si è accoppiato e quindi sia simile quando si accoppia con femmine diverse. In molti studi, invece, è stata riscontrata una certa variabilità nel successo riproduttivo, e in particolare nel successo di competizione spermatica, dei maschi (Lewis and Austad, 1990). Molti di questi studi hanno imputato tale variabilità alle diverse caratteristiche competitive dei maschi, come ad aspetti legati al loro comportamento riproduttivo o alle caratteristiche dei loro spermatozoi e del loro eiaculato (Lewis and Austad, 1994; Radwan, 1996; Simmons and Parker, 1992). Ad ogni modo, anche in questi studi rimane una parte di varianza nel successo di competizione spermatica non spiegata da tali caratteristiche, e che, almeno in parte, può essere attribuita alla variabilità esistente anche nella biologia riproduttiva femminile (Wilson et al., 1997). In specie a fecondazione interna, in particolare, la competizione spermatica avviene all'interno del tratto riproduttivo femminile e pertanto risulta verosimile che in queste specie la variazione nel comportamento, nella morfologia o nella fisiologia femminili possa ripercuotersi nel successo di fecondazione di un individuo (Eberhard, 1996). In altre parole, la paternità può dipendere anche dall'interazione fra i due partner (Tregenza and Wedell, 2000) e non unicamente dal fenotipo del maschio o dei suoi spermatozoi. Aspetti legati al maschio, come ad esempio il numero di spermi inseminati o la qualità degli stessi (Birkhead and Pizzari, 2002; Birkhead et al., 1995; Pizzari and Birkhead, 2002), spesso mascherano effetti più sottili dovuti alla femmina o all'interazione fra i partner (Birkhead, 2000; Clark et al., 1999; Eberhard, 1996; Pitnick and Brown, 2000). Di conseguenza, la relativa importanza dei vari processi che intervengono dopo l'inseminazione può essere difficile da valutare.

Il confronto del successo di competizione spermatica di un maschio dopo accoppiamento con femmine diverse può fornire informazioni utili sull'importanza dell'interazione maschio-femmina nel determinare il successo di competizione spermatica. In letteratura, si possono trovare numerose dimostrazioni dell'influenza dell'interazione fra maschio e femmina, sia in specie a fecondazione esterna (Evans

and Marshall, 2005; Palumbi, 1999), sia in specie a fecondazione interna (Amitin and Pitnick, 2007; Bishop et al., 1996; House and Simmons, 2005; Nilsson et al., 2003; Tregenza and Wedell, 2002; Ward, 2000).

In *Drosophila melanogaster*, ad esempio, il successo degli spermatozoi di un maschio dipende dal genotipo della femmina con cui si è accoppiato (Clark et al., 1999) ed inoltre i maschi non mostrano ripetibilità nel loro successo di competizione spermatica (Bjork et al., 2007; Clark et al., 2000). Risultati simili sono stati ottenuti anche per *Callosobruchus maculatus* (Wilson et al., 1997) e per il gallo (*Gallus gallus*) (Birkhead et al., 2004).

In *Callosobruchus maculatus*, Wilson e colleghi (1997) hanno calcolato la ripetibilità del successo di competizione spermatica di un maschio dopo accoppiamento con tre diverse femmine. Hanno condotto degli esperimenti in cui una coppia di maschi è stata fatta accoppiare con tre femmine e in seguito all'analisi di paternità è stato determinato il relativo successo di fecondazione di ciascun maschio. I gruppi sperimentali erano due: nel primo le coppie di maschi venivano fatte accoppiare con tre femmine geneticamente simili (fra loro sorelle, ma non imparentate con i maschi), mentre nel secondo gruppo le tre femmine erano fra loro non imparentate e quindi assunte come geneticamente dissimili. Se la variazione nella biologia riproduttiva femminile determinata dal genotipo della femmina influenza il successo di un maschio nella competizione spermatica, il valore di p_2 ottenuto da ciascuna coppia di maschi sarà maggiormente ripetibile quando essa è accoppiata a femmine sorelle rispetto a quando è accoppiata a femmine non sorelle. I dati ottenuti rispettavano le previsioni: quando i due maschi erano fatti accoppiare con tre femmine sorelle il successo di competizione spermatica era ripetibile, a differenza del caso in cui fossero stati fatti accoppiare con femmine non imparentate.

Nel gallo (*Gallus gallus*), Birkhead e collaboratori (2004) hanno utilizzato la tecnica dell'inseminazione artificiale, in modo da controllare per eventuali effetti dovuti all'espulsione selettiva degli spermatozoi di maschi non preferiti da parte delle femmine (Pizzari and Birkhead, 2000), spiegando la mancata ripetibilità osservata come il risultato della scelta femminile degli spermatozoi o come effetto della differenziale mortalità degli embrioni.

In questo esperimento ho voluto verificare se in *Poecilia reticulata* il successo di competizione spermatica di un maschio variasse a seconda della femmina con cui si accoppia; in altre parole, che parte della varianza nel successo di competizione spermatica fosse imputabile unicamente alle caratteristiche intrinseche dell'eiaculato e degli spermatozoi di un maschio. Ho utilizzato la tecnica dell'inseminazione artificiale, che permette di controllare per possibili variabili confondenti come l'ordine di accoppiamento, il tempo trascorso fra un accoppiamento e il secondo, o effetti comportamentali femminili che possono in qualche modo influenzare l'esito della competizione spermatica (si vedano i materiali e metodi comuni). Sono state inseminate due femmine con numeri uguali di spermatozoi di due maschi, in modo da poter stimare l'effetto femminile sulla competizione spermatica. Se l'esito della competizione spermatica è in gran parte determinato dalla componente femminile mi aspetto che un maschio ottenga un gran numero di uova fecondate con una femmina, ma non necessariamente con una seconda femmina. Pertanto in questo studio ho condotto dei test di competizione spermatica confrontando il successo relativo di una stessa coppia di maschi quando inseminano due femmine diverse. In caso di un'influenza significativa dell'ambiente sul successo di fecondazione, ci si aspetta che il successo di un maschio sia diverso

nelle due femmine. Nel caso invece in cui siano le caratteristiche maschili di eiaculato e spermatozoi a determinare il successo di un maschio, ci si aspetta che la ripetibilità calcolata sia significativa, e cioè che il successo di un maschio non dipenda dalla femmina con cui si accoppia.

2. MATERIALI E METODI

Ho condotto dei test di competizione spermatica in cui veniva calcolato il relativo successo di fecondazione di ciascuno dei due maschi. In questo esperimento ho inseminato artificialmente due diverse femmine vergini non imparentate fra loro, con uguali numeri di spermatozoi di ciascun maschio, per ciascuna coppia. In questo modo, è stato possibile confrontare il successo della stessa coppia di maschi con due diverse femmine e misurare la ripetibilità del successo di fecondazione, ottenendo una stima della quantità di varianza nel successo di fecondazione di un individuo da attribuire alle sole caratteristiche del suo eiaculato e dei suoi spermatozoi. I maschi di ciascuna famiglia sono stati scelti in modo che non differissero nella percentuale di carotenoidi e di colorazione iridescente nella livrea, data la correlazione positiva fra le caratteristiche fenotipiche e successo di fecondazione e qualità dell'eiaculato di un maschio (Evans et al., 2003b; Locatello et al., 2006)(si vedano anche i risultati dell'esperimento 2).

Per calcolare la ripetibilità nel successo di competizione spermatica ho seguito il metodo descritto in Lessells & Boag (1987) (Lessells and Boag, 1987). La ripetibilità è una misura usata in genetica quantitativa per descrivere la proporzione di varianza in un carattere esistente fra campioni diversi piuttosto che all'interno degli individui di uno stesso campione. È un coefficiente di correlazione intra-classi che si basa sulle componenti della varianza derivate dall'analisi della varianza univariata (ANOVA). Il coefficiente di ripetibilità (r) può essere calcolato dal rapporto fra le varianze F e dai suoi gradi di libertà secondo la formula

$$r = (F-1)/(F-1+n)$$

dove

$$n = (df_1 + df_2 + 1)/(df_1 + 1)$$

Tanto più r si avvicina a 1 e tanto più una misura è ripetibile.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per le analisi statistiche è stato usato il software SPSS v.15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e i dati sono da considerarsi distribuiti normalmente. Dove questa condizione non poteva venire rispettata, si è provveduto ad una trasformazione in arcoseno prima delle analisi. Tutte le probabilità indicate sono a due code.

Né la percentuale di carotenoidi né quella di iridescenti risultano significativamente diverse nei due maschi componenti le coppie (% carotenoidi: $t_{19} = -1.631$, $P = 0.119$; % iridescenti: $t_{19} = 0.482$, $P = 0.635$), come nemmeno il numero di spermatozoi per bundles ($t_{19} = 0.994$; $P = 0.333$), a conferma della scelta bilanciata dei maschi e dell'inseminazione di uguali numeri di spermatozoi. (Per le statistiche descrittive relative al fenotipo del maschio si veda la tabella 9)

In totale sono state formate 20 famiglie, ciascuna composta da 2 maschi e 2 femmine, per un totale di 80 individui (40 maschi e 40 femmine) e 545 piccoli. Il numero medio di piccoli per famiglia è di 22.025 ± 7.393 (media \pm dev. standard), con un minimo di 3 e un massimo di 29 piccoli per famiglia. Il successo di competizione spermatica è stato attribuito sulla base della condivisione delle bande derivanti dalla genotipizzazione ai microsatelliti fra i piccoli, la madre e i padri putativi (si vedano i materiali e metodi comuni). Il successo di competizione spermatica è stato poi calcolato come proporzione di figli del secondo maschio (p2), e varia da 0 a 100% (media \pm dev. standard 50.73 ± 22.68). Questo risulta essere significativamente ripetibile ($r=0.40$, $P<0.05$; figura 16): in altre parole, un maschio che tende a vincere la competizione spermatica, fecondando più uova, con una femmina in media tende a vincere anche con la seconda femmina. Questo risultato conferma evidenze indirette già suggerite da precedenti lavori: in *Poecilia reticulata*, infatti, maschi con una percentuale di carotenoidi maggiore nella livrea ottengono un numero maggiore di uova fecondate in esperimenti di inseminazione artificiale in cui venivano inseminati numeri uguali di spermatozoi di due maschi competitori (Evans et al., 2003b). Tale risultato è probabilmente dovuto alla correlazione positiva fra percentuale di carotenoidi di un maschio e vitalità e velocità degli spermatozoi che un maschio produce (Locatello et al., 2006). Inoltre, maschi con più carotenoidi producono anche un maggior numero di spermatozoi (Pilastro et al., 2002).

In questo studio si è adottata la tecnica dell'inseminazione artificiale, che permette di inseminare un determinato numero di spermatozoi di maschi scelti senza che alla femmina sia permesso di vedere i maschi prima dell'inseminazione. Pertanto, non è possibile che i risultati ottenuti siano dovuti a meccanismi di controllo femminile della paternità basati sul fenotipo maschile, che portino a favorire il maschio preferito in fase postcopulatoria (Pilastro et al., 2007a; Pilastro et al., 2004). Non è nemmeno possibile imputare i risultati ad una diversa mortalità degli embrioni (dovuta ad esempio ad un riassorbimento degli embrioni) in base al fenotipo dei due maschi: in *Poecilia reticulata*, infatti, non vi sono differenze significative nel numero di piccoli prodotti da una femmina in relazione al fenotipo del maschio con cui è accoppiata, rigettando pertanto l'ipotesi che il diverso successo di un maschio possa essere dovuto alla mortalità differenziale degli embrioni (esperimento 1).

Il coefficiente di ripetibilità r , tuttavia, non è molto alto ($r=0.4$), suggerendo che rimane una parte importante, anche se non significativa, della varianza nel successo di competizione spermatica non spiegata dalle caratteristiche intrinseche dell'eiaculato e degli spermatozoi di un maschio. Pertanto, anche se alcuni maschi sono migliori competitori ed inseminatori di altri, vi è una parte del successo di fertilizzazione che può dipendere dalla femmina con cui un maschio si accoppia.

Quanto riscontrato è attribuibile ad aspetti legati alla scelta criptica femminile non direzionale, vale a dire all'interazione fra i genotipi dei due partner o fra gameti maschili e soma femminile. Pertanto, questo suggerirebbe che in *Poecilia reticulata* la compatibilità genetica fra i partner possa giocare un ruolo importante nel determinare il successo di competizione spermatica di un individuo. Con il termine compatibilità genetica, tuttavia, si tende ad indicare un grande numero di diversi meccanismi, come ad esempio la scelta di genotipi che aumentino l'eterozigosità della prole o di genotipi dissimili che permettano di evitare gli effetti nocivi dell'inbreeding e l'accoppiamento con consanguinei (Tregenza and Wedell, 2000). Dai dati a disposizione da questo studio, tuttavia, non è possibile risalire a quale meccanismo agisca in *Poecilia reticulata*. Indipendentemente dal meccanismo,

comunque, gli aspetti non direzionali possono avere importanti conseguenze evolutive: essi possono ad esempio contribuire a mantenere la promiscuità sessuale ed indebolire i meccanismi direzionali della selezione sessuale postcopulatoria, oltre che contribuire a mantenere la varianza riscontrata nei caratteri sessuali secondari (Birkhead and Pizzari, 2002; Tregenza and Wedell, 2000).

In conclusione, il successo di fecondazione è dovuto in parte significativa a caratteri maschili, ma una parte importante è giocata dalla biologia riproduttiva femminile.

	N	Minimo	Massimo	Media	Dev. standard
SL (mm)	40	15.95	22.6	18.86	1.50
Macchie a carotenoidi (%)	40	2.81	17.08	11.46	3.47
Macchie melaniche (%)	40	1.62	21.21	8.69	4.81
Macchie iridescenti (%)	40	1.44	18.84	5.96	4.63

Tabella 9: statistiche descrittive relative ai maschi utilizzati nell'esperimento.

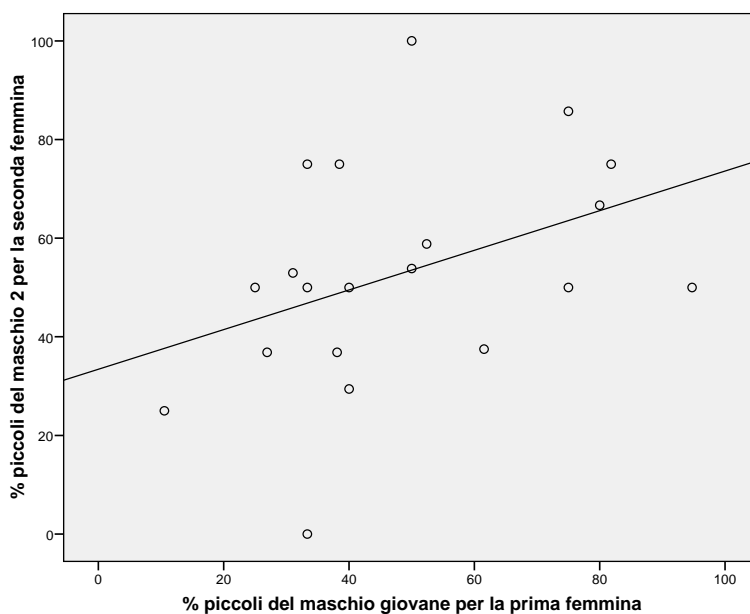


Figura 16: Confronto fra il successo di competizione spermatica del secondo maschio della coppia fra la prima e la seconda femmina di ciascuna famiglia.

EXP.#4: RUOLO DEI GENI MHC NELLA SCELTA CRIPTICA FEMMINILE NON DIREZIONALE

1. INTRODUZIONE

Nella selezione sessuale postcopulatoria, i due principali meccanismi che determinano il successo riproduttivo di un individuo sono la competizione spermatica e la scelta criptica femminile (Birkhead and Moller, 1998). Il primo meccanismo, analogo della selezione precopulatoria intrasessuale, è definito come la competizione da parte degli spermatozoi di maschi diversi per la fecondazione delle uova di una stessa femmina (Parker, 1970), mentre la scelta criptica femminile, corrispettivo postcopulatorio della scelta femminile darwiniana, comprende tutti i meccanismi sotto controllo femminile tramite cui la femmina può favorire i gameti di un determinato maschio nei processi di fecondazione delle uova (Eberhard, 1996). Tale scelta criptica femminile può essere direzionale in caso vengano favoriti i caratteri favoriti anche in fase precopulatoria, oppure ad essere favoriti possono essere caratteristiche di compatibilità fra i gameti maschile e femminile (scelta criptica femminile non direzionale). In quest'ultimo caso, non vengono favorite le caratteristiche assolute di un maschio, come ad esempio aspetti fenotipici o caratteristiche degli spermatozoi, ma piuttosto ci si aspetta che siano favoriti gli spermatozoi di maschi con i genotipi maggiormente compatibili con quello della femmina in questione con il loro, indipendentemente dalle loro caratteristiche fenotipiche.

Il meccanismo coinvolto nella valutazione del genotipo di un potenziale partner sulla base solo degli spermatozoi è tuttavia ancora poco chiaro. I principali candidati per questo processo sono regioni del genoma ad alto polimorfismo, come il Complesso Maggiore di Istocompatibilità dei Vertebrati (o MHC, *Major Histocompatibility Complex*) (Birkhead and Pizzari, 2002; Tregenza and Wedell, 2000), una famiglia multigenica estremamente polimorfica coinvolta nella resistenza ai parassiti e nella scelta femminile (Bernatchez and Landry, 2003).

1.1. IL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ

Il complesso MHC (*Major Histocompatibility Complex*) è di centrale importanza per il sistema immunitario dei Vertebrati, tanto da essere stato definito “il centro dell’universo immunitario” (Trowsdale, 1995), ed è caratterizzato dal maggior polimorfismo (in termini sia di numero di geni e varianti alleliche esistenti, sia di distanza genetica fra gli alleli) descritto per una famiglia genica nei Vertebrati. Il ruolo principale degli MHC è quello di riconoscere proteine estranee, presentarle a specifici linfociti e dare inizio così alla risposta immunitaria (Klein, 1986).

Le molecole MHC sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline e sono costituite da una porzione transmembrana (il dominio immunoglobulinico), che ancora le molecole alla membrana cellulare, e da una tasca di legame per il peptide (PBR, *Peptide Binding Region*).

All’interno delle cellule che presentano l’antigene avviene la **processazione proteolitica dell’antigene**, in cui si generano i peptidi che si legano alla molecola MHC: le proteine estranee che entrano nella cellula (a causa di infezioni virali o di

eventi di fagocitosi) vengono degradate in peptidi più piccoli, che possono essere contenuti nella tasca di legame del recettore MHC. Una volta legati, i peptidi e l'acqua ad essi associata riempiono la tasca, stabilendo contatti con gli altri amminoacidi del sito di riconoscimento dell'antigene. I residui del peptide che stabiliscono interazioni idrofobiche con la tasca si chiamano **residui ancora** e possono essere ubicati in mezzo o al termine della molecola del peptide. Ogni peptide ha solo 1 o 2 residui ancora, e ogni molecola MHC può riconoscere un certo numero di peptidi diversi, a condizione che abbiano residui amminoacidici in grado di formare interazioni non covalenti con i residui ancora della tasca di legame per l'antigene (Altuvia and Margalit, 2004). Nella conformazione ripiegata, i residui amminoacidici polimorfici sono situati all'interno e in prossimità della tasca di alloggio del peptide. I diversi MHC legano e presentano antigeni diversi e sono specificamente riconosciuti dal recettore per l'antigene di cloni linfocitari diversi. La tasca di alloggio del peptide si trova all'estremità N-terminale delle due catene, ed è composta da una coppia di α -eliche (che costituiscono le pareti della tasca) e da 8 nastri di foglietto β (che formano il pavimento della tasca). I domini non polimorfi, invece, costituiscono i siti di legame per i recettori CD4 (linfociti T-helper) e CD8 (cell citotossiche) dei linfociti T: CD4 e CD8 si comportano da corecettori.

Il complesso peptide/MHC così formato viene trasportato sulla superficie cellulare e viene riconosciuto da specifiche cellule linfocitarie: una porzione del peptide legato rimane esposta all'imboccatura della tasca dell'MHC e le catene laterali degli amminoacidi in questa porzione vengono riconosciute dai linfociti T, che interagiscono contemporaneamente anche con residui amminoacidici polimorfici delle α -eliche della molecola MHC.

La famiglia multigenica MHC è suddivisibile in due gruppi principali di molecole immunologicamente attive:

1.1.1. MOLECOLE MHC CLASSE I

Le molecole MHC classe I sono espresse sulla superficie di tutte le cellule nucleate, tranne le cellule spermatiche ed alcuni tipi di neuroni. Esse presentano a cellule T citotossiche CD8+ i peptidi derivanti da infezioni virali (Klein, 1986).

Dal punto di vista strutturale, le molecole classe I sono eterodimeri composti da due catene polipeptidiche associate in modo non covalente: una catena α (o catena pesante) di 44-47 KD, codificata nella regione MHC, e una catena β 2-microglobulinica non codificata nella regione MHC. La catena α ha tre domini transmembrana (α 1, α 2, α 3) ciascuno dei quali è codificato da un diverso esone di un solo gene. I residui C-terminali sporgono nel citoplasma; l'estremità N-terminale si divide in due segmenti (α 1 e α 2) di 90 amminoacidi ciascuno. α 1 e α 2 interagiscono a formare 8 foglietti β antiparalleli che sostengono le pareti di α elica. La tasca che si forma può ospitare peptidi di 8-11 amminoacidi in conformazione estesa. Quando le estremità della tasca sono chiuse peptidi più grandi di 11 amminoacidi non possono entrare, motivo per cui le proteine devono essere processate prima di venire legate ai recettori MHC classe I. I domini α 1 e α 2 contengono amminoacidi polimorfici, responsabili del legame dei peptidi e del riconoscimento dei cloni linfocitari T. α 3, invece, si ripiega a formare un dominio immunoglobulinico, la cui sequenza è conservata fra tutte le molecole classe I e contiene la regione di legame per il recettore CD8 dei linfociti T citotossici. La catena α 3 all'estremità C-terminale ha una sequenza di circa 25 amminoacidi idrofobici che attraversano la membrana

plasmatica, a seguito dei quali si trovano altri 30 amminoacidi che entrano nel citoplasma. Fra questi ci sono un gruppo di amminoacidi basici in grado di interagire con i gruppi fosfolipidici presenti sul foglietto interno della membrana plasmatica e ancorarvi la molecola MHC (Jeffrey and Bangham, 2000).

La catena leggera, invece, è codificata da un gene localizzato fuori della regione MHC e viene chiamata β 2-microglobulina. Essa interagisce in modo non covalente con il dominio α 3 della catena α , è strutturalmente omologa ad un dominio immunoglobulinico e non varia nelle diverse molecole MHC classe I.

1.1.2. MOLECOLE CLASSE II

Le molecole MHC classe II sono espresse sulle cellule ad attività fagocitica, come macrofagi, linfociti e cellule dendritiche. Esse presentano sulla superficie cellulare peptidi alle cellule T-helper CD4+ e sono associate con la risposta ad infezioni di parassiti e patogeni.

Dal punto di vista strutturale, le molecole MHC classe II sono formate da 2 catene polipeptidiche non associate in modo covalente: una catena α (32-34 KD) e una catena β (29-32 KD). Le due catene sono codificate da due geni diversi, altamente polimorfici, situati nella regione MHC. I segmenti terminali α 1 e β 1 delle molecole interagiscono per formare la tasca di legame per il peptide: i residui polimorfici sono localizzati in α 1 e β 1 all'interno e vicino alla tasca. A differenza delle molecole classe I, però, le estremità della tasca sono aperte e la tasca può alloggiare peptidi di dimensioni maggiori, oltre i 30 amminoacidi di lunghezza. Le catene α 2 e β 2, invece, si ripiegano a formare i domini immunoglobulinici e la loro sequenza è altamente conservata all'interno delle molecole classe II. In particolare, β 2 rappresenta la regione di legame con il recettore CD4.

Le molecole classe II appena sintetizzate sono associate ad un polipeptide non polimorfico, detto **catena invariante** (Ii), che svolge un ruolo importante nel traffico di molecole classe II all'interno della cellula.

L'architettura genetica delle regioni MHC è stata descritta per molte specie modello fra i Vertebrati, quali l'uomo (in cui il complesso MHC viene chiamato HLA; (Klein, 1986), topo (in cui viene chiamato H-2; (Younger et al., 2000)), ratto (detto RT-1; (Gunther and Walter, 2001; Hurt et al., 2004)) e pollo (detto B-locus; (Kaufman et al., 1999)). Inoltre, negli ultimi anni questa regione è stata descritta anche per numerose specie non modello (Baker et al., 2006; Bartl, 1998; Dijkstra et al., 2007; Flajnik, 2001; Grimholt et al., 2002; Kelley et al., 2005; Shiina et al., 2002).

Dal confronto dell'organizzazione genomica degli MHC nelle varie classi è emersa una stretta associazione fra i geni classe I e classe II in anfibi (Flajnik et al., 1999), uccelli (Kaufman et al., 1999) e mammiferi (Klein, 1986; Trowsdale, 1995), ma non nei pesci teleostei. Negli Euteleostei, infatti, le due classi di geni sono localizzate su due cromosomi separati e vi è anche un'ulteriore frammentazione dei *loci* classe II, che spesso sono localizzati su due diversi cromosomi (McConnell et al., 1998). Questa diversa organizzazione ha portato a chiedersi quale fosse l'organizzazione ancestrale per questa regione: dalla successiva caratterizzazione del complesso MHC nello squalo nutrice (*Ginglymostoma cirratum*) è emerso che anche in questa specie i due cluster genici (MHC classe I e II) sono in linkage fra di loro (Bartl, 1998), suggerendo pertanto che in un ipotetico antenato di tutti i gnatostomi i due gruppi fossero associati in un'unica regione e che si siano poi separati in un

qualche punto lungo la linea di discendenza che porta agli Euteleostei, successivo alla separazione con la linea che porta ai tetrapodi (Sato et al., 2000; Stet et al., 2003).

1.2. MHC E SCELTA FEMMINILE

I geni MHC sono coinvolti anche nella scelta femminile. Sono state proposte molte teorie, non mutualmente esclusive, per spiegare come i geni MHC possono influenzare il comportamento riproduttivo e il successo riproduttivo degli individui. Le principali prevedono che vi siano accoppiamenti disassortativi basati sul genotipo MHC dei potenziali partner (Penn and Potts, 1999) oppure che vi sia una fecondazione selettiva delle uova sulla base del genotipo MHC degli spermatozoi (Rulicke et al., 1998; Wedekind et al., 1996).

La scelta femminile basata sui geni MHC può essere utilizzata per evitare l'accoppiamento fra individui strettamente imparentati o geneticamente molto simili e può portare ad un aumento della diversità genetica della prole a questo *locus*, con un conseguente aumento anche della loro resistenza a patogeni e parassiti: dato che i geni MHC sono codominanti, individui eterozigoti hanno un maggior numero di tipi di molecole MHC espresse sulla superficie delle loro cellule e possono resistere ad un maggior numero di parassiti rispetto ad individui omozigoti; produrre prole con maggiori livelli di eterozigosità può, pertanto, portare ad un aumento della loro probabilità di sopravvivenza e della loro fitness.

Evidenze di un coinvolgimento dei geni MHC nella scelta del partner sono state ottenute per praticamente tutte le classi di Vertebrati (Bernatchez and Landry, 2003). In molti mammiferi, vi sono evidenze di un utilizzo di informazioni derivate dagli MHC (basate sul collegamento di questi geni con la formazione di sostanze volatili presenti nell'urina e nel sudore (Boehm and Zufall, 2006)) per il riconoscimento dei consanguinei e l'accoppiamento con individui non appartenenti alla famiglia e geneticamente dissimili (Jordan and Bruford, 1998; Ober, 1999; Penn and Potts, 1999), come topo (Manning et al., 1992; Potts et al., 1991); ratto (Brown et al., 1987; Singh et al., 1987) e uomo (Ober, 1999; Ober et al., 1997; Wedekind et al., 1995). Gli accoppiamenti disassortativi possono avere lo scopo di aumentare l'eterozigosità della prole agli MHC (**heterozygote advantage hypothesis**; (Apanius et al., 1997; Potts and Wakeland, 1990)) o di prevenire l'accoppiamento fra consanguinei (**Inbreeding avoidance hypothesis**; (Arkush et al., 2002)).

La maggior parte degli studi condotti su topo riguardanti le preferenze femminili basate sugli MHC hanno utilizzato individui identici per tutti i caratteri tranne che per il loro genotipo MHC (Penn and Potts, 1999) e hanno dimostrato che vi è una preferenza per accoppiamenti disassortativi in entrambi i sessi (Arcaro and Eklund, 1999; Eklund et al., 1991). Pattern simili, comunque, sono stati riscontrati anche per popolazioni naturali (Eklund, 1997).

Più di recente è stata dimostrata una scelta femminile basata sui geni MHC anche in numerose specie non modello in tutte le classi di Vertebrati: in pesci (Reusch et al., 2001) (Aeschlimann et al., 2003), rettili (Olsson et al., 2005; Olsson et al., 2003), uccelli (Freeman-Gallant et al., 2003; Richardson et al., 2005) e mammiferi (Penn and Potts, 1999). Invece, in pecora (*Ovis aries*) (Paterson and Pemberton, 1997), nel bufalo africano (*Syncerus caffer*) (Wenink et al., 1998), nel macaco reso (*Macaca mulatta*) (Sauermaun et al., 2001), nel cannareccione (*Acrocephalus arundinaceus*) (Westerdahl et al., 2004) e nel croccolone (*Gallinago*

media) (Ekblom et al., 2004), non è stata trovata evidenza di scelta femminile basata sui geni MHC.

In alcune specie è stata riscontrata una correlazione positiva fra sviluppo degli ornamenti maschili e genotipi MHC. Nel fagiano (*Phasianus cochicus*) il genotipo MHC (sia classe I sia classe II) correla con la lunghezza dello sperone dei maschi (von Schantz et al., 1996), mentre nel cervo *Odocoileus virginianus* è stata riscontrata associazione fra certi genotipi MHC e il tasso di sviluppo del palco dei maschi (Ditchkoff et al., 2001). Per entrambe queste specie è anche stato dimostrato che le femmine che si accoppiano con maschi con caratteri sessuali secondari più sviluppati producono prole con una maggior probabilità di sopravvivenza: data la relazione fra ornamenti e genotipo MHC è probabile che quest'ultimo risultato sia imputabile ad una maggior resistenza ai parassiti della prole.

Il meccanismo che lega gli MHC alla scelta femminile non è ben chiaro. Molti studi hanno riscontrato un ruolo del riconoscimento olfattivo e hanno proposto che questo potesse essere un meccanismo attraverso cui si potesse valutare il genotipo MHC di un partner (Brown and Eklund, 1994): i geni MHC possono influire sulla concentrazione di acidi volatili che producono un caratteristico odore nell'urina e nel sudore (Hurst et al., 2001; Singh et al., 1987; Wedekind and Furi, 1997; Wedekind et al., 1995). Questo può essere utilizzato come indizio per evitare l'accoppiamento con individui strettamente imparentati o può rappresentare un'indicazione dello stato infettivo di un individuo. Le femmine di topo, ad esempio, sono meno attratte dall'urina di un maschio quando questo è infettato con il virus dell'influenza rispetto a prima o dopo l'infezione (Penn and Potts, 1998). Nell'uomo i geni polimorfici per i recettori dell'olfatto sono localizzati nella regione MHC (Fan et al., 1995) e sia maschi che femmine preferiscono l'odore di individui dissimili per gli MHC da loro (Wedekind and Furi, 1997; Wedekind et al., 1995).

Anche alcune specie di pesci sono in grado di discriminare sulla base dell'odore il genotipo MHC degli individui: il salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*), ad esempio, è in grado di distinguere acqua in cui sono stati aggiunti estratti di epidermide di un individuo identico per i geni MHC classe II β al soggetto del test da individui dissimili, dimostrando di preferire il secondo caso e suggerendo un ruolo di qualche meccanismo che permette di valutare il genotipo di un individuo confrontandolo con il proprio (Olsen et al., 1998). In salmone atlantico (*Salmo salar*) è stato dimostrato che gli individui preferiscono accoppiarsi con individui caratterizzati da alleli MHC diversi dai propri, ottenendo in tal modo prole maggiormente eterozigote per i geni MHC (Landry et al., 2001). Altri studi hanno poi dimostrato accoppiamenti disassortativi sulla base del genotipo MHC nel passero delle praterie (*Passerculus sandwichensis*) (Freeman-Gallant et al 2003) e nella lucertola *Lacerta agilis* (Olsson et al., 2004; Olsson et al., 2003).

Ad ogni modo, la valutazione dell'immunocompetenza di un individuo può non essere basata sulla presenza o assenza di specifici aplotipi, ma sulla combinazione dei geni materni e paterni. Nel pettazzurro (*Luscinia svecica*), ad esempio, è stata confrontata la resistenza ai parassiti di piccoli provenienti da varie covate: pulcini nati da copule extra coppia hanno una maggior resistenza ai parassiti in confronto ai loro fratellastri, sia per parte materna sia per parte paterna. Questo suggerisce che la miglior qualità della prole sia dovuta a specifiche combinazioni alleliche più che alla qualità assoluta di uno dei due genitori (Johnsen et al., 2000).

Se entra in gioco un meccanismo di questo tipo, gli individui dovrebbero essere in grado di valutare non solo la qualità del partner ma anche quanto bene il

genotipo di quest'ultimo si complementa con il proprio. Nello spinarello (*Gasterosteus aculeatus*) in popolazioni naturali la maggior parte dei pesci ha un numero intermedio di alleli MHC classe II fra quelli possibili (Wegner et al., 2003b) ed è stato anche dimostrato che questi individui con un numero intermedio di alleli hanno anche un minor carico di parassiti (Wegner et al., 2003a; Wegner et al., 2003b). In successivi esperimenti, i ricercatori hanno trovato che questo livello ottimale è il risultato della scelta femminile: le femmine non preferivano maschi dissimili da loro (Reusch et al., 2001), ma piuttosto basavano la loro scelta sul proprio numero di alleli e sceglievano maschi che fossero complementari (Aeschlimann et al., 2003; Reusch et al., 2001). Femmine con molti alleli sceglievano maschi con pochi alleli e viceversa, in modo che la diversità della prole prodotta fosse al livello ottimale (Milinski, 2003). Risultati simili sono stati ottenuti anche per il passero domestico (*Passer domesticus*) (Bonneaud et al., 2004).

Se avere più alleli MHC conferisce un vantaggio, ci si aspetta che il numero medio di alleli in una popolazione sia in costante aumento. La probabile spiegazione per cui non si assiste a questo fenomeno è che ogni volta che una molecola MHC è aggiunta al repertorio di un individuo, i cloni di cellule T che possono riconoscere quella molecola devono essere rimosse in modo da evitare l'innescò della risposta immunitaria in seguito al legame con una cellula del proprio organismo. In tutte le cellule non infettate i peptidi derivanti dalla degradazione di proprie proteine (*self*) riempiono la tasca del peptide di molecole MHC classe I e classe II mature, e questi peptidi vengono presentati ai linfociti T. Dato il ruolo centrale delle cellule T nello stimolare l'innescò della risposta immunitaria diventa cruciale che i linfociti T maturi non reagiscano con le cellule che presentano i peptidi "*self*". Il numero di loci MHC presenti in una specie rappresenterebbe pertanto un trade-off tra il vantaggio di presentare un maggior numero di peptidi sulla superficie della cellula e il costo dovuto alla rimozione delle cellule T dal proprio repertorio (Janeway et al., 2001; Lawlor et al., 1990). Un individuo che esprima sulla superficie cellulare tutti i tipi di molecole MHC disponibili nella popolazione probabilmente non avrebbe più cellule T che possano reagire alla presenza di peptidi legati a queste molecole MHC (De Boer and Perelson, 1993; Nowak et al., 1992).

Gli MHC possono influenzare anche la scelta femminile postcopulatoria (Rulicke et al., 1998; Wedekind et al., 1996). Se la valutazione del genotipo MHC di un potenziale partner a livello precopulatorio non è possibile (perché la scelta femminile non è possibile a causa di elevati tassi di coercizione sessuale o perché non esistono informazioni per poter valutare il genotipo MHC del partner), è plausibile supporre che tale valutazione possa avvenire a livello postcopulatorio, attraverso l'interazione fra gameti o fra spermio e epitelio del tratto riproduttivo femminile (Ziegler et al., 2005; Ziegler and Uchanska-Ziegler, 2006) (scelta criptica femminile non direzionale). La selezione degli spermatozoi sulla base del genotipo MHC da questi portato potrebbe avvenire attraverso un coinvolgimento degli stessi recettori MHC espressi sulla superficie dei gameti e sull'epitelio dell'apparato riproduttore femminile oppure attraverso il coinvolgimento dei recettori dell'epitelio olfattivo e dell'organo vomeronasale, attraverso un meccanismo simile a quello coinvolto nel riconoscimento degli odori nelle relazioni sociali di molti animali. Quest'ultima ipotesi viene anche chiamata "**sperm receptor selection hypothesis**" (Ziegler et al., 2002; Ziegler et al., 2005). L'espressione dei recettori MHC sulla superficie degli spermatozoi è argomento di un acceso dibattito (Arnaiz-Villena and

Festenstein, 1976; Fellous and Dausset, 1970; Halim et al., 1982; Martin-Villa et al., 1999), mentre l'espressione dei recettori dell'epitelio olfattivo e dell'organo vomeronasale sulla superficie dei gameti maschili è stata dimostrata nell'uomo (Parmentier et al., 1992), nel topo (Branscomb et al., 2000) e nel cane (Vanderhaeghen et al., 1997). Inoltre, questi recettori espressi sulla superficie degli spermatozoi sono funzionali, influiscono sulla motilità spermatica dopo interazione con specifici ligandi ed esibiscono la stessa specificità dimostrata nell'epitelio olfattivo (Vanderhaeghen et al., 1997).

I dati presenti in letteratura riguardanti un possibile coinvolgimento dei geni MHC a livello postcopulatorio non danno un quadro chiaro della situazione, probabilmente anche a causa della complessità dei meccanismi coinvolti. Nell'uomo (Komlos et al., 1977; Ober et al., 1997; Schachter et al., 1984) e in alcune specie di primati (Knapp et al., 1996), femmine che si accoppiano con un maschio con lo stesso aplotipo MHC hanno una maggior probabilità di abortire. Ci sono anche alcune evidenze di un ridotto successo di schiusa delle uova in alcune specie di rettili (Witzell et al., 1999). Nell'uomo è stata anche riscontrata un'associazione fra genotipo MHC e qualità degli spermatozoi: maschi sterili differiscono nel loro genotipo HLA classe II rispetto ai maschi con spermatozoi normali (van der Ven et al., 2000); mentre in topo il genotipo femminile influenza la motilità degli spermatozoi ed un maggior numero di spermatozoi raggiunge l'ovidotto quando le femmine si accoppiano con maschi di un ceppo diverso dal loro (Nicol and McLaren, 1974). Topi infettati dal virus MHV (*Mouse Hepatitis Virus*) producono un maggior numero di embrioni eterozigoti ai loci MHC rispetto a topi di controllo, indicando che i genitori sono in grado di promuovere specifiche combinazioni di aplotipi durante la fecondazione, in base alla presenza di infezioni virali (Rulicke et al., 1998). Inoltre, Wedekind e collaboratori (1996) hanno dimostrato una fecondazione non casuale delle uova in relazione ai geni MHC dei gameti.

Nel salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*) si è osservato che maschi eterozigoti per il locus MHC classe II fecondavano una proporzione significativamente maggiore di uova rispetto a maschi omozigoti in contesto di competizione spermatica, senza però trovare un effetto della similarità genetica dei due individui (Skarstein et al., 2005). Non è stata, al contrario, trovata evidenza di questo fenomeno nel coregone bianco (*Coregonus sp.*) (Wedekind et al., 2004).

Nonostante i geni MHC siano tipici dei Vertebrati, ci sono indicazioni che sistemi simili di controllo della fertilizzazione sulla base della compatibilità genetica siano presenti in altri taxa (De Tommaso et al., 2005). Nell'ascidia coloniale a fecondazione interna *Botryllus* la fusione dei gameti è controllata da un locus di istocompatibilità altamente polimorfico, coinvolto anche nei processi di riconoscimento istologici (Scofield et al., 1982). Nell'ascidia *Botryllus primigenus*, la fecondazione non avviene se gli spermatozoi condividono un allele con il genotipo diploide materno (Bishop, 1996) e simili sistemi di valutazione della compatibilità fra genotipi materno e degli spermatozoi sembrano esistere anche in *B. schlosseri* (Scofield et al., 1982). In un'altra ascidia coloniale a fecondazione interna, *Diplosoma listerianum*, gli spermatozoi sono selezionati a livello dell'ovidotto e sono bloccati gli spermatozoi dello stesso individuo in modo da evitare l'autofecondazione (Bishop, 1996). Meccanismi simili sono stati dimostrati anche per l'ascidia a fecondazione esterna *Ciona intestinalis* (De Santis and Pinto, 1991).

Lo scopo di questo esperimento è quello di valutare il ruolo dei geni MHC nella scelta criptica femminile non direzionale in *Poecilia reticulata*. In questa

specie, poco è noto riguardo a questo processo. Dal calcolo della ripetibilità del successo di competizione spermatica (esperimento 3: studio della ripetibilità del successo di competizione spermatica) emerge, però, che una parte significativa del successo di fecondazione è dovuto alle caratteristiche dell'ejaculato maschile, ma che una parte importante è comunque imputabile a meccanismi non direzionali.

Per quanto riguarda gli MHC, in *Poecilia reticulata*, sono stati descritti un *locus* classe I e inizialmente un solo *locus* classe II (identificato come *Mhc-Pore DAB*), non in linkage fra di loro (Sato et al., 2000; Sato et al., 1996). In seguito, è stato identificato un secondo *locus* MHC classe II, non in linkage con il primo, e definito *Mhc-Pore DXB* (McConnell et al., 1998). Di recente, inoltre, è stata portata alla luce la probabile duplicazione del *locus* DAB: i recenti lavori di van Oosterhout e collaboratori (2006 a,b) hanno infatti riscontrato da 2 a 4 diversi alleli DAB per individuo. Questo risultato può essere spiegato con l'esistenza di almeno due loci DAB in popolazioni naturali di guppy.

In questa specie, è stato di recente dimostrato che le femmine non evitano attivamente gli accoppiamenti con consanguinei {Viken, 2006 #131}, nonostante esse siano in grado di discriminare fra parenti e individui che non hanno mai incontrato prima (Loekle et al., 1982). Dati i costi associati all'inbreeding in questa specie (Shikano and Taniguchi, 2003; Van Oosterhout et al., 2003) e la mancanza di un meccanismo precopulatorio di *inbreeding avoidance* è plausibile supporre un coinvolgimento di meccanismi postcopulatori non direzionali nella valutazione della compatibilità genetica di un partner.

2. MATERIALI E METODI

In questo esperimento, la variabilità al *locus* DAB MHC classe II β di un individuo è stata messa in relazione con il suo successo di competizione spermatica. Per controllare eventuali effetti confondenti riguardo alla determinazione del successo di fecondazione di un individuo si è scelto di adottare la tecnica dell'inseminazione artificiale, come descritto nella sezione materiali e metodi comuni. Ho utilizzato i dati relativi alla determinazione della paternità di 15 delle 20 famiglie considerate nell'esperimento precedente (EXP#3. Studio della ripetibilità della competizione spermatica). Ho genotipizzato i genitori (i due padri putativi e le due madri) per il *locus* MHC classe IIB, in modo da poter mettere in relazione il successo di fecondazione di un maschio con il suo genotipo MHC. Per una sola famiglia è stato possibile ottenere la genotipizzazione al *locus* MHC classe IIB di una sola femmina delle due, pertanto, il campione totale finale è di 59 individui, 30 maschi e 29 femmine. Adottando un disegno sperimentale a misure ripetute e inseminando due femmine diverse per ciascuna coppia di maschi (come era stato fatto per lo studio della ripetibilità del successo di competizione spermatica) è stato possibile considerare in maggior misura gli aspetti non direzionali del successo di fecondazione.

Per i protocolli dettagliati relativi al mantenimento dei soggetti sperimentali in laboratorio, all'estrazione degli spermatozoi, all'inseminazione artificiale e delle analisi di paternità si veda la sezione dedicata ai materiali e metodi comuni.

2.1. ANALISI GENOTIPO MHC

Il genotipo dell'esone 2 del *locus* MHC classe IIB di *Poecilia reticulata* è stato determinato tramite amplificazione, clonaggio e sequenziamento dei 59 individui. Il frammento amplificato comprende l'intero esone 2 del gene Pore-DAB, uno dei geni MHC classe II di *Poecilia reticulata*. L'esone 2 considerato codifica per il dominio β della tasca di alloggiamento del peptide della proteina MHC classe II e rappresenta pertanto una porzione ipervariabile del gene. I primers utilizzati sono descritti in Sato et al (1996), e sono stati utilizzati anche in altri lavori che si proponevano lo screening del polimorfismo a questo *locus* MHC in altre popolazioni di *Poecilia reticulata* (Sato et al., 2000; van Oosterhout et al., 2006a; van Oosterhout et al., 2006b).

Il protocollo di tipizzazione degli individui consisteva in: estrazione del DNA genomico, amplificazione mediante PCR del *locus* considerato, clonaggio dei prodotti di PCR e screening dei cloni mediante PCR e gel di agarosio, sequenziamento dei cloni positivi e analisi delle sequenze ottenute.

2.1.1. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

Inizialmente si è tentato di utilizzare i campioni di DNA estratto per le analisi di paternità, ma data la degradazione di tale DNA, si è preferito estrarre nuovamente tutti gli individui da un pezzo di tessuto che era stato appositamente conservato.

Per l'estrazione del DNA genomico si è utilizzato il kit di purificazione del DNA da tessuto animale "DNeasy Tissue" (Qiagen). Ciascun campione è stato aggiunto ad una soluzione contenente 8 μ l dell'enzima Proteinasi K (in modo da digerire le proteine presenti nel tessuto) e 180 μ l di un buffer specifico per la corretta azione dell'enzima (0.1 M EDTA pH 8, 0.05 M Tris pH 8). La soluzione così ottenuta è stata mescolata, centrifugata e incubata a 55°C fino alla completa digestione dei tessuti (tale tempo è estremamente variabile e dipende dalla quantità di tessuto utilizzata. Il tempo di incubazione comunque non ha mai ecceduto le due ore). Per favorire la completa digestione dei tessuti le provette (appositamente contrassegnate) sono state agitate mediante Vortex ad intervalli regolari. Una volta ottenuta la completa lisi del tessuto, i campioni sono stati incubati a 70°C per 10 minuti, al fine di inattivare la Proteinasi K.

A questo punto, si è passati al trattamento con RNasi, enzima in grado di digerire completamente tutto l'RNA eventualmente presente nel lisato. Sono stati aggiunti 4 μ l di RNasi (100 mg/ml) e le provette sono state incubate a temperatura ambiente per circa due minuti.

In seguito sono state seguite le istruzioni del produttore (Qiagen) riportate nel manuale di istruzioni del kit per estrazione del DNA da tessuto. I vari passaggi consistevano nell'aggiunta di una serie di buffer forniti nel kit e di una serie di centrifugazioni dopo aver posto i campioni su delle membrane, in modo da separare in modo graduale e selettivo le varie componenti, lasciando in ultima sulla membrana il DNA estratto.

A questo punto, il DNA è stato eluito in 50 μ l di acqua BDH precedentemente scaldata, in modo che la membrana si imbibisse bene e fosse possibile rimuovere dalla membrana la maggior quantità possibile di DNA. Il DNA genomico estratto è

stato conservato in freezer a -80°C oppure utilizzato immediatamente per l'amplificazione.

2.1.2. AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

L'amplificazione ha avuto luogo in un volume totale di 20 µl, contenente una concentrazione finale di ciascun primer di 0.75 µM, 0,2 mM di ciascun dNTP, buffer di reazione (già comprensivo della corretta concentrazione di MgCl₂) e Taq polimerasi (GE Healthcare) come su indicazione del fornitore. Il profilo della PCR consisteva in un passaggio iniziale a 94°C di 3 minuti seguito da 35 cicli di amplificazione con il profilo 94°C per 1 minuto, 52°C per 30 secondi, 72°C per 90 secondi. Tutte le reazioni di PCR prevedevano anche un controllo negativo senza DNA, per verificare l'assenza di contaminazioni nei reagenti che avrebbero potuto falsare l'interpretazione dei risultati. I prodotti di amplificazione risultati sono di 273 paia di basi e sono stati risolti con un gel di agarosio all'1,8% in tampone TAE 0.5x (Tris Base 20 mM, acido acetico 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.0).

Nome	Sequenza 5'-3'	T _M	Dimensione
Tu1292 F	5'GTGGATTCAGAGAATATGCAG3'	52°C	21
Tu 1293 R	5'TGATTTATCCAGAGCGGTTTG3'	52°C	21

Tabella 10: Primers utilizzati per l'amplificazione del locus DAB di *Poecilia reticulata*.

2.1.3. CLONAGGIO DEI PRODOTTI DI PCR E SCREENING DEI CLONI

Una volta ottenuto il prodotto di PCR si è proceduto al clonaggio di tutti gli individui utilizzando il kit pGEM-T (Promega). Il protocollo suggerito dal produttore è stato ottimizzato, in modo da ottenere una buona resa con la minor quantità possibile di reagenti.

Con il termine "clonaggio" si indica l'insieme di procedimenti necessari per l'inserimento di una data sequenza di DNA all'interno di un opportuno vettore di clonazione. Le molecole di DNA ricombinante, prodotte dall'unione dei frammenti di restrizione ai vettori di clonazione per opera dell'enzima DNA ligasi, vengono utilizzate per trasformare cellule batteriche che, moltiplicandosi, producono una discendenza di cellule (clone), permettendo in questo modo di ottenere numerose copie della sequenza inserita (o transgene). Inoltre, dato che le cellule batteriche contengono una sola copia del vettore ciascuna, il clonaggio permette di separare i diversi alleli di un dato gene proveniente da un individuo eterozigote e conoscerne l'esatta sequenza (che altrimenti non sarebbe inferibile).

Dopo aver verificato l'effettiva amplificazione, 0.6 µl del prodotto di PCR sono stati ligati con 1 µl di buffer, 0.2 µl del vettore e 0.2 µl dell'enzima ligasi. Le provette sono state quindi incubate a 4°C per tutta la notte. Il vettore utilizzato in questo kit è il "pGEM-T Easy Vector" (Promega), un vettore linearizzato di lunghezza pari a 3015 paia di basi. Come altri vettori utilizzati per il clonaggio esso presenta dei frammenti di restrizione, un gene che conferisce resistenza all'antibiotico Ampicillina e il gene LacZ, all'interno del quale è inserito il polilinker. E' pertanto possibile eseguire la selezione dei cloni positivi sulla base di una reazione colorimetrica mediata dall'analogo del galattosio X-Gal.

Il giorno successivo si sono aggiunte a ciascuna provetta 10 μ l di cellule competenti (*E. coli*, fornite nel kit), e sono state poi lasciate in ghiaccio per 30 minuti. A questo punto si è provveduto allo shock termico a 42°C per 30 secondi, dopodichè le provette sono state di nuovo riposte in ghiaccio per due minuti. E' stato poi aggiunto il SOC (2% bacto triptone, 0.5% estratto di lievito, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosio) per indurre la trasformazione e le cellule sono state lasciate crescere per 90 minuti a 37°C in agitazione a circa 180 rpm.

Aliquote di batteri (50 μ l) sono state successivamente distribuite su piastre Petri di 9 cm di diametro, contenenti 20 ml di terreno LB (bacto triptone 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7) agarizzato (10 mg/l) a cui sono stati aggiunti 100 mg/l di antibiotico di selezione (Ampicillina) e i substrati di reazione per l'enzima β -galattosidasi: IPTG (isopropil-tiogalattoside; analogo del lattosio) 0.2 mM e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galattoside; substrato cromogeno della β -galattosidasi) 80 μ g/ml, sciolto in dimetilformammide, DMF. Le cellule sono state lasciate crescere a 37°C per circa 16 ore. Sono state previste due piastre Petri per ciascun campione.

Le colonie batteriche risultate positive (cioè quelle che hanno incorporato il frammento di DNA) sono state poi piccate, risospese in 10 μ l di acqua BDH, e poi amplificate in un volume totale di 20 μ l contenente 1 μ l di ciascuno dei primers universali M13 e T7, 2 μ l di dNTP (da stock 2 mM), 2 μ l di Taq buffer (GE Healthcare, già provvisto di MgCl₂) e Taq polimerasi (GE Healthcare, nelle dosi indicate dal produttore). Il profilo di PCR utilizzato per l'amplificazione dei cloni prevedeva un passaggio iniziale a 95°C per 2 minuti, 33 cicli composti da 95°C per 30 secondi, 56°C per 1 minuto e 72°C per 90 secondi, seguito da un ultimo passaggio a 72°C per 5 minuti.

Il prodotto di PCR è stato risolto su gel di agarosio 1,8% in tampone TAE 0.5x (Tris Base 20 mM, acido acetico 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.0).

2.1.4. SEQUENZIAMENTO DEI CLONI POSITIVI E ANALISI DELLE SEQUENZE OTTENUTE

Il sequenziamento dei cloni positivi è stato eseguito dal servizio sequenziamento del BMR Genomics. Dopo aver controllato i risultati dell'amplificazione delle colonie, gli amplificati sono stati purificati tramite reazione enzimatica (utilizzando l'enzima Exosap-IT (USB Corporation), che contiene gli enzimi esonucleasi I e fosfatasi alcalina in uno specifico buffer di reazione) in modo da togliere tutti i residui di reagenti per PCR rimasti nella soluzione. Dopo aver aggiunto 1 μ l di Exosap-IT a ciascun amplificato, le provette sono state incubate a 37°C per 15 minuti e poi a 80°C per altri 15 minuti. Gli amplificati così trattati sono stati messi in piastre da 96 campioni, vi sono state aggiunte 3.2 pmoli del primer con cui doveva avvenire il sequenziamento e sono stati poi seccati ed inviati al servizio di sequenziamento del BMR Genomics.

Sono stati sequenziati 10 cloni per individuo, e le sequenze così ottenute sono state analizzate tramite il software MEGA 4. In questo modo si sono ottenute informazioni relative al numero di alleli di ciascun individuo, al numero di alleli condivisi fra ciascun maschio e ciascuna delle due femmine. In particolare, visto che ci sono da 1 a 4 alleli per individuo, si è scelto di utilizzare nelle analisi la proporzione di alleli condivisi sul numero di alleli totali, in modo da ottenere una

variabile numerica che andasse da 1 (in caso di totale condivisione degli alleli) a 0 (nel caso in cui nessun allele risultasse condiviso) per tutti gli individui, indipendentemente dal numero assoluto di alleli. Si è poi calcolato il cambiamento di similarità relativa di un maschio fra le due femmine, per differenza fra la proporzione di alleli condivisi con ciascuna femmina dal maschio 1 e dal maschio 2 (similarità del maschio 1 con la seconda femmina meno la similarità del maschio 1 con la prima femmina). Valori alti di questa variabile indicano che il maschio 1 è più dissimile dalla seconda femmina che dalla prima.

3. RISULTATI

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS v.15 per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I dati sono stati controllati per la distribuzione normale e per l'omogeneità della varianza. In caso queste assunzioni non fossero rispettate, i dati sono stati opportunamente trasformati (trasformazione arcoseno) prima delle analisi. Tutte le probabilità indicate sono da considerarsi a due code.

Complessivamente, sono state analizzate 15 famiglie, per un totale di 59 adulti (30 maschi e 29 femmine) e 360 piccoli (range 3-29; media \pm dev. standard = $12,41 \pm 7,913$). Dopo la caratterizzazione degli adulti per il gene DAB, sono state trovate da 1 a 4 sequenze (alleli) per individuo, con una media di 2 alleli per individuo (media \pm dev. standard = $2,11 \pm 0,95$) confermando la probabile duplicazione del locus già ipotizzata per altre popolazioni di *Poecilia reticulata* (van Oosterhout et al., 2006a; van Oosterhout et al., 2006b). La duplicazione di loci genici è uno dei meccanismi proposti per l'evoluzione del polimorfismo di famiglie multigeniche come gli MHC (Klein et al., 1993; Nei et al., 1997): il meccanismo prevedrebbe l'iniziale duplicazione di una regione del genoma e la sua successiva diversificazione funzionale (Hughes, 1999). La duplicazione dei geni MHC è un fenomeno molto diffuso (Axtner and Sommer, 2007; Baker et al., 2006) e si pensa che abbia guidato la diversificazione degli MHC nei pesci, con i teleostei più primitivi caratterizzati da un numero inferiore di geni MHC rispetto alle specie di derivazione più recente (Miller et al., 2002; Schaschl and Wegner, 2007; van Oosterhout et al., 2006a).

Nella popolazione considerata in questo esperimento, ho trovato 14 diversi aplotipi, caratterizzati da frequenze di distribuzione molto diverse fra loro (tabella 11 e figura 17). In altre due popolazioni (provenienti dalla parte alta e dalla parte bassa del corso del fiume Aripo nell'isola di Trinidad) van Oosterhout e colleghi (2006 a, b) hanno descritto rispettivamente 15 e 16 diversi aplotipi, differenti però da quelli da me ritrovati per la popolazione in esame. Nonostante non vi siano alleli comuni, anche nel loro caso la distribuzione degli alleli nella popolazione (con un campione di dimensioni paragonabili a quello da me utilizzato) mostra pochi alleli molto frequenti e i rimanenti rappresentati in pochi individui.

Nel mio campione, il numero medio di alleli condivisi è di $0,9 \pm 0,772$ (media \pm dev. standard, range 0-4).

Le caratteristiche fenotipiche di un maschio non correlano con il numero di alleli MHC (SL: $r^2 = -0,212$, $P = 0,260$; % carotenoidi: $r^2 = 0,22$, $P = 0,908$; % nero: $r^2 = 0,045$, $P = 0,813$; % iridescenti: $r^2 = 0,112$, $P = 0,557$; numero di spermatozoi per bundles: $r^2 = 0,007$, $P = 0,971$; VAP: $r^2 = -0,149$, $P = 0,431$).

Avendo inseminato due femmine per ciascuna coppia di maschi è stato possibile mettere in relazione con il genotipo MHC la differenza del successo di un maschio con le due femmine: per fare questo, si è calcolata la differenza di successo (numero di piccoli) di uno dei due maschi della coppia e la si è messa in relazione con la similarità relativa del maschio con le due femmine. Se nell'interazione fra genotipi sono favoriti gli spermatozoi che presentano genotipi diversi rispetto a quello della femmina al *locus* MHC analizzato (come si è visto può succedere in altre specie; si veda l'introduzione di questo capitolo) ci si aspetta che, per ciascuna coppia, il maschio con una proporzione maggiore di alleli non condivisi con la femmina abbia, in media, un successo di fecondazione superiore. Il cambiamento di similarità di un maschio fra le due femmine correla positivamente con la differenza di successo di quel maschio con le due femmine ($r^2=0.545$, $P=0.044$) (figura 18; tabella 12).

nome aplotipo	Numero di individui	frequenza (%)
a1	55	93,22
a3	25	42,37
a2	18	30,51
a6	5	8,47
a10	3	5,08
a13	2	3,39
a12	1	1,69
a14	1	1,69
a15	1	1,69
a4	1	1,69
a5	1	1,69
a7	1	1,69
a8	1	1,69
a9	1	1,69

Tabella 11: Distribuzione degli aplotipi per il gene DAB individuati nella popolazione considerata. Nella tabella è riportato il nome attribuito all'aplotipo, il numero di individui nel campione in cui esso è stato ritrovato e la frequenza relativa di ciascun aplotipo.

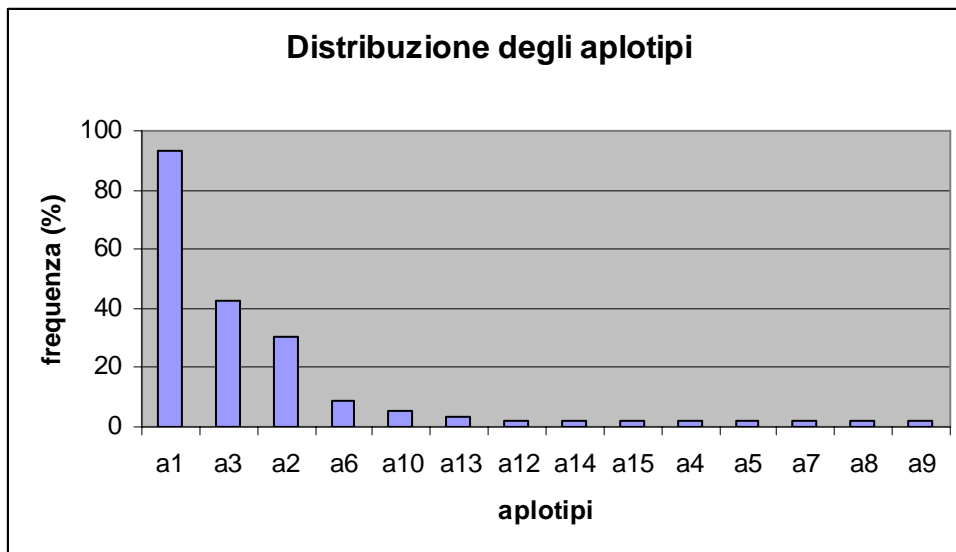


Figura 17: grafico rappresentante la distribuzione (frequenze) degli aplotipi.

Correlazioni

		differenza di successo del maschio 1 con le due femmine	cambiamento di similarità relativa del maschio 1 fra le due femmine
differenza di successo del maschio 1 con le due femmine	Correlazione di Pearson	1	.545*
	Sig. (2-code)		.044
	N	20	14
cambiamento di similarità relativa del maschio 1 fra le due femmine	Correlazione di Pearson	.545*	1
	Sig. (2-code)	.044	
	N	14	14

*. La correlazione è significativa per valori inferiori allo 0.05 (a due code)

Tabella 12: Correlazione fra la differenza di successo del primo maschio della coppia con le due femmine (femmina2-femmina1) e il cambiamento di similarità relativa del maschio 1 fra le due femmine. Se l'interazione fra i due partner porta alla fecondazione delle uova da parte di maschi con genotipi MHC più dissimili da quello della femmina, ci si aspetta che queste due variabili correlino positivamente fra loro; se vengono favoriti genotipi più simili, che le due variabili correlino negativamente, mentre se non vi è alcun effetto del genotipo MHC la correlazione dovrebbe risultare non significativa.

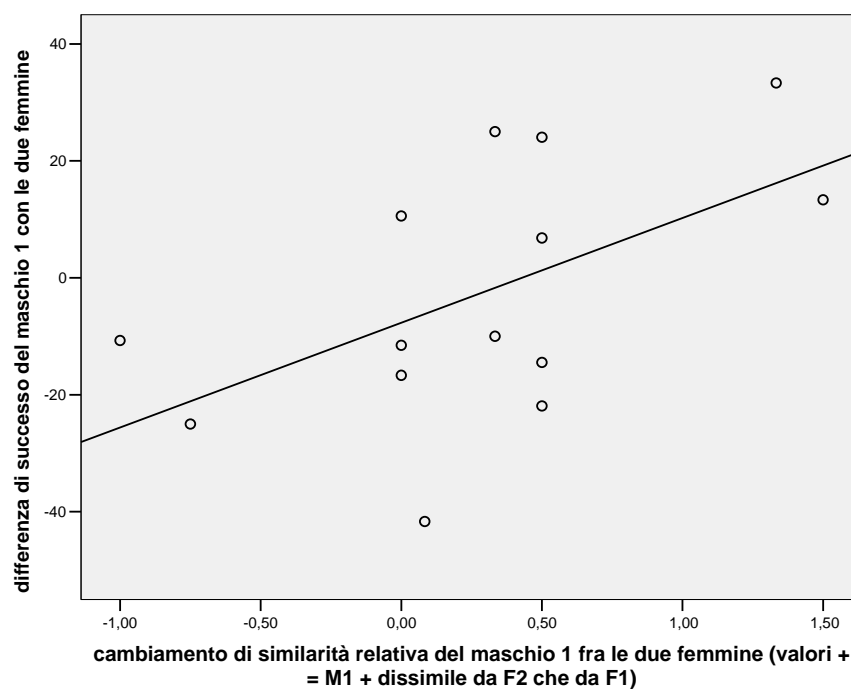


Figura 18: Grafico riportante la relazione fra la differenza di successo del maschio 1 con le due femmine (se passando dalla seconda alla prima femmina egli ha fecondato un numero maggiore o minore di uova) e il cambiamento di similarità relativa del maschio 1 fra le due femmine. Come indicato in figura, valori alti di quest'ultima variabile si ottengono se il maschio 1 è più dissimile (ha una proporzione inferiore di alleli condivisi) con la seconda femmina che con la prima.

4. DISCUSSIONE

Questo esperimento è il primo in cui si sia analizzata la variabilità al *locus* MHC classe IIB, e in particolare al gene MHC-Pore DAB, nella popolazione da me presa in considerazione. Nel campione di 59 individui preso in esame si sono trovati 14 diversi aplotipi per il gene preso in esame, sia per quanto riguarda la sequenza nucleotidica sia per la sequenza amminoacidica. Questo valore è simile al numero di alleli trovati di recente da van Oosterhout e collaboratori (2006) per altre due popolazioni di *Poecilia reticulata*. La distribuzione degli alleli è piuttosto diseguale (tabella 11; figura 17), con tre alleli molto frequenti (dal 93.22 % al 30.51 %), mentre gli altri sono alleli che sono stati ritrovati in uno o pochi individui. Il pattern di distribuzione, comunque, si avvicina a quello descritto da van Oosterhout e collaboratori (2006). Inoltre, si sono riscontrati da 1 a 4 sequenze per ciascun individuo, confermando la probabile duplicazione di questo *locus* ipotizzata per le altre popolazioni (van Oosterhout et al., 2006a; van Oosterhout et al., 2006b). La duplicazione di loci nella regione MHC sembra essere un processo molto importante per l'evoluzione della complessità di questa famiglia. Sono stati proposti due modelli, non mutualmente esclusivi per l'evoluzione dei geni MHC: la generazione di nuovi alleli può derivare da eventi di conversione in cui intervengono scambi di sequenze fra alleli diversi di uno stesso *locus* o di loci diversi, formando così nuove varianti (Parham and Otha, 1996). Un altro modello proposto per la generazione di nuovi alleli è il “birth and death model”, che prevede la produzione di nuovi geni ortologhi attraverso la duplicazione di sequenze geniche che poi, attraverso l'accumulo di mutazioni, divergono nella loro funzione (Nei et al., 1997). Alcuni degli alleli così formati rimarranno nel genoma, mentre altri possono essere eliminati dalla selezione o divenire pseudogeni (Nei and Rooney, 2005). Geni MHC duplicati sono stati di recente descritti in molte specie animali (Axtner and Sommer, 2007; Baker et al., 2006; Harf and Sommer, 2005; Miller and Lambert, 2004; Phillips et al., 2003; Reusch et al., 2004; Schwensow et al., 2007).

Lo scopo di questo esperimento era quello di valutare l'influenza del genotipo MHC di un maschio sulla scelta criptica femminile non direzionale. La “genetic compatibility hypothesis” prevede che le femmine, attraverso l'interazione fra gli spermatozoi e le loro uova o fra gli spermatozoi e il loro apparato riproduttivo, selezionino gli spermatozoi di maschi con genotipi maggiormente compatibili. Questo avverrebbe se non esistono indizi precopulatori che permettano la discriminazione dei potenziali partner sulla base del loro genotipo o se la scelta femminile non è possibile (Zeh and Zeh, 1996). Il genotipo MHC può essere utilizzato come marcatore del grado di similarità fra due individui, e viene usato in molte specie per ridurre il rischio di accoppiarsi con consanguinei (rischio di inbreeding) (Bonneaud et al., 2006; Milinski, 2006; Penn and Potts, 1999). *Poecilia reticulata* ha un olfatto sviluppato (Shohet and Watt, 2004) e sembra essere in grado di riconoscere individui imparentati (Loekle et al., 1982), anche se questo sembra avvenire più sul grado di familiarità di un individuo che sulla suo reale grado di parentela (Griffiths and Magurran, 1999). Ciò nonostante, le femmine di guppy non sembrano evitare in modo attivo accoppiamenti con individui imparentati (Viken et al., 2006), e in questa specie le femmine preferiscono accoppiarsi con un maschio che non hanno mai visto piuttosto che con un maschio già incontrato prima, suggerendo che la discriminazione sulla base della

familiarità sia il metodo precopulatorio utilizzato in questa specie per evitare l'inbreeding (Zajitschek et al., 2006). I costi legati agli accoppiamenti con individui geneticamente simili, in questa specie, sono alti (Mariette et al., 2006): l'inbreeding in guppy ha effetto negativo sulla tolleranza alla salinità e sulla sopravvivenza, sulla frequenza di accoppiamento di un maschio e sull'area delle macchie della livrea maschile (Van Oosterhout et al., 2003) (Shikano and Taniguchi, 2003). Inoltre, non è inusuale che questi pesci rimangano in pozze isolate o semiisolate (Houde, 1997), aumentando in questo modo il potenziale rischio di accoppiarsi con consanguinei. Considerati questi aspetti e l'elevato tasso di coercizione sessuale che caratterizza questa specie, è plausibile ipotizzare l'esistenza di un meccanismo postcopulatorio in grado di selezionare gli spermatozoi maggiormente compatibili e con una minor similarità genetica con la femmina. I risultati ottenuti per *Poecilia reticulata* sono in linea con questa teoria: all'interno della coppia, il maschio che ha un grado di similarità genetica inferiore con la femmina ha un maggior successo di fecondazione (figura 18). Il disegno sperimentale adottato prevedeva l'inseminazione di due diverse femmine, non imparentate fra loro, con la stessa coppia di maschi, e la determinazione della differenza di successo di fecondazione di un maschio con le due femmine. I risultati di questo esperimento dimostrano che quando, in un contesto di competizione spermatica, un maschio fra le due femmine passa da una condizione di maggior similarità genetica con la seconda femmina, il suo successo di fecondazione diminuisce. E, viceversa, se esso è meno geneticamente simile per gli MHC con la seconda femmina feconda in questo caso un maggior numero di piccoli rispetto alla prima femmina. Resta da verificare se questi risultati siano dovuti ad uno specifico effetto del genotipo MHC, o se siano causati dalla similarità genetica generale del maschio con la femmina. In questo secondo caso, l'interazione fra partner non avviene sulla base di un singolo *locus* genico, e l'effetto degli MHC potrebbe essere solamente un riflesso di una situazione più generale (Sherborne et al., 2007).

CONCLUSIONI GENERALI

Lo scopo di questa tesi è quello di determinare la relativa importanza dei meccanismi sotto influenza maschile e femminile nel successo di competizione spermatica. Alla luce di quanto emerso dagli esperimenti condotti si può affermare che, in *Poecilia reticulata*, gli aspetti direzionali della selezione sessuale postcopulatoria hanno un'importanza maggiore rispetto agli aspetti non direzionali, ed in particolare, gioca un ruolo fondamentale il numero di spermatozoi inseminati da un maschio, un carattere noto in questa specie per essere sotto controllo (almeno parzialmente) femminile (Pilastro et al., 2007b; Pilastro et al., 2004). In questa specie, sono conosciuti vari aspetti della selezione sessuale postcopulatoria direzionale, che mettono in relazione la percentuale di carotenoidi (il carattere maschile preferito dalle femmine in fase precopulatoria) sia con la competizione spermatica sia con la scelta femminile. Infatti, maschi con una percentuale di carotenoidi maggiore producono più spermatozoi (Pilastro and Bisazza, 1999), di miglior qualità (Locatello et al., 2006) e fecondano un numero maggiore di uova rispetto a maschi meno colorati sia durante copule naturali (Evans and Magurran, 2001) sia in esperimenti in cui il numero di spermatozoi inseminati da un maschio era mantenuto sperimentalmente costante (Evans et al., 2003b). Dall'altro lato, le femmine accettano un numero maggiore di spermatozoi durante le copule sollecitate da maschi che esse percepiscono come più attraenti (Pilastro et al., 2004), e di recente è stato anche determinato che il meccanismo di tale controllo femminile è la manipolazione della durata della copula (Pilastro et al., 2007b). Da questo contesto, emerge che i maschi con più carotenoidi sono migliori competitori degli altri, e vengono anche aiutati dalle femmine attraverso la scelta criptica.

La percentuale di carotenoidi, tuttavia, non sembra segnalare alle femmine le abilità di fertilizzazione di un maschio, come emerge dall'esperimento 1: né il numero di spermatozoi inseminati, né la percentuale di carotenoidi di un maschio influenza il numero di piccoli prodotti dalla femmina né il tempo intercorso dal momento dell'inseminazione al parto. Questi risultati hanno messo in luce che la femmina non ottiene una maggior fecondità dall'accoppiamento con maschi con più carotenoidi, come era stato invece previsto dalla *Phenotype-linked fertility hypothesis* (Sheldon, 1994). Data la mancanza di benefici della promiscuità femminile legati ad un aumento della fecondità della femmina, i dati di questo esperimento mi portano a supporre che in questa specie l'evoluzione e il mantenimento della promiscuità sessuale e della preferenza femminile per maschi con caratteri sessuali secondari più sviluppati siano guidati dai benefici già indicati per questa specie (Brooks, 2000; Evans et al., 2004; Evans and Magurran, 2000; Grether et al., 2004; Houde, 1992; Kennedy et al., 1987; Reynolds and Gross, 1992).

Lo studio della ripetibilità del successo di competizione spermatica ha, poi, messo in luce che in questa specie il successo di un maschio è attribuibile alle caratteristiche intrinseche del suo eiaculato e dei suoi spermatozoi. Infatti, un maschio che vince la competizione spermatica in una femmina, in media tende a vincerla anche con le altre femmine. Questo risultato è probabilmente dovuto al fatto che alcuni maschi producono spermatozoi con caratteristiche qualitative migliori di altri (Locatello et al., 2006). Questo risultato era suggerito, comunque, dai risultati

del primo esperimento: il fatto che la percentuale di carotenoidi di un maschio non influisse sul numero di piccoli prodotti da femmine che erano state inseminate artificialmente (erano pertanto stati controllati possibili effetti di allocazione differenziale materna) suggeriva che non vi fosse mortalità (o riassorbimento) differenziale degli embrioni durante la gestazione sulla base del fenotipo del padre.

Dal secondo esperimento (importanza relativa di numero e qualità degli spermatozoi nel successo di competizione spermatica) emerge che il numero di spermatozoi inseminati da un maschio è più importante della qualità degli stessi nel suo successo di fecondazione. Il numero degli spermatozoi trasferiti durante accoppiamenti consensuali è sotto il controllo della femmina (Pilastro et al., 2007b; Pilastro et al., 2004), e i risultati da me ottenuti mettono in risalto che gli aspetti sotto controllo femminile sono più importanti di quelli sotto controllo maschile per determinare la paternità delle uova. Questo fenomeno sembra essere un controadattamento femminile alle continue copule coercitive, che permette alla femmina di favorire il maschio preferito nella competizione spermatica. Con questo esperimento, inoltre, è emerso un effetto precedentemente sconosciuto nel successo di competizione spermatica della percentuale di iridescenti espressa sulla livrea di un maschio. Data la mancanza di correlazione fra tale componente del color pattern maschile e le caratteristiche spermatiche da me misurate non è chiaro quale sia il meccanismo che lega colorazione ad iridescenti e successo di fecondazione. Questo aspetto richiede un ulteriore approfondimento.

Nel terzo esperimento ho calcolato la ripetibilità del successo di competizione spermatica di un maschio: dopo aver inseminato artificialmente due femmine per famiglia con gli spermatozoi della stessa coppia di maschi, è risultato che, in media, un maschio che vince la competizione spermatica con una femmina, la vince anche con la seconda femmina. Questo conferma che siano le caratteristiche degli spermatozoi e dell'eiaculato di un maschio che gli conferiscono un maggior successo di fecondazione. Tuttavia, il valore della ripetibilità è basso e suggerisce che una parte consistente, anche se non significativa, del successo di fecondazione è probabilmente dovuta a meccanismi non direzionali. Pertanto, ho voluto considerare anche l'importanza di un meccanismo non direzionale e nella fattispecie ho preso in considerazione il ruolo dei geni MHC nella scelta criptica femminile. Un ruolo di tali geni nella scelta criptica è stato più volte ipotizzato, data l'alta variabilità caratteristica di questa regione (Bernatchez and Landry, 2003) e dato che l'espressione di tali geni o di recettori ad essi legati è stata più volte ipotizzata ed oggetto di dibattito negli ultimi anni (Desoye et al., 1991; Martin-Villa et al., 1999; Ziegler et al., 2002). Inoltre, nonostante il sistema MHC sia caratteristico dei Vertebrati, ci sono indicazioni che in altre specie la scelta femminile e la compatibilità genetica sono sotto il controllo di gruppi di geni simili agli MHC: in *Botryllus* sp., e in altre specie di tunicati, la fecondazione dei gameti è controllata da un *locus* di istocompatibilità altamente polimorfico (Bishop, 1996; De Tommaso et al., 2005; Scofield et al., 1982). In *Poecilia reticulata*, sembra che siano favoriti in fase postcopulatoria maschi con genotipi MHC più dissimili dalla femmina, anche se rimane da verificare se questo sia un effetto proprio di questa regione del genoma, o se sia solamente un riflesso della minor similarità genetica generale dell'individuo che ha un maggior successo. Pertanto, una parte della varianza del successo di competizione spermatica che nel terzo esperimento era stata attribuita a processi non direzionali può essere spiegata da un effetto negativo della similarità genetica fra maschio e femmina nel successo di fecondazione. Tuttavia, il disegno sperimentale

adottato prevedeva l'inseminazione di uguali numeri di spermatozoi dei due maschi della coppia. In questa specie, in copule naturali, il numero di spermatozoi inseminati non è uguale per maschi diversi, anche perché è un carattere sotto controllo femminile, utilizzato per sbilanciare la paternità a favore del maschio preferito (esperimento 2). Queste considerazioni unite alla significativa ripetibilità del successo di un maschio (esperimento 3), mi portano a concludere che, comunque, tale effetto della similarità genetica sia di importanza inferiore ai meccanismi direzionali.

In conclusione, dagli esperimenti di questa tesi emerge che 1) le femmine non ottengono benefici di fecondità dall'accoppiamento con maschi con caratteri sessuali secondari più sviluppati; 2) il numero degli spermatozoi inseminati è un miglior predittore del successo di un maschio nella competizione spermatica rispetto alla qualità degli spermatozoi; 3) un effetto positivo significativo della percentuale di iridescenti di un maschio sul suo successo nella competizione spermatica; 4) il successo di fecondazione di un maschio è significativamente ripetibile; 5) vi è un effetto negativo della similarità ai geni MHC nel successo di fecondazione di un maschio. Tutti questi risultati assieme mostrano che in questa specie i meccanismi direzionali contribuiscono maggiormente al successo di un maschio rispetto ai meccanismi non direzionali, anche se una parte della varianza del successo di fecondazione è spiegata da meccanismi non direzionali, fra i quali la compatibilità genetica dei due partner.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahams MV, 1993. The trade off between foraging and courting in male guppy. *Animal Behaviour* 45:673-681.
- Aeschlimann PB, Haberli MA, Reusch TB, Boehm T, Milinski M, 2003. Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54:119-126.
- Altuvia Y, Margalit H, 2004. A structure-based approach for prediction of MHC-binding peptides. *Methods* 34:454-459.
- Amitin EG, Pitnick S, 2007. Influence of developmental environment on male- and female-mediated sperm precedence in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 20:381-391.
- Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW, Rubinstein DC, 1996. Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics* 13 390-391.
- Andersson M, 1986. Evolution of condition dependent sex ornaments and mating preferences: sexual selection based on viability differences. *Evolution* 40:804-816.
- Andersson M, 1994. *Sexual selection*. Princeton, N.J: Princeton University Press.
- Andersson M, 2005. Evolution of classical polyandry: Three steps to female emancipation. *Ethology* 111:1-23.
- Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK, 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* 17:179-224.
- Arcaro KF, Eklund A, 1999. A review of MHC-based mate preferences and fostering experiments in two congenic strains of mice. *Genetica* 104:241-244.
- Arkush KD, Giese AR, Mendonca HL, McBride AM, Marty GD, Hedrick PW, 2002. Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes. *Canadian Journal of Zoology* 59:966-975.
- Arnaiz-Villena A, Festenstein H, 1976. A review of MHC-based mate preferences and fostering experiments in two congenic strains of mice. *Genetica* 104:241-244.
- Arnqvist G, Danielsson I, 1999. Copulatory behavior, genital morphology and male fertilization success in water striders. *Evolution* 53:147-156.

- Arnqvist G, Nilsson T, 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* 60:145-164.
- Axtner J, Sommer S, 2007. Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II DRB genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Immunogenetics* 59:417-426.
- Baerends GP, Brouwer R, Waterbolk HT, 1955. Ethological studies on *Lebistes reticulatus* (Peters). An analysis of the male courtship pattern. *Behaviour* 8:249-334.
- Baker CS, Vant MD, Dalebout ML, Lento GM, O'Brien SJ, Yuhki N, 2006. Diversity and duplication of DQB and DRB-like genes of the MHC in baleen whales (suborder: Mysticeti). *Immunogenetics* 58:283-296.
- Ball MA, Parker GA, 1996. Sperm competition games: external fertilization and 'adaptive' infertility. *Journal of Theoretical Biology* 180:141-150.
- Barnett M, Telford SR, Tibbles BJ, 1995. Female mediation of sperm competition in the millipede *Alloporus uncinatus* (Diplopoda: Spirostreptidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36:413-419.
- Bartl S, 1998. What sharks can tell us about the evolution of MHC genes. *Immunological Reviews* 166:317-331.
- Bateman AJ, 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2:349-368.
- Becher SA, Magurran AE, 2004. Multiple mating and reproductive skew in Trinidadian guppies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:1009-1014.
- Becher SA, Russell ST, Magurran AE, 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). *Molecular Ecology Notes* 2:456-458.
- Berkeley SA, Chapman C, Sogard SM, 2004. Maternal age as a determinant of larval growth and survival in a marine fish, *Sebastes melanops*. *Ecology* 85:1258-1264.
- Bernasconi G, Hellriegel B, Heyland A, Ward PI, 2002. Sperm survival in the female reproductive tract in the fly *Scathophaga stercoraria* (L.). *Journal of Insect Physiology* 48:197-203.
- Bernatchez L, Landry C, 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* 16:363-377.
- Billard R, 1969. La sperm spermatogenese de *Poecilia reticulata*. *Annales de Biologie animale Biochimie Biophysique* 9:251-271.

- Billard R, 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction, Nutrition, Développement* 26:877-920.
- Billard R, Cosson MP, 1990. The energetics of fish sperm motility. In: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects* (Gagnon C, ed). Boca Raton, Florida: CRC Press; 155-173.
- Billard R, Cosson MP, 1992. Some Problems Related to the Assessment of Sperm Motility in Fresh-Water Fish. *Journal of Experimental Zoology* 261:122-131.
- Birkhead T, Moller AP, 1992. *Sperm Competition in Birds: evolutionary causes and consequences*. New York: Academic Press.
- Birkhead T, Moller AP, Sutherland WJ, 1993. Why do females make it so difficult for males to fertilize their eggs? *Journal of Theoretical Biology* 161:51-60.
- Birkhead TR, 2000. Defining and demonstrating postcopulatory female choice-again. *Evolution* 54:1057-1060.
- Birkhead TR, Chaline N, Biggins JD, Burke T, Pizzari T, 2004. Nontransitivity of paternity in a bird. *Evolution* 58:416-420.
- Birkhead TR, Fletcher F, 1995. Male phenotype and ejaculate quality in the zebra finch *Taeniopygia guttata*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 262:329-334.
- Birkhead TR, Martinez JG, Burke T, Froman DP, 1999. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1759-1764.
- Birkhead TR, Moller AP, 1998. *Sperm Competition and Sexual Selection*. London: Academic Press.
- Birkhead TR, Petrie M, 1995. Ejaculate features and sperm utilization in peafowl (*Pavo cristatus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261:153-158.
- Birkhead TR, Pizzari T, 2002. Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics* 3:262-273.
- Birkhead TR, Wishart GJ, Biggins JD, 1995. Sperm Precedence in the Domestic Fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261:285-292.
- Bisazza A, Grapputo A, Nigro L, 1997. Evolution of reproductive strategies and male sexual ornaments in poeciliid fishes as inferred by mitochondrial 16 rRNA gene phylogeny. *Ethology Ecology and Evolution* 9:55-67.
- Bischoff RJ, Gould JL, Rubenstein DL, 1985. Tail size and female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 17:253-255.

- Bishop JDD, 1996. Female Control of Paternity in the Internally Fertilizing Compound Ascidian *Diplosoma listerianum*. I. Autoradiographic Investigation of Sperm Movements in the Female Reproductive Tract. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 263:369-376.
- Bishop JDD, Jones CS, Noble LR, 1996. Female Control of Paternity in the Internally Fertilizing Compound Ascidian *Diplosoma listerianum*. II. Investigation of Male Mating Success Using RAPD Markers. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 263:401-407.
- Bjork A, Starmer WT, Higginson DM, Rhodes CJ, Pitnick S, 2007. Complex interactions with females and rival males limit the evolution of sperm offence and defence. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 274:1779-1788.
- Blanckenhorn WU, Hosken DJ, Martin OY, Reim C, Teuschl Y, Ward PI, 2002. The costs of copulating in the dung fly *Sepsis cynipsea*. Behavioral Ecology 13:353-358.
- Blount JD, Moller AP, Houston DC, 2001. Antioxidants, showy males and sperm quality. Ecology Letters 4:393-396.
- Boehm T, Zufall F, 2006. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. Trends in Neurosciences 29:100-107.
- Bonneaud C, Chastel O, Federici P, Westerdahl H, Sorci G, 2006. Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 273:1111-1116.
- Bonneaud C, Mazuc J, Chastel O, Westerdahl H, Sorci G, 2004. Terminal investment induced by immune challenge and fitness traits associated with major histocompatibility complex in the house sparrow. Evolution 58:2823-2830.
- Bozynski CC, Liley NR, 2003. The effect of female presence on spermiation, and of male sexual activity on 'ready' sperm in the male guppy. Animal Behaviour 65:53-58.
- Branscomb A, Seger J, White RL, 2000. Evolution of odorant receptors expressed in mammalian testes. Genetics 156:785-797.
- Bressac C, Joly D, Devaux J, Serres C, Feneux D, Lachaise D, 1991. Comparative kinetics of short and long sperm in sperm dimorphic *Drosophila* species. Cell Motility and the Cytoskeleton 19:269-274.
- Briskie JV, Montgomerie R, 1992. Sperm size and sperm competition in birds. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 247:89-95.
- Brooks R, 1996. Melanin as a visual signal amplifier in male guppies. Naturwissenschaften 83:39-41.

- Brooks R, 2000. Negative genetic correlation between male sexual attractiveness and survival. *Nature* 406:67-70.
- Brown JL, Eklund A, 1994. Kin recognition and the major histocompatibility complex: an integrative review. *American Naturalist* 143:435-461.
- Brown RE, Singh PB, Roser B, 1987. The major histocompatibility complex: an integrative review. *American Naturalist* 143:435-461.
- Burness G, Casselman SJ, Schulte-Hostedde AI, Moyes CD, Montgomerie R, 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56:65-70.
- Bussiere LF, Hunt J, Jennions MD, Brooks R, 2006. Sexual conflict and cryptic female choice in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Evolution* 60:792-800.
- Carrè D, Sardet C, 1984. Fertilization and early development in *Beroë ovata*. *Developmental Biology* 105:188-195.
- Casselman SJ, Montgomerie R, 2004. Sperm traits in relation to male quality in colonial spawning bluegill. *Journal of Fish Biology* 64:1700-1711.
- Chapman T, Liddle LF, Kalb JM, Wolfner MF, Partridge L, 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373:241-244.
- Charnov EL, 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton: Princeton University Press.
- Charnov EL, 1993. *Life history invariants*. Oxford: Oxford University Press.
- Clark AG, Begun DJ, Prout T, 1999. Female x Male Interactions in *Drosophila* Sperm Competition. *Science* 283:217-220.
- Clark AG, Dermitzakis ET, Civetta A, 2000. Nontransitivity of sperm precedence in *Drosophila*. *Evolution* 54:1030-1035.
- Clark E, Aronson LR, 1951. Sexual behavior in the guppy, *Lebistes reticulatus* (Peters). *Zoological Science* 36:49-66.
- Constantz GD, 1989. Reproductive biology of Poeciliid fishes. In: *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)* (Meffe GK, Snelson FF, eds). Englewood Cliffs: Prentice Hall; 33-50.
- Cordero C, 1995. Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behavior: honest or arbitrary traits? *Journal of Theoretical Biology* 174:453-461.

- Cordoba-Aguilar A, 2002. Sensory trap as the mechanism of sexual selection in a damselfly genitalic trait (Insecta: Calopterygidae). *American Naturalist* 160:594-601.
- Crudgington HS, Siva-Jothy MT, 2000. Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407:655-656.
- Cunningham EJA, Cheng KM, 1999. Biases in sperm use in the mallard: no evidence for selection by females based on sperm genotype. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:905-905.
- Danielsson I, Askenmo C, 1999. Male genital traits and mating interval affect male fertilization success in the water strider *Gerris lacustris*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46:149-156.
- Darwin C, 1871. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London: Murray.
- De Boer RJ, Perelson AS, 1993. How diverse should the immune system be? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 252:171-175.
- De Santis R, Pinto MR, 1991. Gamete self-discrimination in ascidians - a role for the follicle cells. *Molecular Reproduction and Development* 29:47-50.
- De Tommaso AW, Nyholm SV, Palmeri KJ, Ishizuka KJ, Ludington WB, Mitchel K, Weissman IL, 2005. Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature* 438:454-459.
- Desoye G, Dohr GA, Ziegler A, 1991. Expression of Human Major Histocompatibility Antigens on Germ-Cells and Early Preimplantation Embryos. *Laboratory Investigation* 64:306-312.
- Dijkstra JM, Katagiri T, Hosomichi K, Yanagiya K, Inoko H, Ototake M, Aoki T, Hashimoto K, Shiina T, 2007. A third broad lineage of major histocompatibility complex (MHC) class I in teleost fish; MHC class II linkage and processed genes. *Immunogenetics* 59:305-321.
- Ditchkoff SS, Lochmiller RL, Masters RE, Hooper SR, Van Den Bussche RA, 2001. Major-histocompatibility-complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): evidence for good-genes advertisement. *Evolution* 55:616-625.
- Doucet SM, Montgomerie R, 2003. Structural plumage colour and parasites in satin bowerbirds *Ptilonorhynchus violaceus*: implications for sexual selection. *Journal of Avian Biology* 34:237-242.
- Doucet SM, Shawkey MD, Hill GE, Montgomerie R, 2006. Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *Journal of Experimental Biology* 209:380-390.

- Droney DC, 1998. The influence of the nutritional content of the adult male diet on testis mass, body condition and courtship vigour in a Hawaiian *Drosophila*. *Functional Ecology* 12:920-928.
- Dugatkin LA, Godin JG, 1993. Female mate copying in the guppy (*Poecilia reticulata*): age-dependent effects. *Behavioral Ecology* 4:289-292.
- Dussault GV, Kramer VL, 1981. Food and feeding behaviour of the guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Canadian Journal of Zoology* 59:684-701.
- Eberhard WG, 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Eberhard WG, 1998. Female roles in sperm competition. In: *Sperm Competition and Sexual Selection* (Birkhead TR, Moller AP, eds). London: Academic Press.
- Eisen JA, 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites Evolution and Applications* (Goldstein DB, Schlötterer C, eds). Oxford: Oxford University Press; 34-48.
- Eizaguirre C, Laloï D, Massot M, Richard M, Federici P, Clobert J, 2007. Condition dependence of reproductive strategy and the benefits of polyandry in a viviparous lizard. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 274:425-430.
- Eklom R, Saether SA, Grahn M, Fiske P, Kalas JA, Hoglund J, 2004. Major histocompatibility complex variation and mate choice in a lekking bird, the great snipe (*Gallinago media*). *Molecular Ecology* 13:3821-3828.
- Eklund A, 1997. The major histocompatibility complex and mating preferences in wild house mice. *Behavioral Ecology* 8:630-634.
- Eklund A, Egid K, Brown RE, 1991. The major histocompatibility complex and mating preferences of male mice. *Animal Behaviour* 42:693-694.
- Endler JA, 1978. A predator's view of animal colour patterns. *Journal of Evolutionary Biology* 11:319-364.
- Endler JA, 1980. Natural selection on colour pattern in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 34:76-91.
- Endler JA, 1983. Natural and sexual selection on colour pattern in poeciliid fishes. *Environmental Biology of Fishes* 9:173-190.
- Endler JA, 1987. Predation, light intensity and courtship behaviour in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behaviour* 35:1376-1385.
- Endler JA, 1991. Variation in the appearance of guppy colour patterns to guppies and their predators under different visual conditions. *Vision Research* 31:587-608.

- Endler JA, Houde AE, 1995. Geographic Variation in Female Preferences for Male Traits in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 49:456-468.
- Evans JP, Kelley JL, Bisazza A, Finazzo E, Pilastro A, 2004. Sire attractiveness influences offspring performance in guppies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:2035-2042.
- Evans JP, Magurran AE, 1999. Male mating behaviour and sperm production characteristics under varying sperm competition risk in guppy. *Animal Behaviour* 58:1001-1006.
- Evans JP, Magurran AE, 2000. Multiple benefits of multiple mating in guppies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:10074-10076.
- Evans JP, Magurran AE, 2001. Patterns of Sperm Precedence and Predictors of Paternity in the Trinidadian Guppy. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:719-724.
- Evans JP, Marshall DJ, 2005. Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. *Evolution* 59:106-112.
- Evans JP, Pilastro A, Ramnarine IW, 2003a. Sperm transfer through forced matings and its evolutionary implications in natural guppy (*Poecilia reticulata*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 78:605-612.
- Evans JP, Zane L, Francescato S, Pilastro A, 2003b. Directional postcopulatory sexual selection revealed by artificial insemination. *Nature* 421:360-363.
- Faivre B, Grégoire A, Prévault M, Cézilly F, Sorci G, 2003. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300:103.
- Fan W, Liu YC, Parimoo S, Weissman SM, 1995. Olfactory receptor-like antigens on humans spermatozoon. *Nature* 225:191-193.
- Fedina TY, 2007. Cryptic female choice during spermatophore transfer in *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae). *Journal of Insect Physiology* 53:93-98.
- Fellous M, Dausset J, 1970. Probable haploid expression of HLA antigens on human spermatozoon. *Nature* 225:191-193.
- Fisher DO, Double MC, Blomberg SP, Jennions MD, Cockburn A, 2006. Post-mating sexual selection increases lifetime fitness of polyandrous females in the wild. *Nature* 444:89-92.
- Fisher RA, 1915. The evolution of sexual preference. *Eugenics reviews* 7:184-192.

- Flajnik MF, Ohta Y, Namikawa-Yamada C, Nonaka M, 1999. Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunological Reviews* 167:59-67.
- Flajnik MFK, Masanori, 2001. Comparative Genomics of the MHC: Glimpses into the Evolution of the Adaptive Immune System. *Immunity* 15:351-362.
- Folstad I, Skarstein F, 1997. Is male germ line control creating avenues for female choice? *Behavioral Ecology* 8:109-112.
- Freeman-Gallant CR, Meguerdichian M, Wheelwright NT, Sollecito SV, 2003. Social pairing and female mating fidelity predicted by restriction fragment length polymorphism similarity at the major histocompatibility complex in a songbird. *Molecular Ecology* 12:3077-3083.
- Gage MJG, and PS, Parker GA, 1998. Sperm morphometry in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 53:835-840.
- Gage MJG, Macfarlane C, Yeates S, Shackleton R, Parker GA, 2002. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 61:1528-1539.
- Gage MJG, Macfarlane CP, Yeates S, Ward RG, Searle JB, Parker GA, 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: Relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology* 14:44-47.
- Garcia-Gonzalez F, Simmons LW, 2005. The evolution of polyandry: intrinsic sire effects contribute to embryo viability. *Journal of Evolutionary Biology* 18:1097-1103.
- Garcia-Gonzalez F, Simmons LW, 2007. Shorter sperm confer higher competitive fertilization success. *Evolution* 61:816-824.
- Gardiner DM, 1978. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 59:165-168.
- Godfray HCJ, 1994. *Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology*. Princeton: Princeton University Press.
- Goldstein DB, Ruiz-Linnares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW, 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139:463-471.
- Gomendio M, Roldan ERS, 1991. Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 243:181-185.
- Grether GF, Kasahara S, Kolluru GR, Cooper EL, 2004. Sex-specific effects of carotenoid intake on the immunological response to allografts in guppies

- (*Poecilia reticulata*). Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 271:45-49.
- Griffiths SW, Magurran AE, 1999. Schooling decisions in guppies (*Poecilia reticulata*) are based on familiarity rather than kin recognition by phenotype matching. Behavioral Ecology and Sociobiology 45:437-443.
- Grimholt U, Drablos F, Jorgensen SM, Hoyheim B, Stet RJM, 2002. The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): polymorphism, linkage analysis and protein modelling. Immunogenetics 54:570-581.
- Gromko MH, Newport MEA, 1988. Genetic basis for remating in *Drosophila melanogaster*. II. Response to selection based on the behavior of one sex. Behavioral Genetics 18:621-632.
- Gunther E, Walter L, 2001. The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). Immunogenetics 53:520-542.
- Halim K, Wong DM, Mittal KK, 1982. The HLA typing of human spermatozoa by two color fluoresces. Tissue Antigens 1990-91.
- Hamilton WD, Zuck M, 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science 218:384-387.
- Hancock JM, 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Microsatellites Evolution and Applications (Goldstein DB, Schlötterer C, eds). Oxford: Oxford University Press; 1-9.
- Harano T, Miyatake T, 2005. Heritable variation in polyandry in *Callosobruchus chinensis*. Animal Behaviour 70:299-304.
- Harf R, Sommer S, 2005. Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. Molecular Ecology 14:85-91.
- Herdman EJ, Kelly CD, Godin JG, 2004. Male mate choice in the guppy (*Poecilia reticulata*): do males prefer larger females as mates? Ethology 110:97-111.
- Hildemann WH, Wagner ED, 1954. Intraspecific sperm competition in *Lebistes reticulatus*. The American Naturalist 88:87-91.
- Hillgarth N, Ramenofsky M, Wingfield J, 1997. Testosterone and sexual selection. Behavioral Ecology 8:108-109.
- Hooglund JL, 1998. Why do female Gunnison's prairie dogs copulate with more than one male? Animal Behaviour 55:351-359.
- Hosken DJ, Martin OY, Born J, Huber F, 2003. Sexual conflict in *Sepsis cynipsea*: female reluctance, fertility and mate choice. Journal of Evolutionary Biology 16:485-490.

- Hosken DJ, Stockley P, 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 19:87-93.
- Houde AE, 1992. Sex-linked heritability of a sexually selected character in a natural population on *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) (Guppies). *Heredity* 69:229-235.
- Houde AE, 1997. Sex, color, and mate choice in guppies. Princeton: Princeton University Press.
- House CM, Simmons LW, 2002. Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus*: an example of sexually selected male genitalia. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:447-455.
- House CM, Simmons LW, 2005. Relative influence of male and female genital morphology on paternity in the dung beetle *Onthophagus taurus*. *Behavioral Ecology* 16:889-897.
- Howard DJ, Gregory PG, Chu J, Cain ML, 1998. Conspecific sperm precedence is an effective barrier to hybridization between closely related species. *Evolution* 52:511-516.
- Hughes AL, 1999. *Adaptive Evolution of Genes and Genomes*. New York: Oxford University Press.
- Hughes KA, Du L, Rodd FH, Reznick DN, 1999. Familiarity leads to female mate preference for novel males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour* 58:907-916.
- Hunter FM, Birkhead TR, 2002. Sperm viability and sperm competition in insects. *Current Biology* 12:121-123.
- Hurst JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DHL, 2001. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 414:631-634.
- Hurt P, Walter L, Sudbrak R, Klages S, Muller I, Shiina T, 2004. The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Research* 14:631-639.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M, 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland.
- Jeffrey KJ, Bangham RM, 2000. Do infectious diseases drive MHC diversity? *Microbes and Infection* 2:1335-1341.
- Jennions MD, Petrie M, 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews* 75:21-64.

- Johnsen A, Andersen V, Sunding C, Lifjeld JT, 2000. Female bluethroats enhance offspring immunocompetence through extra-pair copulations. *Nature* 406:296-299.
- Jordan WC, Bruford MW, 1998. New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81 (Pt 3):239-245.
- Kaufman J, Milne S, Gobel TWF, Walker BA, Jacob JP, Zoorob R, al. e, 1999. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* 401:923-925.
- Keil A, Sachser N, 1998. Reproductive benefits from female promiscuous mating in a small mammal. *Ethology* 104:897-903.
- Keller L, 1995. Social life: the paradox of multiple-queen colonies. *Trends in Ecology & Evolution* 10:355-360.
- Keller L, Reeve HK, 1994. Genetic variability, queen number, and polyandry in social hymenoptera. *Evolution* 48:694-704.
- Keller L, Reeve HK, 1995. Why do females mate with multiple males? The sexually selected sperm hypothesis. *Advances in the Study of Behavior* 24:291-315.
- Keller LF, Waller DM, 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* 17:230-241.
- Kelley J, Walter L, Trowsdale J, 2005. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 56:683-695.
- Kelly CD, Godin JGJ, Wright JM, 1999. Geographical variation in multiple paternity within natural populations of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:2403-2408.
- Kemp DJ, 2007. Female butterflies prefer males bearing bright iridescent ornamentation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 274:1043-1047.
- Kemp DJ, Rutowski RL, 2007. Condition dependence, quantitative genetics, and the potential signal content of iridescent ultraviolet butterfly coloration. *Evolution* 61:168-183.
- Kempnaers B, 1992. Extra-pair paternity results from female preference for high quality males in the blue tit. *Nature* 357:494-496.
- Kempnaers B, Congdon B, Boag PT, Roberson RJ, 1999. Extrapair paternity and egg hatchability in tree swallows: evidence for the genetic compatibility hypothesis? *Behavioral Ecology* 10:304-311.
- Kempnaers B, Verheyren GR, Dhondt AA, 1997. Extra-pair paternity in the blue tit (*Parus caeruleus*): female choice, male characteristics, and offspring quality. *Behavioral Ecology* 8:481-492.

- Kennedy CEJ, Endler JA, Poynton SL, McMinn H, 1987. Parasite load predicts mate choice in guppies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 21:291-295.
- Klein D, 1986. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex.*, 1st ed. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons.
- Klein J, Ono H, Klein D, O'Uigin C, 1993. The accordion model of MHC evolution. *Progress in Immunology* 8:137-143.
- Knapp LA, Ha JC, Sackett GP, 1996. Parental MHC antigen sharing and pregnancy wastage in captive pigtail macaques. *Journal of Reproductive Immunology* 32:73-88.
- Kobayashi H, Iwamatsu T, 2002. Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. *Zoological Science* 19:545-555.
- Kodric-Brown A, 1985. Female preference and sexual selection for male coloration in the guppy. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 17:199-205.
- Kodric-Brown A, Nicoletto PF, 1996. Consensus among females in their choice of males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 39:395-400.
- Komlos L, Zamir R, Joshua H, Halbrecht I, 1977. Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clinical Immunology and Immunopathology* 7:330-335.
- Konior M, Keller L, Radwan J, 2005. Effects of inbreeding and heritability of sperm competition success in the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*. *Heredity* 94:577-578.
- Konior M, Radwan J, Kolodziejczyk M, 2001. Polyandry increases offspring fecundity in the bulb mite. *Evolution* 55:1893-1896.
- Kraus FB, Neumann P, Moritz RFA, 2005. Genetic variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 52:1-5.
- Kuckuck C, Greven H, 1997. Notes on the mechanically stimulated discharge of spermiozeugmata in the guppy, *Poecilia reticulata*: a quantitative approach. *Zeitschrift für Fischkunde* 4:73-78.
- LaMunyon CW, Ward S, 1998. Larger Sperm Outcompete Smaller Sperm in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:1997-2002.
- Landry C, Garant D, Duchesne P, Bernatchez L, 2001. 'Good genes as heterozygosity': the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:1279-1285.

- Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P, 1990. Evolution of class-I MHC genes and proteins—from natural-selection to thymic selection. *Annual Reviews of Immunology* 8:23-63.
- Lenington S, 1991. The t complex: a story of genes, behavior and populations. *Advances in the Study of Behavior* 20:51-86.
- Lessells CKM, Boag PT, 1987. Unrepeatable repeatabilities: A common mistake. *Auk* 104:116-121.
- Levitan DR, 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:531-534.
- Lewis SM, Austad SN, 1990. Sources of Intraspecific Variation in Sperm Precedence in Red Flour Beetles. *The American Naturalist* 135:351-359.
- Lewis SM, Austad SN, 1994. Sexual selection in flour beetles: the relationship between sperm precedence and male olfactory attractiveness. *Behavioral Ecology* 5:223-224.
- Liley NR, 1966. Ethological isolating mechanisms in four sympatric species of Poeciliid fishes. *Behaviour supplement* 13:1-197.
- Liljedal S, Folstad I, Skarstein F, 1999. Secondary sex traits, parasites, immunity and ejaculate quality in the Arctic charr. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1893-1898.
- Locatello L, Rasotto MB, Evans JP, Pilastro A, 2006. Colourful male guppies produce faster and more viable sperm. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1595-1602.
- Loekle DM, Madison DM, Christian JJ, 1982. Time dependency and kin recognition of cannibalistic behavior among poeciliid fishes. *Behavioral and Neural Biology* 35:315-318.
- Loyau A, Gomez D, Moureau B, They M, Hart NS, Jalme MS, Bennett ATD, Sorci G, 2007. Iridescent structurally based coloration of eyespots correlates with mating success in the peacock. *Behavioral Ecology* 18:1123-1131.
- Luyten PH, Liley NR, 1985. Geographic variation in the sexual behaviour of the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). *Behaviour* 95:164-179.
- Luyten PH, Liley NR, 1991. Sexual selection and competitive mating success of male guppies (*Poecilia reticulata*) from Trinidad populations. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 28:329-336.
- Madsen T, Shine R, Loman J, Hakansson T, 1992. Why do females adders copulate so frequently? *Nature* 355:440-441.

- Magurran AE, 1998. Population differentiation without speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353:275-286.
- Magurran AE, 2005. *Evolutionary Ecology: The Trinidadian Guppy*. Oxford: Oxford University Press.
- Magurran AE, Nowak MA, 1991. Another battle of the sexes: the consequence of sexual asymmetry in mating cost and predation risk in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 254:31-38.
- Magurran AE, Seghers BH, 1990. Risk sensitive courtship in the guppy *Poecilia reticulata*. *Behaviour* 112:194-201.
- Magurran AE, Seghers BH, 1994. Sexual conflict as a consequence of ecology: evidence from guppy, *Poecilia reticulata*, populations in Trinidad. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 255:31-36.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, Garcia AJ, Gomendio M, Roldan ERS, 2005a. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 72:822-829.
- Malo AF, Roldan ERS, Garde J, Soler AJ, Gomendio M, 2005b. Antlers honestly advertise sperm production and quality. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272:149-157.
- Manning CJ, Wakeland EK, Potts WK, 1992. Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* 360:581-583.
- Mariette M, Kelley JL, Brooks R, Evans JP, 2006. The effects of inbreeding on male courtship behaviour and coloration in guppies. *Ethology* 112:807-814.
- Markow TA, 1997. Assortative fertilization in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:7756-7760.
- Martin-Villa JM, Longas J, Arnaiz-Villena A, 1999. Cyclic Expression of HLA Class I and II Molecules on the Surface of Purified Human Spermatozoa and Their Control by Serum Inhibin B Levels. *Biology of Reproduction* 61:1381-1386.
- 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? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:S40-S42.
- Matthews IM, 1998. *Mating behaviour and reproductive biology of the guppy, Poecilia reticulata* (PhD thesis): University of St. Andrews.

- Matthews IM, Evans JP, Magurran AE, 1997. Male display rate reveals ejaculate characteristics in the Trinidadian guppy *Poecilia reticulata*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 264:695-700.
- Matthews IM, Magurran AE, 2000. Evidence for sperm transfer during sneaky mating in wild Trinidadian guppies. Journal of Fish Biology 56:1381-1386.
- McConnell TJ, Godwin UB, Cuthbertson BJ, 1998. Expressed major histocompatibility complex class II loci in fishes. Immunological Reviews 166:291-300.
- McGraw KJ, Mackillop EA, Dale J, Hauber ME, 2002. Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental plumage. Journal of Experimental Biology 205:3747-3755.
- McLain DK, 1998. Non-genetic benefits of mate choice: fecundity enhancement and sexy sons. Animal Behaviour 139:1089-1101.
- Meffe GK, Snelson FF, 1989. An ecological overview of poeciliid fishes. In: Ecology and Evolution of livebearing fishes (Poeciliidae) (Meffe GK, Snelson FF, eds). Prentice Hall: Englewood Cliffs; 13-31.
- Merila J, Sheldon BC, 1999. Testis size variation in the greenfinch *Carduelis chloris*: relevance for some recent models of sexual selection. Behavioral Ecology and Sociobiology 45:115-123.
- Milinski M, 2003. The function of mate choice in sticklebacks: optimizing Mhc genetics. Journal of Fish Biology 63:1-16.
- Milinski M, 2006. The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 37:159-186.
- Miller HC, Lambert DM, 2004. Gene duplication and gene conversion in class II MHC genes of New Zealand robins (Petroicidae). Immunogenetics 56:178-191.
- Miller KM, Kaukinen KH, Schulze AD, 2002. Expansion and contraction of major histocompatibility complex genes: a teleostean example. Immunogenetics 53:941-963.
- Miyatake T, Matsumura F, 2004. Intra-specific variation in female remating in *Callosobruchus chinensis* and *C. maculatus*. Journal of Insect Physiology 50:403-408.
- Moya-Larano J, Fox CW, 2006. Ejaculate size, second male size, and moderate polyandry increase female fecundity in a seed beetle. Behavioral Ecology 17:940-946.
- Nakamura M, 1998. Multiple mating and cooperative breeding in polygynandrous alpine accentors. II. Male mating tactics. Animal Behaviour 55:277-289.

- Nakamura T, Leppert M, O'Connell P, Wolge R, T. H, Culver M, C. M, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R, 1987. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 235:1616-1622.
- Neff BDP, Trevor E., 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology* 14:19-38.
- Nei M, Gu X, Sitnikova T, 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:7799-7806.
- Nei M, Rooney AP, 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39:121-152.
- Newcomer SD, Zeh JA, Zeh DW, 1999. Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:10236-10241.
- Nicol A, McLaren A, 1974. An effect of female genotype on sperm transport in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* 39:421-424.
- Nicoletto PF, 1993. Female sexual response to condition dependent ornaments in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour* 46:441-450.
- Nilsson T, Fricke C, Arnqvist G, 2003. The effects of male and female genotype on variance in male fertilization success in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53:227-233.
- Nowak MA, Tarczy-Hornoch K, Austyn JM, 1992. The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:10896-10899.
- Ober C, 1999. Studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate. *Human Reproduction Update* 5:103-107.
- Ober C, Weitkamp LR, Cox N, al. e, 1997. HLA and mate choice in humans. *American Journal of Human Genetics* 61:497-504.
- Ojanguren AF, Evans JP, Magurran AE, 2005. Multiple mating influences offspring size in guppies. *Journal of Fish Biology* 67:1184-1188.
- Olsen KH, Grahn M, Lohm J, Langefors A, 1998. MHC and kin discrimination in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Animal Behaviour* 56:319-327.
- Olsson M, Gullberg A, Tegelstrom H, Madsen T, Shine R, 1994. Can female adders multiple? *Nature* 369:528.
- Olsson M, Madsen T, 1995. Female choice on male quantitative traits in lizards-why is it so rare? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36:179-184.

- Olsson M, Madsen T, Ujvari B, Wapstra E, 2004. Fecundity and MHC affects ejaculation tactics and paternity bias in sand lizards. *Evolution* 58:906-909.
- Olsson M, Madsen T, Wapstra E, Silverin B, Ujvari B, Wittzell H, 2005. MHC, health, color, and reproductive success in sand lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58:289-294.
- Olsson M, Norbdy J, Wapstra E, Ujvari B, Wittsel H, 2003. Major histocompatibility complex and mate choice in sand lizards. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:S254-S256.
- Olsson M, Shine R, 1997. Advantages of multiple matings to females: A test of the infertility hypothesis using lizards. *Evolution* 51:1684-1688.
- Otronen M, 1998. Male asymmetry and postcopulatory sexual selection in the fly *Dryomyza anilis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42:185-191.
- Pai A, Yan G, 2002. Polyandry produces sexy sons at the cost of daughters in red flour beetles. *Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences* 269:361-368.
- Palumbi SR, 1999. All males are not created equal: Fertility differences depend on gamete recognition polymorphisms in sea urchins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12632-12637.
- Parenti LR, Rauchenberger M, 1989. Systematic overview of the Poeciliines. In: *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliinae)* (Meffe GK, Snelson FF, eds). Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall; 3-12.
- Parham P, Otha T, 1996. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67-74.
- Parker GA, 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45:525-567.
- Parker GA, 1984. Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Strategies. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. London: Academic Press; 2-60.
- Parker GA, 1993. Sperm competition games: sperm size and number under adult control. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 253:245-254.
- Parker GA, 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: *Sperm Competition and Sexual Selection* (Birkhead T, Moller AP, eds). New York: Academic Press.
- Parker GA, Baker RR, Smith VGF, 1972. The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-male phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 36:529-553.

- Parker KM, Hughes K, Kim TJ, Hedrick PW, 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci from the Gila topminnow (*Poeciliopsis-o-occidentalis*) and their utility in guppies (*Poecilia reticulata*). *Molecular Ecology* 7:361-363.
- Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Schiffmann S, Lefort A, Eggerickx D, Ledent C, 1992. Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ-cells. *Nature* 355:453-455.
- Paterson S, Pemberton JM, 1997. No evidence for major histocompatibility complex-dependent mating patterns in a free-living ruminant population. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1813-1819.
- Penn D, Potts WK, 1998. Chemical signals and parasite mediated sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 13:391-396.
- Penn D, Potts WK, 1999. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *American Naturalist* 153:145-164.
- Peters A, Denk AG, Delhey K, Kempenaers B, 2004. Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1111-1120.
- Peterson CW, Warner RR, 1998. Sperm competition in fishes. In: *Sperm Competition and Sexual Selection* (Birkhead TR, Moller AP, eds). London: Academic Press; 435-464.
- Phillips RB, Zimmerman A, Noakes MA, Palti Y, Morasch MR, Eiben L, Ristow SS, Thorgaard GH, Hansen JD, 2003. Physical and genetic mapping of the rainbow trout major histocompatibility regions: Evidence for duplication of the class I region. *Immunogenetics* 55:561-569.
- Pilastro A, Bisazza A, 1999. Insemination efficiency of two alternative male mating tactics in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1887-1891.
- Pilastro A, Evans JP, Sartorelli S, Bisazza A, 2002. Male phenotype predicts insemination success in guppies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1325-1330.
- Pilastro A, Gasparini C, Boschetto C, Evans JP, 2007a. Colourful male guppies do not provide females with fecundity benefits. *Behavioral Ecology* in press.
- Pilastro A, Mandelli M, Gasparini C, Dadda M, Bisazza A, 2007b. Copulation duration, insemination efficiency and male attractiveness in guppies. *Animal Behaviour* 74:321-328.
- Pilastro A, Simonato M, Bisazza A, Evans JP, 2004. Cryptic female preference for colorful males in guppies. *Evolution* 58:665-669.
- Pitcher TE, Evans JP, 2001. Male phenotype and sperm number in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology* 79:1891-1896.

- Pitcher TE, Neff BD, Rodd FH, Rowe L, 2003. Multiple mating and sequential mate choice in guppies: females trade up. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:1623-1629.
- Pitcher TE, Rodd FH, Rowe L, 2007. Sexual colouration and sperm traits in guppies. *Journal of Fish Biology* 70:165-177.
- Pitnick S, Brown WD, 2000. Criteria for demonstrating female sperm choice. *Evolution* 54:1052-1056.
- Pitnick S, Markow TA, 1994. Male gametic strategies: sperm size, testes size, and the allocation of ejaculates among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila patchea* and its relatives. *American Naturalist* 143:785-819.
- Pizzari T, Birkhead TR, 2000. Female feral fowl eject sperm of subdominant males. *Nature* 405:787-789.
- Pizzari T, Birkhead TR, 2002. The sexually-selected sperm hypothesis: sex-biased inheritance and sexual antagonism. *Biological Reviews* 77:183-209.
- Pizzari T, Jensen P, Cornwallis CK, 2004. A novel test of the phenotype-linked fertility hypothesis reveals independent components of fertility. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:51-58.
- Pocklington R, Dill L, 1995. Predation on females or males: who pays for bright male traits. *Animal Behaviour* 49:1122-1124.
- Potts WK, Manning CJ, Wakeland EK, 1991. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 352:619-621.
- Potts WK, Wakeland EK, 1990. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. *Trends in Ecology & Evolution* 5:181-187.
- Prout T, Clark AG, 1996. Polymorphism in Genes That Influence Sperm Displacement. *Genetics* 144:401-408.
- Pyle DW, Gromko MH, 1979. Genetic basis for repeated mating in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist* 117:133-146.
- Radwan J, 1996. Intraspecific Variation in Sperm Competition Success in the Bulb Mite: A Role for Sperm Size. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263:855-859.
- Radwan J, 1998. Heritability of sperm competition success in the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*. *Journal of Evolutionary Biology* 11:321-327.
- Reinhardt K, 2001. Determinants of ejaculate size in a grasshopper (*Chorthippus parallelus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:503-510.

- Reusch TB, Haberli MA, Aeschlimann PB, Milinski M, 2001. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature* 414:300-302.
- Reusch TBH, Schaschl H, Wegner KM, 2004. Recent duplication and inter-locus gene conversion in major histocompatibility class II genes in a teleost, the three-spined stickleback. *Immunogenetics* 56:427-437.
- Reynolds JD, Gross MR, 1992. Female Mate Preference Enhances Offspring Growth and Reproduction in a Fish, *Poecilia Reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 250:57-62.
- Richardson DS, Komdeur J, Burke T, von Schantz T, 2005. MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 272:759-767.
- Rosen DE, Bailey RM, 1963. The poeciliid fishes (Cyrinodontiformes), their structure, zoogeography and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 126:1-176.
- Rowe L, Arnqvist G, Sih A, Krupa JJ, 1994. Sexual conflict and the evolutionary ecology of mating patterns: water striders as a model system. *Trends in Ecology & Evolution* 9:289-293.
- Rulicke T, Chapuisat M, Homberger FR, Macas E, Wedekind C, 1998. MHC-genotype of progeny influenced by parental infection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:711-716.
- Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP, 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234:1-28.
- Russell ST, Magurran AE, 2006. Intrinsic reproductive isolation between Trinidadian populations of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1294-1303.
- Sato A, Figueroa F, Murray BW, Malaga-Trillo E, Zaleska-Rutczynska Z, Sultmann H, Toyosawa S, Wedekind C, Steck N, Klein J, 2000. Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics* 51:108-116.
- Sato A, Figueroa F, O'hUigin C, Reznick DN, Klein J, 1996. Identification of major histocompatibility complex genes in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Immunogenetics* 43:38-49.
- Sauermann U, Nurnberg P, Bercovitch FB, Berard JD, Trefilov A, Widdig A, 2001. Increased reproductive success of MHC class II heterozygous males among free-ranging rhesus macaques. *Human Genetics* 108:249-254.

- Schachter B, Weitkamp LR, Johnson EM, 1984. Paternal HLA compatibility, fetal wastage and neural tube defects: evidence for a T/t-like locus in humans. *American Journal of Human Genetics* 36:1082-1091.
- Schaschl H, Wegner K, 2007. Contrasting mode of evolution between the MHC class I genomic region and class II region in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.; Gasterosteidae: Teleostei). *Immunogenetics* 59:295-304.
- Schlötterer C, Vogl C, Tautz D, 1997. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* 146:309-320.
- Schulte-Hostedde AI, Millar JS, 2004. Intraspecific variation of testis size and sperm length in the yellow pine chipmunk (*Tamias amoenus*): implications for sperm competition and reproductive success. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:272-277.
- Schulte-Hostedde AI, Millar JS, Hickling GJ, 2005. Condition dependence of testis size in small mammals. *Evolutionary Ecology Research* 7:143-149.
- Schulte-Hostedde AI, Montgomerie R, 2006. Intraspecific variation in ejaculate traits of the northern watersnake (*Nerodia sipedon*). *Journal of Zoology* 270:147-152.
- Schwensow N, Fietz J, Dausmann KH, Sommer S, 2007. Neutral versus adaptive genetic variation in parasite resistance: importance of major histocompatibility complex supertypes in a free-ranging primate. *Heredity* 99:265-277.
- Scofield VL, Schlumpberger JM, West LA, Weissman IL, 1982. Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system. *Nature* 295:499-502.
- Sheldon BC, 1994. Male phenotype, fertility, and the pursuit of extra-pair copulations by female birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 257:25-30.
- Sherborne AL, Thom MD, Paterson S, Jury F, Ollier WER, Stockley P, Beynon RJ, Hurst JL, 2007. The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Current Biology* 17:2061-2066.
- Shiina T, Imanishi T, Habara T, Aono R, Yamaguchi K, 2002. Comparative genome sequencing analyses of MHC regions and establishment of MHC integrated database (M-INTEGRA). *Tissue Antigens* 59:7.
- Shikano T, Taniguchi N, 2003. DNA markers for estimation of inbreeding depression and heterosis in the guppy *Poecilia reticulata*. *Aquaculture Research* 34:905-911.

- Shohet AJ, Watt PJ, 2004. Female association preferences based on olfactory cues in the guppy, *Poecilia reticulata*. Behavioral Ecology and Sociobiology 55:363-369.
- Shuker DM, Phillimore AJ, Burton-Chellew MN, Hodge SE, West SA, 2007. The quantitative genetic basis of polyandry in the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. Heredity 98:69-73.
- Simmons LW, 2001a. The evolution of polyandry: an examination of the genetic incompatibility and good sperm hypotheses. Journal of Evolutionary Biology 14:585-594.
- Simmons LW, 2001b. Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in the Insects. Princeton: Princeton University Press.
- Simmons LW, Beveridge M, Wedell N, Tregenza T, 2006. Postcopulatory inbreeding avoidance by female crickets only revealed by molecular markers. Molecular Ecology 15:3817-3824.
- Simmons LW, Parker GA, 1992. Individual Variation in Sperm Competition Success of Yellow Dung Flies, *Scatophaga stercoraria*. Evolution 46:366-375.
- Simmons LW, Wernham J, Garcia-Gonzalez F, Kamien D, 2003. Variation in paternity in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*: no detectable influence of sperm numbers or sperm length. Behavioral Ecology 14:539-545.
- Singh PB, Brown RE, Roser B, 1987. MHC antigens in urine as olfactory cues. Nature 327:161-164.
- Skarstein F, Folstad I, Liljedal S, Grahn M, 2005. MHC and fertilization success in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Behavioral Ecology and Sociobiology 57:374-380.
- Skinner AMJ, Watt PJ, 2007. Phenotypic correlates of spermatozoon quality in the guppy, *Poecilia reticulata*. Behavioral Ecology 18:47-52.
- Smuts BB, Smuts RW, 1993. Male aggression and sexual coercion of females in nonhuman primates and other mammals: evidence and theoretical implications. Advances in the Study of Behaviour 22:1-61.
- Snook RR, 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. Trends in Ecology and Evolution 20:46-53.
- Solyman BD, Wade WH, 1990. Heritable variation for female mating frequency in field crickets, *Gryllus integer*. Behavioral Ecology and Sociobiology 26:73-76.
- Stet RJM, Kruiswijk CP, Dixon B, 2003. Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes: The road not taken. Critical Reviews in Immunology 23:441-471.

- Stockley P, 1997a. No evidence of sperm selection by female common shrews. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1497-1500.
- Stockley P, 1997b. Sexual conflict resulting from adaptations to sperm competition. *Trends in Ecology & Evolution* 12:154-159.
- Stockley P, 1999. Sperm selection and genetic incompatibility: does relatedness of mates affect male success in sperm competition? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1663-1669.
- Stoltz JA, Neff BD, 2006. Sperm competition in a fish with external fertilization: the contribution of sperm number, speed and length. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1873-1881.
- Stone GN, 1995. Female foraging responses to sexual harassment in the solitary bee *Anthophora plumipes*. *Animal Behaviour* 50:405-412.
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator or arthropod reproduction. *Annual Reviews on Microbiology* 53:71-102.
- Stutt AD, Siva-Jothy MT, 2001. Traumatic insemination and sexual conflict in the bed bug *Cimex lectularius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 10:5683-5687.
- Swanson WJ, Clark AG, Waldrip-Dail HM, Wolfner MF, Aquadro CF, 2001. Evolutionary EST Analysis Identifies Rapidly Evolving Male Reproductive Proteins in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7375-7379.
- Swanson WJ, Vaquier VD, 1998. Concerted evolution in an egg receptor for a rapidly evolving abalone sperm protein. *Science* 281:710-712.
- Tadler A, 1999. Selection of a conspicuous male genitalic trait in the seedbug *Lygaeus simulans*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1773-1777.
- Taylor JS, Durkin JM, Breden F, 1999. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution* 16:567-572.
- Telford SR, Jennions MD, 1998. Establishing cryptic female choice in animals. *Trends in Ecology & Evolution* 13:216-218.
- Thornhill R, 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *American Naturalist* 122:765-788.
- Tregenza T, Wedell N, 1998. Benefits of multiple mates in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Evolution* 52:1726-1730.

- Tregenza T, Wedell N, 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited Review. *Molecular Ecology* 9:1013-1027.
- Tregenza T, Wedell N, 2002. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. *Nature* 415:71-73.
- Trowsdale J, 1995. "Both bird and man and beast": comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 41:1-17.
- Uglem I, Galloway TF, Rosenqvist G, Folstad I, 2001. male dimorphism, sperm traits and immunology in the corkwing wrasse (*Symphodus melops* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:511-518.
- van der Ven K, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, Krebs D, 2000. Evidence for major histocompatibility complex-mediated effects on spermatogenesis in humans. *Human Reproduction* 15:189-196.
- van Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, 2006a. Evolution of MHC class IIB in the genome of wild and ornamental guppies, *Poecilia reticulata*. *Heredity* 97:111-118.
- van Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, Blais J, Barson NJ, Ramnarine IW, Mohammed RS, Persad N, Cable J, 2006b. Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution* 60:2562-2574.
- Van Oosterhout C, Trigg RE, Carvalho GR, Magurran AE, Hauser L, Shaw PW, 2003. Inbreeding depression and genetic load of sexually selected traits: How the guppy lost its spots. *Journal of Evolutionary Biology* 16:273-281.
- Vanderhaeghen P, Schurmans S, Vassart G, Parmentier M, 1997. Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics* 39:239-246.
- Vaquier VD, 1998. Evolution of gamete recognition proteins. *Science* 281:1995-1998.
- Viken A, Fleming IA, Rosenqvist G, 2006. Premating Avoidance of Inbreeding Absent in Female Guppies (*Poecilia reticulata*). *Ethology* 112:716-723.
- Vladic TV, Afzelius BA, Bronnikov GE, 2002. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biology of Reproduction* 66:98-105.
- Vladic TV, Jarvi T, 2001. Sperm quality in the alternative reproductive tactics of Atlantic salmon: the importance of the loaded raffle mechanism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:2375-2381.
- von Schantz T, Wittzell H, Goranson G, Grahn M, Persson K, 1996. MHC genotype and male ornamentation: genetic evidence for the Hamilton-Zuck model.

Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 263:265-271.

- Wade WH, Chang NW, 1995. Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature* 373:72-74.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, 1991. CHELEX-100 as medium for simple extraction of DANN for PCR-based typing for forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- Ward PI, 2000. Cryptic female choice in the yellow dung fly *Scatophaga stercoraria* (L.). *Evolution* 54:1680-1686.
- Watson PJ, 1991. Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphila litigiosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour* 41:343-360.
- Watson PJ, 1998. Multi-male mating and female choice increase offspring growth in the spider *Neriene litigiosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour* 55:387-403.
- Wedekind C, Chapuisat M, Macas E, Rulicke T, 1996. Non-random fertilization in mice correlates with the MHC and something else. *Heredity* 77 400-409.
- Wedekind C, Furi S, 1997. Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1471-1479.
- Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke A, 1995. MHC-Dependent Mate Preferences in Humans. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 260:245-249.
- Wedekind C, Walker M, Portmann J, Cenni B, Muller R, Binz T, 2004. MHC-linked susceptibility to a bacterial infection, but no MHC-linked cryptic female choice in whitefish. *Journal of Evolutionary Biology* 17:11-18.
- Wedell N, 1997. Ejaculate size in bushcrickets: the importance of being large. *Journal of Evolutionary Biology* 10:315-325.
- Wedell N, 2001. Female remating in butterflies: interaction between female genotype and nonfertile sperm. *Journal of Evolutionary Biology* 14:746-754.
- Wedell N, Gage MJG, Parker GA, 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution* 17:313-320.
- Wegner KM, Kalbe M, Kurtz J, Reusch TBH, Milinski M, 2003a. Parasite selection for immunogenetic optimality. *Science* 301:1343-1343.
- Wegner KM, Reusch TBH, Kalbe M, 2003b. Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology* 16:224-232.

- Wenink PW, Groen AF, Roelke-Parker ME, Prins HTH, 1998. African buffalo maintain high genetic diversity in the major histocompatibility complex in spite of historically known population bottlenecks. *Molecular Ecology* 7:1315-1322.
- Westerdahl H, Hansson B, Bensch S, Hasselquist D, 2004. Between-year variation of MHC allele frequencies in great reed warblers: selection or drift? *Journal of Evolutionary Biology* 17:485-492.
- Wilkinson GS, Presgraves DC, Crymes L, 1998. Male eyes span in stalked-eyed flies indicates genetic quality by meiotic drive suppression. *Nature* 391:276-279.
- Williams GC, 1966. *Adaptation and natural selection*. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Wilson N, Tubman SC, Eady PE, Robertson GW, 1997. Female genotype affects male success in sperm competition. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:1491-1495.
- Winge O, 1937. Succession of broods in *Lebistes*. *Nature* 149:573-584.
- Witzell H, Madsen H, Westerdahl H, Shine R, Von Schantz T, 1999. MHC variation in birds and reptiles. *Genetica* 104:301-309.
- Wolfner MF, 2002. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity* 88:85-93.
- Wootton RJ, 1990. *Ecology of teleost fishes*. London: Chapman & Hall.
- Yamagishi M, Ito Y, Tsubaki Y, 1992. Sperm competition in the melon fly, *Bactrocera curcurbitae* (Diptera: Tephritidae): effects of sperm "longevity" on sperm precedence. *Journal of Insect Behavior* 5:599-609.
- Yasui Y, 1997. A "good sperm" model can explain the evolution of costly, multiple mating by females. *American Naturalist* 149:573-584.
- Yasui Y, 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology & Evolution* 13:246-250.
- Younger RM, Amadou C, Bethel G, Ehlers A, Fischer L, K., 2000. Characterization of clustered MHC-linked olfactory receptor genes in human and mouse. *Genome Research* 11:51930.
- Zahavi A, 1975. Mate selection-a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53:205-214.
- Zajitschek SRK, Evans JP, Brooks R, 2006. Independent effects of familiarity and mating preferences for ornamental traits on mating decisions in guppies. *Behavioral Ecology* 17:911-916.

- Zeh JA, 1997. Polyandry and enhanced reproductive success in the harlequin-beetleriding pseudoscorpion. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 40:111-118.
- Zeh JA, Zeh DW, 1994. Last-Male Sperm Precedence Breaks down when Females Mate with Three Males. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 257:287-292.
- Zeh JA, Zeh DW, 1996. The evolution of polyandry. 1. Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263:1711-1717.
- Zeh JA, Zeh DW, 1997. The evolution of polyandry. 2. Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264:69-75.
- Ziegler A, Dohr G, Uchanska-Ziegler B, 2002. Possible roles for products of polymorphic MHC and linked olfactory receptor genes during selection processes in reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology* 48:34-42.
- Ziegler A, Kentenich H, Uchanska-Ziegler B, 2005. Female choice and the MHC. *Trends in Immunology* 26:496-502.
- Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, 2006. Female reproductive choice and the MHC. In: *Journal of Reproductive Immunology*; 137-138.