



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**STRESS DELLA DIETA E TRADE-OFFS TRA CARATTERI  
PRE E POST ACCOPPIAMENTO NEL PESCE MILIONE,  
*POECILIA RETICULATA***

Relatore: Prof. **Alessandro Grapputo**

Co-relatrice: Prof.essa **Alexandra Glavaschi**

Laureando: **Leonardo Mozzo**

Matricola: **1228753**

Anno accademico 2021/2022

## INDICE

<b>CAPITOLO</b>	<b>pagina</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>La scelta allocativa.....</b>	<b>1</b>
<b>Biologia di <i>Poecilia reticulata</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>Scopo dell'esperimento.....</b>	<b>5</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>6</b>
<b>Disegno sperimentale.....</b>	<b>6</b>
<b>Analisi statistiche.....</b>	<b>8</b>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>9</b>
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>13</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>15</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>16</b>

## INTRODUZIONE

### La scelta allocativa

È generalmente accettato che i tratti che migliorano l'accesso di un sesso (di solito i maschi) al sesso limitante (di solito le femmine) siano costosi e che la loro espressione dipenda dalla condizione dell'individuo, quest'ultima definita come il pool di risorse allocate ai tratti che aumentano la fitness. Di conseguenza, la teoria prevede che solo i maschi in buone condizioni possano acquisire e allocare efficacemente le risorse per la riproduzione e pagare il costo dell'espressione di ornamenti elaborati. In particolare, gli individui con accesso a risorse illimitate saranno in grado di allocare energie in tutti i tratti, causando una correlazione positiva tra loro, mentre quelli sottoposti a risorse limitate saranno costretti a investire in un tratto piuttosto che in un altro, generando una correlazione negativa tra i tratti. Questo può aiutare a spiegare perché le correlazioni negative tra i tratti non sono sempre osservabili, anche quando sono attesi trade offs (Grether et al. 1999). La teoria della competizione spermatica prevede un trade-off tra l'investimento nei tratti pre e post-copulatori, generando così correlazioni negative tra i tratti che vengono messi in gioco prima e durante gli episodi di selezione sessuale. Questi trade offs possono essere difficili da individuare perché in genere sono sensibili a molte variabili, oltre che alla quantità di risorse disponibili, anche se la teoria prevede che siano più evidenti quando le risorse sono limitate (Devigili et al. 2012). È noto che l'espressione dei tratti maschili sottoposti alla selezione dalle femmine è abbondante (Cotton et al. 2004) e comprende tratti associati alla competizione maschio-maschio, all'attrattiva per le femmine e al successo della fecondazione in condizioni di competizione post-copulatoria (Schulte-Hostedde et al. 2005). In genere, quando le risorse disponibili per i maschi si riducono, i tratti soggetti a selezione sessuale mostrano una riduzione più marcata nella loro espressione fenotipica rispetto ai tratti non selezionati sessualmente (Cotton et al. 2004). Un certo numero di studi su *P. reticulata* ha rivelato che i tratti soggetti a selezione sessuale pre-copulatoria, compresa l'intensità del corteggiamento e l'area di carotenoidi nelle colorazioni maschili, sono positivamente (fenotipicamente) correlati con diversi tratti post-copulatori, tra cui il numero di spermatozoi, la velocità dello sperma e la proporzione di spermatozoi vivi per eiaculato (vitalità dello sperma) (Locatello et al. 2006). Un lavoro più recente sui pesci poecilidi ha confermato che questi tratti (quantità, velocità e vitalità) sono importanti predittori della paternità quando le cellule spermatiche di due individui differenti sono in lotta per la fecondazione della femmina. Questi risultati possono spiegare perché la competizione spermatica favorisca i maschi con livelli relativamente elevati di carotenoidi e un alto tasso di corteggiamento (Cotton et al. 2004). L'evidenza di correlazione fenotipica positiva tra l'espressione di questi tratti è però contrastata da

analisi genetiche quantitative riguardanti i trade-offs tra l'area della colorazione strutturale iridescente e la qualità dello sperma (velocità e vitalità del nuoto) (Evans 2010). Tuttavia questi risultati apparentemente contrastanti possono riflettere la fisiologia e il costo metabolico che stanno dietro l'espressione dei diversi tratti considerati e possono anche riflettere le differenze nella disponibilità di risorse messa in campo nei diversi esperimenti, che deve ancora essere esplorata come fattore alla base delle correlazioni tra caratteri pre- e post-copulatori.

Per quanto riguarda l'espressione di colorazioni associate ai carotenoidi, gli animali ne acquisiscono consumando piante o batteri produttori di carotenoidi o dal consumo di altri animali sequestratori di carotenoidi. Nessun animale può sintetizzare questi pigmenti ex novo. Se la disponibilità di carotenoidi è limitata o meno le colorazioni sessuali secondarie in natura è una questione aperta. I carotenoidi sono molto presenti nelle diete naturali degli animali, a concentrazioni così elevate che la possibilità che possano agire da fattori limitanti per le colorazioni è alquanto improbabile. Tuttavia, la velocità con cui i carotenoidi ingeriti vengono assorbiti, la capacità di convertire i carotenoidi in pigmenti utilizzabili e il tasso al quale vengono depositati i pigmenti nel tegumento variano molto a seconda della specie. I vertebrati sono notoriamente poco efficienti nell'assimilare i carotenoidi. Per esempio i salmonidi d'allevamento trattengono solo il 4-6% dei carotenoidi sintetici che ingeriscono e ne depositano solo una piccola frazione nel tegumento. Quindi l'assimilazione dei carotenoidi in natura deve essere ancora più bassa, dal momento che i pesci convertono pochi composti naturali in pigmenti utilizzabili. Questi bassi tassi di assimilazione non sembrano essere la conseguenza di una scarsa attività fisiologica dell'organismo, perché la quantità di pigmento accumulato aumenta con la concentrazione di carotenoidi nella dieta. Quindi ciò che viene rilevato da questi studi è l'elevato costo metabolico legato alla produzione di queste colorazioni (Grether et al. 1999).

Molto spesso in natura le risorse sono limitate nel tempo e nello spazio, al contrario di quanto accade infatti nelle condizioni ricreate in laboratorio, e gli organismi possono andare incontro a periodi di stress metabolici dovuti a cambiamenti più o meno repentini nelle condizioni dell'habitat (Cattelan et al. 2020). Spesso queste variazioni riguardano fattori abiotici come la temperatura, il fotoperiodo, la salinità o la composizione chimica del mezzo; altre volte invece riguardano fattori biotici dell'ecosistema, come un cambiamento nel numero o nella presenza di alcune popolazioni, che vanno a modificare anche tutte le relazioni trofiche che si erano instaurate in precedenza a scapito delle popolazioni più sensibili e meno tolleranti a situazioni di forte stress dovute a carenze alimentari.

Tuttavia, nonostante le crescenti evidenze scientifiche che la variabilità ambientale abbia degli effetti sull'espressione dei caratteri sessuali (Evans et al. 2019), la nostra comprensione riguardo l'effetto che la disponibilità di risorse abbia sulla selezione sessuale, influenzando i tratti selezionati sessualmente, è ancora molto limitata.

## **Biologia di *Poecilia reticulata***

*Poecilia reticulata* è comunemente chiamato guppy ed è un pesce appartenente alla famiglia dei Poeciliidae; specie originaria di Trinidad e Tobago, Venezuela, Guyana e Suriname, è ora diffusa nelle aree tropicali di tutto il mondo a seguito dell'introduzione da parte dell'uomo. Il guppy abita acque diverse, ma sempre miti (23-24 °C); è diffuso in stagni, laghi, fiumi e canali, con fondale costituito da ghiaio multicolore, dalle sorgenti di montagna alle foci dei fiumi e lagune, poiché sopporta diverse concentrazioni di salinità. Elemento importante è un'alta concentrazione di piante acquatiche. Si tratta di una specie a dieta onnivora, si nutre infatti di alghe, bacche, materiale vegetale, larve di invertebrati e a volte degli avannotti della propria o di altre specie. La specie mostra un marcato dimorfismo sessuale. Le femmine infatti hanno una colorazione mimetica grigio-verde e una macchia nera nella regione anale; sono solitamente più grandi dei maschi perché caratterizzate da crescita indefinita. I maschi sono dotati di un tegumento fortemente colorato composto da un pattern di macchie di dimensioni e forme molto variabili. Si distinguono tre tipologie di colorazione ovvero a carotenoidi e pteridine (arancio, rosso, giallo), a base melaninica (nere) e a iridescenze (verde, viola, blu, argento) (Soravia et al. 2015).

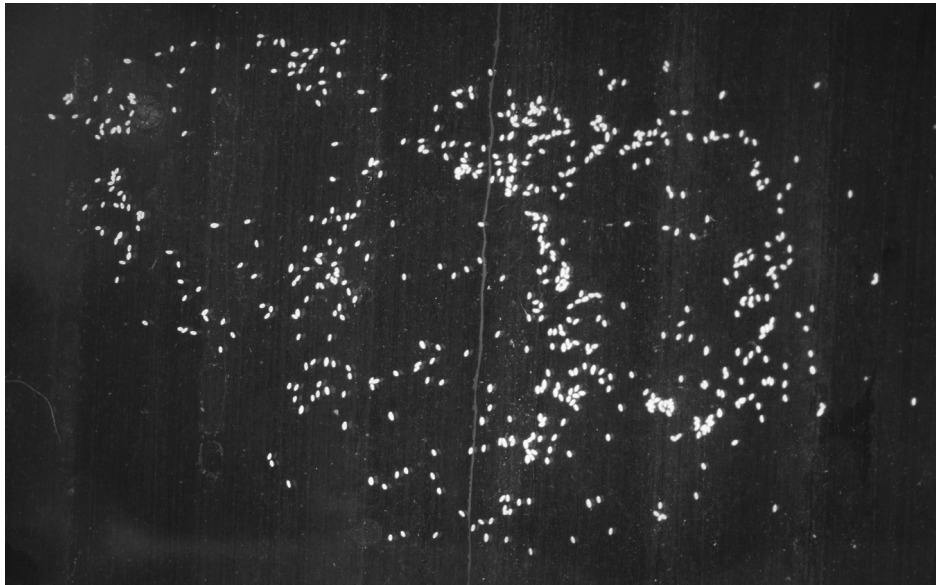


**Foto 1:** *Esemplare maschio di *Poecilia reticulata* della popolazione di Trinidad.*

*P. reticulata* è una specie a fecondazione interna, ovovivipara. Questo significa che le uova restano nel ventre materno fino alla schiusa; vengono poi partoriti dei piccoli già formati e autosufficienti. Per questo motivo i maschi possiedono un organo intromittente, il gonopodio, derivato da una modificazione della pinna anale attraverso la quale l'eiaculato, costituito da pacchetti di spermatozoi, detti spermatozeugmata,

viene trasferito alla femmina. Ogni spermatozeugmata contiene circa 21000 cellule spermatiche (Evans 2010). Le femmine raggiungono la maturità sessuale dopo circa 2 mesi dalla nascita mentre i maschi dopo 3-5 settimane. I guppy si riproducono potenzialmente tutto l'anno, grazie anche all'assenza di condizioni climatiche proibitive che caratterizza la fascia tropicale. I maschi alternano due diverse strategie riproduttive: il corteggiamento e le copule coercitive. Durante il corteggiamento, i maschi eseguono esibizioni ritualizzate di corteggiamento per mostrare alle femmine i pattern di colorazioni altamente polimorfiche. Durante tali rituali le macchie nere in genere aumentano di dimensioni, e le linee nere attorno alle altre macchie di colore (che non cambiano durante il corteggiamento) appaiono più spesso in modo tale da accentuarle di più. Per ogni ciclo riproduttivo le femmine copulano con più di un maschio perciò normalmente la paternità della prole è multipla, suddivisa tra due o tre maschi. La scelta pre-copulatoria in guppy è però limitata dall'elevata frequenza di copule forzate, ovvero un tentativo al minuto per le circa dodici ore di attività giornaliera, tutto l'anno e per tutta la durata della vita della femmina (in media sei mesi). La presenza di poliandria femminile, accompagnata da un alto tasso di copule coercitive, ha sottoposto i maschi ad una forte selezione post-copulatoria in cui i caratteri sessuali principali, come la quantità e la velocità degli spermatozoi, sono strettamente associati al successo post-copulatorio. Questi meccanismi obbligano gli individui maschi ad allocare risorse sia nell'espressione dei tratti pre-accoppiamento che nei tratti post-accoppiamento, dove la quantità e la capacità degli spermatozoi di fecondare la femmina diventano indispensabili per ottenere il successo riproduttivo (Devigili et al. 2012).

Gli spermatozoi sono raggruppati in pacchetti spermatici detti spermatozeugmata ("bundles" in inglese), il cui numero può variare da poche centinaia fino anche a circa 1600 elementi, come misurato in questo esperimento. Questi sperm bundles hanno misura di circa 135 - 235  $\mu\text{m}$  e comprendono in media 21000 cellule spermatiche ciascuno. La loro produzione e la loro velocità in vitro sono influenzate positivamente dalla presenza delle femmine (Evans 2019). Nella **foto 2** si può osservare dell'eiaculato di *P. reticulata* di un esemplare utilizzato nell'esperimento.



**Foto 2:** Eiaculato di *P. reticulata* ingrandito a 10X al microscopio. Nella foto sono visibili circa 1000 spermatozeugmata, ciascuna contenente circa 21000 cellule spermatiche.

### **Scopo dell'esperimento**

Nel seguente esperimento è stato indagato l'effetto che una dieta ristretta, che rispecchia uno stress ambientale, ha avuto sull'espressione di vari caratteri sessuali in *Poecilia reticulata* e l'effetto sulle correlazioni tra i caratteri soggetti a selezione sessuale pre e post-accoppiamento. È stata utilizzata questa specie nell'esperimento in questione poiché, grazie alle caratteristiche sopra elencate, si presta perfettamente agli studi sull'allocazione delle risorse, essendo una specie caratterizzata da un marcato dimorfismo sessuale con caratteri soggetti a selezione prima dell'accoppiamento come le colorazioni maschili soggetti alle preferenze femminili e caratteri soggetti a selezione post-copulatoria e a forte competizione tra maschi, come il numero e velocità degli spermatozoa. Quello che ci potremmo aspettare da un possibile stress ambientale, che in questo caso è simulato in laboratorio con l'utilizzo di un trattamento dietetico ristretto, è che i caratteri sessuali abbiano una minor espressione rispetto alla dieta abbondante di nutrienti. Mentre ci aspettiamo una correlazione positiva tra i caratteri pre e post-accoppiamento nel trattamento ad-libitum (Devigili et al. 2012). Nella dieta ristretta invece ci aspettiamo che queste correlazioni vengano a mancare oppure si invertano.

## MATERIALI E METODI

### Disegno sperimentale

Per l'esperimento sono stati usati i Guppy, *Poecilia reticulata*, la cui popolazione originaria è stata pescata nel 2003 dal fiume *Lower Tacarigua* a Trinidad, isola situata in America centrale caraibica, facente parte dello stato insulare di Trinidad e Tobago. Vivono attualmente in laboratorio in vasche da 150 litri con una densità di popolazione di circa 1 pesce/litro, maschi e femmine insieme, ad una temperatura dell'acqua di 24–26 °C e un fotoperiodo uguale costante (12 ore di luce/ 12 ore di buio). Per quanto riguarda la dieta vengono nutriti due volte al giorno, 6 giorni alla settimana con cibo secco e *Artemia sp. nauplii* (*Artemia salina*), ovvero lo stadio larvale di piccoli crostacei di acqua marina. Gli esemplari utilizzati in questo esperimento, tutti maschi adulti tra i 4 e i 6 mesi di vita, sono stati isolati individualmente e randomicamente per tutta la durata dell'esperimento (30 giorni) in vasche da 3,5 litri collegate a un sistema di ricircolo dell'acqua. Ogni individuo è stato sottoposto a due trattamenti dietetici consecutivi, uno ad-libitum e l'altro ristretto, della durata di 14 giorni ciascuno e con l'ordine di trattamento bilanciato (metà del campione ha subito prima il trattamento ad-libitum prima e poi il trattamento ristretto, l'altra metà viceversa), vedi **tabella 1**.

**Tabella 1:** *Dieta dei guppy nelle due condizioni sperimentali.*

Trattamento	Descrizione
Ad-libitum	cibo secco al mattino e 150 naupli* di <i>Artemia salina</i> al pomeriggio per 14 giorni
Ristretto	50 naupli* di <i>Artemia salina</i> al giorno per 14 giorni

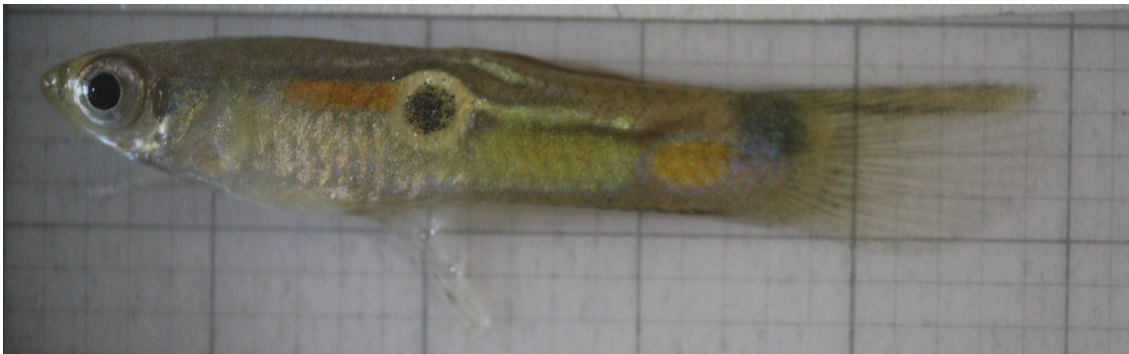
\* *La concentrazione di Naupli è stata misurata giornalmente contando al microscopio da dissezione gli individui in 10 campioni da 50  $\mu$ L e utilizzando la media come stima della concentrazione. Il volume finale è stato regolato con una micropipetta.*

Al termine del primo trattamento i maschi sono stati anestetizzati in un bagno di MS-222 e posti con il fianco destro su carta millimetrata. Lo sperma è stato raccolto in una goccia di soluzione salina, facendo oscillare il gonopodio avanti e indietro e applicando una leggera pressione sull'addome. Successivamente pesce ed eiaculato sono stati fotografati al microscopio da dissezione equipaggiato con una fotocamera digitale Canon 400D.

In seguito alla procedura sopra descritta, i maschi sono stati riportati nelle loro vasche di contenimento e il trattamento dietetico è stato invertito. Al termine del secondo



trattamento dietetico, i maschi e i loro eiaculati sono stati fotografati come spiegato in precedenza. Le fotografie sono state poi analizzate utilizzando il software di analisi di immagini digitali *ImageJ* (versione 1.53K). Dalle foto sono stati quantificati i seguenti tratti: area corporea ( $\text{mm}^2$ ), lunghezza del corpo (mm), lunghezza del gonopodio (mm), superficie corporea ( $\text{mm}^2$ ) interessate da macchie di carotenoidi, iridescenze, melanina, numero di gruppi di spermi. Nelle misurazioni sono state considerate come area e lunghezza corporea la superficie e la lunghezza visibili del pesce sul fianco sinistro, esclusa la pinna caudale, la pinna dorsale e il gonopodio. Con lo stesso criterio sono state misurate le macchie colorate visibili delle tre categorie di colorazioni principali presenti sulla superficie corporea. In particolare le colorazioni giallo, rosso e arancione sono state classificate come Carotenoidi; le colorazioni verde, viola, argento e bianco perlaceo sono state classificate come Iridescenze; e le colorazioni nere, grigio scuro come Melanina.



**Foto 3:** Esemplare di *P. reticulata* posto sul fianco destro, su carta millimetrata. I quadrati più piccoli rappresentano  $1 \text{ mm}^2$ .

Inoltre una volta ottenuto l'eiaculato è stata misurata anche la velocità degli spermi ( $\mu\text{m/s}$ ), prelevando dei gruppi di spermi con una pipetta da sequenziamento (modello 203, volume 0.05–3 mL, Drummond Scientific Company) e trasferendoli immediatamente al sistema Hamilton-Thorne CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Le analisi della velocità dello sperma sono state eseguite due volte per ciascun maschio utilizzando tre spermatozeugmata per campione dopo l'attivazione con una soluzione a 150 mM di KCl, mescolato con un'altra soluzione a 4 mg/L di siero di albumina bovina. I test di velocità CASA degli spermatozoi hanno dato in modo significativo misure ripetibili, in questo caso è stato tenuto conto solo della VAP: velocità traiettoria media (Devigili et al 2015).

## **Analisi statistiche**

Per i successivi studi e analisi statistiche è stato preso in considerazione un campione di 80 individui maschi, 50 dei quali avevano fatto il trattamento ad-libitum e poi ristretto, gli altri 30 viceversa. Da notare che la velocità degli spermatozoi non è stata misurata in tutti gli 80 individui del campione, in particolare mancano i dati di quattro individui sottoposti al trattamento ristretto e due individui sottoposti al trattamento ad-libitum, poiché non è stata misurata durante la fase sperimentale. Dei dati raccolti durante l'esperimento sono stati utilizzati per l'analisi statistica solo i più rilevanti per lo studio in questione, come: lunghezza del corpo (mm), area corporea (mm<sup>2</sup>), area di carotenoidi relativa, area di iridescenze relative, area di melanina relativa, lunghezza del gonopodio (mm), numero di spermatozoi e velocità degli spermatozoi (µm/s). Per calcolare le aree delle colorazioni relative è stato semplicemente eseguito il rapporto tra le superfici interessate da colorazioni e la superficie corporea. Mentre il numero di spermatozoi è stato ricavato dai gruppi spermatozoi che contengono circa 21000 cellule spermatiche ciascuno (Evans 2015).

Come software di trascrizione dei dati sono stati utilizzati Microsoft Excel (versione 16.0.14527.20162) e LibreOffice Calc (versione 6.4.7.2). Mentre come software per le analisi statistiche è stato utilizzato Rstudio (versione 1.4). In particolare con l'uso di Rstudio è stato possibile effettuare il "t-test appaiato" (paired t-test), che può dimostrare se le differenze nelle medie dei valori riportati per ciascun carattere è significativamente influenzata dal tipo di trattamento e quindi se il tipo di dieta ha influito sull'espressione dei caratteri, sia su quelli pre che post-accoppiamento. Come valore di significatività è stato considerato un  $P < 0.05$  (P value) ovvero la probabilità che il rifiuto dell'ipotesi sia dovuto al caso. I risultati ottenuti sono visibili nella **tabella 2** nel capitolo "Risultati".

È stato inoltre calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman e il P value, che permettono di evidenziare eventuali correlazioni positive o negative tra i tratti pre e post accoppiamento nelle due tipologie di trattamento. Come per il test precedente è stato preso in considerazione un valore di  $P < 0.05$ . I risultati ottenuti sono visibili nella **tabella 3** nel capitolo "Risultati".

## RISULTATI

Come possiamo notare dalla **tabella 2** il trattamento con dieta ristretta non ha avuto un effetto significativo sull'espressione dei caratteri, tranne che per il tratto dei Carotenoidi dove abbiamo un valore  $|t|$  uguale a 2.086 e un valore P uguale a 0.043, entrambi valori accettabili per confermare la tesi che la dieta ristretta abbia avuto un ruolo preponderante nella differenza nell'espressione delle macchie di carotenoidi. In questo caso infatti, anche se di poco, la media dell'area relativa dei carotenoidi misurata nel campione, successivamente alla dieta ad-libitum, è maggiore ( $0.06 \pm 0.03$ ) rispetto a quella misurata in seguito alla dieta restrittiva ( $0.05 \pm 0.02$ ) (**Figura 4**). Nel numero di spermatozoi prodotti e nella loro velocità invece non è stata riscontrata nessuna diminuzione significativa, poiché il valore di P (maggiore di 0.05) non è stato sufficiente a confermare l'ipotesi che questa differenza potesse essere effettivamente stata influenzata dal tipo di dieta.

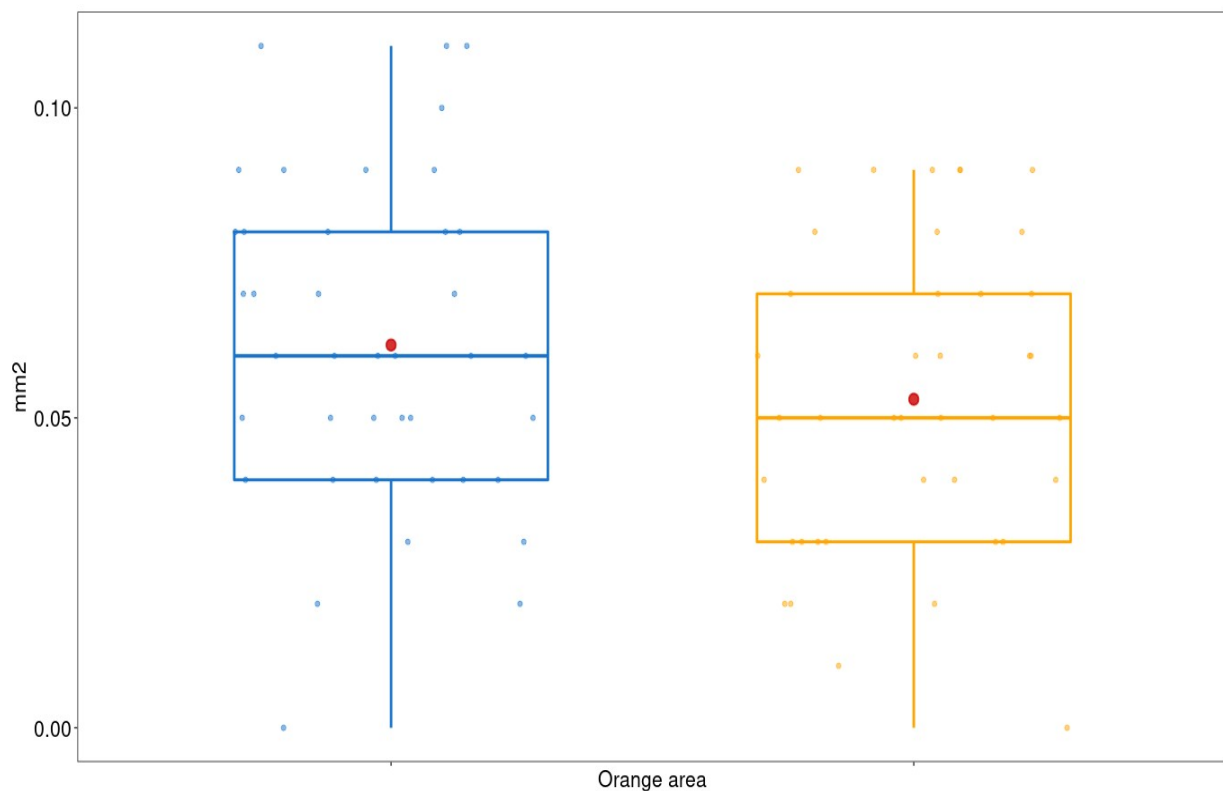
Per quanto riguarda invece i caratteri come Area corporea, Iridescenze, Melanina e Gonopodio non si è riscontrato un aumento nei loro valori misurati successivamente alla dieta restrittiva. Invece la lunghezza corporea è risultata maggiore nei pesci sottoposti a dieta restrittiva rispetto a quelli sottoposti alla dieta ad-libitum. Con una media di  $18.51 \text{ mm} \pm 1.44 \text{ mm}$  nel trattamento ristretto rispetto ai  $17.73 \text{ mm} \pm 1.57 \text{ mm}$  del trattamento ad-libitum, un valore  $|t|$  uguale a 2.333 e una significatività accettabile ( $P=0.025$ ) è confermata la tesi che i due tipi di dieta abbiano influenzato diversamente la lunghezza corporea nei maschi di guppy.

**Tabella 2.** Risultati del t-test accoppiato. Effetto della dieta sull'espressione dei caratteri.

Tratto	Media ad-libitum $\pm$ s.d.	Media ristretto $\pm$ s.d.	Valore t	Grado di libertà	Valore P
Area corporea (mm <sup>2</sup> )	$54.32 \pm 9.58$	$57.42 \pm 8.80$	-1.497	39	0.142
Lunghezza corporea (mm)	$17.73 \pm 1.57$	$18.51 \pm 1.44$	-2.333	39	0.025
Caroteneoidi	$0.06 \pm 0.03$	$0.05 \pm 0.02$	2.086	39	0.043

Iridescenze	$0.18 \pm 0.08$	$0.18 \pm 0.08$	-0.396	39	0.694
Melanina	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$	-0.502	39	0.619
Gonopodio (mm)	$3.65 \pm 0.41$	$3.66 \pm 0.43$	-0.137	39	0.892
N° di spermatozoi	$14.07 \pm 7.49$	$12.94 \pm 7.68$	0.931	39	0.357
Velocità degli spermatozoi ( $\mu\text{m/s}$ )	$47.90 \pm 9.48$	$44.63 \pm 8.26$	0.074	34	0.941

**Figura 4:** Distribuzione dei valori delle aree delle di carotenoidi negli esemplari di *P. reticulata*. In blu i valori riferiti agli individui sottoposti alla dieta ad-libitum, mentre in arancione quelli sottoposti alla dieta ristretta. Il punto rosso rappresenta la media.



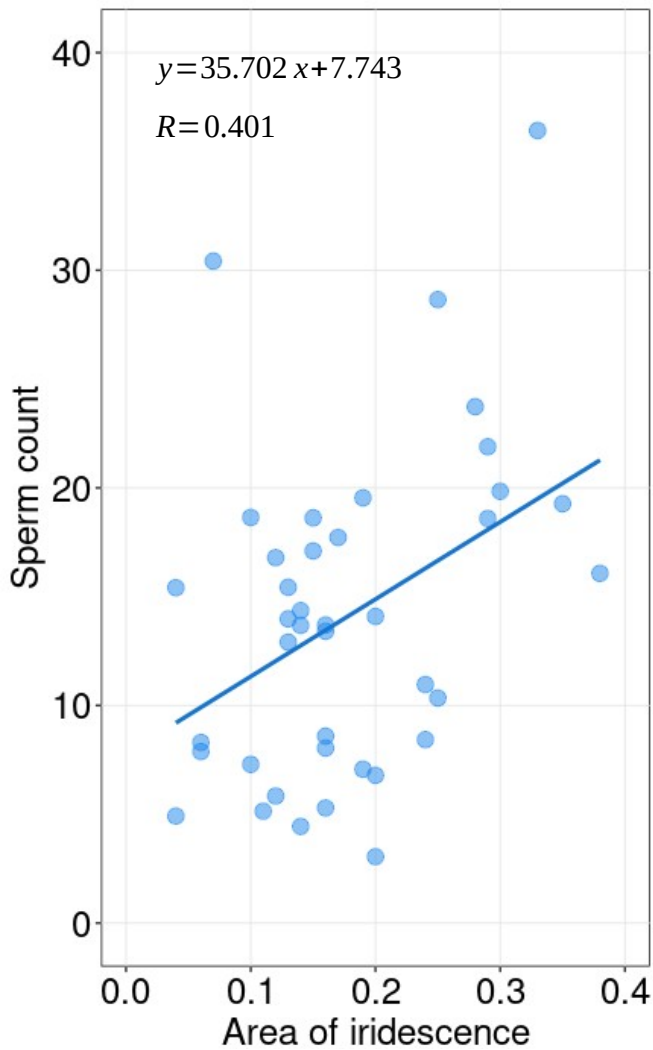
Dalla **tabella 3**, possiamo evincere tutte le correlazioni tra i caratteri pre- e post-copulatori nelle due diverse tipologie di dieta applicate. Tutte le correlazioni non sono risultate significative, tranne la correlazione positiva tra Iridescenze e il numero di spermatozoi nel trattamento ad-libitum. Da ciò possiamo dedurre che gli individui maschi con più colorazioni iridescenti, in condizioni di diete abbondanti di nutrienti, producano un più alto numero di spermatozoi.

**Tabella 3.** Correlazione di Spearman,  $X(Y) = \rho_s$  (P value). Correlazioni tra caratteri pre e post accoppiamento nei due trattamenti.

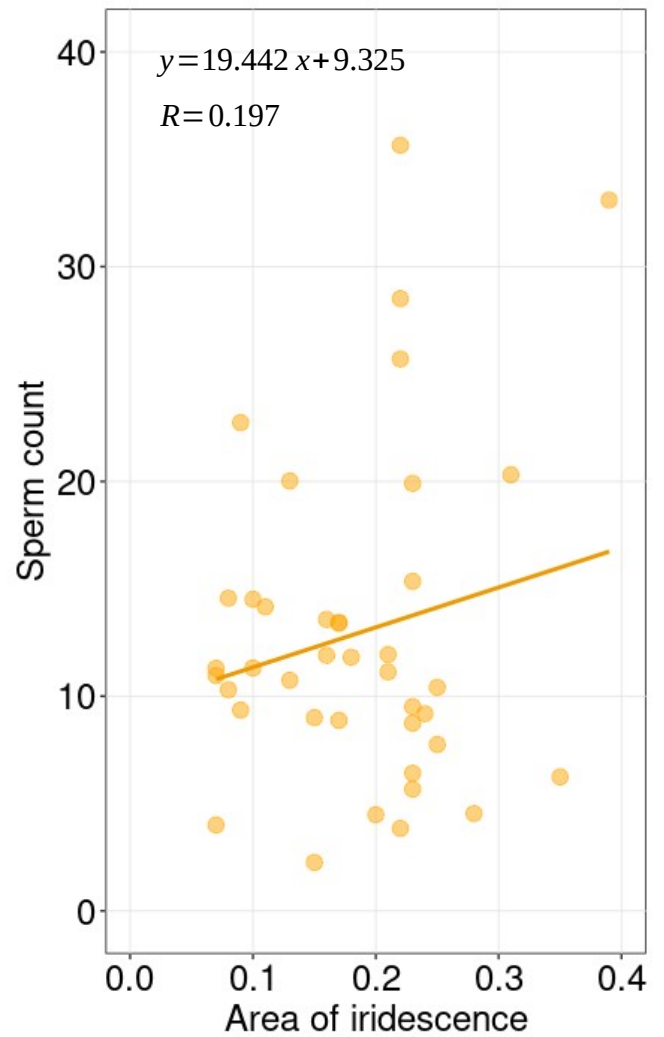
<b>Dieta Ad-libitum</b>					
		Tratti pre-accoppiamento			
		Area corporea	Carotenoidi	Iridescenze	Melanina
Tratti post-accoppiamento	N° spermatozoi	-0.128 (0.428)	-0.087 (0.591)	0.366 (0.020)	0.202 (0.210)
	Velocità degli spermatozoi	0.011 (0.947)	-0.105 (0.530)	0.232 (0.160)	0.084 (0.615)
<b>Dieta Ristretta</b>					
		Tratti pre-accoppiamento			
		Area corporea	Carotenoidi	Iridescenze	Melanina
Tratti post-accoppiamento	N° spermatozoi	0.132 (0.414)	-0.173 (0.287)	-0.056 (0.730)	-0.127 (0.435)
	Velocità degli spermatozoi	-0.012 (0.946)	-0.200 (0.241)	0.019 (0.913)	0.073 (0.672)

Dalle **figure 5 e 6** possiamo vedere la relazione grafica tra i due tratti dell'area delle iridescenze e della quantità di spermatozoi prodotti, che come detto in precedenza sono correlati positivamente.

**Figura 5:** Distribuzione della correlazione tra area di iridescenze ( $\text{mm}^2$ ) e quantità di spermatozoi (milioni) con linea di tendenza nella dieta *ad libitum*.



**Figura 6:** Distribuzione della correlazione tra area di iridescenze ( $\text{mm}^2$ ) e quantità di spermatozoi (milioni) con linea di tendenza nella dieta ristretta.



## DISCUSSIONE

Attraverso questo studio sperimentale su *Poecilia reticulata*, utilizzato come organismo modello, è stato possibile evincere determinati comportamenti intrinseci (trade offs) attuati in condizioni di stress. Questi risultati potrebbero anche essere estesi ad altre specie di pesci e non solo, anche in altri animali sociali che attuano una riproduzione dalle caratteristiche simili e una dinamica di popolazione simile; dove avremo quindi una forte selezione sessuale basata sulla scelta femminile pre e post copulatoria sul fenotipo dei maschi, che dovrà quindi avere le caratteristiche migliori anche in condizioni di stress.

Come detto in precedenza, abbiamo cercato di esprimere scientificamente quanto e in che modo la mancanza di cibo potesse modificare l'espressione di certi caratteri sessuali. Dagli studi pregressi, che già si sono occupati della questione allocativa e dei trade-offs messi in atto da *P. reticulata*, ci saremmo potuti aspettare una marcata differenza tra la quantità e la qualità degli spermatozoi prodotti sotto i due diversi regimi dietetici. In particolare avremmo dovuto osservare un calo nell'espressione di questi tratti nella dieta ristretta rispetto alla dieta ad-libitum. E lo stesso discorso anche per quanto riguarda l'espressione delle colorazioni, in particolare quelle derivate dai carotenoidi. Tutte queste predizioni erano state fatte soprattutto anche alla luce dell'elevato costo metabolico per produrre questi tratti (Grether et al. 1999; Rahman et al. 2013; Rahman et al. 2014). Dai risultati emersi da questo studio però, non tutte queste aspettative sono state soddisfatte.

Ciò che è stato riscontrato nello studio è un effetto negativo della dieta ristretta sull'espressione delle colorazioni dei carotenoidi. Si può notare infatti come sia stata misurata una diminuzione nell'area della colorazione in seguito al trattamento restrittivo. Tale differenza è supportata scientificamente anche dal t-test appaiato e dal valore P che confermano una correlazione con il tipo di trattamento. D'altro canto invece i tratti sessuali quali: la quantità di spermatozoi e la velocità di questi ultimi, non sono stati influenzati significativamente dato l'elevato P value che non conferma la correlazione con il tipo di dieta. Questo risultato va sicuramente contro tutti gli studi effettuati in precedenza, dove veniva mostrato come l'espressione di questi tratti fosse una delle più costose da produrre e quindi come fosse anche la più soggetta a variazioni in condizioni di stress (Devigili et al. 2012).

Sono state invece interessate da una correlazione opposta le dimensioni corporee degli individui, ovvero l'area corporea e la lunghezza corporea, che hanno visto un aumento in seguito alla dieta ristretta rispetto alla dieta ad-libitum. Questa tendenza può essere il risultato di un trade-off attuato dagli individui che, in condizioni avverse come la scarsità di nutrienti, hanno preferito optare per un'allocazione delle risorse volta

soprattutto all'accrescimento, piuttosto che nello sviluppo di colorazioni o nella produzione di spermatozoi, poiché troppo costose dal punto di vista metabolico. Questa scelta intrinseca potrebbe comunque portare a un giovamento dal punto di vista della selezione sessuale, in particolare nella competizione maschio-maschio dove viste le dimensioni maggiori un individuo potrebbe escludere gli altri maschi dalla copula con la femmina. Una chiave di lettura data dalla selezione sessuale potrebbe essere quella che durante la scelta precopulatoria femminile vengano preferiti i maschi dalle dimensioni maggiori, poiché questo carattere potrebbe essere associato a un vantaggio per le femmine stesse e per la prole. Questa scelta precopulatoria ha poi portato alla selezione del carattere che esprime le dimensioni maggiori, che porterà quindi gli individui ad un'allocazione delle risorse nell'accrescimento soprattutto in condizioni di stress alimentare.

Per quanto riguarda le correlazioni tra i caratteri pre e post-accoppiamento, all'interno dei due diversi trattamenti, non si sono osservati risultati rilevanti per quasi nessuna delle colorazioni prese in esame, a differenza di studi precedenti dove, per esempio, l'espressione dei carotenoidi era positivamente correlata a caratteri come il numero di spermatozoi e la loro velocità (Locatello et al. 2006). C'è invece una correlazione positiva, supportata da un P value di 0.02, tra l'area delle iridescenze e la quantità di spermatozoi prodotti nella dieta ad-libitum. Questa tendenza è in linea con quanto analizzato nella stessa popolazione di guppy in studi precedenti, anche questa relazione viene meno una volta che si analizzano i valori del trattamento ristretto. Questa correlazione positiva conferma come in questo caso, una maggior area di colorazioni iridescenti sia anche associata ad una quantità di spermatozoi prodotti maggiore rispetto a maschi con meno macchie iridescenti sul corpo (Cattelan et al 2020; Glavaschi et al. 2022). Rispetto ad altri studi precedenti, dove i maschi erano sottoposti alle due diverse diete in gruppi separati, tutti gli individui hanno sperimentato entrambi i trattamenti: ad-libitum e ristretto, effettuando prima una dieta e poi l'altra. Ciò è stato attuato per ricreare con la maggior fedeltà possibile l'habitat naturale, dove la disponibilità varia nel tempo.

Vorrei inoltre sottolineare come, ai maschi, non è stato consentito l'accesso alle femmine, poiché isolati ancora prima dell'inizio dei trattamenti. Quindi non possiamo dire quale sia il reale successo pre e post-copulatorio degli individui da noi analizzati in questo esperimento.



## CONCLUSIONI

Per concludere vorrei evidenziare la conferma scientifica di quanto già espresso in diversi studi precedenti riguardo l'effetto negativo di uno stress, in questo caso la dieta restrittiva, sul pattern delle colorazioni dei maschi di *P. reticulata*, in particolare dei carotenoidi, evidentemente costosi da esprimere attraverso il fenotipo. Mentre invece vorrei far notare l'effetto positivo che il trattamento ristretto ha avuto sulle dimensioni corporee, frutto probabilmente di un trade-off in cui le poche risorse disponibili sono state utilizzate per l'accrescimento piuttosto che nell'espressione di colorazioni come i carotenoidi, appunto molto costosi metabolicamente.

Entrambi le correlazioni sono l'evidente frutto di una scelta allocativa intrinseca dettata dalle condizioni ambientali. Per quanto riguarda invece le correlazioni tra i tratti pre e post-copulatori non si possono notare particolari trade offs o correlazioni positive. Se non che, nel trattamento ad-libitum, dove la correlazione positiva che ci potremmo aspettare tra le macchie di carotenoidi e gli spermatozoi prodotti è invece dimostrata tra questi ultimi e le colorazioni iridescenti.

Ciò su cui potrebbe focalizzarsi un futuro studio sull'argomento potrebbe essere sicuramente l'effettivo successo riproduttivo legato ai tratti pre e post-copulatori in popolazioni di *P. reticulata*, in cui i maschi hanno accesso alle femmine, sempre soggette a stress. Stress che potrebbe anche interessare altri parametri dell'ecosistema come temperatura, presenza di sostanze chimiche tossiche o fotoperiodo.

## BIBLIOGRAFIA

- Cattelan, S., Evans, J. P., Garcia-Gonzalez, F., Morbiato, E., e Pilastro, A. (2020). Dietary stress increases the total opportunity for sexual selection and modifies selection on condition-dependent traits. *Ecology Letters*, 23(3), 447–456.
- Cotton, S., Fowler, K., e Pomiankowski, A. (2004). Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1541), 771–783.
- Devigili, A., Kelley, J. L., Pilastro, A., e Evans, J. P. (2012). Expression of pre- and postcopulatory traits under different dietary conditions in guppies. *Behavioral Ecology*, 24(3), 740–749.
- Devigili, A., Evans, J. P., di Nisio, A., e Pilastro, A. (2015). Multivariate selection drives concordant patterns of pre- and postcopulatory sexual selection in a livebearing fish. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–9.
- Evans, J. P. (2010). Quantitative genetic evidence that males trade attractiveness for ejaculate quality in guppies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1697), 3195–3201.
- Evans, J.P., Rahman, M.M. and Gasparini, C. (2015), Genotype-by-environment interactions underlie the expression of pre- and post-copulatory sexually selected traits in guppies. *J. Evol. Biol.*, 28: 959-972.
- Gasparini, C., Devigili, A., Dosselli, R., e Pilastro, A. (2013). Pattern of inbreeding depression, condition dependence, and additive genetic variance in Trinidadian guppy ejaculate traits Present addresses. *Ecology and Evolution*, 3(15), 4940–4953.
- Glavaschi, A., Cattelan, S., Devigili, A., e Pilastro, A. (2022). Immediate predation risk alters the relationship between potential and realised selection on male traits in the Trinidad guppy *Poecilia reticulata*. *BioRxiv*, 2022.04.03.486867.
- Grether, G. F., Hudon, J., e Millie, D. F. (1999). Carotenoid limitation of sexual coloration along an environmental gradient in guppies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1426), 1317–1322

Krebs J. R. e Davies N. B. (1993). *Ecologia e comportamento animale/ An introduction to behavioural ecology*. Ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, 258-289.

Locatello, L., Rasotto, M.B., Evans, J.P. & Pilastro, A. (2006). Colourful male guppies produce faster and more viable sperm. *J. Evol. Biol.* 19: 1595–1602.

Rahman, M. M., Kelley, J. L., e Evans, J. P. (2013). Condition-dependent expression of pre- and postcopulatory sexual traits in guppies. *Ecology and Evolution*, 3(7), 2197–2213.

Rahman, M. M., Turchini, G. M., Gasparini, C., Norambuena, F., e Evans, J. P. (2014). The Expression of Pre- and Postcopulatory Sexually Selected Traits Reflects Levels of Dietary Stress in Guppies. *PLOS ONE*, 9(8), e105856.

Schulte-Hostedde, A., I., Millar, J., S., e Hickling, G., J. (2005). Condition dependence of testis size in small mammals. *Evol Ecol Res* 7:143-149

Shalilian, M. (2011) Scelta maschile per gruppi di femmine di numerosità differente in *Poecilia reticulata*. Tesi Magistrale, Università di Padova.  
<http://hdl.handle.net/20.500.12608/14848>

Soravia, C. (2015). Interazione tra fluido ovarico e velocità degli spermatozoi in due popolazioni di *Poecilia reticulata*. Tesi Triennale, Università di Padova.