

Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología,
Edafología y Química Agrícola

Área de zoología

TESIS DOCTORAL



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Consecuencias de la variación individual de las señales
químicas de los machos de lagartija carpetana
(*Iberolacerta cyreni*) para su éxito reproductor, la
organización social, las preferencias de las hembras y el
fenotipo de la descendencia**

Memoria presentada por el licenciado Gonzalo M. Rodríguez Ruiz para optar al grado de Doctor en Biología y Conservación de la Biodiversidad, dirigida por el Doctor José Martín Rueda y la Doctora Pilar López Martínez del Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales - Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Madrid, Salamanca, 2018

Gonzalo M. Rodríguez Ruiz

Los dibujos de la cubierta, encabezamientos y títulos fueron realizados por Rodrigo García Báscones (Rompe). Los textos de los capítulos constituyen manuscritos aún no publicados de los estudios realizados. Queda prohibida la reproducción o publicación total o parcial, así como la producción de obras derivadas sin la autorización expresa de los autores.

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI), BES-2015-071805, concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad. Asimismo, los estudios realizados han sido financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto CGL2014-53523-P.

Para la realización de todos los estudios hemos podido contar el apoyo de las instalaciones de la Estación Biológica “El Ventorrillo” del Museo Nacional de Ciencias Naturales. Todos los trabajos de investigación han sido respaldados por los permisos pertinentes.

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología,
Edafología y Química Agrícola

Área de Zoología

TESIS DOCTORAL



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Consecuencias de la variación individual de las señales químicas de los machos de lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*) para su éxito reproductor, la organización social, las preferencias de las hembras y el fenotipo de la descendencia

Memoria presentada por el licenciado Gonzalo M. Rodríguez Ruiz para optar al grado de Doctor en Biología y Conservación de la Biodiversidad, dirigida por el Doctor José Martín Rueda y la Doctora Pilar López Martínez del Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales - Consejo Superior de Investigaciones

Científicas

Madrid, Salamanca, 2018

El doctorando

Gonzalo M. Rodríguez Ruiz

V°B° del Director
José Martín Rueda

V°B° de la Directora
Pilar López Martínez

V°B° del Tutor
Valentín Pérez-Mellado

D. José Martín Rueda, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid y Profesor de Investigación en el Departamento de Ecología Evolutiva del Museo de Ciencias Naturales - CSIC

D^a. Pilar López Martínez, Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid e Investigadora científica en el Departamento de Ecología Evolutiva del Museo de Ciencias Naturales - CSIC

Certificamos que la presente Tesis Doctoral titulada "Consecuencias de la variación individual de las señales químicas de los machos de lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*) para su éxito reproductor, la organización social, las preferencias de las hembras y el fenotipo de la descendencia", ha sido realizada por Gonzalo M. Rodríguez Ruiz, licenciado en Biología, bajo nuestra dirección en el Departamento Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales - Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Y que consideramos que reúne los requisitos científicos y formales para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.

En Madrid, a de Julio de 2018

Dr. José Martín Rueda

Dra. Pilar López Martínez

"Harry, I have no idea where this will lead us, but I have a definite feeling it will be a place both wonderful and strange"

Special Agent Dale Cooper

"Las cosas no se hacen para ser el primero, sino porque amas hacerlas, porque te enamoras del proyecto"

"El misterio es lo que más amo, es el magnetismo de la vida, y me resulta maravilloso saber que de la mayoría de las cosas no conocemos absolutamente nada"

David Lynch

A mi familia

CONTENIDOS

Agradecimientos	10
Resumen	15
Introducción	21
Objetivos	44
Capítulos	
I - Immune challenge affects visual and chemical sexual signals of wild male Carpetan rock lizards: a field experiment	59
II - Effects of an experimental challenge of the immune system on space use, reproductive strategies and reproductive success of male lizards <i>Iberolacerta cyreni</i>	79
III - Improving the attractive of chemical signals to females does not ensure the males' mating success: effects on home range, male-male competition and dominance hierarchy in the Carpetan rock lizard (<i>Iberolacerta cyreni</i>)	99
IV - Benef-Eat from what you smell. Looking for reproductive benefits of being pre-sensory biased in mate choice of female Carpetan rock lizards	123
V - Dietary Vitamin D availability in gravid female rock lizard induces anticipatory maternal effects in the offspring	145
VI - Maternal vitamin D3 supplementation affects offspring state and behavioral predictability in Carpetan rock lizard (<i>Iberolacerta cyreni</i>)	169
Conclusiones	197

AGRADECIMIENTOS

Es hora de recapitular. Han sido cinco años tremendamente intensos. Cinco años en los que he vivido muchas experiencias y que sin duda han merecido la pena. Recuerdo perfectamente el día en el que me planteé si yo sería capaz de hacer una tesis y si eso era algo para mí. También recuerdo el día en el que decidí que, independientemente de que fuese algo de lo que era capaz, era algo que quería vivir. Por eso el primer agradecimiento de la lista es para mis padres. Por apoyarme en esta aventura, sabiendo que las probabilidades de obtener una beca eran prácticamente nulas. Gracias por apoyarme, por dejarme vivir esto y por entender que el camino que he elegido no se recorre solo. Esta tesis también es vuestra. Como también es tuya Álvaro, (anda que no te di la paliza con el dichoso Arduino y la pista de carreras). Eres el hermano sabio que todo el mundo querría tener. Tienes la facultad de despejar el cielo oscuro con tres palabras, aunque a veces no te des cuenta. Gracias a los tres por... todo. Es la única palabra que verdaderamente resume lo que quiero decir.

El segundo agradecimiento es para las tres personas que me cambiaron la vida con esto: Valentín, gracias por descubrirme la pasión por la ciencia y por la zoología. Por enseñarme lo bonita que puede ser la vida cuando te dedicas a lo que te apasiona. Por abrirme la puerta de la investigación con vertebrados, que era algo que veía imposible al principio de la carrera. Por hacerme entender que el contenido de las “cacas” puede ser “oro puro” y que el nudo ballestrinque vale más que para hacer amarres. Pero sobre todo gracias por la confianza de estos años y por no haber dudado ni un momento cuando Jose te dijo que tenía un hueco para mí. Fue duro despedirse de Salamanca y de las islas (volveré, sin duda) pero todo lo que aprendí contigo son los cimientos de esta tesis. Pilar, Jose, gracias por abrirme la puerta y dejarme pasar hasta la cocina. Estos tres años han sido increíbles. Gracias por la facilidad para todo, por no ponerme límites, por escuchar todas las ideas locas y por dejarme llevarlas a cabo. No soy capaz de decir todo lo que estoy aprendiendo con vosotros, de la ciencia y de la vida. Gracias por dejarme tanta responsabilidad en las cosas, y darme tanta confianza. Pero si hay algo por lo que estoy especialmente agradecido es por trabajar mano a mano en esto. Nunca me he sentido solo en el desarrollo de esta tesis, siempre he sabido que estabais ahí y siempre he podido recurrir a vosotros; incluso cuando había medio planeta de por medio y una vaca hace que El Ventorrillo se convierta en una película de Berlanga. Gracias por no juzgarme y entender, aunque sea muy raro, lo importante que son mis historias de scouts para mí. Gracias por vuestra amistad que, espero, nunca se acabe por muy lejos que me lleve la ciencia.

Con la mudanza al Museo vinieron muchas cosas, pero sobre todo un equipo del que aprender una barbaridad. Gracias Roberto y Jesús por acogerme y por todos los consejos de estos años. Ha sido una pasada conocer a dos fanáticos de la herpetología que saben tanto de tantos bichos de todo el planeta de los que yo no había oído hablar nunca. Yo nunca me he considerado herpetólogo, porque no soy (o más bien era) fanático de los reptiles, pero si una cosa he aprendido de vosotros es a ser más curioso todavía y a darme cuenta de que siempre hay cosas que aprender. Que no hay que ser conformista, ni en lo científico ni en lo político. Que la constancia es la clave de todo y que, si te apasiona la ciencia, da igual que sean lagartijas que moscas: Lo que importa siempre es la pregunta. Espero que en el futuro podamos sacar algo juntos los tres y quedar para cenar de una vez en el mejicano ese. Se os echa de menos. ¡Mucha suerte!

También quiero agradecer el apoyo y las lecciones científicas y de vida a Javier, Alfredo y Emilio. Gracias por interesaros siempre por cómo iba todo, por la implicación y sobre todo por tratarme como a un colega de profesión. Gracias Javier por tu rigor, por tu empeño, por implicarte tanto y por la confianza. Gracias Alfredo por la experiencia, por tu sabiduría y por los “¿Sabemos ya algo de los resultados?” que demuestra que la curiosidad es el motor de todo. Gracias Emilio por ser un ejemplo de cómo afrontar la vida de científico cuando las cosas no son fáciles y hay que luchar por seguir adelante. Menos mal que nos queda Portugal.

Tres personas más me abrieron las puertas de su casa y me dejaron parasitarles el salón como si fuese mi habitación. Jelu, Angel, Rodri, no sé ni qué decirlos. Sois mis hermanos y no sé si sois conscientes del apoyo que me habéis dado estos años. No solo por abrirme vuestra casa, sino por todo lo demás. Vivir Madrid con vosotros ha sido una pasada y, aunque vuestra casa a veces parecía una sitcom en la que yo era el personaje que entra y sale cada dos o tres capítulos, nunca me he sentido de prestado. Lo digo como lo siento, somos hermanos y sois mi familia también.

Hay tres personas más que no pueden faltar en los agradecimientos. Gracias Abuelo por dejarme el piso para poder trastear y aprender lo que es hacer ciencia de manera autónoma. Gracias por interesarte tanto por lo que hago y por tus “¿Qué tal con el jefe?” y tus caras de extrañeza cuando te explico que, por muy bien que esté con el jefe y por muy bien que lo haga, en el 2019 esto del contrato se acaba. Pero seguiremos adelante. Gracias también a mi TioVictor y a mi TioLuis porque ese verano en la ferretería me dio la oportunidad de ser un poco más independiente y pensar que podría afrontar la tesis estando emancipado económicamente. Fue el primer empujón, aprendí con vosotros una barbaridad y desde entonces todo cambió.

Agradezco también al Museo Nacional de Ciencias Naturales el haberme dejado utilizar las instalaciones del Ventorrillo y alojarme entre sus históricas paredes. El Ventorrillo es un tesoro escondido y un recurso sin igual para el investigador ecólogo de cualquier parte del planeta. No solo por la versatilidad de sus instalaciones y la cercanía al parque nacional; sino por ser un verdadero punto de encuentro entre científicos en el que nacen continuamente sinergias e ideas surgidas de la pasión por la ciencia.

Y quedan muchas personas que agradecer, pero podría estar con esto tantas páginas como tiene la tesis. Gracias a todos por vuestro apoyo, vuestra amistad, vuestro interés y vuestro esfuerzo tratando de entender las cosas que hacemos con las lagartijas. Gracias por los buenos momentos, por haber sido parte de mi vida estos años y por haberme dejado compartir un trozo de la vuestra. A lo mejor el resultado de esta tesis no tiene que ver con vosotros, pero lo que yo he crecido durante este tiempo... sin duda que sí:

A mi familia pitoriana no son solo 5 años, sino que ya va para 15... Os quiero a todos, no os vayáis nunca. Y no me refiero a estar lejos, eso es conquistar territorios nuevos. Ya sabéis a lo que me refiero.

A la gente del Museo, los moduleros y a los Ventorrilleros: Ester, Irene, Roger, Raquel, Jaime, Eva, Elisa, Mireia, Melinda, David, Octavio, Héctor, Stefania, Gergõ, Jaime, Eva, Jorge, Tomás, Pedro, Marcos, Claudio, Ismini, Caro, Pablo, Marco, Alicia, María... seguro que me dejo a alguien ¿Mariano? ¿James? Gracias por tantas conversaciones apasionadas de ciencia, de lo que la rodea, de los infernales trámites burocráticos, por las indignaciones con la administración, por las risas, las cañas, los dixit y los catanes. Gracias por hacer de esto una vida y no solo trabajo.

A mis hermanos scout, de Ávila y los que vienen conmigo hacia lo salvaje. Vosotros entendéis el valor del esfuerzo, de la ilusión y de entregarse por algo. Lo aprendí de vosotros y creo que lo he volcado todo aquí. Gracias por proponerme aventuras, proyectos, retos, por ser ejemplo de entrega y de altruismo. Durante la etapa de la tesis especialmente tengo que agradecer a mi "equipo de que?" y allegados. Gracias por los ánimos, la comprensión, el apoyo, las largas conversaciones en coche, las ideas locas, por pensar en grande, por hacer un ppv a los 29, y por recordarme que lo primero es lo primero, que mejor preguntar y no suponer, que hay que emocionarse, que ellos son nuestra razón de estar y que no hay que conformarse nunca. ¡Y cumplir la ley scout claro!

También quiero agradecer a Juan una frase que me dijo hace ya trece años: “¿Biología o Ciencias Ambientales? ¿De verdad te lo estás planteando?” Eres la persona capaz de voltear mi mundo solo con una frase (esta es solo una de ellas, pero tengo unas cuantas) y esa vez me hiciste ver que apostar por la vocación no se puede hacer a medias. Gracias por haber llegado a mi vida. Si no nos hubiésemos conocido hace quince años, seguro que hoy no sería la misma persona.

No me puedo olvidar de la gente de Salamanca. Primero los del depar: Alicia, Ana, Mario, Zaida y Abraham. Fue una pasada conocerlos y trabajar codo con codo. Ali, sacaremos lo de las cyreni adelante, seguro. Zeta, Abraham, esperadme en Brasil que voy; Mario tu no me esperes, vente para acá que hay hueco! Ana, tenemos pendiente hacer algo de aprendizaje social a medias ¿nos animamos?

A los malones. Pues que os he echado y os echo de menos. Esto con unas pintas por las tardes con vosotros se hubiese llevado mucho mejor. Animo con las opos, las granjas, los centros de buceo y todos los proyectos que os pongáis por delante. Sara, gracias por estar ahí siempre, aunque estés al otro lado del mundo.

A los vecinos del 4º, del 1º y de la azotea: Sergio, Rubén y Jenni. Si algo me dolió de irme a Madrid fue separarme de vosotros. Hay un día que recuerdo especialmente en el que Jenni dijo que la ciencia solo mola si la haces con tu gente. ¡Hagamos algo juntos! la mezcla puede ser una quimera o... un IF 12! Por soñar...

También quiero recordad aquí a los compañeros de Chafarinas: Javi, Alfredo, Gonzalo, Ángel y Paco. Muchas gracias por vuestra amistad y por el soporte que nos facilitáis en nuestras visitas. Por las conversaciones en la terracita mirando a Rey. Por los paseos en barca rodeando congreso. Por hacernos mucho más fáciles los días allí y dejarnos siempre con ganas de volver.

Creo que es justo, aunque no se entere nunca, agradecer a Alexandra Elbakyan, creadora de Sci-hub, la labor de difusión que realiza de la ciencia. Creo que no podríamos saber la cantidad de ciencia que se hace hoy en todo el mundo gracias a ella y a su web. Pero estoy seguro de que muchísimos investigadores lo utilizan a diario y, lo necesitan. Y negarlo sería muy hipócrita.

Pues solo me queda agradecer a la persona más importante en esta etapa. Con sus altos y sus bajos, pero siempre presente. Incluso cuando no estaba. Gracias por las notitas, por recordarme que puedo, por las banderitas, por ilusionarte con cada cosa, por volver y por ser tú. Por hacer que me emocione cuando más lo necesito. Empezamos cuando esto era un sueño y parece que

por fin voy a despertar. Despierta conmigo y hagamos que haya merecido la pena tanto esfuerzo por mantener esto vivo. Esta tesis también es tuya.

Ahora veremos que nos depara el futuro, si la ciencia es de verdad lo mío o me tengo que dedicar a otras labores. Veremos si se puede vivir de esto y seguir tratando de descubrir los misterios del mundo o si el mundo está tan mal que hay que meterse a arreglarlo. Dicen dos colegas que “va ganando el mal” y que “Dios se ha largado sin pagar la última ronda” y a veces creo que tienen razón. El futuro será como sea, pero aquí estaré para hacer lo que de mi dependa, con vosotros.

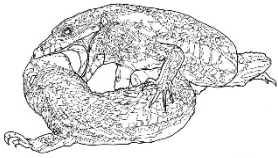
Quedan aventuras por correr



RESUMEN

La lagartija carpetana, *Iberolacerta cyreni*, es una especie que ha sido utilizada en multitud de ocasiones como modelo para estudiar la comunicación química y su papel en la selección sexual y en la reproducción de los lagartos. Actualmente se conocen parte de los mecanismos básicos que soportan la producción de señales en los machos de *I. cyreni*, así como de las respuestas de las hembras. Eso hace de la lagartija carpetana una especie idónea para responder preguntas más profundas que trascienden la emisión o la recepción de señales y permiten estudiar aspectos más detallados de la ecología evolutiva de la comunicación. En esta tesis estudiamos cómo la variación en la producción de las señales por los machos de la lagartija carpetana tiene efectos en el éxito reproductivo, la organización social, las preferencias de las hembras y el fenotipo de las crías.

Se ha postulado que las señales sexuales pueden ser evolutivamente estables si son honestas y dependen de la condición o son costosas para el emisor. Los machos secretan compuestos químicos costosos con los que marcan sus territorios y que, si son preferidos por las hembras, pueden atraerlas hacia esas áreas. De esta manera, los machos, si además defienden de manera efectiva ese territorio, podrían incrementar su éxito de apareamiento. En algunos casos, la presencia y abundancia de algunos compuestos en las señales químicas dependen de la condición corporal del macho y de la disponibilidad de recursos alimenticios particulares en el ambiente. El **primer capítulo** trata de conocer como una situación de desventaja para algunos machos, afecta a la expresión de los ornamentos químicos y visuales. Puesto que la producción de estas señales es costosa y dependiente de la condición, sometimos experimentalmente a un grupo de machos de una población natural a un desafío inmune mediante la inyección de un lipopolisacárido bacteriano (LPS), para después medir el cambio en la intensidad de la expresión de las señales visuales y químicas. Nuestros resultados mostraron cómo se produjeron cambios en ambos tipos de señales. En los parches de color que definen las señales visuales se produjo un descenso en las cantidades relativas de coloración ultravioleta de la zona gular y de los ocelos laterales, la cual depende de los componentes estructurales y de melanina. Mientras que no se vio afectada la coloración dorsal verdosa dependiente de carotenoides. En las señales químicas detectamos en las secreciones un descenso de las proporciones de ergosterol; compuesto que parece jugar un importante papel en la selección sexual al ser preferido por las hembras y que, en su forma activa (vitamina D) tiene funciones relevantes en el sistema inmune. Los resultados sugieren la existencia de un compromiso entre la regulación fisiológica del sistema inmune y la



elaboración o desviación de compuestos esenciales, tanto a los ornamentos químicos como a los visuales. Este compromiso podría tener un importante papel en los procesos de selección intra- e intersexual. Dado que experimentos previos en cautividad han mostrado resultados diferentes, nuestro trabajo sugiere también que la expresión de las señales es dependiente del contexto y muestra la importancia de desarrollar nuevos estudios en condiciones naturales. Este capítulo muestra como la producción de las señales químicas y visuales en lagartos es dependiente de la condición del emisor por lo que podrían constituir señales honestas de la calidad del macho en la que las hembras basarían su elección de pareja

En el **segundo capítulo** comprobamos si, además de provocar un descenso en la expresión de las señales, el desafío inmune provocaba un menor éxito reproductivo de aquellos machos que sufrían un desafío inmune experimental con lipopolisacárido. Como medida indirecta del acceso a las hembras de los machos, medimos también su área de campeo y el solapamiento con las áreas de otros machos. Nuestros resultados mostraron que el éxito reproductivo se incrementaba con el tamaño corporal (o la edad) mientras que el tratamiento experimental no causó diferencias en el éxito reproductivo medio. Sin embargo, los machos con el desafío inmune redujeron el tamaño de sus áreas de campeo y su éxito reproductivo no estuvo relacionado con el tamaño corporal. Esto sugiere la existencia de una estrategia reproductiva alternativa en aquellos machos "subóptimos", los cuales podrían considerar bajas sus probabilidades de supervivencia. Esto conduciría a estos machos subóptimos a adoptar una estrategia de alto esfuerzo reproductivo en forma de "inversión terminal", a pesar de la baja calidad de sus señales sexuales y de los costes potenciales que tendría para su supervivencia.

La selección sexual no solo tiene el componente de la selección de pareja por la hembra, sino que la competición entre machos por buenos territorios que contengan más hembras también es determinante. En el **tercer capítulo** estudiamos cómo un aumento experimental de la calidad de las señales químicas de los machos puede influir en el uso del espacio por las hembras, si se ven atraídas por los territorios marcados por estos machos. También estudiamos cómo afecta la calidad de las señales a la estructura jerárquica entre machos producida por los enfrentamientos agonísticos entre ellos y al comportamiento reproductivo. Para ello suplementamos con vitamina D₃ a un grupo de machos durante las semanas anteriores a la época de apareamiento y los liberamos, junto con otro grupo de machos no suplementados y un grupo de hembras, en un cercado seminatural para que copulasen libremente. Para garantizar que no existía competición por el hábitat, colocamos refugios idénticos distribuidos de manera uniforme, en un número igual al de machos en el cercado y durante la época reproductiva



estudiamos la dinámica de uso del espacio y las interacciones sociales que se produjeron entre todos los individuos, tanto agonísticas como reproductivas. Los resultados mostraron que la jerarquía y la dominancia entre machos tuvo una importancia capital para conseguir un mayor éxito de apareamiento, independientemente de la calidad de las señales producidas. Esto sugiere que, a pesar del papel que puedan jugar las señales en la selección sexual, la competición entre machos es un factor clave para conseguir tener mayor acceso a las hembras. Sin embargo, dado que existen procesos de competición post-cópula por fecundar los óvulos de la hembra, no podemos asegurar con nuestro experimento que conseguir un mayor número de cópulas asegure el éxito reproductivo.

No está del todo claro si la competición entre machos es solo por acceder a más hembras o por defender territorios de mejor calidad que sean ocupados por ellas. Experimentalmente, se ha comprobado que las hembras modifican su área de campeo atraídas por aquellas zonas marcadas con compuestos costosos para los machos, como la provitamina D_3 . Y también se ha comprobado que las hembras en situación de inanición responden con más intensidad a las señales químicas producidas por los machos. Eso sugiere que el origen de la preferencia de las hembras por estas señales podría deberse a la existencia de un sesgo sensorial preexistente por estos compuestos, probablemente por encontrarse en recursos alimenticios. En el **cuarto capítulo** comprobamos si la preferencia de las hembras por la provitamina D_3 se debe a que esta molécula, o las presas que la contienen, es un recurso valioso para las hembras en gestación. Para ello suplementamos a dos grupos de hembras grávidas con provitamina y con vitamina D_3 y estudiamos los potenciales beneficios que podrían tener para ellas, para sus huevos y sus crías en términos de diferencias en la condición corporal, la morfometría, el tamaño de puesta y el éxito de eclosión. También estudiamos el interés mostrado por las hembras suplementadas hacia los olores de las secreciones de los machos. Nuestros resultados no mostraron grandes diferencias entre tratamientos, excepto en la menor condición corporal de las crías de las madres tratadas con provitamina. También encontramos que la respuesta de las hembras a los olores de los machos fue menor en las hembras que habían sido suplementadas que en las hembras control. Esto sugiere que el potencial sesgo sensorial de las hembras podría estar relacionado con las necesidades fisiológicas de las hembras o con el nivel de hambre que están soportando cuando actúan como receptores de la señal del macho.

Si una hembra elige un hábitat concreto siguiendo las señales del macho, su elección puede condicionar, en función de la calidad y de los recursos existentes, el desarrollo futuro de las crías. En el **capítulo quinto** comprobamos la posible existencia de efectos maternos inducidos



por la disponibilidad alimenticia de provitamina y vitamina D que soportan las hembras durante el embarazo. Para ello realizamos un suplemento con vitamina y provitamina similar al del capítulo cuarto y sometimos a las crías, una vez nacidas, a tests de velocidad de carrera y de escalada para estudiar su fenotipo y su condición corporal. También realizamos un test de dispersión para comprobar qué individuos tenían mayor tendencia a dispersarse abandonando el hábitat elegido por la madre. Nuestros resultados mostraron que, aunque la velocidad de carrera y escalada no fue diferente en las crías de madres suplementadas, la habilidad para escalar, sí fue mejor en las madres con mayor acceso a la provitamina y a la vitamina D. Sin embargo, los hijos de madres suplementadas con provitamina mostraron más tendencia a ser residentes, que los hijos de las madres control. Esto sugiere la existencia de un efecto materno anticipador en respuesta a las condiciones del hábitat. Las madres cuyo contenido corporal en provitamina D fue mayor, podrían haber “informado” de alguna manera a sus crías de que la calidad del hábitat en el que nacieron era buena, evitando así una dispersión innecesaria. Aunque hay coincidencia ente la molécula que es atractiva para las madres y la molécula que informaría a las crías de la calidad del hábitat en el que nacen, solo podemos especular con la existencia de una molécula informativa transgeneracional con el mismo significado para madres que para crías.

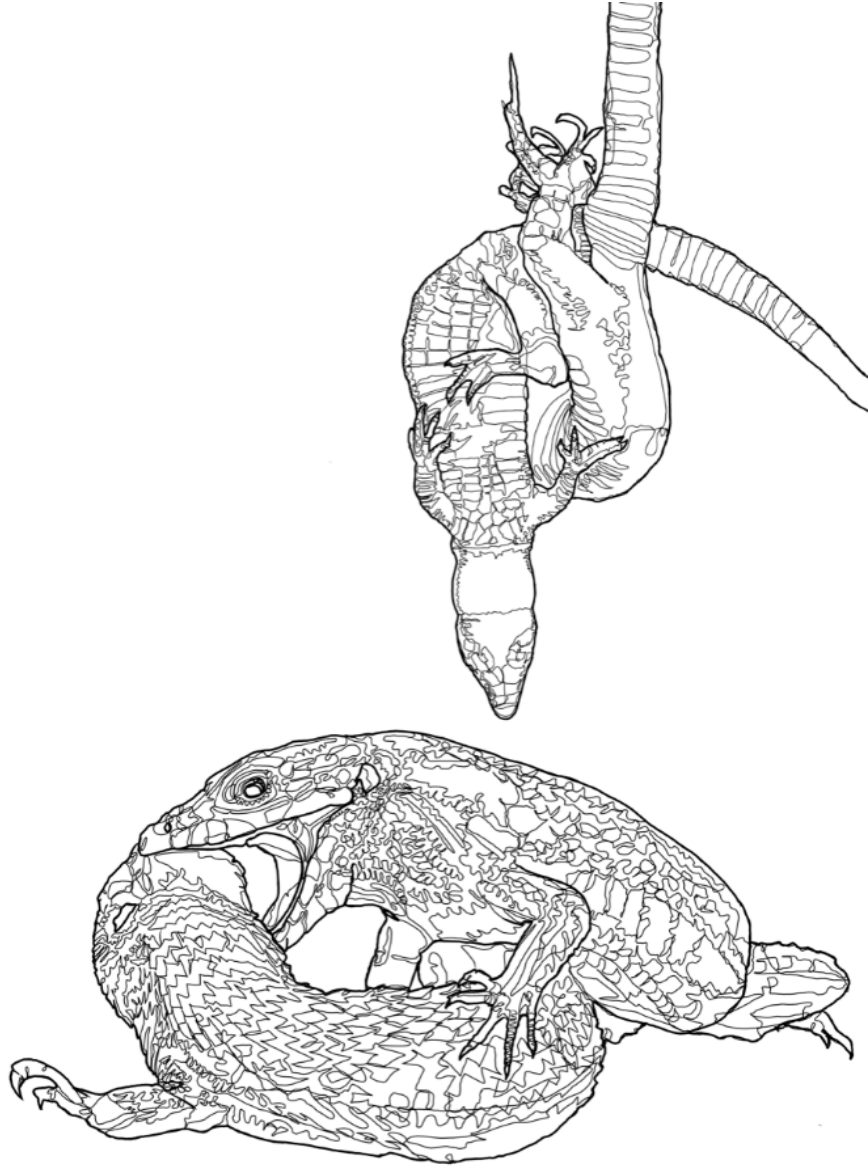
Aunque los efectos maternos pueden condicionar el fenotipo de las crías hasta el momento de la eclosión, el ambiente externo es lo que determinará, una vez que nacen, sus características de desarrollo. Sin embargo, las características individuales de las crías pueden condicionar la respuesta que ejecutan en función del ambiente en el que se desarrollan. En el **capítulo sexto** evaluamos cómo la calidad del ambiente materno durante la gravidez y la existencia de un ambiente postnatal estresante afecta a la personalidad de las crías. Para ello, hicimos un experimento en el que tratamos a crías de hembras que habían sido suplementadas con vitamina D con corticosterona, simulando una situación de estrés post-natal. Las crías fueron probadas en sucesivos test comportamentales que evaluaban su tendencia a ser más o menos activos, ocupar durante más tiempo un refugio y asumir más riesgos. Nosotros evaluamos la coherencia entre los comportamientos encontrados, así como su repetibilidad en el tiempo. También evaluamos su velocidad de escalada como medida indirecta de su condición y de su comportamiento en una situación de estrés. Nuestros resultados mostraron, de nuevo, un fuerte efecto de la dieta materna en la motricidad de las crías y revelaron la existencia de personalidades en cuanto al uso del refugio en el caso de las crías con estrés inducido que eran hijas de madres suplementadas. También encontramos que la actividad de las crías de madres suplementadas fue más predecible que la de los otros grupos, independientemente del nivel de



estrés; y que el nivel de estrés afectó al nivel de riesgo asumido. Nuestros resultados sugieren que la condición de los individuos, influida por la dieta de la madre, y las condiciones encontradas en el ambiente postnatal, afectan a la expresión de patrones individuales de personalidad induciendo, según los casos, variaciones en la predictibilidad y repetibilidad del comportamiento.



INTRODUCCIÓN





INTRODUCCIÓN GENERAL

La importancia de la información ecológica

La supervivencia de los animales está condicionada por la información disponible en su entorno y la interpretación que realizan de ella. Recopilar información permitirá al animal reducir la incertidumbre ante la variación ambiental cambiante (Dall y Johnstone 2002; Dall et al. 2005) y, utilizándola de manera correcta, incrementar su Eficacia Biológica (*Fitness*). Para ello, en función de la información disponible, deberá de tratar de recopilar toda la posible, evaluar su calidad y confianza de la misma, y tomar la decisión adecuada. Dependiendo de la procedencia de la información y de si la información y la respuesta ejecutada son correctas y coherentes entre ellas, el animal tendrá posibilidades de incrementar su eficacia biológica (Wiley 1983). La información debe ser evaluada para determinar su importancia y su veracidad para, posteriormente, ejecutar una respuesta adecuada al respecto. Por ejemplo, ante el indicio de presencia de un depredador, el animal evaluará si la información recibida es veraz y valorará si debe tomar la decisión de huir o permanecer. La decisión en la respuesta implica elegir entre varias opciones que suponen asumir diferente inversión de energía y/o de riesgo en función de los beneficios esperados.

Por medio de la interacción directa con el ambiente, un animal puede recopilar “información personal” por sí mismo sobre las características del medio biótico o abiótico. Esta estrategia puede suponer un gran gasto de energía y conllevar un gran riesgo si se basa en el ensayo y error. Sin embargo, existe una estrategia alternativa utilizando como fuentes de información a los coespecíficos y su comportamiento. Este tipo de información es la “adquirida socialmente” (Danchin et al. 2004). Si la información social obtenida es, por ejemplo, acerca de la presencia o ausencia de individuos, de su localización espacial o de las actividades realizadas, estaremos hablando de “información social inadvertida”. Este tipo de información se transmite de manera *no intencionada*, por lo que no implica un proceso comunicativo (ver abajo señales e indicios). El animal que observe estos comportamientos estará recibiendo “indicios sociales” (*social cues*) o “información pública” acerca de la presencia o ausencia de unos determinados rasgos en el coespecífico. Sin embargo, detrás de esta información proporcionada por el otro individuo, no habría la *intencionalidad* que se supone implica la emisión de una señal.

Recopilar información personal sobre el ambiente puede ser muy preciso, y por lo tanto muy fiable, pero a la vez muy costoso desde un punto de vista del riesgo y la energía. Aunque utilizar la información social es menos preciso y potencialmente menos fiable es, al mismo



tiempo, muy barato. Por ejemplo, en un contexto del forrajeo, si un animal busca comida por sí mismo puede invertir mucha energía en localizar recursos alimenticios mientras que, si observa los parches de forrajeo que utilizan sus coespecíficos, podría localizar los recursos de una manera más eficiente. Utilizar la estrategia social podría suponer un ahorro de energía para el observador con respecto a la que emplearía el buscador autónomo. Dentro de una población, la estrategia utilizada puede variar entre individuos, siendo los que principalmente utilizan la información personal los “productores” (*Producers*) y los que usan la información proporcionada por los primeros los “gorriones” (*Scroungers*) (Barnard y Sibly 1981). Sin entrar a fondo en la teoría del juego *Producers-Scroungers* que plantea cuál sería la estrategia óptima según cada caso (ver Giraldeau y Beauchamp 1999; Giraldeau y Dubois 2008), se puede observar que la información social puede dar ventaja a uno de los dos agentes implicados, el gorrón. Esta dinámica en la que un animal utiliza, o se beneficia, de la información proporcionada por otro, de manera “intencional” o no, implica que existe un “perceptor” de información que percibe e interpreta la información producida por el primero.

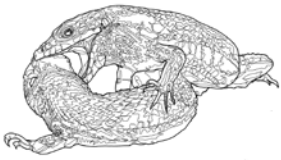
La información ecológica y la comunicación animal

Debido a que la percepción de información social en animales implica un perceptor de la información proporcionada por otro individuo, la recopilación de información social en animales se ha estudiado desde el marco teórico de la comunicación animal (Dall et al. 2005). Sin embargo, la definición y el enfoque adecuado para el estudio de la comunicación es todavía uno de los grandes temas de debate dentro de la academia (Seyfarth y Cheney 2017). Parte de esta discusión está causada por la forma en la que se ha afrontado el estudio de la comunicación animal y su semejanza o paralelismo con el proceso comunicativo humano: un emisor codifica y envía una señal a un receptor que, a su vez, decodifica y ejecuta una respuesta en función de la señal recibida (Marler 1982). Probablemente, el que los primeros modelos que describieron la comunicación animal y el lenguaje humano siguiesen este mismo esquema se deba a cierta influencia del sistema del telégrafo y no tanto a la observación de lo que sucede en realidad en los animales (Wiley 2013). Actualmente, algunos autores postulan por prescindir de esta analogía entre lenguaje humano y comunicación animal porque, defienden, supone un constructo artificial que limita nuestra comprensión de lo que realmente ocurre (Seyfarth y Cheney 2003; Rendall y Owren 2013). En realidad, parece que está en disputa no solo el marco teórico, sino la propia definición de comunicación animal.



Dos escuelas de pensamiento debaten acerca de si en el proceso comunicativo se produce, precisamente, una transferencia de información honesta entre el emisor y el receptor (ej. Otte 1974; Zahavi 1975; Hauser 1996), o basada en la influencia o manipulación que ejerce el emisor sobre el receptor (ej. Dawkins y Krebs 1978; Owings y Morton 1998; Maynard-Smith y Harper 2003). Los primeros postulan que la comunicación no puede entenderse sin transferencia de información y, los segundos, que la información, no solo no es necesaria para definirla (Stegmann 2013), sino que debemos prescindir de ella en favor de un enfoque adaptativo (Scott-Phillips 2008). La raíz de la discusión y la divergencia de enfoques parece radicar en la forma y el origen evolutivo de la señal comunicativa (en sentido amplio, ver más abajo) y las presiones de selección que actúan sobre el emisor y el receptor. Actualmente se ofrecen propuestas desde ambas posturas. Por un lado, se proponen nuevos marcos teóricos que prescindan de la transferencia de información y una reorientación de los mecanismos (Rendall y Owren 2013) y por el otro una redefinición que busque puntos comunes sin prescindir de la información (Carazo y Font 2010). Sin embargo, puede ser difícil traspasar la discusión desde la teoría a la práctica. Actualmente, la mayoría de los ecólogos evolutivos entienden la comunicación, de manera general, como un proceso de transferencia de información entre un emisor y un receptor por medio de señales (Bradbury y Vehrencamp 2011). Aunque eso no impide matizar y concretar lo que sucede en cada caso en función de las especies estudiadas, su ecología y su historia evolutiva.

En el proceso comunicativo, el receptor como perceptor del “mensaje” podría beneficiarse de la información enviada por el emisor (Stegmann 2013). Sin embargo, este beneficio podría verse comprometido si la información facilitada por el emisor no es fiable (Searcy y Nowicki 2005). Por otra parte, si el receptor ejecuta la respuesta adecuada, el emisor podría beneficiarse de haber facilitado esa información. Este es, precisamente, el motivo por el que el emisor iniciaría el proceso (Dawkins y Krebs 1978). Desde este enfoque, la comunicación permitiría al emisor obtener efectos (respuestas) y al receptor obtener información (Carazo y Font 2010). Encontraremos diferencias en las estrategias desarrolladas y en las presiones de selección a las que están sometidos el emisor, como productor de información y espectador de la respuesta, y el receptor, como extractor e intérprete de la información (Guilford y Dawkins 1991; Guilford y Dawkins 1993). También serán diferentes los beneficios obtenidos por ambos en función del coste de la transmisión de la información para cada uno. El emisor puede necesitar invertir energía o recursos en la transmisión de información sin tener la certeza de que ésta llegará al receptor y obtendrá beneficio de ello. Y, a su vez el receptor, puede tener que invertir en extraer y descifrar la información (por ejemplo, con ensayo-error y aprendizaje) y



tener que asumir el coste asociado de ejecutar una respuesta sin tener certeza de si la información era veraz. Esto muestra que el proceso comunicativo es asimétrico y que puede ser cooperativo o no cooperativo entre emisor y receptor. La clave de todo parece estar en el “paquete de información” que el emisor envía o el receptor percibe.

Los “paquetes de información”: indicios y señales

La primera distinción fundamental realizada para distinguir los paquetes de información se realiza a la luz de si la evolución los ha modelado para que el emisor los emita o, simplemente, son interpretados como información disponible por el receptor sin que la evolución haya participado en su construcción (Maynard-Smith y Harper 1995; Maynard-Smith y Harper 2003). En el primer caso, hablamos de señales (*signals*) y, en el segundo, de indicios o rastros (*cues*). Un **indicio** es definido como una característica del mundo, animado o inanimado, que puede ser usada por un animal como una guía de una futura acción (Hasson 1994). La diferencia con la señal, además del diseño evolutivo, es que es que el receptor percibirá la información procedente del coespecífico sin que este realmente tenga intención de transmitirla (Johnstone 1997). Por lo tanto, dentro de los indicios, podríamos encontrar la información que un receptor percibe sobre el hábitat, el clima o también sobre la presencia de depredadores o de presas. Sin embargo, también podría constituir un indicio la información social inadvertida: recursos tróficos, de nidificación, de asoleamiento... o también rasgos morfológicos o comportamentales que describen el fenotipo del coespecífico (Bradbury y Vehrencamp 2011). Estos indicios podrían utilizarse en un contexto de relaciones sociales como la competición intraespecífica o la selección sexual, en los que las señales *verdaderas* también están muy presentes. Al hablar de indicio, nos referimos principalmente a la percepción de información que realiza el receptor sin que ni siquiera se requiera la presencia del otro individuo coespecífico (Danchin et al. 2004).

Ha habido alguna propuesta para diferenciar los indicios de las señales basándose en que las últimas serían más conspicuas, más redundantes, más estereotipadas y, a menudo, precedidas de componentes de alerta (Wiley 1983). Sin embargo, esta descripción de las señales, aunque relativamente acertada, no alude a su origen que parece que es lo realmente determinante para distinguir entre indicios y señales. Stegmann (2013) define las señales como “*eventos físicos, comportamientos o estructuras a las cuales un receptor responde*”. Esta definición incluiría como señales también a los indicios y podría ser confusa a la hora de estudiar el proceso comunicativo. Por ello, una de las definiciones ampliamente aceptada, es la definición de señal dada por los que apuestan por la comunicación basada en la influencia: **Señal** es “*un acto o estructura que altera el comportamiento de otro organismo (respuesta) y que ha evolucionado para ese propósito, siendo efectiva porque la respuesta del receptor también ha*



evolucionado” (Maynard-Smith y Harper 2003; Scott-Phillips 2008; Bradbury y Vehrencamp 2011). Una definición reciente aportada por Carazo y Font (2010) y basada en la definición de **información funcional** de Stegmann (2005) permite mantener la distinción evolutiva entre señal e indicio pero incide en la interpretación que realiza el receptor de la información recibida: *“Señal es cualquier acto o estructura que (i) afecta al comportamiento de otros organismos, (ii) evoluciona (o es mantenida) por causa de sus efectos, y (iii) es efectiva porque transfiere información (funcional) a los receptores”*. Esta última definición permite contemplar la recepción de información sin tener que restringirnos únicamente al ámbito adaptativo del emisor y también evaluar el éxito y la eficiencia de la señal.

Se puede considerar que, para que se dé un proceso de comunicación animal, debe haber un individuo emisor que envía una señal a un individuo receptor que la interpretará y ejecutará una respuesta acorde; y que, tanto emisor como receptor, estarán sometidos a diferentes restricciones y presiones evolutivas (Endler 1993). Podemos concluir que no toda la recopilación de información implica comunicación (por ejemplo, el uso de indicios), pero sí que la recopilación de información podría ser uno de los mecanismos que permite la comunicación animal por medio de señales.

Fialibilidad (honestidad) y engaño en las señales

Aunque parece que la comunicación animal podría beneficiar tanto a emisor como a receptor, esto solo debería suceder si la información transmitida en la señal es veraz (Maynard-Smith y Harper 2003). Es posible que el emisor trate de engañar al receptor para obtener un beneficio (Dawkins y Krebs 1978). Un ejemplo clásico de señalización engañosa es la reflejada en el mimetismo batesiano (Grafen 1990). En este caso el emisor, aun siendo una presa sabrosa y apetecible, adopta una coloración (señal) similar a la de otros animales que en realidad son venenosos para protegerse indirectamente. El receptor, al ver los colores y la semejanza del emisor probablemente interpretará que el animal es venenoso, aunque no lo sea. En este caso hablamos de una **señal engañosa o manipulativa** que solo beneficiaría al emisor. Mientras que, si la señal refleja la información emitida de manera fiable, se beneficiarían tanto el emisor como el receptor y hablaríamos de **señales honestas** (para una excelente revisión acerca de confianza y engaño en la comunicación animal ver Searcy y Nowicki 2005).

La búsqueda de señales honestas y su diferenciación de las señales engañosas o manipulativas ha sido uno de los grandes retos de la ecología del comportamiento; sobre todo estudiada en el concepto de la señalización sexual (Grafen 1990). Puesto que la señal debe



beneficiar al emisor y al receptor, uno de los puntos clave es la confianza que el segundo puede depositar en la señal recibida en cuanto a la información contenida. Searcy y Nowicki (2005) establecen dos criterios para evaluar si una señal es confiable: (1) alguna característica de la señal está comúnmente relacionada con algún atributo del señalador y su ambiente y (2) el receptor debe beneficiarse de la información obtenida sobre ese atributo. Esto nos muestra y nos introduce en uno de los aspectos clave en la señalización: ésta depende de los rasgos (atributos) del emisor.

La variabilidad en la producción de señales

Se deduce que, si existe variación en las características de diferentes individuos, no todos los individuos serán capaces de desarrollar la señal de la misma manera o con la misma intensidad y que la información transmitida dependerá de los rasgos de cada uno. Esta variación interindividual garantiza, por otra parte, que los rasgos que constituyen la señal sean seleccionados evolutivamente de entre todos aquellos posibles. Pero, a la vez, esta variación está producida por la propia variabilidad genética y fenotípica de los animales. Las señales podrían indicar de manera directa o indirecta cuáles son las características genéticas de cada individuo, así como el fenotipo en el momento de expresión de la señal, podría reflejar aspectos genéticos o de la historia vital (*life-history*) de los animales (edad, tamaño, potencial reproductivo, etc.) (Roff 1992). La literatura sobre el estudio de rasgos individuales y su relación con la señalización es tremendamente amplia (ver ejemplos en Krebs y Davies 1997; Maynard-Smith y Harper 2003; Searcy y Nowicki 2005). Y, últimamente, también se han hallado relaciones con la variación individual debida a la personalidad y los síndromes comportamentales (Akçay et al. 2014; Dirienzo y Hedrick 2014). Todos estos rasgos están relacionados con la eficacia biológica de los individuos y, la variabilidad de las señales expresadas por cada uno de ellos podría reflejar de manera honesta las características del individuo. Esto hace que la comunicación sea pieza clave de múltiples procesos ecológicos en los animales y que las señales estén implicadas, por ejemplo, en procesos de reconocimiento de individuos, de su calidad o de su estrategia comportamental (Tibbetts y Dale 2007). Son diversos los factores que contribuyen a la variación de la señalización tanto en la producción de señales como en la recepción de estas, contribuyendo a la evolución de los sistemas de comunicación y, por ende, a la evolución de las especies (Boughman 2001).

- Los costes de señalización

Toda transmisión de una señal tendría un coste asociado, como pérdida de recursos o de eficacia biológica, solo por el hecho de enviarla. El coste necesario e inevitable para asegurar que la señal



se transmite de manera eficaz es llamado **coste de eficacia** y trataría de compensar las restricciones causadas por el ambiente y los órganos sensoriales del receptor (Guilford y Dawkins 1991). Sin embargo, hay otro coste asociado al mantenimiento de la honestidad de la señal, el **coste estratégico** (Grafen 1990). Este coste sería diferente para cada individuo porque dependería de la estrategia de inversión de recursos que cada uno puede asumir. Para hablar de este coste tipo de coste debemos plantear primero el **principio del Hándicap** (Zahavi 1975). Entendemos por Hándicap aquella *señal cuya fiabilidad es asegurada porque su coste es mayor que los requeridos únicamente para ser una señal eficaz*; este coste podría reflejarse en la producción de la señal o en las consecuencias de la misma (definido en Maynard-Smith y Harper 2003). Un hándicap existiría si aquellos individuos de mayor calidad expresan una señal muy intensamente, por ejemplo un ornamento colorido, a la vez que asumen un coste causado por alguna desventaja como alta carga parasitaria, vejez, una lesión, etc. El coste que asume, o la inversión que el individuo realiza, al emitir la señal es tan elevado que garantiza que la señal sea honesta. La combinación de la desventaja y la intensidad de la señal mostraría de una manera más efectiva que esos individuos son capaces de expresar la señal “a pesar de” tener esa desventaja. A pesar de todo, el principio del hándicap parece paradójico por lo que ha tenido y sigue teniendo (Számadó 2001) muchos detractores. Maynard-Smith y Harper (1995) plantearon una diferenciación con respecto al hándicap que denominaron **índice**: *aquella señal cuya intensidad está causalmente relacionada con la calidad que está siendo señalada y que no puede ser falseada*. Esto implicaría que no tiene un coste asociado, sino que es solo la señal que es posible producir porque está totalmente relacionada con la característica que señala (Hasson 1994). Una última definición reciente expresa que las **señales** (o *displays*) pueden ser **dependientes de la condición** (Hill 2011): *señal dependiente de la condición es aquella característica conspicua de un organismo que varía en su expresión dependiendo de su capacidad de resistir (o mantener la funcionalidad óptima de los procesos esenciales) frente a los desafíos ambientales*. Esta última definición parece que nos permite llegar a un punto común entre los índices y los hándicaps. Si asumimos que la señal es honesta, los animales invertirán en la señalización todo lo que puedan. Si un individuo posee un hándicap y es capaz de expresar la señal querría decir que el coste de la señal es asumible por él, lo que indica que su “calidad” es buena a pesar del hándicap. Es decir, que su condición es buena, aunque posea el hándicap y, por eso, puede costear la expresión de la señal. Sin embargo, lo que indica que la señal es honesta es que tiene un alto coste que no todos los individuos pueden permitirse. Si la señal es honesta no se puede falsear, incluso con un hándicap; y las señales reflejarán la capacidad de los individuos para invertir en la señal todo lo posible. Podremos ver señales muy intensas o extravagantes en individuos que tienen desventajas porque son capaces de producirlas, no



porque utilicen el engaño. Este enfoque de la expresión de las señales como dependientes de la condición del emisor es el que guía el estudio realizado en esta tesis doctoral, dado que hay evidencias previas en la especie de objeto de estudio de que las señales siguen este patrón (ver apartado “*Iberolacerta cyreni* como especie modelo”)

- **Trade-offs**

La gran pregunta es acerca de cuánto puede invertir el animal en la señal. Normalmente no es solo cuestión de energía, sino de la dependencia de la expresión de algunas señales del uso de recursos concretos para producirse; por ejemplo, de los carotenoides en las señales coloridas (Perez-Rodriguez 2009) o de las vitaminas en las señales químicas (Kopena et al. 2011). Una inversión excesiva en la expresión de la señal podría suponer un coste demasiado elevado para el emisor en términos de supervivencia (Kotiaho 2001). Debe de existir un compromiso (*trade-off*) entre la expresión de la señal y la capacidad de mantener la homeostasis interna, pero también puede existir un compromiso entre emitir una señal demasiado conspicua y exponerse a elevados riesgos de depredación (Kotiaho 2001). La variación individual en la producción de señales es dependiente no solo del estado de cada individuo sino también de su genotipo y de su historia vital que da lugar al fenotipo en el momento de expresar la señal, que determinan los compromisos a los que cada individuo puede enfrentarse (Kokko 1998). Este mecanismo de equilibrio entre la posibilidad de expresar la señal más efectiva posible (en términos de intensidad de la expresión) y la cantidad de recursos disponibles-utilizados y/o de riesgo asumido, es una restricción necesaria para mantener la honestidad de la señal.

Transmisión de información entre coespecíficos

La recopilación de la información por los animales está restringida por los sistemas sensoriales que poseen y por su rango de detección. Normalmente los animales recopilan información por medio de sensores que pueden ser de varios tipos: acústicos, visuales, fotorreceptores, mecanorreceptores (incluidos fonorreceptores), termorreceptores, electrorreceptores, magnetorreceptores y quimiorreceptores (Kay 1998; Moyes y Schulte 2008; Stevens 2013). Cada sensor en cada especie tendría un rango de detección particular que determinaría la información que es posible recopilar por cada uno de ellos. La selección natural, por ejemplo, habría seleccionado aquellos sensores que permitían la detección de la aproximación de un depredador puesto que, aquellos animales que no fuesen capaz de utilizar la información disponible por el depredador habrían sido depredados más fácilmente.

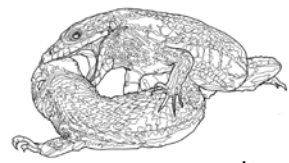


Desde el punto de vista comunicativo, solo aquellas señales que pueden ser detectadas por los sensores nerviosos de los receptores tendrán posibilidad de desarrollarse (Bradbury y Vehrencamp 2011). Esta compatibilidad entre sistemas de emisión y de recepción de señales son un requisito indispensable para que la comunicación entre coespecíficos tenga lugar. Por ejemplo, la emisión de señales coloridas en los pájaros debe de responder al espectro de visión de luz que los coespecíficos son capaces de detectar. La selección natural y sexual habría favorecido la selección de las señales producidas en aquel rango del espectro que es visible por los coespecíficos, desechando aquellas señales que se encontraban fuera del rango del espectro visible. Los sensores determinan, entonces, el tipo de comunicación que puede darse entre los animales; siendo entre los vertebrados la comunicación acústica, visual y olfativa (o química) las más comunes.

- **Transmisión de información de padres a hijos**

Existe un tipo de transmisión de información entre coespecíficos que no está sujeta al sistema de detección y que tiene una gran importancia a nivel evolutivo: la transmisión de información genética (Crick 1970). Los hijos heredarán una gran cantidad de genes de los padres que determinarán su genotipo, el cual es información disponible para desarrollar el organismo, producir el fenotipo según la interacción con el ambiente y transmitir esa misma información a su progenie.

Los padres no solo transmitirán información genética a los hijos, sino que hay una contribución añadida muy grande a la información de la que los hijos disponen antes y después de nacer que es debida a los padres. Esta información que influye directamente en el fenotipo de las crías y no tiene componente genético alguno, son los llamados **efectos parentales**: *la influencia paterna en el fenotipo de las crías que no puede ser atribuida a la transmisión mendeliana de cromosomas* (Kirkpatrick y Russell 1989; Mousseau y Fox 1998). La influencia ejercida depende de las relaciones paterno-filiales y se da en eventos como la gestación, el momento de la alimentación, el lugar de nidificación, etc. En función de la ecología de la especie y de la inversión que realice en cuidados parentales encontraremos diferentes efectos y de distinta intensidad sobre el fenotipo de las crías. Normalmente los efectos parentales se dividen entre efectos paternos o maternos en función de quién es el responsable de la transmisión de información. Sin embargo, son los efectos maternos los que han recibido mayor atención en los estudios de ecología evolutiva (Mousseau et al. 2009). La razón puede ser la gran influencia que el ambiente materno tiene sobre las crías desde el momento de la fecundación. De hecho los **efectos maternos** actualmente se conciben como *la variación fenotípica en las crías causada por el fenotipo materno atendiendo a la herencia no-genética* (herencia mediada por RNA y herencia



cultural y ecológica (Danchin y Wagner 2010)), *la plasticidad fenotípica y la epigenética* (ver revisiones en Uller 2008; Danchin y Pocheville 2014). No solo el fenotipo, sino el ambiente materno, tanto externo (el hábitat) como interno (el cuerpo durante la gestación), es determinante para el desarrollo del fenotipo de las crías de manera positiva o negativa (Mousseau y Fox 1998; Marshall y Uller 2007). Las crías podrían adquirir información sobre su ambiente futuro antes del nacimiento dado que el ambiente materno es un buen predictor del mismo (Bestion et al. 2014). Los efectos maternos inducidos por el ambiente (Lacey 1998) serían adaptativos si la información proporcionada programa la fisiología de las crías de manera acorde a las condiciones que luego se encontrará (Wells 2007; Monaghan 2008). A este tipo de efectos maternos se les conoce como **efectos maternos anticipadores** (*anticipatory maternal effects*) (Marshall y Uller 2007). La madre, indirectamente, podría informar a las crías de las características ambientales del hábitat elegido como la cantidad de recursos disponible (Warner et al. 2015), la presencia de depredadores (Feng et al. 2015) o las fuentes de estrés (Meylan et al. 2012). De esta manera el fenotipo del embrión se “pre-adaptaría” al nuevo ambiente por medio de modificaciones morfológicas (Roff 1998) o, una vez nazca, por medio de respuestas comportamentales concretas (Bestion et al. 2014). Sin embargo, no está claro si la información proporcionada por la madre constituye una señal comunicativa enviada por la madre a las crías (Lacey 1998) o solo un indicio del que las crías pueden disponer (Warner et al. 2015).

Comunicación compleja: multimodal y multisensorial

A pesar de las distinciones que habitualmente se hacen al hablar de comunicación animal según el canal que empleen (auditivo, visual o químico), en realidad, la comunicación se produce a través de una combinación de múltiples señales de diversa naturaleza (Johnstone 1996). Si la comunicación se produce a través de varias señales, pero dentro del mismo canal sensorial, hablamos de **señalización múltiple** (*multiple signalling*); mientras que, si se produce combinando varios sistemas sensoriales, como visual y químico, hablamos de **señalización multimodal** (*multimodal signalling*).

Se han dado dos posibles explicaciones para la existencia de la señalización compleja (Johnstone 1997). La primera en referencia a la cantidad de información que proporcionan las señales del emisor (comunicación basada en la información) y la segunda en referencia al aprovechamiento de las preferencias del receptor (comunicación basada en la influencia o manipulación): (1) Si las señales complejas proporcionan al receptor información repetida sobre una característica del emisor podrían estar reforzando la información proporcionada por una



señal al combinarla con la otra produciendo señales redundantes, lo que permitiría una evaluación más fiable de la condición del señalador (*back-up hypothesis*); pero también podría suceder que las diferentes señales proporcionasen información sobre aspectos diferentes de la condición del animal (*multiple message hypothesis*) (Johnstone 1996), permitiendo una evaluación global de los rasgos del emisor al reflejar distintas “calidades” (por ejemplo, la cantidad de carotenoides podría reflejar la condición física y la cantidad de melanina el estatus social) (Candolin 2003); (2) Si sirven para facilitar la detección o tomar ventaja de las preferencias arbitrarias del receptor el emisor estaría beneficiándose de la manipulación del receptor. Podrían haber evolucionado desde sesgos sensoriales pre-existentes en el receptor (Ryan y Keddy-Hector 1992; Ryan y Rand 1993). También se han propuesto que las señales complejas en realidad no reflejarían de forma precisa la condición del animal (*unreliable signal hypothesis*), sino que la complejidad de la señal aumentaría la confusión (Møller y Pomiankowski 1993). Sin embargo, no está claro cuál es la razón de la existencia de las señales múltiples y hay argumentos y evidencias que apoyan todas las hipótesis en mayor o menor medida. Por ejemplo, no todas las características del señalador podrían ser contempladas como señales comunicativas, sino que también podrían contemplarse como una combinación de señales e indicios que permitirían una evaluación más precisa o fiable del emisor por parte del receptor. Las señales, complejas o no, habrían sido seleccionadas en función de los hábitats de las especies, siendo las propias restricciones causadas por el ambiente una fuente de variación de las señales (*environmental selection hypothesis*) (Morton 1975; Richards y Wiley 1980). Esto es porque la capacidad de detección podría variar en función de las condiciones ambientales y, en ese caso, las señales complejas podrían asegurar la recepción de la señal por diferentes vías si reflejan la misma información. Para esto la información proporcionada por las señales debería de ser coherente entre sí, y el uso de un canal sensorial u otro (*multimodal signalling*) o de señales redundantes reforzaría la percepción de los rasgos del emisor cuando las características ambientales cambian (Candolin 2003). El problema surgiría si detectásemos señales que reflejan informaciones contrarias entre ellas, que podrían confundir al receptor. En ese caso deberíamos de evaluar si la señal es honesta o engañosa.

El origen evolutivo de la señalización: sesgos sensoriales

Parece que Dawkins y Krebs (1978) no se referían a esta incoherencia en la combinación de señales cuando hablaban de manipular al receptor, sino a aprovechar que el receptor tiene una determinada sensibilidad para “leer la mente” del emisor y beneficiarse de ello. Hay todo un cuerpo teórico que argumenta sobre el origen de la comunicación y la señalización en el que



el emisor se aprovecharía de las “preferencias” iniciales del receptor (Cummings y Endler 2018). En el contexto del estudio de la selección sexual, se describieron tres procesos que, a pesar de ser complementarios o prácticamente similares, se han distinguido por el énfasis en las ventajas adaptativas o las presiones de selección de cada uno (ver Endler y Basolo 1998): (1) los sesgos sensoriales pre-existentes en el receptor (*sensory bias hypothesis*) (Basolo 1990, 1995), (2) la explotación sensorial por parte del emisor de esos sesgos (*sensory exploitation*) (Ryan y Rand 1990; Ryan 1998), y (3) las trampas sensoriales en las que podría caer el receptor (*sensory traps*) (Christy 1995). Parece que hay acuerdo en que el sesgo del receptor estaría causado porque el sensor nervioso que recibe la señal, en su origen, tendría la función de percibir información ambiental (indicios) y no una función comunicativa (señales) (Endler y Basolo 1998). Esto hizo que se planteara la unión de todas las propuestas bajo el mismo marco teórico de las “hipótesis del sesgo sensorial” (Fuller et al. 2005). Sin embargo, hay un modelo para explicar el origen de las señales que parece reunir tanto las preferencias o sesgos del receptor como las presiones ejercidas por las características del ambiente, el modelo del impulso sensorial (*sensory drive*) (Endler 1992; Cummings y Endler 2018). Este modelo establece que tanto los rasgos del emisor como el comportamiento del receptor habrían coevolucionado bajo las restricciones ambientales bióticas o abióticas. Distingue entre el componente de señalización, atribuido al emisor, y el componente sensorial, atribuido al receptor; y plantea que la coevolución de ambos sistemas habría sido definida por la explotación sensorial (Cummings y Endler 2018).

La comunicación y la selección sexual

Dentro de la perspectiva de la comunicación, las señales sexuales tienen un particular interés dado que median el comportamiento de elección de pareja, o la competencia entre machos para acceder a más hembras. Esto es de relevancia por las consecuencias que tienen en los procesos de selección sexual (Andersson 1994) y en el éxito reproductivo de los individuos. Normalmente la selección sexual es comprendida como dos procesos interdependientes y que actúan reforzándose mutuamente: la competición entre machos por el acceso a las parejas potenciales (*male-male competition*) y la elección de pareja por las hembras (*mate choice*) (Berglund et al. 1996; Wiley y Poston 1996; Wong y Candolin 2005; Hunt et al. 2009). Los machos competirían por las hembras por medio de encuentros agonísticos, mientras que las hembras solo seleccionarían como parejas aquellos machos que prefieren (Halliday 1983). Al ser dos procesos diferentes están sometidos a distintas presiones de selección (Qvarnström y Forsgren 1998) pero, se puede deducir, que en ambos tiene una importancia clave la recopilación de



información sobre los coespecíficos. Como los machos son los sujetos habituales de selección sexual, nos centraremos en la producción de señales que estos ejercen por medio de ornamentos y en cómo las hembras o los otros machos interpretan estas señales en el contexto reproductivo.

En el proceso de apareamiento, los machos, proporcionarían información mediante sus rasgos individuales reflejando de manera honesta sus características genéticas, su condición o sus habilidades competitivas. Tanto machos como hembras evaluarían los rasgos exhibidos por los machos, ya sea en forma de señales (Grafen 1990; Kotiaho 2001) o de indicios (Valone y Templeton 2002) determinando esto las relaciones sociales entre ellos. Los machos podrían evaluar la capacidad competitiva de los rivales por medio de las señales ejecutadas y, así, valorar sus probabilidades de ganar o perder en un enfrentamiento (Enquist y Leimar 1983). Por su parte, las hembras podrían evaluar la expresión de las señales o los rasgos del macho para comparar entre ellos y elegir la mejor pareja (Bateson y Healy 2005).

- ***Male-male competition***

La competición entre machos para fecundar a las hembras no solo se da en los momentos previos a la cópula, sino que también después de la cópula hay mecanismos de competencia espermática, de infanticidio o de aborto que evitan que los competidores tengan mayor eficacia biológica (Carranza 1994). En esta tesis doctoral nos limitaremos a los procesos de competición entre machos previos a cópula; es decir, por el acceso al apareamiento con más hembras. Esta competición, principalmente, se desarrolla por medio de combates agonísticos que procuran la exclusión del rival de un territorio o área de campeo (Huntingford et al. 1987). En los momentos previos al combate, los machos pueden exhibir sus rasgos enviando señales al conteniendo sobre su habilidad competitiva e, indirectamente, su posición en la jerarquía de dominancia. La evaluación de las señales emitidas por el rival permitiría tomar una decisión más eficiente desde el punto de vista de riesgos asumidos y costes energéticos (Enquist 1985). Sin embargo, esta evaluación del rival no tiene por qué hacerse por medio de señales, sino que puede hacerse durante el propio encuentro agonístico y que, tras el combate, el reconocimiento individual entre machos evite nuevos enfrentamientos (Jaeger 1981). Este comportamiento fue nombrado por (Fisher 1954) con el irónico término de “reconocimiento del querido enemigo” (*dear enemy recognition*) en referencia al ahorro energético que supondría evitar el enfrentamiento con machos ya conocidos, dado que el resultado de un nuevo enfrentamiento es altamente predecible.



La defensa agonística del territorio en el que se encuentran las hembras puede ser apoyada por medio de otras señales no solo comportamentales sino también químicas o acústicas. El marcaje territorial mediante marcas olorosas en el sustrato (secreciones, heces u orina) o vocalizaciones es muy común en un amplio rango de especies y podría tener función de exclusión de competidores (Gosling 1982). Los rivales comprobarían la presencia del dueño del territorio y podrían reconocerle, si han tenido encuentros previos, o estimar su capacidad competitiva utilizando las marcas territoriales para extraer esa información (Gosling y McKay 1990).

Aquellos machos que tienen buenas habilidades de combate podrían incrementar sus oportunidades de apareamiento excluyendo a los rivales más débiles (Andersson et al. 2002). Si las jerarquías de dominancia a menudo se establecen teniendo en la parte más alta a los machos de mayor "calidad" y, estos también expresan de manera honesta su calidad en las señales sexuales, probablemente serán los que más se reproduzcan por ser más elegidos por las hembras (Wong y Candolin 2005). En todo caso, ser más dominante y tener mayor acceso potencial a las hembras no tiene por qué garantizar ser elegido por ellas ni obtener cópulas. Como tampoco ser selectivas garantiza a las hembras copular con los mejores, como se ha visto en el éxito de cópula de individuos flotantes o satélites sin territorio (Smith 1978) o en el caso de violaciones (Pinsker y Doschek 1980; Thornhill 1980).

- ***Mate choice***

Puesto que en la mayoría de las ocasiones la elección de pareja es ejercida por las hembras, trataremos este apartado desde este punto de vista (pero ver Kokko y Johnstone 2002; Clutton-Brock 2007). Las preferencias de las hembras por los machos estarían guiadas por aquella información, señales o indicios, que ellas perciben y por las que son atraídas. A su vez, las propiedades sensoriales de las hembras estarían influidas por los comportamientos o rasgos de los machos que exhiben cierto fenotipo por el cual mostrarían preferencia (Heisler et al. 1987). Sin embargo, preferir solo implica una parcialidad preconcebida por una cosa sobre otra y no implica elegir finalmente lo preferido (Jennions y Petrie 1997). Es difícil separar entre preferencia y elección real, pero la información recopilada por las hembras para preferir o seleccionar al macho está basada en los mismos procesos citados anteriormente. La hembra extraería la información acerca de las características del macho a partir de indicios, como rasgos fenotípicos (morfología, rasgos olfativos, comportamentales...) o recursos defendidos o producidos por él (nido, territorio...), o a partir de señales verdaderas que el macho envía a la



hembra para atraerla (danzas de cortejo, displays coloridos, vocalizaciones, señales químicas...)
(Candolin 2003)

La competición entre machos puede en algunos casos favorecer la selección sexual si las hembras utilizan las peleas entre machos para evaluar la calidad de los mismos puesto que la competición mostraría la honestidad de esa calidad. Incluso en algunos casos las mismas señales que muestran la dominancia o la habilidad competitiva podrían ser usadas por las hembras para evaluar la calidad de los machos (Wong y Candolin 2005).

Mucho se ha discutido acerca de los mecanismos que establecen la selección sexual ejercida por las hembras. Andersson y Simmons (2006) recopilaron estos mecanismos evolutivos y nos basamos en su trabajo para hacer una descripción de ellos:

- Beneficios directos: las señales del macho reflejarían aspectos de los que se beneficiaría la hembra directamente como ventajas materiales, calidad del territorio, nutrición o cuidados parentales.
- Sesgos sensoriales: las hembras preferirían aquellos machos que exhiben ornamentos o envían señales que son atractivas para las hembras porque *a priori* ellas tendrían una tendencia a responder a esas señales en un contexto diferente al apareamiento (sesgos por la comida, por el movimiento, por el sonido...). En este caso las hembras no obtendrían inicialmente ningún beneficio de la elección, ya que sería un subproducto del sesgo sensorial (Kirkpatrick 1987; Kirkpatrick y Ryan 1991).
- Hijos atractivos de Fisher (*Fisherian sexy sons*): Fisher (1930) planteó que si un rasgo (señal) es atractivo para las hembras, entonces sería seleccionado. Atribuyó esa varianza en los rasgos del macho a componentes genéticos, que es lo que indirectamente estaría eligiendo la hembra. Con ello haría que sus hijos se pareciesen al padre no solo en la genética, sino en la expresión de la señal. Los hijos tendrían más probabilidades de ser atractivos y de reproducirse a su vez, incrementando su eficacia biológica.
- Mecanismos indicadores (buenos genes o hándicaps): el atractivo de las señales del macho reflejaría indirectamente su calidad genética por medio de señales honestas. Si la hembra elige a estos machos estaría favoreciendo la eficacia biológica de la descendencia al proporcionarles buenos genes heredados del padre.



- **Compatibilidad genética:** las hembras podrían elegir aquellos machos que tiene alelos que complementan su genoma para beneficiar a sus crías con un genoma más diverso.

Parece plausible el que las hembras utilicen varias señales para decidir con qué macho reproducirse. El uso de la señalización múltiple y la señalización multimodal podría ser adaptativo para las hembras al aumentar su eficacia biológica al reducir los errores y los costes de la elección. Esto podría suceder si la hembra analiza la información recopilada a partir de varios indicios o señales emitidas por el macho que reflejen distintas “calidades” o si las señales fuesen redundantes (Candolin 2003).

La comunicación en reptiles: un comentario breve

Tradicionalmente, la comunicación en reptiles se ha estudiado principalmente desde las modalidades visual y química. Y, aunque se ha considerado que los reptiles no poseen comunicación acústica debido a que solo algunos de ellos son capaces de emitir sonidos (ej. Wever et al. 1966; Marcellini 1974), actualmente la comunicación acústica en reptiles es un campo de investigación creciente (ej. Brumm y Zollinger 2017; García-Roa et al. 2017; Reyes-Olivares y Labra 2017).

- **Comunicación visual en reptiles**

Entre las señales visuales de los reptiles encontramos aquellas que son comportamentales como cabeceos (*head bob displays*), pataleos (*foot shakes*), “flexiones” (*push-up displays*), desplazamientos rápidos o amenazas abriendo la boca, pero también señales coloridas en los que los patrones de coloración pueden reflejar distintas características (Vitt y Caldwell 2014). El color tiene mucha importancia en la comunicación visual en los reptiles, no solo las que vemos los humanos sino también las que son expresadas en el espectro del ultravioleta (ej. Fleishman et al. 1993; Whiting et al. 2006; Martín et al. 2015, 2016). En las señales visuales coloridas influyen mucho las características del hábitat, la luz incidente y la reflejada (Endler 1992), por lo que una de las grandes presiones de selección en este tipo de señales es el ambiente (Leal et al. 2004). Sin embargo, la producción de coloraciones en los reptiles es a menudo dependiente de la condición (Pérez i de Lanuza et al. 2014) y de los recursos utilizados como carotenoides (Kopena et al. 2014a) o vitaminas (Kopena et al. 2014b). De este modo reflejarían señales honestas que pueden ser utilizadas en la señalización del estatus de dominancia (Whiting et al. 2003) y en la selección de pareja (Tokarz 1995).

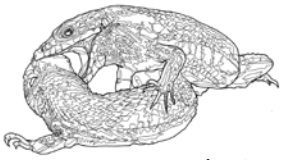


- **Comunicación química en reptiles**

El primer acercamiento a la comunicación química en animales fue a través del concepto de **feromona** (Karlson y Lüscher 1959): *sustancias que son secretadas al exterior por un individuo y recibidas por un segundo individuo de la misma especie, y con las cuales desencadenan una reacción específica, por ejemplo, un comportamiento estereotipado o un proceso de desarrollo.* Actualmente el concepto de señal química es un poco más amplio y el de feromona se ha restringido a un tipo de señal química “evolucionada” (Wyatt 2014). Las señales químicas no tendrían por qué ser feromonas, aunque las feromonas son, sin duda, señales químicas. La diferencia puede establecerse en que las feromonas desencadenan una respuesta más o menos automática y siempre común a todos los individuos de la especie mientras que las señales químicas no restringen la respuesta necesaria a ser automática sino al aprendizaje por parte del receptor del significado de la señal (Wyatt 2010, 2014).

Los compuestos químicos secretados por algunos ofidios a través de la piel o por los lagartos a través de glándulas epidérmicas (Weldon et al. 2008; Baeckens et al. 2017) constituyen señales utilizadas en procesos de comunicación social (Mason y Parker 2010). Es común que las señales químicas en reptiles no sean compuestos únicos sino una mezcla (Martín y López 2011). Las evidencias de que la comunicación química en reptiles tiene gran importancia han ido creciendo en los últimos años (Martín y López 2011). En los lacértidos, las señales químicas frecuentemente están basadas en las secreciones de glándulas femorales o precoacales de los machos cuya fracción lipídica está formada por compuestos volátiles como esteroides, ácidos grasos y alcoholes cuya detección a través del aire es sencilla (Weldon et al. 2008; Martín y López 2014). Entre los procesos sociales en los que participa la señalización química en lacértidos se han encontrado procesos de reconocimiento intraespecífico entre distintos morfotipos (Lopez et al. 2009) o individuos (Aragón et al. 2001b; Carazo et al. 2008). También se ha visto la importancia de las señales químicas en la discriminación individual entre individuos conocidos (Aragón et al. 2001a) y familiares (Bull et al. 2001), y entre distintos sexos (Gonzalo et al. 2004). Y el papel que ejercen en la evaluación de rivales (López y Martín 2002a; Carazo et al. 2007) y en la competencia entre machos (López et al. 2002), así como en la selección y las preferencias de las hembras cuando eligen pareja (López y Martín 2005b).

Si los compuestos químicos secretados reflejan de manera honesta la condición de los machos que los producen (Martín y López 2015), es muy probable que la comunicación química contribuya en gran medida a la evaluación del rival o de la selección de pareja por las hembras. En lacértidos se han encontrado abundantes evidencias de relaciones dependientes de la condición entre rasgos de los machos y la señalización química en las secreciones. La respuesta



inmune y la carga parasitaria de los machos de *Psamodromus algirus* parece estar relacionada con las proporciones de octadecanol y eicosanol en sus secreciones (Martín et al. 2007a), y en los machos de *Podarcis muralis* con las proporciones de ácidos grasos como el oleico, hexadecanoico y octadecanoico (Martín et al. 2008). También las proporciones de colesterol en las secreciones se incrementan con el tamaño corporal en el género *Iberolacerta* (Martín y López 2007) y parece que las proporciones de hexadecanol en *I. monticola* indicarían el estatus de dominancia entre machos (Martín et al. 2007b). Todas estas señales podrían tener un papel en la selección sexual, tanto en la competición entre machos (López y Martín 2011) como siendo atractivos para las hembras (Kopena et al. 2011)

***Iberolacerta cyreni* como especie modelo**

La lagartija carpetana, *Iberolacerta cyreni*, es una de las especies de reptiles ibéricos mejor conocida. Ha sido estudiada en profundidad durante los últimos treinta años y se conoce con mucho detalle su ecología, su biología reproductiva y los principales aspectos que dominan en sus relaciones de comunicación entre coespecíficos. Todo esto hace de esta especie un modelo idóneo para profundizar en el estudio de las implicaciones ecológicas y evolutivas de la señalización intraespecífica.

La lagartija carpetana es un lacértido de tamaño medio-grande que habita las zonas más altas del Sistema Central español (Pérez-Mellado 1997). En la Sierra de Guadarrama, lugar donde se ha llevado a cabo nuestro estudio, habita en el intervalo altitudinal entre el Puerto de Navacerrada a 1.760 m. s. n. m. y la cumbre de Peñalara a 2.430 m. s. n. m. (García-París et al. 1989a; García-París et al. 1989b). Es una especie ligada a roquedos de alta montaña como canchales y berrocales con rocas grandes salpicados de matorrales de piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*) y enebro rastrero (*Juniperus communis*) y pastizales de *Festuca* sp. Es un depredador generalista que principalmente se alimenta de artrópodos, siendo más frecuentes en su dieta coleópteros, dípteros y formícidos (Pérez-Mellado et al. 1991). Su periodo de actividad anual está limitado por la climatología extrema de los lugares que habita, permaneciendo activa desde finales de marzo o abril hasta primeros de octubre (Pérez-Mellado 1982). La época reproductiva tienen lugar normalmente durante el mes de mayo y las primeras semanas de junio (Aragón et al. 2001c), a principios de julio ya se ven hembras con huevos oviductales y la única puesta anual se produce en el periodo entre julio y agosto (tamaño medio de puesta en Guadarrama 7 ± 2 huevos, tiempo medio de incubación 49 ± 4 días (Arribas en



Salvador 2014) pero ver capítulos 2, 4 y 5) y los primeros juveniles eclosionan en la segunda quincena de agosto y las primeras semanas de septiembre.

Como todas las especies del género *Iberolacerta*, esta especie presenta dimorfismo sexual. Las diferencias más apreciables son el tamaño corporal (mayor en hembras), el tamaño relativo de la cabeza (mayor en machos) y la presencia de poros femorales más patentes en machos (Pérez-Mellado et al. 1993). Durante la época reproductora los machos adultos más viejos suelen adquirir una coloración de celo azul-verdoso mientras que la mayoría de las hembras y los machos más jóvenes permanecen de color pardo (Pérez-Mellado et al. 1993).

Es una especie poligínica (Salvador et al. 2007). Los machos territoriales marcan sus dominios vitales con las secreciones femorales (López y Martín 2005a) y con excrementos (López et al. 1998; Aragón et al. 2000) y defienden territorios cuyo tamaño tratan de incrementar aumentando su tasa de movimientos y así solapar su área de campeo con más hembras (Aragón et al. 2001c). Normalmente, el uso de esta estrategia territorial provoca encuentros agonísticos entre machos (Martín y Salvador 1993), estando el resultado de estas peleas condicionado por el tamaño relativo de la cabeza y determinando su posición en la jerarquía de dominancia (López y Martín 2002b; López et al. 2002). Las marcas territoriales también pueden ser utilizadas por otros machos para identificar al dueño del territorio y para evaluar el potencial agonístico (Aragón et al. 2000; Aragón et al. 2001a) o el estatus social (López y Martín 2011). Este proceso podría estar basado en la variabilidad de las proporciones de los diferentes compuestos químicos en las secreciones femorales, dado que destinar algunos compuestos al marcaje podrían ser costoso y dependiente de la condición (Martín y López 2015). Parece que los machos son capaces de evaluar la capacidad competitiva del rival en un encuentro agonístico utilizando las proporciones de colesterol en sus secreciones femorales (Martín y López 2007). También es conocido que, en esta especie, es posible la discriminación individual y el reconocimiento de coespecíficos conocidos por medio de las marcas olfativas (Aragón et al. 2001b). Se ha sugerido que este podría ser el mecanismo por el cual reducir los costes de los encuentros agonísticos entre machos conocidos (López y Martín 2011).

También las hembras podrían utilizar las secreciones femorales para evaluar la calidad de los machos que produjeron la señal química (Martín y López 2006a). Por ejemplo, solo algunos machos de alta calidad podrían derivar del metabolismo compuestos como el ácido oleico que está relacionado con una mayor condición corporal (Martín y López 2010) y niveles menores de asimetría fluctuante (López et al. 2006). Dentro de las preferencias de las hembras se ha visto que prefieren asociarse con olores de machos con menor nivel de asimetría



fluctuante (Martín y López 2000) o mejor respuesta inmune (López et al. 2006), lo que probablemente esté relacionado con una mayor calidad genética o un mayor acceso a recursos alimenticios. Experimentos previos han documentado como la cantidad de cholesta-5,7-dien-3-ol (provitamina D₃) que los machos derivan a las secreciones femorales, aumenta cuando la ingestión de vitamina D es incrementada (Martín y López 2006b). Este estudio mostró también como las hembras prefieren asociarse con áreas marcadas por aquellos machos cuyas secreciones tenían mayores concentraciones de provitamina D. Un experimento en el hábitat natural de la especie documentó como un incremento experimental de la cantidad de ergosterol (provitamina D₂) provocaba un aumento de la densidad de hembras en aquellas zonas (Martín y López 2012). Se cree que las hembras podrían verse atraídas por el olor que los mejores machos depositan en las rocas dentro de su territorio y que las hembras podrían basar la selección de pareja en las señales químicas escogiendo aparearse solo con aquellos machos con alto contenido de vitamina D en las secreciones (Martín y López 2012). Sin embargo, un estudio anterior demostró también que las hembras hambrientas respondían con más intensidad a los olores de provitamina D y a las secreciones femorales de machos que las hembras saciadas, lo que sugiere que la atracción de las hembras por el olor a provitamina D podría deberse a un sesgo sensorial de las hembras hacia estímulos alimenticios (Martín y López 2008). No está claro si las hembras utilizarían las secreciones de los machos para evaluar la calidad de los mismos o para informarse acerca de los recursos alimenticios disponibles en el hábitat. Dado que la provitamina D₃ es un precursor del colecalciferol (=Vitamina D₃) (Fraser 1995; Holick 1995) y este es un compuesto esencial en el metabolismo del calcio de los reptiles y otros vertebrados (Allen et al. 1999), podría tener una importancia clave en el desarrollo de los huevos y de los juveniles.

Aunque los estudios mencionados sugieren que las características de las señales químicas están relacionadas de manera honesta con la calidad del macho, y que las hembras al preferir determinados olores estarían favoreciendo el apareamiento de aquellos machos que los producen, nunca se ha estudiado si realmente el éxito reproductor de los machos preferidos es mayor (en términos de número y calidad de crías conseguidas). Tampoco se ha comprobado si las hembras seleccionan sus territorios particulares en base a las características del hábitat o en base a las señales dejadas por los machos que en ellos habitan. Esta distinción provocaría una lucha entre machos por acceder a las hembras o por acceder a los mejores territorios teniendo un reflejo probable en la estructura social y en la jerarquía de dominancia. Por último, muy poco se ha estudiado acerca de los efectos que produce la señalización de los machos y la elección del hábitat por la hembra en otros aspectos relevantes como el fenotipo de las crías. Todo este conocimiento previo de la especie, de las señales químicas producidas por los machos, y la

respuesta ejercida por las hembras, hace de *Iberlacerta cyreni* un modelo idóneo para alcanzar los objetivos planteados en esta tesis doctoral.





OBJETIVOS:

Esta tesis examina las consecuencias que la variación individual en la producción de señales químicas de carácter sexual de los machos tiene en su éxito reproductor, la estructura social, las preferencias de la madre y el fenotipo de las crías. Por lo tanto, esta tesis está dividida en 6 capítulos que siguen los siguientes objetivos específicos:

Capítulo 1

Desarrollar un estudio experimental en condiciones naturales para conocer cómo una situación patológica (activación del sistema inmune) en los machos, afecta a la expresión de los ornamentos químicos y visuales.

Se realizó un estudio experimental de captura-recaptura en una población natural de *Iberolacerta cyreni*. Antes de la temporada reproductiva se capturaron todos los machos de la población a los que se sometió a un desafío inmune mediante la inyección de un lipopolisacárido bacteriano sin efectos patogénicos. Durante la temporada reproductiva los machos fueron recapturados para medir la expresión del color (señales visuales) y recolectar una muestra de sus secreciones femorales (señales químicas) que permitiese una evaluación de sus ornamentos sexuales.

Capítulo 2

Comprobar, mediante una activación experimental del sistema inmune, si el éxito reproductivo de los machos es dependiente de su condición en el momento de la estación reproductora.

En una población natural se realizó un estudio experimental en el que, a la mitad de los machos, se les inyectó un polisacárido bacteriano sin efectos patogénicos para comprobar si la condición determina el éxito reproductivo. Al final de la temporada de apareamiento se recapturaron todas las hembras de la población y se mantuvieron en cautividad hasta que pusieron los huevos. Una vez nacieron las crías realizamos un análisis de paternidad para comprobar el éxito reproductivo de los machos tratados experimentalmente.



Capítulo 3

Estudiar si el efecto de un aumento experimental de la calidad de las señales químicas de los machos afecta a la estructura poblacional, a la jerarquía de dominancia, al acceso a las hembras y al comportamiento reproductivo.

Se preparó un cercado seminatural en el que se distribuyeron de manera uniforme cuarenta refugios idénticos y se liberaron hembras y machos controles y experimentales (a los que se les había incrementado experimentalmente la calidad de las secreciones femorales para que copularan libremente). Durante la temporada de apareamiento se hizo un seguimiento de las relaciones sociales entre todos los individuos tratando de diferenciar entre competencia entre machos y selección de pareja. Se registraron todos los comportamientos agonísticos y los vencedores en cada uno para estudiar la jerarquía de dominancia, así como las cópulas para estudiar el éxito de apareamiento.

Capítulo 4

Investigar si existe un sesgo sensorial en las hembras al realizar una selección de hábitat o de pareja basada en señales químicas de los machos, buscando si existen beneficios potenciales para los huevos y las crías de un suplemento alimenticio basado en los mismos compuestos que les atraen en los machos.

Se realizó un experimento en el que suplementamos experimentalmente a hembras grávidas con provitamina y vitamina D₃ hasta el momento en el que hicieron la puesta. Para comprobar posibles beneficios del suplemento vitamínico se midieron características de los huevos y de las crías, así como el tiempo de incubación y el éxito de eclosión.

Capítulo 5

Examinar la existencia de posibles efectos maternos causados en las crías por una mayor disponibilidad alimenticia para las madres de los mismos compuestos que son atractivos para las hembras cuando son producidas por los machos.

Se capturaron hembras grávidas que fueron suplementadas con vitaminas hasta el momento de la puesta. Una vez nacieron los juveniles se les sometió a pruebas de rendimiento locomotor (carrera y escalada) y a un test en el que se evaluó su capacidad de dispersión para comprobar la existencia de efectos maternos causados por la dieta de la madre.



Capítulo 6

Comprobar si la calidad del ambiente materno durante la gravidez y la existencia de un ambiente postnatal estresante afecta a la personalidad de las crías.

A las crías de hembras suplementadas durante la gravidez con vitamina D₃, se les trató con corticosterona para simular una situación de estrés postnatal. Los juveniles fueron testados en la capacidad de escalada para conocer su condición en el momento del nacimiento, y se les realizaron pruebas comportamentales en los que se midió el riesgo asumido y la actividad como indicadores de la personalidad individual.



Referencias

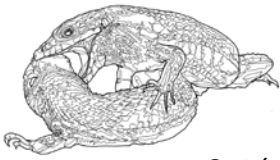
- Akcay C, Campbell SE, Beecher MD (2014) Individual differences affect honest signalling in a songbird. *Proc Biol Sci* 281:20132496
- Allen ME, Chen TC, Holick MF, Merkel E (1999) Evaluation of vitamin D status in the Green Iguana (*Iguana iguana*): oral administration vs UVB exposure. En: Holick MF, Jung EG (eds) *Biologic Effects of Light 1998: Proceedings of a Symposium Basel, Switzerland November 1–3, 1998*. Springer US, Boston, MA, pp 99-101
- Andersson M (1994) *Sexual selection*. Princeton University Press, New Jersey
- Andersson M, Simmons LW (2006) Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution* 21:296-302
- Andersson S, Pryke SR, Ornborg J, Lawes MJ (2002) Multiple receivers, multiple ornaments, and a trade-off between agonistic and epigamic signaling in a widowbird. *Am Nat* 160:683-91
- Aragón P, López P, Martín J (2000) Size dependent chemosensory responses to familiar and unfamiliar conspecific faecal pellets by the Iberian Rock-Lizard, *Lacerta monticola*. *Ethology* 106
- Aragón P, López P, Martín J (2001a) Chemosensory discrimination of familiar and unfamiliar conspecifics by lizards: implications of field spatial relationships between males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:128-133
- Aragón P, López P, Martín J (2001b) Discrimination of femoral gland secretions from familiar and unfamiliar conspecifics by male Iberian rock-lizards, *Lacerta monticola*. *Journal of Herpetology* 35:346-350
- Aragón P, López P, Martín J (2001c) Seasonal changes in activity and spatial and social relationships of the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Canadian Journal of Zoology* 79:1965-1971
- Baeckens S, Herrel A, Broeckhoven C, Vasilopoulou-Kampitsi M, Huyghe K, Goyens J, Van Damme R (2017) Evolutionary morphology of the lizard chemosensory system. *Sci Rep* 7:10141
- Barnard CJ, Sibly RM (1981) Producers and scroungers. A general model and application captive house sparrows. *Animal Behaviour* 29:543-550
- Basolo AL (1990) Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science* 250:808-810
- Basolo AL (1995) Phylogenetic evidence for the role of a pre-existing bias in sexual selection. *Proceedings: Biological Sciences* 259:307-311



- Bateson M, Healy SD (2005) Comparative evaluation and its implications for mate choice. *Trends Ecol Evol* 20:659-64
- Berglund A, Bisazza A, Pilastro A (1996) Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society* 58:385-399
- Bestion E, Teyssier A, Aubret F, Clobert J, Cote J (2014) Maternal exposure to predator scents: offspring phenotypic adjustment and dispersal. *Proc Biol Sci* 281
- Boughman JW (2001) Divergent sexual selection enhances reproductive isolation in sticklebacks. *Nature* 411:944
- Bradbury JW, Vehrencamp SL (2011) *Principles of animal communication*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Brumm H, Zollinger SA (2017) Vocal plasticity in a reptile. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284
- Bull M, Griffin C, Bonnett M, Gardner M, Cooper S (2001) Discrimination between related and unrelated individuals in the Australian lizard *Egernia striolata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:173-179
- Candolin U (2003) The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews* 78:575-595
- Carazo P, Font E (2010) Putting information back into biological communication. *Journal of Evolutionary Biology* 23:661-669
- Carazo P, Font E, Desfilis E (2007) Chemosensory assessment of rival competitive ability and scent-mark function in a lizard, *Podarcis hispanica*. *Animal Behaviour* 74:895-902
- Carazo P, Font E, Desfilis E (2008) Beyond 'nasty neighbours' and 'dear enemies'? Individual recognition by scent marks in a lizard (*Podarcis hispanica*). *Animal Behaviour* 76:1953-1963
- Carranza J (1994) Sistemas de apareamiento y selección sexual En: Carranza J (ed) *Etología: introducción a la ciencia del comportamiento*. Universidad de Extremadura, Cáceres (España), pp 363-406
- Christy JH (1995) Mimicry, mate choice, and the sensory trap hypothesis. *The American Naturalist* 146:171-181
- Clutton-Brock T (2007) Sexual selection in males and females. *Science* 318:1882-1885
- Crick F (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature* 227:561
- Cummings ME, Endler JA (2018) 25 Years of Sensory Drive: the evidence and its watery bias. *Current Zoology*:zoy043-zoy043
- Dall SR, Giraldeau LA, Olsson O, McNamara JM, Stephens DW (2005) Information and its use by animals in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 20:187-93



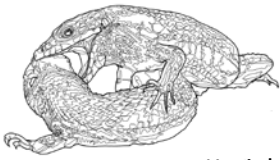
- Dall SRX, Johnstone RA (2002) Managing uncertainty: information and insurance under the risk of starvation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 357:1519-1526
- Danchin E, Giraldeau L-A, Valone TJ, Wagner RH (2004) Public information: from noisy neighbors to cultural evolution. *SCIENCE* 305:487-491
- Danchin E, Pocheville A (2014) Inheritance is where physiology meets evolution. *J Physiol* 592:2307-17
- Danchin É, Wagner RH (2010) Inclusive heritability: combining genetic and non-genetic information to study animal behavior and culture. *Oikos* 119:210-218
- Dawkins R, Krebs JR (1978) Animal signals: information or manipulation? En: Krebs JR, Davies NB (eds) *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Sinauer Associates, Inc., Sutherland, MA
- Dirienzo N, Hedrick AV (2014) Animal personalities and their implications for complex signaling. *Current Zoology* 60:381-386
- Endler JA (1992) Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *The American Naturalist* 139:S125-S153
- Endler JA (1993) Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 340:215-225
- Endler JA, Basolo AL (1998) Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 13:415-420
- Enquist M (1985) Communication during aggressive interactions with particular reference to variation in choice of behaviour. *Anim Behav* 33:1152-1161
- Enquist M, Leimar O (1983) Evolution of fighting behaviour: Decision rules and assessment of relative strength. *Journal of Theoretical Biology* 102:387-410
- Feng S, McGhee KE, Bell AM (2015) Effect of maternal predator exposure on the ability of stickleback offspring to generalize a learned colour-reward association. *Anim Behav* 107:61-69
- Fisher JB (1954) Evolution and bird sociality. En: Huxley J, Hardy AC, Ford EB (eds) *Evolution as a process*. Allen & Unwin, London, pp 71-83
- Fisher RAS (1930) *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford
- Fleishman LJ, Loew ER, Leal M (1993) Ultraviolet vision in lizards. *Nature* 365:397
- Fraser DR (1995) Vitamin D. *The Lancet* 345:104-107
- Fuller RC, Houle D, Travis J (2005) Sensory bias as an explanation for the evolution of mate preferences. *The American Naturalist* 166:437-446



- García-París M, Martín C, Dorda J, Esteban M (1989a) Atlas provisional de los anfibios y reptiles de Madrid. *Revista Española de Herpetología* 3:237-257
- García-París M, Martín C, Dorda J, Esteban M (1989b) Los anfibios y reptiles de Madrid. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid
- García-Roa R, Llusia D, López P, Martín J (2017) First evidence of sound production in the genus *Iberolacerta* Arribas, 1997, vol 30
- Giraldeau L-A, Beauchamp G (1999) Food exploitation: searching for the optimal joining policy *Trends in Ecology & Evolution* 14:102-106
- Giraldeau L-A, Dubois F (2008) Chapter 2 Social foraging and the study of exploitative behavior. En, pp 59-104
- Gonzalo A, Cabido C, Martín J, López P (2004) Detection and discrimination of conspecific scents by the anguid slow-worm *Anguis fragilis*. *Journal of Chemical Ecology* 30:1565-1573
- Gosling LM (1982) A reassessment of the function of scent marking in territories. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 60:89-118
- Gosling LM, McKay HV (1990) Competitor assessment by scent matching: an experimental test. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26:415-420
- Grafen A (1990) Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* 144:517-546
- Guilford T, Dawkins MS (1991) Receiver psychology and the evolution of animal signals. *Animal Behaviour* 42:1-14
- Guilford T, Dawkins MS (1993) Receiver psychology and the design of animal signals. *Trends in Neurosciences* 16:430-436
- Halliday TR (1983) The study of mate choice. En: Bateson P (ed) *Mate Choice*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp 3-32
- Hasson O (1994) Cheating Signals. *Journal of Theoretical Biology* 167:223-238
- Hauser MD (1996) *The evolution of communication*. M.I.T. Press, Cambridge
- Heisler L, Andersson M, Arnold S, R. Boake C, Borgia G, Hausfater G, Kirkpatrick M, Lande R, Maynard Smith J, O'Donald P, Thornhill R, Weissing F (1987) The evolution of mating preferences and sexually selected traits
- Hill GE (2011) Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecol Lett* 14:625-34
- Holick MF (1995) Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61:638S-645S



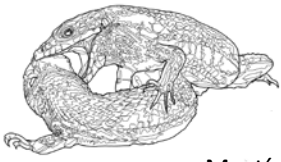
- Hunt J, Breuker CJ, Sadowski JA, Moore AJ (2009) Male-male competition, female mate choice and their interaction: determining total sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology* 22:13-26
- Huntingford FA, Turner AK, Downie LM (1987) *Animal conflict*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL
- Jaeger RG (1981) Dear enemy recognition and the costs of aggression between salamanders. *The American Naturalist* 117:962-974
- Jennions MD, Petrie M (1997) Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews* 72:283-327
- Johnstone RA (1996) Multiple displays in animal communication: 'backup signals' and 'multiple messages'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 351:329-338
- Johnstone RA (1997) The evolution of animal signals. En: Krebs JR, Davies NB (eds) *Behavioural ecology: an evolutionary approach*, 4 edn. Blackwell Science, pp 155-178
- Karlson P, Lüscher M (1959) 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183:55
- Kay I (1998) *Introduction to animal physiology*. BIOS Scientific Publishers Ltd, New York
- Kirkpatrick M (1987) Sexual selection by female choice in polygynous animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:43-70
- Kirkpatrick M, Russell L (1989) The evolution of maternal characters. *Evolution* 43:485-503
- Kirkpatrick M, Ryan MJ (1991) The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature* 350:33
- Kokko H (1998) Good genes, old age and life-history trade-offs. *Evolutionary Ecology* 12:739-750
- Kokko H, Johnstone RA (2002) Why is mutual mate choice not the norm? Operational sex ratios, sex roles and the evolution of sexually dimorphic and monomorphic signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:319-30
- Kopena R, López P, Martín J (2014a) Relative contribution of dietary carotenoids and vitamin E to visual and chemical sexual signals of male Iberian green lizards: an experimental test. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68:571-581
- Kopena R, López P, Martín J (2014b) What are carotenoids signaling? Immunostimulatory effects of dietary vitamin E, but not of carotenoids, in Iberian green lizards. *Naturwissenschaften* 101:1107-14
- Kopena R, López P, Martín J, Herczeg G (2011) Vitamin E supplementation increases the attractiveness of males' scent for female European green lizards. *PLoS One* 6:e19410



- Kotiaho JS (2001) Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biological Reviews* 76:365-376
- Krebs JR, Davies NB (1997) *Behavioural ecology: An evolutionary approach*, 4 edn. Wiley-Blackwell
- Lacey EP (1998) What is an adaptive environmentally induced parental effect? . En: Mousseau TA, Fox CW (eds) *Maternal effects as adaptations*. Oxford University Press., New York, Oxford, pp 54-66
- Laing CJ, Fraser DR (1999) The vitamin D system in iguanian lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology B*:373-379
- Leal M, Fleishman L, xa, J, Acting Editor: Christine RB (2004) Differences in visual signal design and detectability between allopatric populations of *Anolis* lizards. *The American Naturalist* 163:26-39
- López P, Amo L, Martín J (2006) Reliable signaling by chemical cues of male traits and health state in male lizards, *Lacerta monticola*. *J Chem Ecol* 32:473-88
- López P, Aragón P, Martín J (1998) Iberian Rock Lizards (*Lacerta monticola cyreni*) assess conspecific information using composite signals from faecal pellets. *Ethology* 104:809-820
- López P, Martín J (2002a) Chemical rival recognition decreases aggression levels in male Iberian wall lizards, *Podarcis hispanica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51:461-465
- López P, Martín J (2005a) Chemical compounds from femoral gland secretions of male iberian rock lizards. *Zeitschrift für Naturforschung* 60:632-636
- López P, Martín J (2005b) Female Iberian wall lizards prefer male scents that signal a better cell-mediated immune response. *Biol Lett* 1:404-6
- López P, Martín J (2011) Male Iberian rock lizards may reduce the costs of fighting by scent matching of the resource holders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65:1891-1898
- López P, Martín M (2002b) Locomotor capacity and dominance in male lizards *Lacerta monticola*: a trade-off between survival and reproductive success? *Biological Journal of the Linnean Society* 77:201-209
- Lopez P, Moreira PL, Martin J (2009) Chemical polymorphism and chemosensory recognition between *Iberolacerta monticola* lizard color morphs. *Chem Senses* 34:723-31
- López P, Muñoz A, Martín J (2002) Symmetry, male dominance and female mate preferences in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52:342-347



- Marcellini DL (1974) Acoustic behavior of the gekkonid lizard, *Hemidactylus frenatus*.
Herpetologica 30:44-52
- Marler PR (1982) Avian and primate communication: the problem of natural categories.
Neurosci Biobehav Rev 6:87-94
- Marshall DJ, Uller T (2007) When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116:1957-1963
- Martín J, Amo L, López P (2008) Parasites and health affect multiple sexual signals in male
common wall lizards, *Podarcis muralis*. *Naturwissenschaften* 95:293-300
- Martín J, Civantos E, Amo L, López P (2007a) Chemical ornaments of male lizards
Psammodromus algirus may reveal their parasite load and health state to females.
Behavioral Ecology and Sociobiology 62:173-179
- Martín J, López P (2000) Chemoreception, symmetry and mate choice in lizards. *Proc Biol Sci*
267:1265-9
- Martín J, López P (2006a) Links between male quality, male chemical signals, and female mate
choice in Iberian rock lizards. *Functional Ecology* 20:1087-1096
- Martín J, López P (2006b) Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males'
scent for female Iberian rock lizards. *Proc Biol Sci* 273:2619-24
- Martín J, López P (2007) Scent may signal fighting ability in male Iberian rock lizards. *Biology
Letters* 3:125-127
- Martín J, López P (2008) Female sensory bias may allow honest chemical signaling by male
Iberian rock lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62:1927-1934
- Martín J, López P (2010) Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more
oily scents are more attractive. *Chem Senses* 35:253-62
- Martín J, López P (2011) Pheromones and reproduction in reptiles. En: Norris David O, López
KH (eds) *Hormones and reproduction of vertebrates* Academic Press, San Diego,
California
- Martín J, López P (2012) Supplementation of male pheromone on rock substrates attracts
female rock lizards to the territories of males: a field experiment. *PLoS One* 7:e30108
- Martín J, López P (2014) Pheromones and chemical communication in lizards. En: Rheubert JL,
Siegel DS, Trauth SE (eds) *Reproductive biology and phylogeny of lizards and tuatara*.
CRC Press, Boca Raton pp 43-77
- Martín J, López P (2015) Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of
lizards. *Horm Behav* 68:14-24
- Martín J, Moreira PL, López P (2007b) Status-signalling chemical badges in male Iberian rock
lizards. *Functional Ecology* 21:568-576



- Martín J, Salvador A (1993) Tail loss reduces mating success in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behav Ecol Sociobiol* 32:185-189
- Martin M, Le Galliard JF, Meylan S, Loew ER (2015) The importance of ultraviolet and near-infrared sensitivity for visual discrimination in two species of lacertid lizards. *J Exp Biol* 218:458-65
- Martin M, Meylan S, Haussy C, Decencière B, Perret S, Le Galliard J-F (2016) UV color determines the issue of conflicts but does not covary with individual quality in a lizard. *Behavioral Ecology* 27:262-270
- Mason RT, Parker MR (2010) Social behavior and pheromonal communication in reptiles. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 196:729-49
- Maynard-Smith J, Harper D (1995) Animal signals: models and terminology. *Journal of Theoretical Biology* 177:305-311
- Maynard-Smith J, Harper D (2003) Animal signals. Oxford University Press, Oxford and New York
- Meylan S, Miles DB, Clobert J (2012) Hormonally mediated maternal effects, individual strategy and global change. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:1647-64
- Møller AP, Pomiankowski A (1993) Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32:167-176
- Monaghan P (2008) Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:1635-45
- Morton ES (1975) Ecological sources of selection on avian sounds. *The American Naturalist* 109:17-34
- Mousseau TA, Fox CW (1998) The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution* 13
- Mousseau TA, Uller T, Wapstra E, Badyaev AV (2009) Evolution of maternal effects: past and present. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:1035-8
- Moyes CD, Schulte PM (2008) Principles of animal physiology, 2 edn. Pearson Education Limited, San Francisco, CA, USA
- Otte D (1974) Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:385-417
- Owings DH, Morton ES (1998) Animal vocal communication: a new approach Cambridge University Press, Cambridge
- Pérez-Mellado V (1982) Datos sobre *Lacerta monticola* Boulenger, 1905 (Sauria: Lacertidae) en el oeste del Sistema Central. Doñana, *Acta Vertebrata* 9:107-129



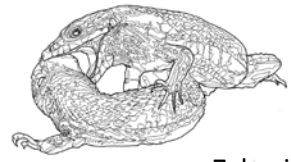
- Pérez-Mellado V (1997) *Lacerta monticola* Boulenger, 1905. En: Pleguezuelos JM (ed) Distribución y Biogeografía de los Anfibios y Reptiles en España y Portugal. Asociación Herpetológica Española y Universidad de Granada, Granada, pp 225-227
- Pérez-Mellado V, Barbadillo LJ, Barahona F, Brown RP, Corti C, Guerrero F, Lanza B (1993) A systematic survey of the Iberian rock lizard *Lacerta monticola* Boulenger, 1905. En: Valakos E, Bohme W, Pérez-Mellado V, Maragou P (eds) Lacertids of the Mediterranean region A biological approach. Hellenic Zoological Society, Athens, pp 85-105
- Pérez-Mellado V, Bauwens D, Gil M, Guerrero F, Lizana M, Ciudad MJ (1991) Diet composition and prey selection in the lizard *Lacerta monticola*. Canadian Journal of Zoology 69:1728-1735
- Pérez-Rodríguez L (2009) Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. Bioessays 31:1116-26
- Pérez de Lanuza G, Carazo P, Font E (2014) Colours of quality: structural (but not pigment) coloration informs about male quality in a polychromatic lizard. Animal Behaviour 90:73-81
- Pinsker W, Doschek E (1980) Courtship and rape: the mating behavior of *Drosophila subobscura* in light and in darkness. Zeitschrift für Tierpsychologie 54:57-70
- Qvarnström A, Forsgren E (1998) Should females prefer dominant males? Trends in Ecology & Evolution 13:498-501
- Rendall D, Owren MJ (2013) Communication without meaning or information: abandoning language-based and informational constructs in animal communication theory. En: Stegmann UE (ed) Animal Communication Theory: Information and Influence. Cambridge University Press, Cambridge, pp 151-188
- Reyes-Olivares C, Labra A (2017) Emission of sounds by native lizards of Chile: the state of the art, vol 4
- Richards DG, Wiley RH (1980) Reverberations and amplitude fluctuations in the propagation of sound in a forest: implications for animal communication. The American Naturalist 115:381-399
- Roff D (1992) The evolution of life histories : theory and analysis. Chapman & Hall, New York
- Roff DA (1998) The detection and measurement of maternal effects. En: Mousseau TA, Fox CW (eds) Maternal effects as adaptations Oxford University Press., New York, Oxford, pp 83–96
- Ryan MJ (1998) Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex differences. Science 281:1999-2003



- Ryan MJ, Keddy-Hector A (1992) Directional patterns of female mate choice and the role of sensory biases. *American Naturalist* 139:s4-s35
- Ryan MJ, Rand AS (1990) The sensory basis of sexual selection for complex calls in the Tungara frog, *Physalaemus pustulosus* (Sexual selection for sensory exploitation). *Evolution* 44:305-314
- Ryan MJ, Rand AS (1993) Species evolution and sexual selection as unitary problem in animal communication. *Evolution* 47:647-657
- Salvador A, Diaz JA, Veiga JP, Bloor P, Brown RP (2007) Correlates of reproductive success in male lizards of the alpine species *Iberolacerta cyreni*. *Behavioral Ecology* 19:169-176
- Scott-Phillips TC (2008) Defining biological communication. *Journal of Evolutionary Biology* 21:387-395
- Searcy WA, Nowicki S (2005) The evolution of animal communication: reliability and deception in signalling systems. Princeton University Press Princeton and Oxford
- Seyfarth RM, Cheney DL (2003) Signalers and receivers in animal communication. *Annual Review of Psychology* 54:145-173
- Seyfarth RM, Cheney DL (2017) The origin of meaning in animal signals. *Animal Behaviour* 124:339-346
- Smith SM (1978) The "Underworld" in a territorial sparrow: adaptive strategy for floaters. *The American Naturalist* 112:571-582
- Stegmann UE (2005) John Maynard Smith's notion of animal signals. *Biology and Philosophy* 20:1011-1025
- Stegmann UE (2013) Introduction: A primer on information and influence in animal communication. En: Stegmann UE (ed) *Animal Communication Theory: Information and Influence*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-40
- Stevens M (2013) *Sensory ecology, behaviour, and evolution*. Oxford University Press, Oxford
- Számádó S (2001) The cost of honesty and the fallacy of the handicap principle. *Animal Behaviour* 81:3-10
- Thornhill R (1980) Rape in *Panorpa* scorpion flies and a general rape hypothesis. *Animal Behaviour* 28:52-59
- Tibbetts EA, Dale J (2007) Individual recognition: it is good to be different. *Trends Ecol Evol* 22:529-37
- Tokarz RR (1995) Mate choice in lizards: a review. *Herpetological Monographs* 9:17-40
- Uller (2008) Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends Ecol Evol* 23:432-8



- Valone TJ, Templeton JJ (2002) Public information for the assessment of quality: a widespread social phenomenon. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1549-57
- Vitt LJ, Caldwell JP (2014) Chapter 9 - Communication and social behavior. En: Vitt LJ, Caldwell JP (eds) *Herpetology (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp 255-289
- Warner DA, Buckelew AM, Pearson PR, Dhawan A (2015) The effect of prey availability on offspring survival depends on maternal food resources. *Biological Journal of the Linnean Society* 115:437-447
- Weldon PJ, Flachsbarth B, Schulz S (2008) Natural products from the integument of nonavian reptiles. *Nat Prod Rep* 25:738-56
- Wells JC (2007) The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. *Biol Rev Camb Philos Soc* 82:143-72
- Wever EG, Hepp-Reymond MC, Vernon JA (1966) Vocalization and hearing in the leopard lizard. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55:98-106
- Whiting MJ, Nagy KA, Bateman PW (2003) Evolution and maintenance of social status-signaling badges. En: Cox SF, McCoy JK, Baird TA (eds) *Lizard Social Behavior*. The John Hopkins University Press, pp 47-82
- Whiting MJ, Stuart-Fox DM, O'Connor D, Firth D, Bennett NC, Blomberg SP (2006) Ultraviolet signals ultra-aggression in a lizard. *Animal Behaviour* 72:353-363
- Wiley RH (1983) The evolution of communication: information and manipulation. En: Halliday TR, Slater PJB (eds) *Animal Behaviour, Vol 2, Communication*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 156-189.
- Wiley RH (2013) Communication as a transfer of information: measurement, mechanism and meaning. En: Stegmann U (ed) *Animal Communication Theory: Information and Influence*. Cambridge University Press, Cambridge
- Wiley RH, Poston J (1996) Perspective: Indirect mate choice, competition for mates, and coevolution of the sexes. *Evolution* 50:1371-1381
- Wong BBM, Candolin U (2005) How is female mate choice affected by male competition? *Biological Reviews* 80:559-571
- Wyatt T (2014) *Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures*, 2nd edn
- Wyatt TD (2010) Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 196:685-700



Zahavi A (1975) Mate selection. A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*
53:205-214

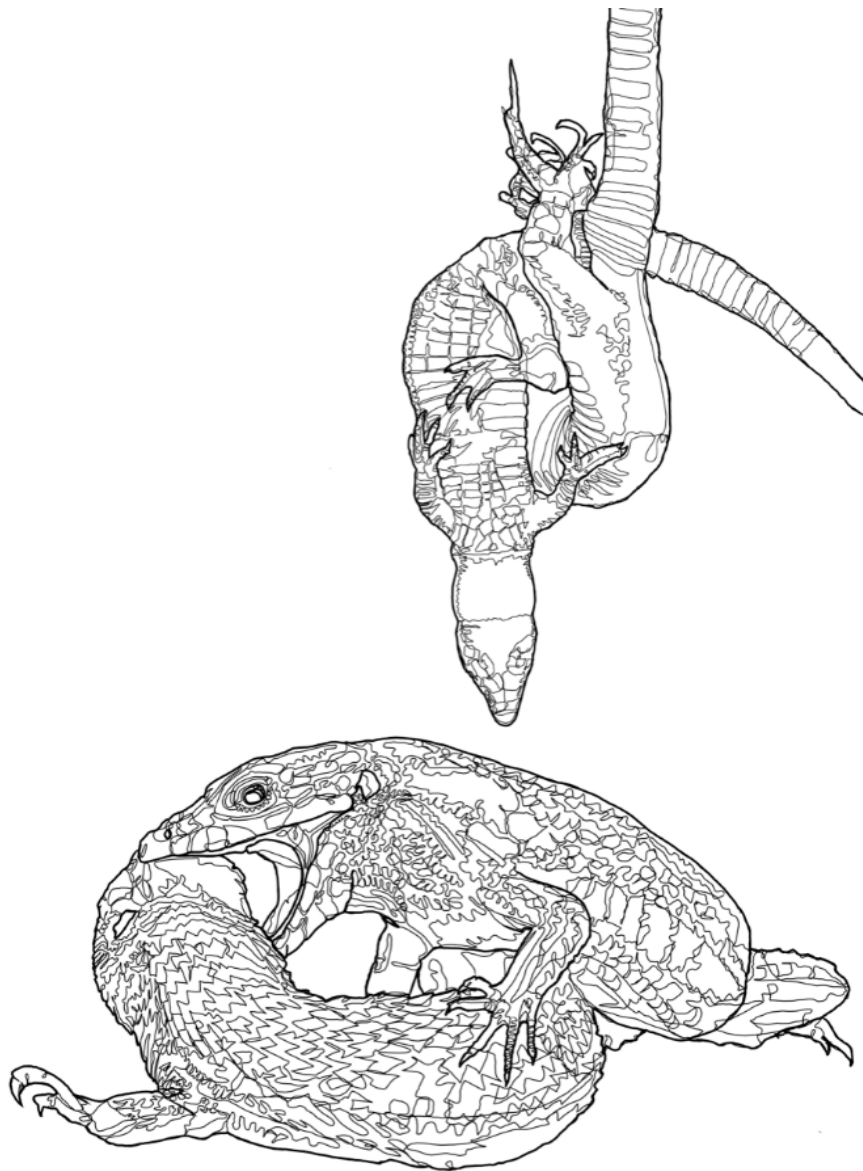
CAPÍTULO 1

Immune challenge affects visual and chemical sexual signals of wild male

Carpetan rock lizards: a field experiment

Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Jesús Ortega, Alfredo Salvador,

José Javier Cuervo, Pilar López y José Martín



Immune challenge affects visual and chemical sexual signals of wild male Carpetan rock lizards: a field experiment

Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Jesús Ortega, Alfredo Salvador,
José Javier Cuervo, Pilar López y José Martín¹

¹*Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain*

Abstract Sexual signals can be evolutionarily stable if they are honest and condition dependent or costly to the signaler. One of the possible costs is the existence of a trade-off between maintaining the immune system and the elaboration of ornaments. Experimental immune challenges made under controlled captivity conditions showed a reduction in the “intensity” of sexual signals, but it is not clear whether these detrimental effects observed in captivity are important for the actual development of sexual signals in wild populations under natural conditions. We experimentally challenged the immune system of free-range wild male Carpetan rock lizards, *Iberolacerta cyreni*, with a bacterial antigen (LPS) without pathogenic effects to explore whether and how an immune activation affected visual and chemical ornaments in nature. The immune activation resulted in decreased relative amounts of UV coloration in the throat and the lateral ocelli (which depend on structural and melanin components), while, in contrast to other studies, the carotenoid dependent dorsal green coloration was not affected. Immune activation also decreased proportions of ergosterol in femoral secretions, a compound known to be selected by females in scent of males, and which active form (vitamin D) has a variety of important effects on the immune system function. These results suggested the existence of a trade-off between physiological regulation of the immune system and the elaboration or the allocation of essential compounds to both visual and chemical sexual ornaments. This trade-off may have an important role in both intra- and intersexual selection processes. Our results also suggested that these effects can be context-dependent and that studies under natural conditions (which could also reveal interannual variability) are needed to understand the actual relationships in the wild between the immune system, the sexual signals and their reproductive consequences.

Keywords Sexual selection, Chemical signals, Visual signals, Immune challenge, Coloration, Lizards, Sexual signals.

Introduction

Signals used in sexual selection can be evolutionarily stable if they are honest and condition dependent or costly to the signaler, with this cost being correlated with the signaler’s quality (Zahavi 1975; Pomiankowski 1988; Grafen 1990). Sexual signals are often reliable because there is a condition dependent trade-off between the energetic costs of producing and



maintaining components of both sexual advertisement and the immune system (Wedekind 1992; Wedekind and Folstad 1994; Sheldon and Verhulst 1996; Lochmiller and Deerenberg 2000). Therefore, only individuals in good condition could simultaneously produce a strong immune response and extravagant sexual ornaments (Westneat and Birkhead 1998).

Within this context, many animals have evolved a variety of colorful sexual ornaments that are used in intraspecific relationships (Cooper and Greenberg 1992). For example, in many lizards, the size and color of males' visual badges may determine success in male-male competition (Thompson and Moore 1991; Olsson 1994; Zucker 1994; Martin and Forsman 1999) or mate acquisition (Díaz 1993; Baird et al. 1997; Kwiatkowski and Sullivan 2002; Anderholm et al. 2004). Many studies have suggested that only healthier males may afford to produce more elaborate visual colorful displays (e.g. Blount et al. 2003; Faivre et al. 2003; Martín et al. 2008), probably because of the trade-off between allocation of pigments, such as carotenoids, to both regulation of the immune and antioxidant function and ornamentation (Blount et al. 2003; Faivre et al. 2003; McGraw 2005; Lopez et al. 2009b).

Similarly, many animals use chemical signals in social relationships and mate choice (Mason 1992; Johansson and Jones 2007; Wyatt 2014). Some studies have suggested that only healthier males may afford to produce more attractive 'chemical ornaments' (Penn and Potts 1998; Rantala et al. 2002; Rantala et al. 2003; Zala et al. 2004; Lopez et al. 2009a), probably because compounds allocated to the chemical signal are often diverted from their metabolic roles in the immune and antioxidant functions (Martín and López 2006b; Kopena et al. 2014a; Martín and López 2015). Both visual and chemical signals may be important in different contexts within the same species (López et al. 2002, 2003), and, therefore, if both types of signals are reliable, its reliability should be based on similar trade-offs.

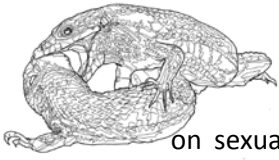
The Carpetan rock lizard, *Iberolacerta cyreni*, is a small (70-80 mm adult snout-to-vent length, SVL) lacertid lizard that inhabits rocky habitats of some high mountains of the Iberian Peninsula. These lizards show a clear sexual, seasonal and ontogenetic dimorphism in coloration (i.e. adult males have green dorsal patterns, especially during the mating season, while young males and females are brown). This suggests that coloration could be considered as a secondary sexual signal as in other lizards (Cooper and Greenberg 1992; Stapley and Keogh 2006). Moreover, lateral blue ocelli of males are used in intrasexual relationships (López et al. 2004), and males with highly saturated green dorsal coloration have higher reproductive success (Salvador et al. 2007). Males also produce abundant femoral gland chemical secretions during the mating season, which, as in other lizards, may reliably convey information about a male's



quality or genetic compatibility (Olsson et al. 2003; Martín and López 2006b, c, 2015). Females may use this information to choose prospective mates. For example, female rock lizards prefer scent marks of males with high proportions of ergosterol in their femoral secretions (Martín and López 2006b, 2012), which may signal a better immune response (López et al. 2006).

In this paper, we designed a field experiment to explore whether costs of immunity affected the expression of both chemical and visual ornaments of male lizards *I. cyreni*, which would allow honest signaling of male condition via multiple types of signals. Although, in many animals there are many evidences of a correlation between parasite load or health state and the elaboration of sexual signals (e.g. Ressel and Schall 1989; Saks et al. 2003; Martín et al. 2008), costs of immunity *per se* can be confounded with the costs of the pathogenic effects of parasites. Thus, to look for actual immunity costs, many experimental studies have used antigens that are identified by the immune system as a pathogen and that elicit an immune response without being actually pathogenic (e.g. Bonneaud et al. 2003; Alonso-Alvarez et al. 2004; Staszewski and Boulinier 2004; Loyau et al. 2005; Uller et al. 2006). Here, we experimentally challenged the immune system of wild male lizards *I. cyreni* with a bacterial antigen (LPS), without pathogenic effects, and examined whether and how the characteristics of their visual and chemical sexual signals were affected by the activation of the immune system. We predicted that if existed a trade-off between the immune function and the elaboration of visual and chemical ornaments, an activation of the immune system should reduce the “intensity” of both visual and chemical displays.

Previous similar experiments have been performed in captivity to ensure that all individuals have similar environmental conditions, such as similar access to food and thermoregulation opportunities (Lopez et al. 2009a, b; Tobler et al. 2015; Zamora-Camacho et al. 2016; Kopena et al. 2017). This was made to ensure that differences in the quality of the individuals or of their home ranges did not affect or compensate for the effects of the activation of the immune system. Therefore, it is unknown whether these detrimental effects observed in captivity are important for the actual development of sexual signals in wild populations. There are two alternative possibilities; challenged individuals might be able to compensate the costs of the immune response in the field through behavioral modifications (e.g. by increasing antioxidants in the diet or reducing activity), and, in that case, the expected detrimental effects on sexual signals development would not be important or might even not appear at all. Alternatively, limitations of the natural environment, for example in terms of diet of thermoregulatory opportunities, might increase the detrimental costs of the immune challenge



on sexual signals in a greater extent or affect to different aspects than those observed in captivity.

Materials and methods

Field and experimental procedure

We made the field study in a 100 x 100 m marked plot close to “Puerto de Navacerrada” at 1850 m asl (Guadarrama Mountains, Central Spain). The habitat in all the plot consisted of a homogeneous natural mix of grassy areas (e.g. *Festuca sp.*), low shrubs (*Juniperus communis*, *Cytisus oromediterraneus*) and rock gravels. We walked daily the plot when weather conditions were favorable. At the beginning of May 2016 (between 3rd and 27th), we captured by noosing 34 adult male lizards of similar body sizes. At this time of the year, lizards had just recently emerged from hibernation and the mating season had not yet started. For this reason, lizards had not yet developed fully sexual coloration and had no active femoral secretions. Every day, captured lizards were transported to “El Ventorrillo” field station, 5 km from the study site, for being processed. From each individual, we took morphological measures (snout-to-vent length: SVL, tail length, head size) with a digital caliper to the nearest 0.1 mm and measured body mass with a digital scale to the nearest 0.01 g.

We challenged the immune system of male lizards using an injection of lipopolysaccharide (LPS) from the cell wall of the bacteria, *E. coli* (serotype 0111-B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). We used LPS because it induces an inflammatory immune response by non-specifically activating B and T lymphocytes and by producing specific anti-LPS antibodies, which have no pathogenic effects (Janeway et al. 2001). Nevertheless, LPS also induces immunopathological effects such as fever (Deen and Hutchison 2001; Zamora-Camacho et al. 2016), alters the oxidative state (Tobler et al. 2015) and may reduce reproductive output and growth (Uller et al. 2006). We randomly assigned male lizards to one of the treatments; 18 experimental males (‘LPS-males’) were injected intraperitoneally with LPS (2.5 µg per g of body weight) diluted in 0.05 ml of PBS (phosphate buffered saline), while 16 control males (‘C-males’) were injected with the same volume (0.05 ml) of PBS alone. The serotype was similar, and the concentration similar or lower than those previously used to stimulate the immune system in other lizards (Deen and Hutchison 2001; Uller et al. 2006; Lopez et al. 2009a, b). There were not significant differences in SVL of lizards between treatments (C-males: 68 ± 1 mm; LPS-males: 70 ± 1 mm; GLM: $F_{1,32}=0.60$, $P=0.44$).



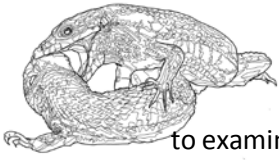
Lizards were marked permanently with a passive transponder microchip (High Performance 8 mm PIT Tag.; Biomark, Inc., Boise, Idaho, USA) injected subcutaneously. Lizards were also painted with a four color dorsal spots code for individual temporal identification at long distance. Subsequently, lizards were released with good condition at their exact capture points within the same day of capture.

We recaptured every male that we found in the plot or its surroundings at the beginning of June (between 1st and 10th June), in the middle of the mating season, some days after we carried out the LPS treatment (time interval between applying the treatment and recapture, C-males: mean \pm SE = 18 ± 3 days; LPS-males: 17 ± 2 days; GLM, $F_{1,19}=0.39$, $P=0.54$). We transported lizards to the field station to weigh them, to measure their now fully developed nuptial coloration and to take a sample of femoral gland secretions, which was now abundantly produced (see below). Lizards were thereafter released at their capture points.

Visual signals

We measured reflectance of the coloration (from 300 to 700 nm) of four areas of the body (the "whitish" to "bluish" throat and submandibular mental region, the "greenish" areas of the dorsum, and the lateral dark "bluish" ocelli). We used an Ocean Optics USB2000 spectroradiometer with a DT-1000-MINI Deuterium–Halogen light source (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL, USA). To exclude ambient light and standardize measuring distance and angle (45°) to the skin, a cylindrical metallic tube was mounted on the bifurcated fiber optic probe (Montgomerie 2006). Reflectance was measured always by the same person. At each body part, we measured coloration on three nearby points. Reflectance (R) was calculated relative to a white standard (WS-1-SS) with the OOIBase32 software (Ocean Optics, Inc.). Mean reflectance was summarized over 5 nm steps ('binned'; Grill and Rush 2000) and we calculated average values of reflectance for the three measurements of each body part of each individual before statistical analysis.

We used principal component analyses (PCA) to summarize the reflectance spectra of the different body parts (Cuthill et al. 1999; Grill and Rush 2000). We used this method because it makes no assumptions about how reflectance variation is perceived or which aspects of the spectrum might be important (Cuthill et al. 1999). Typically, in the PCA of spectral data, the PC1 represents variation in intensity of coloration or brightness, and the subsequent PCs represent combinations of hue and chroma (Cuthill et al. 1999; Grill and Rush 2000). We made four PCA, one for the spectra of each body part of all males. Then, we used general lineal models (GLMs)



to examine the variation in PC scores between treatments (between effect; ‘treatment’: C-males vs. LPS-males).

Chemical signals

Immediately after recapture in the mating season, we extracted samples of femoral gland secretion directly into 1.1 mL total recovery glass vials (ref. V2275, Análisis Vínicos S.L., Tomelloso, Spain). We closed vials with Teflon-lined stoppers and stored them at -20°C until analyses. Samples were analysed by gas chromatography (Agilent 7890A) coupled to mass spectrometry (Agilent 5975C with triple axis detector) equipped with an Agilent HP5-MS column (for details of chemical analyses see for example Kopena et al. 2017). We identified chemicals by comparison of mass spectra in the NIST/EPA/NIH 2002 library, and later confirmed them with authentic standards (from Sigma-Aldrich Chemical Co.).

From the chromatograms we calculated, using the Xcalibur software, the percent of the total ion current (TIC) to determine the relative amount of each compound. We specifically examined whether the experimental immune challenge affected the proportion of cholesterol and ergosterol in femoral secretions of males because previous experiments suggested that these steroids may be important as secondary sexual signals in this and other lacertid lizard species (Martín and López 2007; Lopez and Martin 2012; Martín and López 2012, 2014). We transformed areas of cholesterol and ergosterol in secretions collected after the experimental treatment following Aitchison’s (1986) formula, and used them as dependent variables in general lineal models (GLMs) testing the effects of the treatment (between factor, C-males vs. LPS-males).

Results

Body weight

LPS- and C-males did not significant differ in body weight and both lose weight in a similar way since the first capture, before starting the mating season, to their recapture in the middle of the mating season (C-males: from 7.8 ± 0.5 g to 7.3 ± 0.4 g; LPS-males: from 7.7 ± 0.4 g to 7.2 ± 0.4 g; repeated measures GLM, time effect: $F_{1,19}=21.98$, $P<0.0002$; treatment: $F_{1,19}=0.09$, $P=0.77$; time x treatment: $F_{1,19}=0.31$, $P=0.58$).

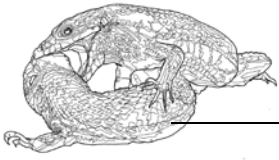
Visual signals



The PCAs on average reflectance data of all spectra made separately for each body part produced in each case three principal components (PCs) that together accounted in all cases for more than 92% of the variation in the original spectra (see Table 1). In all cases, PC1 represented achromatic brightness variation in the original spectra because coefficients relating PC1 to the original reflectance data were all negative and of similar magnitude. The comparison between LPS- and C-males and the unmanipulated group (U-males) did not show any significant differences in brightness of coloration of any body part among treatments (Table 1)

		Treatment		GLM	
		C-males	LPS-males	$F_{1,19}$	P
Gular:					
PC1 (57.7 %)	↓ Brightness 445-650 nm	0.01 ± 0.32	-0.13 ± 0.32	0.03	0.87
PC2 (25.4 %)	↕ 300-440 nm 655-700 nm 300-580 nm	-0.36 ± 0.28	0.74 ± 0.28	11.56	0.003
PC3 (10.7 %)	↕ 585-700 nm	0.48 ± 0.31	-0.01 ± 0.31	1.92	0.16
Mental:					
PC1 (63.8 %)	↓ Brightness 445-650 nm	0.17 ± 0.32	-0.03 ± 0.32	0.67	0.73
PC2 (21.8 %)	↕ 300-440 nm 655-700 nm 300-575 nm	-0.29 ± 0.30	0.66 ± 0.29	3.21	0.04
PC3 (7.5 %)	↕ 580-700 nm	0.29 ± 0.31	-0.34 ± 0.31	1.92	0.16

Table 1a Mean (\pm SE) of PC scores describing characteristics of coloration of different body parts of wild male lizards *I. cyreni* 17 + 2 days after the injection of control PBS (C-males) or LPS (LPS-males). For each PC the amount of variance explained was showed below, and the arrows indicate the variable or range of wavelengths correlated with each PC. Results (F , P) from GLM tests comparing the PCscores among treatments are shown.



		Treatment		GLM	
		C-males	LPS-males	$F_{1,19}$	P
Dorsal:					
PC1 (76.0 %)	↓ brightness 300-465 nm	0.03 ± 0.32	0.22 ± 0.32	0.82	0.62
PC2 (12.0 %)	↕ 470-700 nm 435-610 nm	0.13 ± 0.32	-0.44 ± 0.32	1.69	0.21
PC3 (7.4 %)	↕ 300-430 nm 615-700 nm	0.48 ± 0.31	0.06 ± 0.31	1.28	0.35
Ocelli:					
PC1 (60.4 %)	↓ brightness 300-485 nm	0.25 ± 0.32	-0.24 ± 0.32	1.49	0.27
PC2 (20.6 %)	↕ 490-700 nm 395-595 nm	0.26 ± 0.29	-0.86 ± 0.29	3.72	0.025
PC3 (11.6 %)	↕ 300-390 nm 600-700 nm	0.24 ± 0.32	0.17 ± 0.32	1.05	0.47

Table 2b Mean (\pm SE) of PC scores describing characteristics of coloration of different body parts of wild male lizards *I. cyreni* 17 + 2 days after the injection of control PBS (C-males) or LPS (LPS-males). For each PC the amount of variance explained was showed below, and the arrows indicate the variable or range of wavelengths correlated with each PC. Results (F , P) from GLM tests comparing the PCscores among treatments are shown.

The second (PC2) and third PCs (PC3) represented, depending on the body part, variation in the relative amount of short- to long-wavelength reflectance (PC2 for dorsal and ocelli coloration; PC3 for the rest) or in the relative amounts of medium wavelengths to both very short (i.e. UV) and very long wavelengths (PC2 for gular and mental coloration; PC3 for the rest) (Table 1). There were significant differences between treatments in the PC2s of gular and mental coloration, which indicated that LPS-males showed relatively lower amounts of very short wavelengths (UV coloration) in the throat in comparison with C-males (Table 1). Similarly, significant differences in the PC2 of ocelli coloration indicated that the ocelli of LPS-males had



relatively lower amounts of short wavelengths (i.e. UV and blue) than C-males (Table 1). Finally, dorsal coloration was not significantly affected by the immune challenge.

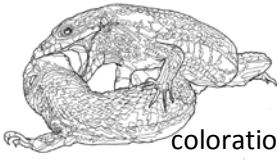
Chemical signals

Proportions of ergosterol in femoral gland secretions were significantly higher in C-males than in LPS-males (2.1 ± 0.2 % vs. 1.4 ± 0.2 %; GLM, $F_{1,19}=5.81$, $P=0.026$). In contrast, there were not significant differences among treatments in relative proportions of cholesterol (49.0 ± 5.6 % vs. 56.2 ± 5.3 %; GLM, $F_{1,19}=0.88$, $P=0.36$).

Discussion

Our experiment made under natural conditions showed that an experimental activation of the immune system in wild male lizards *I. cireni* resulted in changes in some, but not others, characteristics of both their sexual visual and chemical signals. This suggests that, in their natural environment, there may be a trade-off between activation of the immune system and, at least, some aspects of the elaboration of visual and chemical sexual signals in this lizard. The effects in coloration are partly similar to those found in other animals in experiments made under controlled captivity conditions (birds: Faivre et al. 2003; Alonso-Alvarez et al. 2004; lizards: López et al. 2009a; turtles: Ibáñez et al. 2014) and also in some wild birds (Torres and Velando 2007). Similarly, an immune challenge can also change composition of chemical signals in other lizards and mammals (Lopez et al. 2009a; Kimball et al. 2014). Nevertheless, contrary to expected, captive male lizards *Lacerta schreiberi* that suffered an immune challenge, but also received supplementary vitamin E in the diet, were able to increase saturation of UV-blue throat coloration and to maintain the characteristics of their chemical signals (Kopena et al. 2017). This further suggests that optimal captivity conditions may modify the effects of the immune challenge, and that studies made under natural conditions (which could also reveal interannual variability) are needed to understand the actual relationships in the wild between the immune system and the sexual signals.

With respect to visual signals, in our experiment, challenged males decreased (or did not increase) the relative amount of UV coloration in the throat and the lateral ocelli (i.e. they had less saturated UV coloration), while the carotenoid dependent dorsal green coloration was not affected. In contrast, in captive *P. hispanica* lizards, an immune challenge decreased the carotenoid dependent yellow component of the ventrolateral coloration, but did not affect UV and blue-green components of this coloration (Lopez et al. 2009b). Changes in throat UV



coloration might be caused by the combined effects of nanostructural changes in platelet distances and spacing in the iridophore layer and a decrease in the eumelanin content of the underneath melanophore layer (Quinn and Hews 2003; Grether et al. 2004; Saenko et al. 2013; Kopena et al. 2017).

In green lizards *Lacerta viridis*, the throat UV coloration of males seems to be the visual signal most preferred by females during mate choice (Bajer et al. 2010, 2012; Molnár et al. 2012). Also UV-blue throat saturation of male green lizards is linked with dominance behavior (Martín and López 2009; Bajer et al. 2011). Similarly in *I. cyreni*, the UV-blue lateral ocelli of males are important in intrasexual relationships (López et al. 2004), although the role of throat UV coloration in mate choice has not been explored in this species. Nevertheless, if UV coloration had similar roles in *I. cyreni*, the changes in UV coloration induced by the immune challenge may be important in sexual selection and have reproductive consequences.

In contrast to a previous captivity study where ventrolateral orange coloration of *P. hispanica* lizards was affected by an immune challenge (Lopez et al. 2009b), we did not find any effect in the carotenoid dependent greenish dorsal coloration of wild *I. cyreni*. In other captivity studies of birds and turtles, the induced immune activity diverted carotenoids from blood and decreased carotenoid-based coloration of the skin or beak (Faivre et al. 2003; Alonso-Alvarez et al. 2004; Ibanez et al. 2014) although not of feathers (Navara and Hill 2003; Fitze et al. 2007). These contrasting results might indicate that, in our field study, the carotenoids needed by lizards to develop this visual signal might be in enough supply in natural prey to convey both dorsal coloration and other possible physiological roles induced by the immune activation. Therefore, natural conditions might allow lizard in the wild to compensate for any detrimental effect in this signal, at least under favorable conditions. Alternatively, some of these carotenoids used for ornamentation might not be effective as immunostimulants, as it has been suggested in other lizards (Kopena et al. 2014b) and birds (Fitze et al. 2007). Therefore, these carotenoids would not be needed for the immune response and could be allocated to the visual signal, which would not result affected by the experiment.

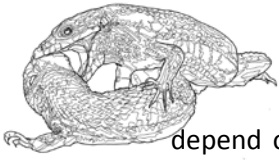
An alternative explanation to our results might be that, because at least in female lizards of other species reproduction is suppressed or reduced after the experimental activation of the immune system with LPS injections (Uller et al. 2006) or cutaneous wound healing (French et al. 2007a, b) it is possible that in our experiment LPS-male lizards simply did not develop nuptial coloration as control males did because LPS injection suppressed reproduction. However, both LPS- and control males increased production of femoral gland secretions and showed



reproductive behaviors (i.e. we observed fights with other males and mating attempts with females during the field study), This indicated that all males were sexually active irrespective of the experimental treatment. These data suggest that changes in coloration in LPS-males were not a simply consequence of decreased reproduction.

The immune challenge also affected notoriously to the “quality” of chemical signals of *I. cyreni* lizards; the activation of the immune system resulted in decreased proportions of ergosterol, but not of cholesterol, in femoral secretions of male lizards. Similarly, proportions of cholesta-5,7-dien-3-ol in femoral secretions of male lizards *P. hispanica* decreased after an experimental immune challenge (Lopez et al. 2009a). Moreover, in several species of lacertid lizards there is often a natural relationship between proportions of these steroids in secretions and their immune responses (López and Martín 2005; López et al. 2006; Martín and López 2006b, 2015). These results indicate that there is a trade off between the immune system and the elaboration of chemical sexual signals that is also showed in nature. Ergosterol and cholesta-5,7-dien-3-ol are precursors for vitamin D and, at least in humans and other mammals, the active form of vitamin D is a potent immune system modulator with a variety of effects on immune system function that may enhance innate immunity and inhibit the development of autoimmunity (Fraser 1995; Griffin et al. 2003; Hayes et al. 2003). Therefore, activation of the immune system might require lizards to allocate larger amounts of systemic provitamin D, later transformed to vitamin D, to the immune function and, consequently, less provitamin D would be available to be allocated to femoral secretions. Because female lizards can detect changes in concentration of these lipids in secretions of males and prefer scent marks of males with high proportions of them (López and Martín 2005; Martín and López 2006a, 2012), it is likely that these compounds reliably signal health of a male to females, likely affecting to mate choice decisions. Similarly, immune activation changes volatile composition of urine in rodents, eliciting avoidance from conspecifics (Kimball et al. 2014; Boillat et al. 2015), and of sweat in humans (Olsson et al. 2014) in a way that females do not further prefer the modified pheromone.

Interestingly, in the lizards *L. schreiberi* and *Gallotia galloti*, the immune challenge caused by parasites increased UV saturation of sexual ornaments (Megía-Palma et al. 2016a, b), and an experimental immune challenge with LPS in captivity conditions in *L. schreiberi* did not affect UV coloration and even males could increase it if they had supplementary antioxidants in the diet (Kopena et al. 2017). These contradictory results suggest that the trade-off between the immune response and the coloration can be context-dependent, being different as a function of the energetic state of the animal (French et al. 2007a; Ruiz et al. 2011), which in the wild will



depend on the particular natural conditions in every season and year. Also, apparently sick challenged animals might decide to invest in sexual signals, or in reproductive behavior per se, in spite of being costly for their immune function, as a form of terminal investment in reproduction, if they considered that their survival probabilities for the next breeding season are very low due to the immune challenge (Weil et al. 2006; Cote et al. 2010; Kopena et al. 2017). Therefore, in spite of potential survival costs, the observed reproductive consequences of an immune challenge might not be as expected considering its apparent detrimental effects for the sexual signals.

Acknowledgments

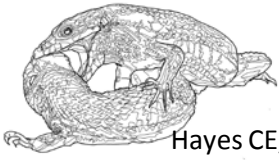
We thank "El Ventorrillo" MNCN Field Station for use of their facilities. Financial support was provided by the project MINECO CGL2014-53523-P. The experiments enforced all the present Spanish laws and were performed under license from the Environmental Organisms of Madrid Community where they were carried out.

References

- Aitchison J (1986) The statistical analysis of compositional data. Chapman and Hall, London
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Gaillard M, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004) An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *Am Nat* 164:651-9
- Anderholm S, Olsson M, Wapstra E, Ryberg K (2004) Fit and fat from enlarged badges: a field experiment on male sand lizards. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271:S142-S144
- Baird TA, Fox SF, McCoy JK (1997) Population differences in the roles of size and coloration in intra- and intersexual selection in the collared lizard, *Crotaphytus collaris*: influence of habitat and social organization. *Behavioral Ecology* 8:506-517
- Bajer, Molnar, Torok, Herczeg G (2011) Ultraviolet nuptial colour determines fight success in male European green lizards (*Lacerta viridis*). *Biol Lett* 7:866-8
- Bajer, Molnár, Török, Herczeg G (2010) Female European green lizards (*Lacerta viridis*) prefer males with high ultraviolet throat reflectance. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64:2007-2014
- Bajer, Molnár, Török, Herczeg G (2012) Temperature, but not available energy, affects the expression of a sexually selected ultraviolet (UV) colour trait in male European green lizards. *PLOS ONE* 7:e34359



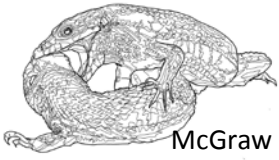
- Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR, Surai PF (2003) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300:125-127
- Boillat M, Challet L, Rossier D, Kan C, Carleton A, Rodriguez I (2015) The vomeronasal system mediates sick conspecific avoidance. *Current Biology* 25:251-255
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G (2003) Assessing the cost of mounting an immune response. *Am Nat* 161:367-79
- Cooper W, Greenberg N (1992) Reptilian coloration and behavior. In: Gans C, Crews D (eds) *Biology of the Reptilia*, Vol 18. University of Chicago Press, Chicago, pp 298-422
- Cote J, Meylan S, Clobert J, Voituron Y (2010) Carotenoid-based coloration, oxidative stress and corticosterone in common lizards. *J Exp Biol* 213:2116-24
- Cuthill I, Bennett A, Partridge J, Maier E (1999) Plumage reflectance and the objective assessment of avian sexual dichromatism. *Am Nat* 153:183-200
- Deen CM, Hutchison VH (2001) Effects of lipopolysaccharide and acclimation temperature on induced behavioral fever in juvenile *Iguana iguana*. *Journal of Thermal Biology* 26:55-63
- Díaz JA (1993) Breeding coloration, mating opportunities, activity, and survival in the lacertid lizard *Psammotromus algirus*. *Canadian Journal of Zoology* 71:1104-1110
- Faivre B, Grégoire A, Prévault M, Cézilly F, Sorci G (2003) Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300:103-103
- Fitze PS, Tschirren B, Gasparini J, Richner H (2007) Carotenoid-based plumage colors and immune function: is there a trade-off for rare carotenoids? *Am Nat* 169 Suppl 1:S137-44
- Fraser DR (1995) Vitamin D. *The Lancet* 345:104-107
- French SS, DeNardo DF, Moore MC (2007a) Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *Am Nat* 170:79-89
- French SS, Hohnston GIH, Moore MC (2007b) Immune activity suppresses reproduction in food-limited female tree lizards *Urosaurus ornatus*. *Functional Ecology* 21:1115-1122
- Grafen A (1990) Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* 144:517-546
- 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*). *Proc Biol Sci* 271:45-9
- Griffin MD, Xing N, Kumar R (2003) Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation. *Annual review of nutrition* 23:117-45
- Grill C, Rush V (2000) Analysing spectral data: comparison and application of two techniques. *Biol J Linn Soc* 69:121-138



- Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB (2003) The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:277-300
- Ibanez A, Polo-Cavia N, Lopez P, Martin J (2014) Honest sexual signaling in turtles: experimental evidence of a trade-off between immune response and coloration in red-eared sliders *Trachemys scripta elegans*. *Naturwissenschaften* 101:803-11
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001) *Immunobiology. The immune system in health and disease*, 5th edn. Garland Publishing, New York
- Johansson BG, Jones TM (2007) The role of chemical communication in mate choice. *Biol Rev Camb Philos Soc* 82:265-89
- Kimball BA, Opiekun M, Yamazaki K, Beauchamp GK (2014) Immunization alters body odor. *Physiology & Behavior* 128:80-85
- Kopena R, López P, Martín J (2014a) Relative contribution of dietary carotenoids and vitamin E to visual and chemical sexual signals of male Iberian green lizards: an experimental test. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68:571-581
- Kopena R, López P, Martín J (2014b) What are carotenoids signaling? Immunostimulatory effects of dietary vitamin E, but not of carotenoids, in Iberian green lizards. *Naturwissenschaften* 101:1107-14
- Kopena R, López P, Martín J (2017) Immune challenged male Iberian green lizards may increase the expression of some sexual signals if they have supplementary vitamin E. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71:173
- Kwiatkowski MA, Sullivan BK (2002) Geographic variation in sexual selection among populations of an iguanid lizard, *Sauromalus obesus* (= *ater*). *Evolution* 56:2039-51
- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87-98
- López P, Amo L, Martín J (2006) Reliable signaling by chemical cues of male traits and health state in male lizards, *Lacerta monticola*. *J Chem Ecol* 32:473-88
- Lopez P, Gabirot M, Martin J (2009a) Immune activation affects chemical sexual ornaments of male Iberian wall lizards. *Naturwissenschaften* 96:65-9
- Lopez P, Gabirot M, Martin J (2009b) Immune challenge affects sexual coloration of male Iberian wall lizards. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 311:96-104
- Lopez P, Martin J (2012) Chemosensory exploration of male scent by female rock lizards result from multiple chemical signals of males. *Chem Senses* 37:47-54
- López P, Martín J (2005) Female Iberian wall lizards prefer male scents that signal a better cell-mediated immune response. *Biol Lett* 1:404-6



- López P, Martín J, Cuadrado M (2002) Pheromone-mediated intrasexual aggression in male lizards, *Podarcis hispanicus*. *Aggressive Behavior* 28:154-163
- López P, Martín J, Cuadrado M (2003) Chemosensory cues allow male lizards *Psammodromus algirus* to override visual concealment of sexual identity by satellite males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54:218-224
- López P, Martín J, Cuadrado M (2004) The role of lateral blue spots in intrasexual relationships between male iberian rock-lizards, *Lacerta monticola*. *Ethology* 110:543-561
- Loyau A, Saint Jalme M, Cagniant C, Sorci G (2005) Multiple sexual advertisements honestly reflect health status in peacocks (*Pavo cristatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58:552-557
- Martín J, Amo L, López P (2008) Parasites and health affect multiple sexual signals in male common wall lizards, *Podarcis muralis*. *Naturwissenschaften* 95:293-300
- Martin J, Forsman A (1999) Social costs and development of nuptial coloration in male *Psammodromus algirus* lizards: an experiment. *Behavioral Ecology* 10:396-400
- Martín J, López P (2006a) Chemosensory responses by female iberian wall lizards, *Podarcis hispanica* to selected lipids found in femoral gland secretions of males. *Journal of Herpetology* 40:556-561
- Martín J, López P (2006b) Links between male quality, male chemical signals, and female mate choice in Iberian rock lizards. *Functional Ecology* 20:1087-1096
- Martín J, López P (2006c) Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards. *Proc Biol Sci* 273:2619-24
- Martín J, López P (2007) Scent may signal fighting ability in male Iberian rock lizards. *Biology Letters* 3:125-127
- Martín J, López P (2009) Multiple color signals may reveal multiple messages in male Schreiber's green lizards, *Lacerta schreiberi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:1743-1755
- Martín J, López P (2012) Supplementation of male pheromone on rock substrates attracts female rock lizards to the territories of males: a field experiment. *PLoS One* 7:e30108
- Martín J, López P (2014) Pheromones and chemical communication in lizards. In: Rheubert JL, Siegel DS, Trauth SE (eds) *Reproductive biology and phylogeny of lizards and tuatara*. CRC Press, Boca Raton pp 43-77
- Martín J, López P (2015) Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of lizards. *Horm Behav* 68:14-24
- Mason RT (1992) Reptilian pheromones. In: Gans C, Crews D (eds) *Biology of the Reptilia* Vol 18. University Chicago Press, Chicago, pp 114-228



- McGraw KJ (2005) The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? *Animal Behaviour* 69:757-764
- Megía-Palma R, Martínez J, Merino S (2016a) Structural- and carotenoid-based throat colour patches in males of *Lacerta schreiberi* reflect different parasitic diseases. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70:2017-2025
- Megía-Palma R, Martínez J, Merino S (2016b) A structural colour ornament correlates positively with parasite load and body condition in an insular lizard species. *The Science of Nature* 103:52
- Molnár O, Bajer K, Török J, Herczeg G (2012) Individual quality and nuptial throat colour in male European green lizards. *Journal of Zoology* 287:233-239
- Montgomerie R (2006) Analyzing colors. In: Hill G, McGraw K (eds) *Bird Coloration, Vol 1 Mechanisms and Measurements*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp 90-147
- Navara KJ, Hill GE (2003) Dietary carotenoid pigments and immune function in a songbird with extensive carotenoid-based plumage coloration. *Behavioral Ecology* 14:909-916
- Olsson M (1994) Nuptial coloration in the sand lizard, *Lacerta agilis*: an intra-sexually selected cue to fighting ability. *Animal Behaviour* 48:607-613
- Olsson M, Lundström JN, Kimball BA, Gordon AR, Karshikoff B, Hosseini N, Sorjonen K, Olgart Höglund C, Solares C, Soop A, Axelsson J, Lekander M (2014) The scent of disease: human body odor contains an early chemosensory cue of sickness. *Psychological Science* 25:817-823
- Olsson M, Madsen T, Nordby J, Wapstra E, Ujvari B, Wittsell 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
- Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 13:391-396
- Pomiankowski A (1988) The evolution of female mating preferences for male genetic quality. In: Harvey PH, Partridge L (eds) *Oxford surveys in evolutionary biology*. Oxford University Press, USA, pp 136-184
- Quinn VS, Hews DK (2003) Positive relationship between abdominal coloration and dermal melanin density in phrynosomatid lizards. *Copeia* 2003:858-864
- Rantala MJ, Jokinen I, Kortet R, Vainikka A, Suhonen J (2002) Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 269:1681-1685



- Rantala MJ, Kortet R, Kotiaho JS, Vainikka A, Suhonen J (2003) Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology* 17:534-540
- Ressel S, Schall JJ (1989) Parasites and showy males: malarial infection and color variation in fence lizards. *Oecologia* 78:158-164
- Ruiz M, Wang D, Reinke BA, Demas GE, Martins EP (2011) Trade-offs between reproductive coloration and innate immunity in a natural population of female sagebrush lizards, *Sceloporus graciosus*. *The Herpetological journal* 21:131-134
- Saenko SV, Teysier J, van der Marel D, Milinkovitch MC (2013) Precise colocalization of interacting structural and pigmentary elements generates extensive color pattern variation in *Phelsuma* lizards. *BMC Biology* 11:105
- Saks L, Ots I, Horak P (2003) Carotenoid-based plumage coloration of male greenfinches reflects health and immunocompetence. *Oecologia* 134:301-7
- Salvador A, Diaz JA, Veiga JP, Bloor P, Brown RP (2007) Correlates of reproductive success in male lizards of the alpine species *Iberolacerta cyreni*. *Behavioral Ecology* 19:169-176
- Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11:317-321
- Stapley J, Keogh JS (2006) Experimental and molecular evidence that body size and ventral colour interact to influence male reproductive success in a lizard. *Ethology Ecology & Evolution* 18:275-288
- Staszewski V, Boulinier T (2004) Vaccination: a way to address questions in behavioral and population ecology? *Trends in Parasitology* 20:17-22
- Thompson CW, Moore MC (1991) Throat colour reliably signals status in male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Animal Behaviour* 42:745-753
- Tobler M, Ballen C, Healey M, Wilson M, Olsson M (2015) Oxidant trade-offs in immunity: An experimental test in a lizard. *PLOS ONE* 10:e0126155
- Torres R, Velando A (2007) Male reproductive senescence: the price of immune-induced oxidative damage on sexual attractiveness in the blue-footed booby. *J Anim Ecol* 76:1161-8
- Uller T, Isaksson C, Olsson M (2006) Immune challenge reduces reproductive output and growth in a lizard. *Functional Ecology* 20:873-879
- Wedekind C (1992) Detailed information about parasites revealed by sexual ornamentation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 247:169-174
- Wedekind C, Folstad I (1994) Adaptive or nonadaptive immunosuppression by sex hormones? *The American Naturalist* 143:936-938



Weil ZM, Martin LB, Workman JL, Nelson RJ (2006) Immune challenge retards seasonal reproductive regression in rodents: evidence for terminal investment. *Biology Letters* 2:393-396

Westneat DF, Birkhead TR (1998) Alternative hypotheses linking the immune system and mate choice for good genes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 265:1065-1073

Wyatt T (2014) *Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures*, 2nd edn

Zahavi A (1975) Mate selection. A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53:205-214

Zala SM, Potts WK, Penn DJ (2004) Scent-marking displays provide honest signals of health and infection. *Behavioral Ecology* 15:338-344

Zamora-Camacho FJ, Reguera S, Moreno-Rueda G (2016) Elevational variation in body-temperature response to immune challenge in a lizard. *PeerJ* 4:e1972

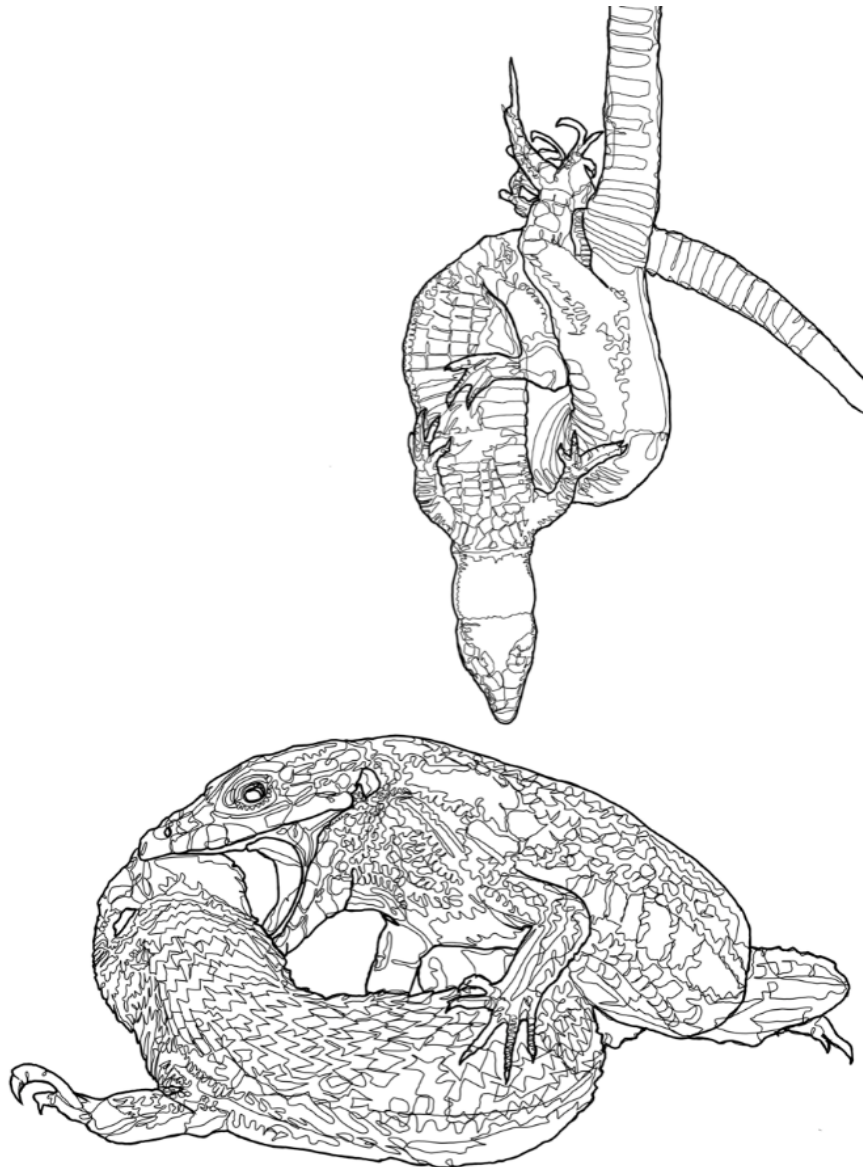
Zucker N (1994) A dual status-signalling system: a matter of redundancy or differing roles? *Animal Behaviour* 47:15-22

CAPÍTULO 2

**Effects of an experimental challenge of the immune system on space use,
reproductive strategies and reproductive success of male lizards**

Iberolacerta cyreni

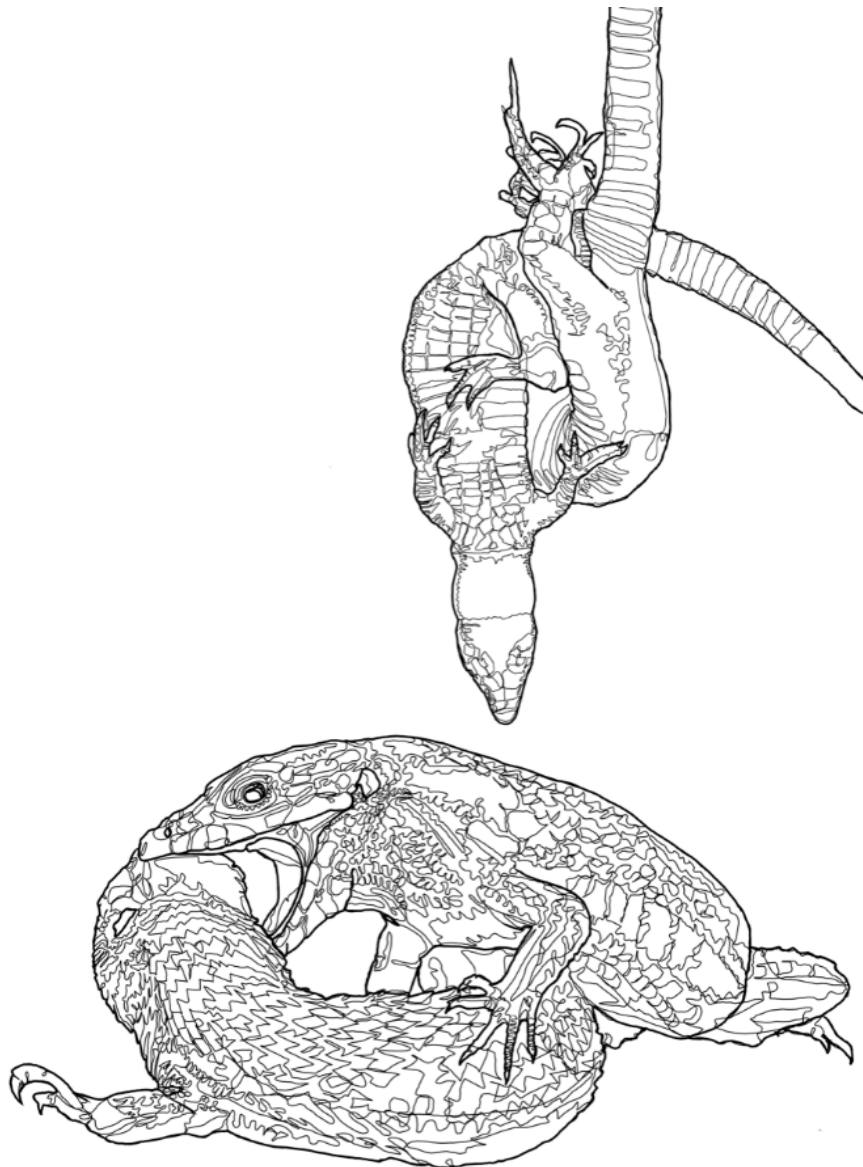
Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Irbin B. Llanqui, Jesús Ortega,
Alfredo Salvador, José Javier Cuervo, Pilar López y José Martín



CAPÍTULO 3

Improving the attractive of chemical signals to females does not ensure the males' mating success: effects on home range, male-male competition and dominance hierarchy in the Carpetan rock lizard (*Iberolacerta cyreni*)

Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Irbin B. Llanqui, Jesús Ortega,
Alfredo Salvador, Pilar López y José Martín



Improving the attractive of chemical signals to females does not ensure the males' mating success: effects on home range, male-male competition and dominance hierarchy in the Carpetan rock lizard (*Iberolacerta cyreni*)

Gonzalo Rodríguez-Ruiz¹, Irbin B. Llanqui², Jesús Ortega¹,
Alfredo Salvador¹, Pilar López¹ y José Martín¹

¹ *Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain*

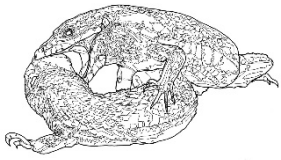
² *Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú*

Abstract. Chemical communication exerts a key role in sexual selection and reproduction of lizards. Males secrete costly semiochemicals that may attract females and enhance their mating success. However, territorialism, male-male competition, and the population social structure are also important factors affecting reproductive success. Here we made an experiment to test whether increasing the attractiveness of chemical signals by males is enough to enhance their mating success independently of male-male competition. To improve the quality of the chemical signals, experimental males were supplemented with dietary vitamin D before the mating season. After that, we released males and females in a semi-natural enclosure and let them to mate freely. Shelters in the enclosure were distributed uniformly to avoid competition because of differences in the habitat. During the mating season, we tracked lizards and recorded their mating and agonistic behaviors. We expected that these higher-quality signals attracted more females to home ranges of experimental males, but that female presence increased the male-male competition and had a reflection in the structure of the dominance hierarchy. Contrary to our expectations, our results suggest that the role of male-male competition and dominance hierarchy were more important than the quality of the signals in the experiment for obtaining a higher mating success.

Keywords Chemical communication, Dominance, hierarchy, Male-male competition, Agonistic encounter, Home-range, Lizard, Signals, Semiochemical.

Introduction

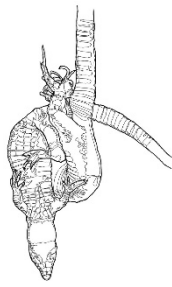
The role of communication in sexual selection has been a widely discussed topic in behavioral ecology (Ryan 1990, 1998; Hauser 1999). From simple signals as colors (Endler 1983), acoustic calls (Searcy and Andersson 1986; Ryan and Rand 1993) or chemical signals (Ayasse et al. 2001) until very complex behaviors like sexual displays (Johnstone 1996) and courtships (Mateos and Carranza 1999), there is a very wide range of traits used to attract and be chosen by a mate. Typically, within a sexual selection context, the signaler is the male who tries to attract a female



(receiver) (Jennions and Petrie 1997). Currently there is still a debate about the origin of the signals (Endler 1993), which might be originated either from sexual selection, in which females would have chosen those signals that considered more attractive, or from a pre-existing sensory bias in females that males would have exploited (Endler and Basolo 1998; Fuller et al. 2005; Grether 2010). However, it is clear that the main ecological function of sexual signals is to attract potential mates (Endler 1992). The attraction of females towards signals could constitute a form of indirect evaluation of the genetic quality of males (Grafen 1990). As the production of some signals is costly to males, females should select those males that produce "better" signals, which should be, at the same time, those that have the best genetic quality (Kotiaho 2001). Chemical signals, such as scent marks (Alberts 1992), have the advantage of working in absence of the signaler (Huntingford et al. 1987). In this way, a female that smells a scent mark could decide whether to stay or leave using the information provided by chemical cues in the mark. A male, indeed, could use his energy for other activities like foraging, while the information about his quality is available in scent marks in his territory.

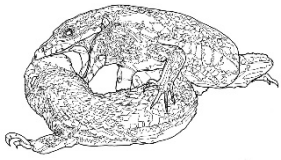
A potential disadvantage of marking a territory with scent is that the information is available for everybody, not only for females but also for other competitor males (Benadi et al. 2008; Jordan et al. 2010). Thus, if a male wants to increase his fitness by having higher reproductive success than the other males, he should compete with them and defend his home range and the females that overlapped with it (Stamps and Krishnan 1995). However, the strategy followed by a male may vary among individuals. While some males establish and defend a territory or a more or less stable home range, others could act as floaters or satellites (Brown 1963; Smith 1978). The territorial strategy should be costlier than the floater strategy in terms of marking and defense but more efficient in increasing mating success.

From a strictly ecological point of view, a territorial male would expulse every male that enters his territory (Brown 1969; Smith 1978; Maher and Lott 1995); this occurs to a greater or lesser degree in species of many zoological groups like fish birds or mammals (Adams 1990; Tobias and Seddon 2000; Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2003; White and Rundle 2015; Koch et al. 2016). But there exists a territorial behavior of "low magnitude" in which the home ranges of several males overlap, and it is in this flexible borderline where the agonistic encounters take place (e.g. Ferner 1974). In this system, the fight for a territory is determined by the dominance status of one male over the others (Stamps and Krishnan 1994). The dominant would defend his dominion (Brown 1975; cited in Maher, 1995) and the resources contained in it, including females.



The outcomes of agonistic encounters in the fight for a territory determine the social structure of the population, establishing a dominance hierarchy among males (Bernstein 1981; Drews 1993). This ranking of males is mainly based on the victories and defeats in agonistic encounters (Bayly et al. 2006), but there are several mechanisms operating at the same time in fights between males. The size of the individuals and the competitive ability could decide who is the winner in a contest, but males could evaluate their own chances of winning or losing by assessing the fighting ability of the rival (Mathis and Simons 1994). The esteem of the rival could be developed by trial-and-error involving in an agonistic encounter with an unfamiliar male and trying to get the victory (Enquist and Leimar 1983). However, this could be a suboptimal strategy because the cost, mainly energetic but also of the risk of damage, could be very high. Otherwise, the esteem of the rival could be done by assessing the traits of the rival before involving in an agonistic encounter with him (Reichert and Quinn 2017). In this assessment, chemical communication could have a very important role if a male uses the scent marks of a territory to assess in advance the competitive ability of the owner or to recognize neighbors as “dear enemies” minimizing the number of potential agonistic encounters (Jaeger 1981).

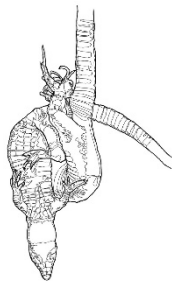
Since the dominance hierarchy is established by the males in their competition for access to females, it is plausible that the hierarchy is also influenced by the number of females inside each male’s home range. Because females may be attracted by scent marks towards home ranges of high-quality males, it would be expected that those males were also involved in more agonistic encounters with other males. Also, if there was a relationship between high-quality signals and fighting skills, these males would win more confrontations and would be at the top of the dominance hierarchy. There is a conundrum to resolve which is the main process operating in males’ mating success: Are males more successful in mating because of their attractiveness to females or because of their ability to defend a territory in which females are found? A good species to test this hypothesis is the Carpetan rock lizard *Iberolacerta cyreni*. In this species, territorial males scent mark their home ranges with femoral gland secretions (López and Martín 2005) and feces (López et al. 1998; Aragón et al. 2000). Territorial males defend their home ranges and try to enhance their surface area to overlap with the home range of more females (Aragón et al. 2001c). Usually, this territorial strategy provokes agonistic encounters between males (Martín and Salvador 1993), being the outcome of these encounters conditioned by the relative head size which determined the position of a male in the dominance hierarchy (López and Martín 2002; López et al. 2002). The scent marks that these males use to demarcate the territory can be used by other males to recognize the identity of the owner of the home range and to assess his fighting potential or social status in the dominance hierarchy (Aragón et al. 2000, 2001a; López and Martín



2011). It has been suggested that this rival assessment prior to a fight would reduce the costs of an agonistic encounter between males of different status (López and Martín 2011). Individual discrimination and familiar recognition by means of scents (Aragón et al. 2001b) might be based on the variability in the proportion of different compounds in the femoral secretions, since allocating some compounds to the secretions could be costly and condition-dependent (Martín and López 2015). For example, just males of high quality could divert from metabolism chemicals like oleic acid that has been shown to be related to a higher body condition (Martín and López 2010) and low levels of fluctuating asymmetry (López et al. 2006). Similarly, males may assess the competitive ability of the rival in an agonistic encounter using the proportion of cholesterol in their secretions, probably because cholesterol production depends on testosterone levels (Martín and López 2007).

Females may also detect differences in concentration of some compounds in males' scent marks and use them to assess the quality of the male that made the signal (Martín and López 2006a). However, females might not prefer signals from dominant males but from males with, for example, lower fluctuating asymmetry (López et al. 2002) or a better immune response (López et al. 2006), which is probably related with a high genetic quality or a high access to resources. Previous experiments have shown that the quantity of cholesta-5,7-dien-3-ol (provitamin D₃) that males can allocate in femoral secretions increases when the dietary intake of vitamin D is enhanced (Martín and López 2006b). This study also showed that females preferred to associate with areas marked with the scent of males whose secretions had higher amounts of provitamin D. Another experiment revealed how increasing experimentally the quantity of ergosterol (provitamin D₂) in natural territories of males result in that females modified their home ranges to inhabit preferentially inside these areas (Martín and López 2012). Because females are the main resource defended by males, it is expected that a change in female distribution caused by high-quality chemical signals could also have an effect on agonistic encounters and dominance hierarchy between males.

Here, we tested whether an experimental increase of the quality of chemical signals of some males, while maintaining the characteristics of the territories, may provoke changes in the space use and agonistic and mating behavior of *I. cyreni* lizards. To test this, we increased experimentally the "quality" of the secretions of a group of males before the mating season by means of a dietary supplement of vitamin D. This should increase the amount of provitamin D in the male's secretions. We hypothesized that, the greater amount of this compound in secretions should render experimental males more attractive to females, but it would not affect to rival



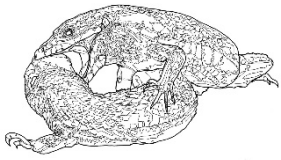
assessment or dominance relationships between males, which should depend on males' fighting skills independently of the experimental treatment. We expected that, if female mate choice, rather than male-male competition, was the main process determining mating success, the higher attractiveness of supplemented males resulted in a higher degree of overlapping with home ranges of females and a higher frequency of mating interactions with females, despite the position of a male in the dominance hierarchy. However, if the presence of a higher number of females also attracted other males and increased competition between males, we expected that supplemented males would have more agonistic encounters, and, that their home ranges would be more overlapped by other males than the home ranges of control males.

Material and Methods

Study animals and diet supplementation

In early May 2017, we captured *I. cyreni* lizards (31 females and 40 males) by noosing at "Alto del Telégrafo" (Guadarrama Mountains, Madrid Province, Central Spain) at an elevation of 1,900 m. Immediately after capture, lizards were transported to 'El Ventorrillo' field station (5 km from capture site), where they were housed. From each lizard, we measured snout-vent length (SVL), tail length (TL), head length (HL), head height (HH), head width (HW) and body mass (BM). All morphological variables were measured with a digital caliper (to the nearest 0.1 mm) except body mass that was measured with a digital scale (to the nearest 0.01 g). Animals were housed in individual plastic terraria (40 × 30 × 25 cm) inside a climatic walk-in chamber (Ibercex V-450-D; ASL S.A.) with adequate temperatures (diurnal = 21 °C; nocturnal = 7 °C) and photoperiod (12 h:12 h, light:dark) and with ultraviolet radiation from UV-lamps during 1.5 h a day. Each terrarium was provided with a layer of coconut fiber as a substrate, a piece of roof tile as a shelter, a hot spot for thermoregulation that allowed lizards to attain optimal body temperatures. Drinking water and food (crickets and mealworms) were provided *ad libitum*.

To avoid differences caused by body size, we ordered the males by snout-to-vent length and paired them. One male of each pair was randomly assigned to the vitamin D (experimental) or control treatment. Thus, there were no differences in SVL between treatments (control mean \pm SE = 73.48 \pm 0.67 mm, experimental mean \pm SE = 72.84 \pm 0.74 mm; $F_{1,38}=0.42$, $P=0.52$). Every two days, during two weeks, the experimental group was supplemented with 0.20 μ g of vitamin D (MYPROTEIN, The Hut.com Ltd., UK) dissolved in 0.25 ml of soybean oil (Sigma-Aldrich Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), while males of the control group received 0.25 ml of soybean oil alone.

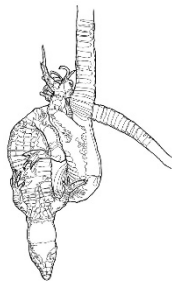


Soybean oil does not contain any amount of natural vitamin D. To ensure that all the animals received the same quantity of supplement, the solution was gently delivered into lizard's mouth with a sterile plastic syringe.

Experimental enclosure and observations of lizard behavior

After the two weeks period of diet supplementation, on 19th May, all the males (SVL, mean \pm SE = 73.1 ± 0.5 mm;) and females (SVL = 74.2 ± 0.5 mm) were released in a semi-natural outdoor enclosure (28x12 m) located at 'El Ventorrillo' field station facilities, in a grass prairie rounded by trees. The enclosure walls were made of polyethylene sheet sustained by bamboo sticks every three meters and in the corners. Although the lizards cannot climb the wall, this had 60 cm of high to prevent escape. To avoid attacks from predatory birds, the whole enclosure was covered with an anti-bird net sustained by links crossing all the enclosure. Since this lizard species used to associate with rocks (Martín and Salvador 1995), we placed forty similar artificial groups of rocks inside the enclosure for shelter and basking platforms. Every artificial group of rocks consisted of three concrete bricks (39x19x19 cm length x width x high) with holes and one mud brick buried under them (24x11x7.5 cm length x width x high), shaping a space with many basking platforms and shelters. The groups of rocks were placed in four parallel rows (240 cm of separation between rows) of ten groups each one (280 cm of separation between groups within a row). There were as many artificial groups of rocks as males were released to ensure that every male could establish his own territory in the enclosure. The position of groups of rocks in 4 rows and 10 columns determined an X, Y grid that allows us to reference the position of the lizards in the enclosure.

To ensure an accurate tracking of lizards, all the animals were marked subcutaneously with a passive transponder microchip (High Performance 8 mm PIT Tag. Biomark, Inc., Boise, Idaho, USA) and were painted with a code of four color dorsal points for long-distance individual identification. Males and females were released in the midday of 19th May all together at the central point of the enclosure. That day we allowed the animals to establish in the groups of rocks, starting the observations on 20th May. Lizards stayed at the enclosure for seventeen days, since 19th May until 5th June, when the mating season had finished. This period was similar to the correspondent mating season in nature (Elvira and Vigal 1985). Every day between 9:30 and 16:30 h (GMT), during the main period of lizards' activity, two researchers walked systematically around the whole enclosure and, from several hidden and advantage points, we observed and recorded the social behavior of lizards like matings or agonistic encounters between males. In addition to that, every hour we made a census recording the position of all the observed animals in relation to the groups of rocks to estimate their individual home ranges (see below) and the activity levels

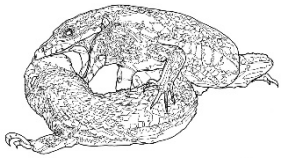


of each animal. We used the frequency of observations of each animal during census as an index of its activity. The census hourly period allowed independence of the observations. When the frequency of matings and fights between males descended in a meaningful drastic way, we considered that the mating season had finished (Aragón et al. 2001c) and all the animals were extracted from the enclosure and released at their capture sites.

Social interactions

We recorded every social behavior observed during the systematic surveys of the enclosure. We considered every interaction between two individuals, i.e. when two lizards were close to each other (less than 50 cm of distance) and both were clearly aware of their mutual presence eliciting a behavioral response in, at least, one of them. We classified the interactions into two broad categories: 'agonistic interactions' between two males, including when a male chased another male without physical contact to expel him from the territory and also fights between males that sometimes included bites. Under the category 'mating interactions' between a male and a female we included when a male followed the female and bite or tried to bite the proximal zone of the tail to start a copulation, successful copulations, and observations of mate guarding when the male and female stayed close together basking or sheltered. These behavioral categories were used to compute the frequencies of mating attempts and copulations, and to estimate the mating success as the proportion of successful copulations obtained by the male with respect to the total frequency of mating interactions made by that male. When some of these behaviors were observed, we noted the time and the location in the enclosure where the interaction took place, identified the individuals involved and assigned a winner and loser in case of agonistic interactions.

From the outcomes of males' agonistic interactions, we examined statistically the frequency of victories and defeats in agonistic encounters for every male lizard. We constructed a matrix of dominance relationships to study the hierarchy structure based on agonistic encounters won and lost. We determined several hierarchy properties such as 'linearity' and 'steepness' (h') (De Vries 1995), 'triangle transitivity' (T_{tri}) and proportion of interaction between individuals (Shizuka and McDonald 2012, 2014). In addition, we computed a dominance index, the 'Elo-rating' (ELO) index, which is a widely used rank of dominance used in zoology that attends to the probability of winning a new agonistic encounter considering the results of prior fights (Albers and de Vries 2001).



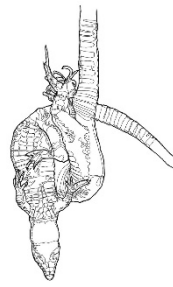
Home Range

Individual home range (HR) size was determined using the location points of lizards recorded in the hourly census. These points were transformed into a coordinates system in which the dimensions of the enclosure (28x12 m) and the distance between groups of rocks (240 cm between rows and 280 cm between columns) were included to estimate the HR areas in m² with the package *adehabitatHR* (Calenge 2006) from the software R (R Development Core Team 2017). HRs areas were computed using the kernel density estimator (KDE) (Worton 1989) instead of the most commonly method used in reptiles (Stone and Baird 2002), the minimum convex polygon (MCP) (Mohr 1947; Rose 1982) because MCP could be problematic in intraspecific comparisons with little variation in home range size (Nilsen et al. 2008). The smooth parameter (h) for KDE functions was estimated using the reference bandwidth method (h=2.399) (Silverman 1986; Calenge 2015). It is important to note that, although we used the term HR to refer to the area covered by the lizards inside the enclosure, these HR sizes were restricted by the enclosure size. Therefore, the values of HR provided in this study should not be taken as the actual values of HR that would result from a field-study of the HR in *I. cyreni* (See Pérez-Mellado et al. 1988; Aragón et al. 2001c). HRs sizes and the overlapping area were computed under two different approaches, first removing the 5% of extreme points (HR KDE95) that were considered as occasional occurrences (Powell 2000) and, second, removing the 50% of the points (HR KDE50) to use just the 'core areas' or those places with highest intensity of use for an individual (Baker et al. 2017). We calculated separately the overlap of each male with females and with other males considering these as indirect measures of attractiveness and dominance respectively. Both overlapped areas were calculated estimating first the mean area overlapped between males or females for every individual and, then, computing the percentage overlapped with respect to the individual HR size.

Data analyses

To check whether the vitamin supplementation treatment affected the frequency of agonistic and mating interactions, the dominance hierarchy, and the home range size and degree of overlap, general linear (GLM) and generalized linear (GLZ) models with the treatment as the main factor were fitted. When it was needed, data were log-transformed to ensure normality and, for count data, Poisson or binomial distributions were used.

As activity and body size of the males were found to be correlated with social status in previous works (Martín and López 2000) and reproductive success (Salvador et al. 2007), we computed new models including activity and body size as covariates in all the models. Since it has been shown that vitamin D dietary supplement causes changes in male's personality (Horváth et



al. 2016), we also looked for effects on activity caused by the treatment. To include in the models the body size effect we computed a Principal Components Analysis (PCA) including SVL, mass and the measures of the head (height, width, length). The first component (PC1) explained 64,11% of the variance, it was highly correlated with the five morphological measures and, thus, it was considered representative of the whole body size. The scores of PC1 were included as a covariate in statistical models.

To test if dominant males had greater HR that overlapped in greater proportions with HR of females and in less proportion with HR of other males and the relationship with mating, we included the dominance variables (frequency of victories and ELO) in space and mating models as covariates. As the dominance variables reflect different aspects of male's social relationships but they are, presumably, pretty correlated between them, we computed different models each one including one dominance variable. All the analyses were performed with R software (R Development Core Team 2017).

Results

Activity level and home range size

Supplementation of vitamin D appeared to have no effect in activity levels of males (Table 1) but it was rather determined by male's body size such that larger males were more active independently of the experimental treatment (Fig. 1 and table 2) when size was included as a covariate in the model. Home range size, both considering the whole area (KDE95) and the core area (KDE50), neither were explained by the supplement (Tables 1 and 3). However, dominance index and the number of victories were the variables that explained the HR size both for the complete

and core area (Table 3 and Fig 2.). Thus, supplementation appeared to have no effect in activity level and the HR size appeared to be related to male-male competition.

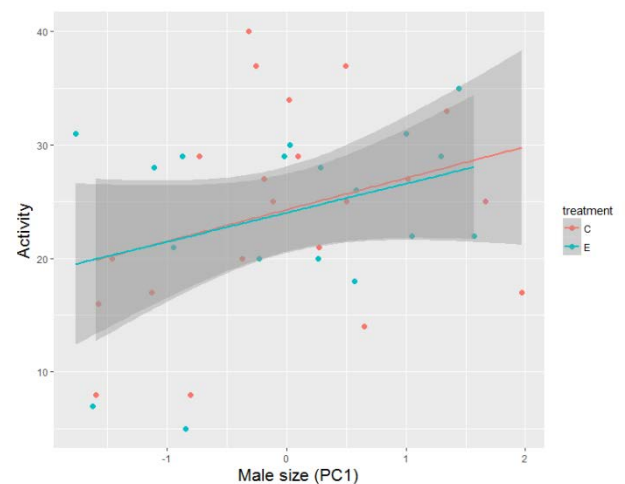


Figure 1 Scatterplot showing the relationship between male size (PC1) and activity level.

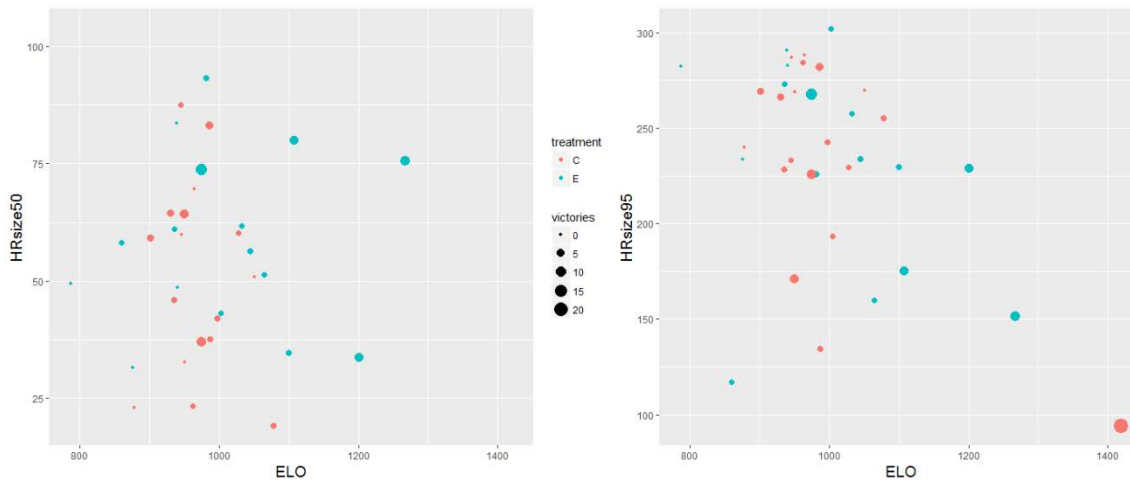
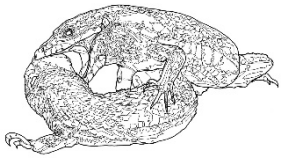
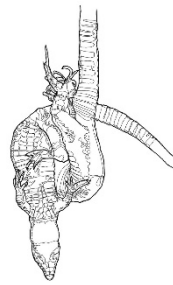


Figure 2 Scatterplots with Home range size and ELO index of dominance with the numbers of victories

Males attractiveness

We measured the attractiveness indirectly by means of the degree of overlap in HR between females and supplemented males; and, directly, through the mating behavior (i.e. frequency of interactions between males and females, mating attempts, and successful matings). Our results showed that the supplement treatment appeared to have no effect increasing the attractive of a male to females. Models with the supplement treatment as the main factor were not significant both for HR overlapped by females and mating behavior (Table 1). Models with covariates showed that the HR overlapped by females appeared not to be related to any of the variables measured (Table 4), while the mating behavior appeared to be highly related to dominance and agonistic encounters (Table 3). The number of interactions between males and females were related to the activity and the number of victories in agonistic encounters, but not by the dominance index (ELO). And, although the mating attempts were related just to the activity and the male's size, the frequency of matings was related to dominance and not with the frequency of victories. However, the mating success (obtained matings t in relation to attempts to mate) was related to size, victories and ELO index (Table 3). These results revealed that the supplemented males were not more attractive to females in terms of HR overlapped and mating behavior, while the fighting skills related to body size, the number of victories and dominance, appeared to be more effective as a mean to obtain more matings.



Variable	Supplement males		Control males		df	F.value/Chisq	P-value
	Mean	SD	Mean	SD			
HR size (KDE95) (m ²)	235.84	51.48	235.57	50.89	1,38	0.002	0.96
HR size (KDE50) (m ²)	62.92	20.95	52.14	20.05	1,36	2.77	0.11
HR MM overlap (KDE95) (m ²)	67.99	2.79	67.47	2.38	1,38	0.37	0.55
HR MM overlap (KDE50) (m ²)	25.94	7.23	25.66	9.88	1,36	0.65	0.42
HR FM overlap (KDE95) (m ²)	62.90	2.57	62.35	2.37	1,38	0.48	0.49
HR FM overlap (KDE50) (m ²)	21.99	6.72	25.66	9.88	1,36	1.79	0.19
Frequency of M-F interaction	1.26	1.85	1.76	2.51	1,2	0.55	0.46
Frequency of matings	0.42	0.77	0.43	0.75	1,2	0.001	0.97
Frequency of mate attempts	0.63	1.16	0.76	1.04	1,2	0.14	0.71
Mating success (%)	48	47	28	36	1,21	1.28	0.27
Activity	24.11	7.85	24.24	9.11	1,2	0.002	0.96
Frequency of agonistic encounters	4.79	4.95	5.81	6.78	1,2	0.29	0.59
Frequency of victories	2.37	3.47	5.33	1.00	1,2	0.22	0.64
ELO index	1007.00	124.57	990.94	116.42	1,2	2.19	0.14

Table 1 Mean values and results of models with experimental treatment as an explanatory variable (F-M interaction: interactions between males and females)

Competition for access to females

The results in HR overlapped by males and the frequency of agonistic encounters were similar to attractiveness results. The supplement had no effect either in these variables in both main effects models (Table 1) and covariates models (Tables 2 and 4). The frequency of agonistic encounters was explained by activity level and not by the experimental supplement neither size, and the proportion overlapped by males were explained by any of the variables used in our



models. Thus, the supplemented males did not suffer more competition pressure, in terms of HR overlapped by males and frequency of agonistic encounters, than the control males.

Dominance hierarchy

Our results showed that supplemented males were not the winners of more agonistic encounters (Tables 1), but were the more active males those that won a higher number of agonistic interactions (Table 2). The dominance hierarchy based on the matrix of victories in agonistic encounters appeared as certain linear ($h'=0.76$) but with very low steepness (proportion of interaction ratio=3.1) and a very low transitivity ($T_{tri}=0.3$). These values indicated that there was no direct competition (i.e. fights) among all the males and pointed to some kind of esteem of the rival fighting ability. The dominance index (ELO) was not explained by the treatment in the main factor model (Table 1) and neither in the covariates model (Table 2) This difference between variables that explained the victories, activity, and the ELO index, in covariates model, could mean that the dominance hierarchy at the end of the experiment was not related just to winning more agonistic encounters. Besides, the trajectories of ELO rating through the study showed a very unstable changing hierarchy at the beginning of the experiment and a stable hierarchy since the middle of the experiment until the end (Figure 3).

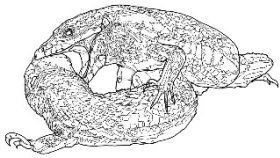
Model	df	Chisq	P-value	Predictors	df	Chisq	P-value
Activity ~ Supp. + Size	1,2	11.57	0.003	Size	1,2	11.57	0.0007
				Supplement	1,2	0.03	0.8
Frequency of agonistic encounters ~ Supp.+ Size + Act.	2,3	18.55	0.0003	Size	1	0.38	0.54
				Activity	1	21.27	<0.0001
				Supplement	1	0.001	0.97
Victories ~ Supp.+ Size + Act.	2,3	11.70	0.008	Size	1	0.33	0.57
				Activity	1	12.92	0.0003
				Supplement	1	0.25	0.62
ELO index ~ Supp.+ Size + Act.	2,3	3.89	0.27				

Table 2 Results of activity and social relationships among males models. Significant effects are marked in bold.



Model	df	F /Chisq	P	Predictors	df	F /Chisq	P
M-F interaction ~ Supp. + Size + Act. + HR + Victories	2,5	25.52	0.0001	Size	1	1.95	0.16
				Activity	1	5.11	0.024
				HR size	1	1.46	0.23
				Victories	1	10.14	0.001
				Supplement	1	0.10	0.75
M-F interaction ~ Supp. + Size + Act. + HR + ELO	2,5	13.12	0.02	Size	1	0.98	0.35
				Activity	1	8.92	0.003
				HR size	1	0.22	0.64
				ELO	1	0.57	0.45
				Supplement	1	0.01	0.92
Matings ~ Supp. + Size + Act. + HR + Victories	2,5	1.14	0.36				
Matings ~ Supp. + Size + Act. + HR + ELO	2,5	11.63	0.04	Size	1	0.66	0.42
				Activity	1	5.85	0.016
				HR size	1	0.25	0.62
				ELO	1	8.26	0.004
				Supplement	1	0.05	0.82
Mate attempts ~ Supp. + Size + Act. + HR + Victories	2,5	18.73	0.002	Size	1	4.17	0.041
				Activity	1	3.08	0.08
				HR size	1	0.18	0.67
				Victories	1	3.75	0.053
				Supplement	1	0.05	0.83
Mate attempts ~ Supp. + Size + Act. + HR + ELO	2,5	12.61	0.03	Size	1	4.36	0.04
				Activity	1	7.99	0.005
				HR size	1	0.16	0.69
				ELO	1	0.06	0.80
				Supplement	1	0.002	0.97
Mating success ~ Supp. + Size + Act. + HR + Victories	5,17	3.43	0.025	Size	1,17	10.14	0.005
				Activity	1,17	0.37	0.55
				HR size	1,17	0.27	0.61
				Victories	1,17	4.66	0.046
				Supplement	1,17	0.98	0.34
Mating success ~ Supp. + Size + Act. + HR + ELO	5,17	4.71	0.007	Size	1,17	7.50	0.014
				Activity	1,17	0.40	0.54
				HR size	1,17	0.0007	0.98
				ELO	1,17	8.71	0.009
				Supplement	1,17	2.16	0.16

Table 3 Results of social interactions among males and females models (HR size estimated with KDE 95). Significant effects are marked in bold



Model	df	F	P	Predictors	df	F	P
HR size (KDE95) ~ Supp.+ Size + Act. + Victories	4,35	4.26	0.006	Size	1,35	0.1	0.75
				Activity	1,35	0.25	0.62
				Victories	1,35	14.92	0.0005
HR size (KDE95) ~ Supp. + Size + Activity + ELO	4,30	2.9	0.04	Supplement	1,35	0.06	0.81
				Size	1,30	0.76	0.39
				Activity	1,30	0.37	0.55
				ELO	1,30	9.93	0.004
				Supplement	1,30	0.004	0.95
HR size (KDE50) ~ Supp. + Size + Act. + Victories	4,33	1.15	0.35				
HR size (KDE50) ~ Supp. + Size + Act. + ELO	4,28	0.68	0.61				
HR MM overlap (KDE95) ~ Supp. + Size + Act. + Victories	4,35	2.14	0.10				
HR MM overlap (KDE95) ~ Supp. + Size + Act. + ELO	4,30	2.06	0.11				
HR MM overlap (KDE50) ~ Supp. + Size + Act. + Victories	4,33	1.19	0.30				
HR MM overlap (KDE50) ~ Supp. + Size + Act. + ELO	4,28	1.34	0.28				
HR MF overlap (KDE95) ~ Supp. + Size + Act. + Victories	4,35	2.41	0.07				
HR MF overlap (KDE95) ~ Supp. + Size + Act. + ELO	4,30	1.61	0.20				
HR MF overlap (KDE50) ~ Supp. + Size + Act. + Victories	4,33	0.56	0.69				
HR MF overlap (KDE50) ~ Supp. + Size + Act. + ELO	4,28	0.70	0.60				

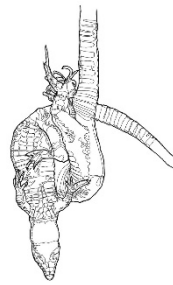
Table 4 Results of space use models. Significant effects are marked in bold

Discussion

The results showed that the supplement of vitamin D treatment did not affect to the males' activity. This is consistent with previous findings if we consider that low activity is related to an increase of shelter use (Horváth et al. 2016). We neither found a relationship of the treatment with HR size, while the models showed that HR size could be rather related to the victories in agonistic encounters and dominance. This could point to the existence of a defense of the territory by the dominant males.

Attractiveness

In terms of the proportion of HR overlapped by females, supplemented males appeared not to be more attractive to females, but neither were the dominant males. The use of space by females appeared not to be related to the presumably presence of scent marks of males. Basing on previous works, we proposed that being more attractive by producing more cholesta-5,7-dien-3-ol would have effects on the males' access to females by attracting more females to the areas scent marked (Martín and López 2012). However, neither the supplement nor the dominance did have effects on the proportions of the HR of a male overlapped by females. Since the habitat design in the enclosure was uniform, due to the equal group of rocks, we could suppose that the

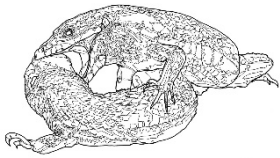


distribution was not caused by differences in the habitat. However, there might be differences between groups of rocks that were not appreciable to us. Either way, we cannot infer the cause of the female distribution, just assume that it was not due to supplemented males' attractiveness and neither to differences in habitat quality.

The results in mating behavior could support the previous conclusions about the attractiveness of the supplemented males. The number of matings and the mating success were not related to the experimental supplement but by the number of victories and the dominance. We also found a significant relationship of mating success with the number of victories and the dominance ranking, which had in account the relationship between the number of interactions with females and the successful copulations obtained. This could suggest that expelling other males to improve the mating success is a good strategy that, presumably, could only be achieved by the "best" males. This could indicate that a better access to females is achieved by those males that have the best fighting skills, including a larger body size, which, probably, render the male-male competition as the best way to access to females by these males.

Dominance and victories

Since in the main factor models the dominance and the number of victories were not related to vitamin D supplementation, but the covariates models explained that dominance and victories were related to the activity level and by body size, which had been reported as the main fighting skill in other lizards (Vitt and Cooper 1985; Anderson and Vitt 1990). However, the dominance index was not explained by the same variables as the frequency of victories, which could indicate that it was related to other reasons and not only by the fighting skills. Since the value of the dominance index was estimated at the end of the experiment and pondering the probability of winning or losing an agonistic encounter according to the prior fights, these differences could indicate the existence of a rival esteem between the males based on traits different than size. Previous works in *I. cyreni* have found that there exists individual recognition between conspecific males (Aragón et al. 2001b) and a esteem of the rival identity (López and Martín 2011) based on semiochemicals. The evolution of the Elo-rating score (Figure 2) shows a hierarchy that was conformed through the agonistic encounters, unstable at the beginning and stable at the end which could mean a esteem of the rival based on trial-and-error in agonistic encounters. While, if the rival assessment was directly linked with phenotypic traits, we might expect a more stable hierarchy since the beginning. Either way, the dominance hierarchy is independent of the treatment, besides the vitamin D could have improved the health of the treated males (van Etten et al. 2008) and then, probably, gave them more chances to climbing positions in the hierarchy.



Conclusions

Our results suggest that there was a sum of factors acting together and that matings would be mainly the result of male-male competition and not so much of female mate choice. In our experiment, it seems that the production of cholesta-5,7-dien-3-ol was not so determinant in mating success as was considered previously (Martín and López 2006b). When male-male competition is high, it seems to be determinant to mating success although the lack of significance in the HR overlap and the low value of transitivity in the hierarchy might indicate that the males did not establish true HRs during the experiment. High transitivity would have been expected in that case because the fights are more common between neighbors (Martín and Salvador 1997; Martín and López 2000).

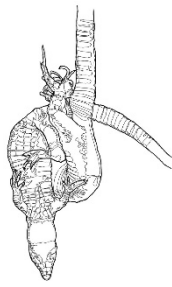
We suggest that male-male competition, through dominance and agonistic encounters, is an important process that could ensure the mating success of male *I. cyreni* in spite of female's mate choice. However, we cannot ensure that the actual reproductive success corresponds with the observed mating success because post-copulatory processes of selection could act in the females (Andersson and Simmons 2006). New experiments incorporating paternity analyses should be done to trace more accurately the actual female's choice.

Acknowledgments

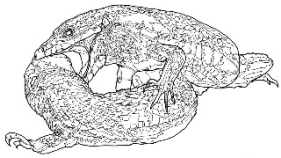
We thank "El Ventorrillo" MNCN Field Station for use of their facilities. Financial support was provided by the project MINECO CGL2014-53523-P. The experiments enforced all the present Spanish laws and were performed under license from the Environmental Organisms of Madrid Community where they were carried out.

References

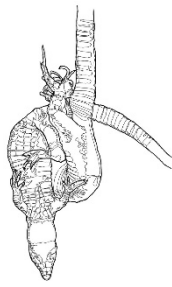
- Adams ES (1990) Boundary disputes in the territorial ant *Azteca trigona*: effects of asymmetries in colony size. *Animal Behaviour* 39:321-328
- Albers PCH, de Vries H (2001) Elo-rating as a tool in the sequential estimation of dominance strengths. *Animal Behaviour* 61:489-495
- Alberts AC (1992) Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates. *The American Naturalist* 139:S62-S89
- Anderson RA, Vitt LJ (1990) Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphism in teiid lizards. *Oecologia* 84:145-157
- Andersson M, Simmons LW (2006) Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution* 21:296-302



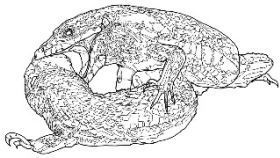
- Aragón P, López P, Martín J (2000) Size dependent chemosensory responses to familiar and unfamiliar conspecific faecal pellets by the Iberian Rock-Lizard, *Lacerta monticola*. *Ethology* 106
- Aragón P, López P, Martín J (2001a) Chemosensory discrimination of familiar and unfamiliar conspecifics by lizards: implications of field spatial relationships between males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:128-133
- Aragón P, López P, Martín J (2001b) Discrimination of femoral gland secretions from familiar and unfamiliar conspecifics by male Iberian rock-lizards, *Lacerta monticola*. *Journal of Herpetology* 35:346-350
- Aragón P, López P, Martín J (2001c) Seasonal changes in activity and spatial and social relationships of the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Canadian Journal of Zoology* 79:1965-1971
- Ayasse M, Paxton RJ, Tengö J (2001) Mating behavior and chemical communication in the order hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 46:31-78
- Baker MAA, Reeve N, Conkey AAT, Macdonald DW, Yamaguchi N (2017) Hedgehogs on the move: Testing the effects of land use change on home range size and movement patterns of free-ranging Ethiopian hedgehogs. *PLoS ONE* 12
- Bayly KL, Evans CS, Taylor A (2006) Measuring social structure: a comparison of eight dominance indices. *Behav Processes* 73:1-12
- Benadi G, Fichtel C, Kappeler P (2008) Intergroup relations and home range use in Verreaux's sifaka (*Propithecus verreauxi*). *American Journal of Primatology* 70:956-965
- Bernstein IS (1981) Dominance: The baby and the bathwater. *Behavioral and Brain Sciences* 4:419-429
- Brown JL (1963) Aggressiveness, dominance and social organization in the Steller Jay. *The Condor* 65:460-484
- Brown JL (1969) Territorial behavior and population regulation in birds: A review and re-evaluation. *The Wilson Bulletin* 81:293-329
- Brown JL (1975) *The evolution of behavior*. Norton, New York
- Calenge C (2006) The package "adehabitat" for the R software: A tool for the analysis of space and habitat use by animals. *Ecological Modelling* 197:516-519
- Calenge C (2015) Home range estimation in R: the adehabitatHR package
- De Vries H (1995) An improved test of linearity in dominance hierarchies containing unknown or tied relationships. *Anim Behav* 50:1375-1389
- Drews C (1993) The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125:283-313



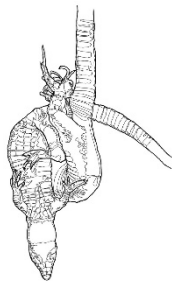
- Elvira B, Vigal CR (1985) Further data on the reproduction of *Lacerta monticola cyreni* (Sauria, Lacertidae) in Central Spain. *Amphibia-Reptilia* 6:173-180
- Endler JA (1983) Natural and sexual selection on color patterns in poeciliid fishes. *Environmental Biology of Fishes* 9:173-190
- Endler JA (1992) Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *The American Naturalist* 139:S125-S153
- Endler JA (1993) Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 340:215-225
- Endler JA, Basolo AL (1998) Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 13:415-420
- Enquist M, Leimar O (1983) Evolution of fighting behaviour: Decision rules and assessment of relative strength. *Journal of Theoretical Biology* 102:387-410
- Ferner JW (1974) Home-range size and overlap in *Sceloporus undulatus erythrocheilus* (Reptilia: Iguanidae). *Copeia* 1974:332-337
- Fuller RC, Houle D, Travis J (2005) Sensory bias as an explanation for the evolution of mate preferences. *The American Naturalist* 166:437-446
- Grafen A (1990) Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* 144:517-546
- Grether GF (2010) The evolution of mate preferences, sensory biases, and indicator traits. In: Brockmann HJ, Roper TJ, Naguib M, Wynne-Edwards KE, Mitani JC, Simmons LW (eds) *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press, pp 35-76
- Hauser MD (1999) Evolution of communication. In: Hauser MD, Konishi M (eds) *The design of animal communication*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp 451-459
- Horváth G, Martín J, López P, Garamszegi LZ, Herczeg G (2016) Food and vitamin D3 availability affects lizard personalities: an experiment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71
- Huntingford FA, Turner AK, Downie LM (1987) *Animal conflict*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL
- Jaeger RG (1981) Dear enemy recognition and the costs of aggression between salamanders. *The American Naturalist* 117:962-974
- Jaroensutasinee M, Jaroensutasinee K (2003) Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. *Behavioural Processes* 64:23-29
- Jennions MD, Petrie M (1997) Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews* 72:283-327



- Johnstone RA (1996) Multiple displays in animal communication: 'backup signals' and 'multiple messages'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 351:329-338
- Jordan NR, Mwanguhya F, Kyabulima S, Rüedi P, Cant MA (2010) Scent marking within and between groups of wild banded mongooses. *Journal of Zoology* 280:72-83
- Koch F, Signer J, Kappeler PM, Fichtel C (2016) The role of the residence-effect on the outcome of intergroup encounters in Verreaux's sifakas. *Scientific Reports* 6:28457
- Kotiaho JS (2001) Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biological Reviews* 76:365-376
- López P, Amo L, Martín J (2006) Reliable signaling by chemical cues of male traits and health state in male lizards, *Lacerta monticola*. *J Chem Ecol* 32:473-88
- López P, Aragón P, Martín J (1998) Iberian Rock Lizards (*Lacerta monticola cyreni*) assess conspecific information using composite signals from faecal pellets. *Ethology* 104:809-820
- López P, Martín J (2005) Chemical compounds from femoral gland secretions of male iberian rock lizards. *Zeitschrift für Naturforschung* 60:632-636
- López P, Martín J (2011) Male Iberian rock lizards may reduce the costs of fighting by scent matching of the resource holders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65:1891-1898
- López P, Martín M (2002) Locomotor capacity and dominance in male lizards *Lacerta monticola*: a trade-off between survival and reproductive success? *Biological Journal of the Linnean Society* 77:201-209
- López P, Muñoz A, Martín J (2002) Symmetry, male dominance and female mate preferences in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52:342-347
- Maher CR, Lott DF (1995) Definitions of territoriality used in the study of variation in vertebrate spacing systems. *Animal Behaviour* 49:1581-1597
- Martín J, López P (2000) Social status of male Iberian rock lizards (*Lacerta monticola*) influences their activity patterns during the mating season. *Canadian Journal of Zoology* 78:1105-1109
- Martín J, López P (2006a) Links between male quality, male chemical signals, and female mate choice in Iberian rock lizards. *Functional Ecology* 20:1087-1096
- Martín J, López P (2006b) Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards. *Proc Biol Sci* 273:2619-24
- Martín J, López P (2007) Scent may signal fighting ability in male Iberian rock lizards. *Biology Letters* 3:125-127



- Martín J, López P (2010) Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more oily scents are more attractive. *Chem Senses* 35:253-62
- Martín J, López P (2012) Supplementation of male pheromone on rock substrates attracts female rock lizards to the territories of males: a field experiment. *PLoS One* 7:e30108
- Martín J, López P (2015) Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of lizards. *Horm Behav* 68:14-24
- Martín J, Salvador A (1993) Tail loss reduces mating success in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behav Ecol Sociobiol* 32:185-189
- Martín J, Salvador A (1995) Microhabitat selection by the Iberian rock lizard *Lacerta monticola* Effects on density and spatial distribution of individuals. *Biological Conservation* 79:303-307
- Martín J, Salvador A (1997) Effects of tail loss on the time-budgets, movements, and spacing patterns of Iberian rock lizards, *Lacerta monticola*. *Herpetologica* 53:117-125
- Mateos C, Carranza J (1999) Effects of Male Dominance and Courtship Display on Female Choice in the Ring-Necked Pheasant. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45:235-244
- Mathis A, Simons RR (1994) Size-Dependent Responses of Resident Male Red-Backed Salamanders to Chemical Stimuli from Conspecifics. *Herpetologica* 50:335-344
- Mohr CO (1947) Table of Equivalent Populations of North American Small Mammals. *The American Midland Naturalist* 37:223-249
- Nilsen EB, Pedersen S, Linnell JDC (2008) Can minimum convex polygon home ranges be used to draw biologically meaningful conclusions? *Ecological Research* 23:635-639
- Pérez-Mellado V, Gil MJ, Guerrero F, Pollo CP, Rodríguez-Merino E, Marco A, Lizana M (1988) Uso del espacio y del tiempo en *Lacerta monticola* en la Sierra de Gredos. *Graellsia* 44:65-80
- Powell R (2000) Animal Home Ranges and Territories and Home Range Estimators. In: Boitani L, Fuller TK (eds) *Research Techniques in Animal Ecology Methods and Cases in Conservation Science*. Columbia University Press, New York, pp 64-110
- R Development Core Team (2017) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Reichert MS, Quinn JL (2017) Cognition in contests: mechanisms, ecology, and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 32:773-785
- Rose B (1982) Lizard home ranges: methodology and functions. *Journal of Herpetology* 16:253-269
- Ryan MJ (1990) Signals, species, and sexual selection. *American Scientist* 78:46-52



- Ryan MJ (1998) Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex differences. *Science* 281:1999-2003
- Ryan MJ, Rand AS (1993) Species evolution and sexual selection as unitary problem in animal communication. *Evolution* 47:647-657
- Salvador A, Diaz JA, Veiga JP, Bloor P, Brown RP (2007) Correlates of reproductive success in male lizards of the alpine species *Iberolacerta cyreni*. *Behavioral Ecology* 19:169-176
- Searcy WA, Andersson M (1986) Sexual selection and the evolution of song. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17:507-533
- Shizuka D, McDonald DB (2012) A social network perspective on measurements of dominance hierarchies. *Animal Behaviour* 83:925-934
- Shizuka D, McDonald DB (2014) A social network perspective on measurements of dominance hierarchies. *Animal Behaviour* 83:925-934
- Silverman B (1986) *Density Estimation For Statistics And Data Analysis*, vol Vol. 26. Chapman and Hall, London
- Smith SM (1978) The "Underworld" in a territorial sparrow: adaptive strategy for floaters. *The American Naturalist* 112:571-582
- Stamps JA, Krishnan VV (1994) Territory acquisition in lizards: II. Establishing social and spatial relationships. *Animal Behaviour* 47:1387-1400
- Stamps JA, Krishnan VV (1995) Territory acquisition in lizards: III. Competing for space. *Animal Behaviour* 49:679-693
- Stone PA, Baird TA (2002) Estimating lizard home range: the rose model revisited. *Journal of Herpetology* 36:427-436
- Tobias J, Seddon N (2000) Territoriality as a paternity guard in the European robin, *Erithacus rubecula*. *Animal Behaviour* 60:165-173
- van Etten E, Stoffels K, Gysemans C, Mathieu C, Overbergh L (2008) Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system. *Nutr Rev* 66:S125-34
- Vitt LJ, Cooper WE (1985) The evolution of sexual dimorphism in the skink *Eumeces laticeps*: an example of sexual selection. *Canadian Journal of Zoology* 63:995-1002
- White AJ, Rundle HD (2015) Territory defense as a condition-dependent component of male reproductive success in *Drosophila serrata*. *Evolution* 69:407-418
- Worton BJ (1989) Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies. *Ecology* 70:164-168



Supplemental material: ELO index

Elo Rating (Elo 1978): this dominance index uses the sequence and order of the agonistic encounters; Elo do not use a matrix of encounters to compute the dominance. Every individual starts the experiment with a predetermined and arbitrary score (e.g. 1000) and, after each interaction the score is updated. The winner increases their score and the loser decrease it. The number of points in the score wins or lost depends on the expected result from the prior interactions to that agonistic encounter

- If win the individual of the higher rank:

$$\text{New Winner rating} = \text{Old Winner rating} + (1 - p) \times K$$

$$\text{New Loser rating} = \text{Old Loser rating} - (1 - p) \times K$$

- If win the individual of the lower rank:

$$\text{New Winner rating} = \text{Old Winner rating} + p \times K$$

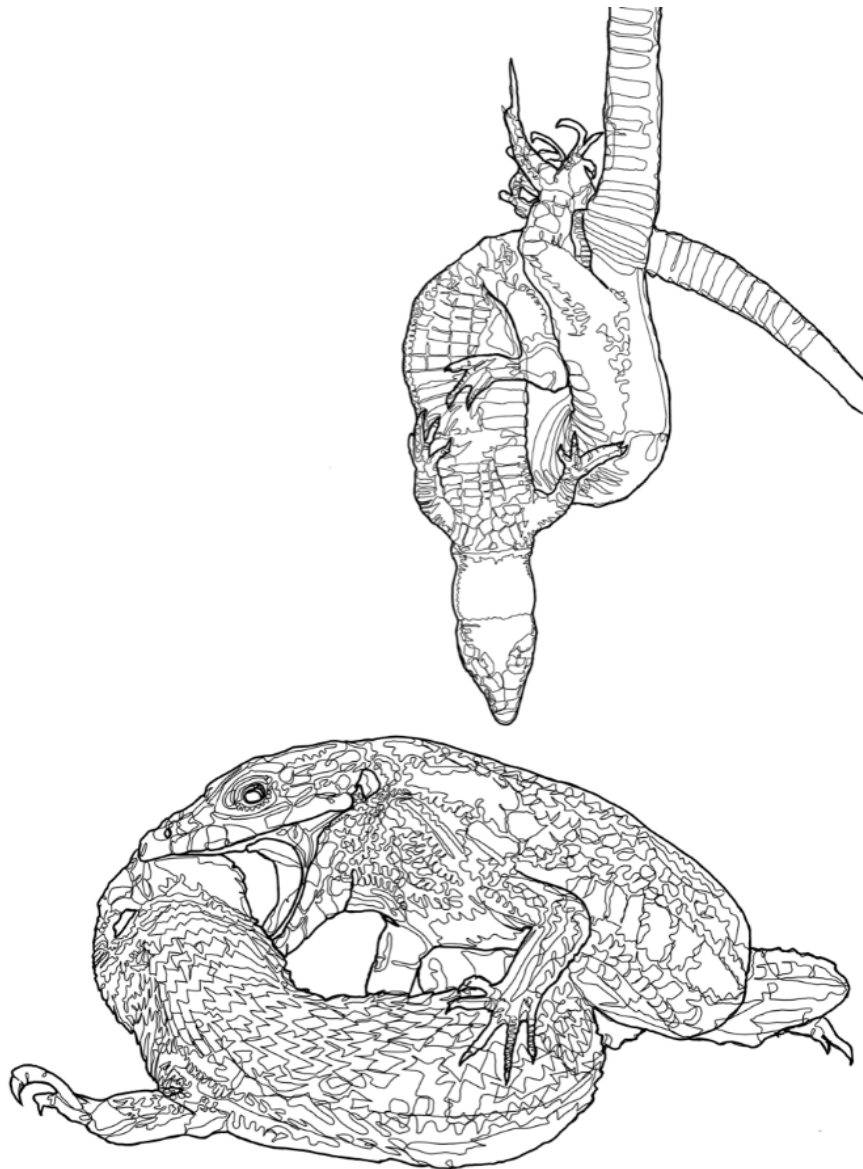
$$\text{New Loser rating} = \text{Old Loser rating} - p \times K$$

- P is the victory hope of an individual of higher Rank. It is a function of the absolute difference in the rating of the two individuals involved in the agonistic encounter before the interaction.
- K is a constant that determines the number of score points that an individual win or loss after the interaction. We used k=100

CAPÍTULO 4

Benef-Eat from what you smell. Looking for reproductive benefits of being pre-sensory biased in mate choice of female Carpetan rock lizards

Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Pilar López y José Martín



Benef-Eat from what you smell. Looking for reproductive benefits of being pre-sensory biased in mate choice of female Carpetan rock lizards

Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Pilar López y José Martín¹

¹ *Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain*

Abstract Female Carpetan rock-lizards (*Iberolacerta cyreni*) seem to assess the quality of males from their chemical signals (femoral secretions) used to scent mark their home ranges. Females would ensure to mate with high-quality males by selecting those areas marked by males with secretions that have a high proportion of two forms of provitamin D (cholesta-5,7-dien-3-ol and ergosterol). An alternative explanation might be that females were not choosing a mate, but that they had a pre-sensory bias to look for areas with greater availability of vitamin D in the food. Those males able to obtain enough food rich in vitamin D can increase the concentration of provitamin D in their secretions and might take advantage of this bias. We experimentally evaluated the possible benefits of a nutritional supplement of provitamin D and vitamin D in pregnant females for their laying and offspring. We measured the characteristics of the eggs and the hatchlings but we did not find great differences between treatments, except, in the lower body condition of the juveniles of mothers treated with provitamin. We also tested the interest of supplemented females by males' femoral secretions. The results showed that the chemosensory response of the females to males' scents was reduced when the amount of vitamin D exceeded their needs. This suggests that the potential bias to scents could be related to the females' physiological needs or hunger level when acting as signal receivers.

Keywords Sensory bias, Mate choice, Chemical signals, Honest signals, Lizards, Provitamin D₃, Vitamin D₃, Eggs, Tongue flick.

Introduction

Intraspecific communication within sexual and territorialism contexts is one of the most studied topics in behavioral ecology (i.e. García-Brull et al. 1993; McGregor 1993; Johansson and Jones 2007). Communicative signals are highly variable and use different mechanisms throughout the animal kingdom (Bradbury and Vehrencamp 2011). Signals such as colors, sounds or chemicals have been developed in many species and combined to send and to interpret messages between conspecifics. In many cases, signals are used by males to court and attract females to their home ranges to mate. Signals produced by males may constitute honest signals (Grafen 1990) that indicate to females the males' quality and help to decide which is the "best" male to mate.



Many researchers have asked about the origin and evolution of signaling in intersexual communication context and about why males' signals are attractive for females. Against the classical adaptive approach (Dawkins and Guilford 1996) mainly focused on honestly signaling male quality (Zahavi 1975), there have been suggested other theories centered in the origin of the sensorial reception of the signal (Ryan 1990; Endler 1992). The latter postulate that the receiver has a prior sensory bias by the stimulus that would code the signal posteriorly. These bias could be generated because the receptor had a previous sensory function not related with sexual communication but with the environment perception; and this perception might have been used by the sender to perform the message (Endler and Basolo 1998). Because there is no agreement about whether the sensory bias is exploited by the sender or if the receiver falls in a sensory trap, the 'Sensory bias hypothesis' has been proposed as a theoretical framework that assembles both approaches (Fuller et al. 2005).

In a mate-choice context, chemical signaling has, in many species, an important role to assess traits of potential mates such as quality (Moore 1988), reproductive or health state (Kavaliers and Colwell 1995), or even genetic compatibility (Penn 2002). Territorial scent-marks are often used to assess these male traits by conspecifics (Carazo et al. 2011) and to attract (Campos et al. 2017) or repel them (Byrne and Keogh 2007). The sensory bias hypothesis could explain the evolution of attractive sexual chemical signals; it might explain how one attractive stimulus, but not related to sexual functions but to other resources such as food, may become a sexual signal. If access to a resource is costly for the producer, then, the signal could become also an honest signal and act not only to attract but also to inform to the receiver. Empirical evidence of sensory bias for food-chemicals that are also found in sexual chemical signals of males has been found in several species. For example, in several moth species, females are attracted by males that impregnate their body with an "herbal essence" from plants that are usually taken as food by these moths (Krasnoff and Dussourd 1989; Löfstedt et al. 1989).

Lizards and snakes are animals that commonly use scents to assess the characteristics of their surrounding environment (i.e. Bull et al. 2001) by means of tongue-flicking behavior (Cooper and Burghardt 1990). Femoral gland secretions of male lizards are a waxy mixture composed of proteins and many lipophilic compounds characteristic of each species but highly variable between individuals (Alberts 1993; Martín and López 2014). The production of some of these compounds and its allocation to secretions is costly and, therefore, condition-dependent (Martín and López 2015). Frequently, females prefer the scent of males whose have raised large amounts of these costly compounds in their secretions. This is probably explained because these males are also those of high quality. Some evidence found in several lizard species could indicate the



existence of a pre-existing sensory bias for chemicals from food items and that are also found in males' scents (Martín and López 2006b, 2008; Kopena et al. 2011). In these animals, although courtship has less importance in mate-choice, scent and territorial marks may also shape a key factor in female mate choice (Calsbeek and Sinervo 2002). But this relationship between food and male scent chemicals might also allow females to use males' scent marks as a source of public information (Valone 1989) about the habitat quality, as it has been reported in the timber rattlesnake *Crotalus horridus* (Clark 2007). From this point of view, this sensory bias could be pre-existing and be just the origin of the current signal or, actually, it could be a current resource of males to attract females to their home ranges and copulate with them.

For example, females of the Carpetan rock lizard, *Iberolacerta cyreni*, modify their home ranges during the breeding season by moving towards areas scent-marked by high-quality males (Martín and López 2012). Females seem able to assess the quality of males from their femoral secretions deposited on scent marks, choosing those areas marked by males that, for example, are heavier (López et al. 2003), more symmetrical (Martín and López 2000; López et al. 2002) or that have a higher immune response (López et al. 2006). This quality of males appears to be reflected in femoral secretions composition, and, thus, the signal-production is condition-dependent (Martín and López 2015). For example, high proportions of oleic acid appear in secretions of males with higher body condition (Martín and López 2010) and low levels of fluctuating asymmetry (López et al. 2006), or high proportion of ergosterol (Provitamin D₂) appears in secretions of males with higher immune responses (Martín and López 2010, 2012). Therefore, this female's attraction might have a purely sexual component, but it has also been suggested that the origin of the current attraction of females to these compounds may be due to a pre-existing sensory bias related to food stimuli and that natural selection would have favored their evolution towards sexual signals (Martín and López 2008).

The first approach to this hypothesis in *I. cyreni* lizards showed that hungry females responded more strongly than satiated females to the chemical stimuli of provitamin D₃ alone and also to scent marks of males, which also contain this chemical (Martín and López 2008). These results suggest that the attraction of females to these chemical cues may be related to food needs, which could be considered as evidence to support the sensory bias hypothesis.

Cholesta-5,7-dien-3-ol (Provitamin D₃), along with ergosterol, seem two of the key lipids implicated in male selection in *I. cyreni* and other lacertid lizards such as *Podarcis guadarramae* (López and Martín 2005). These lipids attract females according to their proportions in scent marks of males (Martín and López 2006a, b, 2012). Cholesta-5,7-dien-3-ol is also found in the skin, where



it is transformed by sun UV-B irradiation to Vitamin D₃ (Fraser 1995; Holick 1995). This vitamin is an essential compound in the metabolism of lizards and many other vertebrates (Allen et al. 1999; Laing and Fraser 1999). For example, vitamin D₃ is involved in calcium mobilization, acts as a modulator of innate immunity, participates in cellular differentiation or stimulates the insulin secretion among other physiological functions (Holick 2008). There is a relationship between Provitamin D₃ proportions in femoral secretions and vitamin D₃ availability in the body of male *I. cyreni* lizards; thus, when the needs of dietary vitamin D are overtaken, males can increase the amount of provitamin D₃ allocated to secretions (Martín and López 2006b, 2015). Indeed, that these males become more attractive to females appears an evidence of the relation cost-benefit of allocating provitamin D₃, and other costly molecules, to femoral gland secretions. In this sense, chemosignals may act as honest signals showing consistency between costs and individual condition (Martín and López 2015). Females could use the quality of scent marks of males to consider associating with areas inhabited by males of high quality (Martín and López 2012) and, thus, enhance the probabilities to mate with them.

However, since the mating system of *I. cyreni* is polygynandrous (Salvador et al. 2007), and females prefer areas with a high density of males (Martín and López 2013), another alternative explanation is that females chose a given area because of the quality of that area and not because of the quality of the males that live there. This could be explained if the areas chosen by high-quality males are habitats of good quality, with enough dietary resources to support a very high density of lizards. One of these resources could be the access to vitamin D₃, either from the diet, because the habitat should be rich in prey with a high content of vitamin D₃ or its precursors; but also because the habitat has a high availability of good basking sites to combine thermoregulation activity with sun-synthesis of vitamin D₃.

In addition to the metabolic roles of vitamin D (Henry 2011), the access to vitamin D₃ could be especially important for gravid females. This is because, acting as a hormone (Norman 2008), vitamin D₃ is involved in multiple processes very important to gestation, since calcium absorption in the intestine (Holick 2007) to calcium accumulation in the yolk (Stewart and Ecaj 2010). Vitamin D₃ deficiency would probably lead to a calcium deficit, or an inability to use calcium within the body. Calcium has functions such as blood clotting, maintenance of pressure, intervenes in cellular communication, brain functions and muscle contraction (Cline 2012). In chicken embryos, a deficit of vitamin D₃ lead to thin and soft-shelled eggs and, in the embryo, hypocalcemia and/or hypophosphatemia, all of which probably explain a decrease in the percentage of births (Narbaitz and Tsang 1989). Therefore, we could expect that availability of vitamin D₃ could also be a relevant factor for gravid female lizards. It is likely that females need more vitamin D for an optimal



reproduction or for the optimal growth of the offspring; and, because of that, they prefer substrates scent marked with higher quantities of provitamin D₃. This alternative hypothesis to the simple sexual interest for male signals fits with the sensory bias hypothesis, considering that males could be exploiting the metabolic needs of vitamin D₃ of females to attract them.

Here, we made the first approach to test the hypothesis that females could use male scent marks not only as sexual signals but also as a source of environmental information related to food resources. Following the sensory bias hypothesis, we looked for benefits of getting a great access to vitamin D. By addressing the functions of vitamin and calcium in pregnant female lizard body, we mainly looked for potential benefits in three aspects relative to 1) condition and nutritional status of females, 2) the characteristics of their clutches and, finally, 3) the condition and growth rate of their offspring. To test this, we designed an experiment providing in the diet supplementary provitamin D₃ or vitamin D₃ to gravid female lizards *I. cyreni*. Females supplemented with vitamin D₃ would have unlimited and direct access to vitamin D₃, while those supplemented with provitamin D₃ would need to spend some time basking under the sun if they want to transform the dietary provitamin in the active form of vitamin D₃. However, from a physiological point of view, both provitamin D₃ and vitamin D₃ do not have different functions, so we could expect a similar effect in females, eggs, and offspring. Besides, we measured the interest of supplemented females in femoral secretions of males by means a tongue-flick bioassay (Cooper and Burghardt 1990) to detect possible a relationship between the needs of vitamin D₃ and the female's interest in male's scents. This allowed us to go deeper into the sensory bias theory and to test if it could be a valid explanation for female preferences using *I. cyreni* as a species model.

In this paper, we look for evidence of benefits to gravid females, their eggs and their offspring development of having more access to provitamin D₃ and vitamin D₃ during the pregnancy period. We expected that having more vitamin D available will be better for the health of females and their offspring. We hypothesized that body condition of females after laying the eggs would be better in supplemented females. Another potential effect of vitamin supplementation is the action over the characteristics of the clutch. We expected that supplemented females would have bigger and heavier eggs due to the nutritional supplement. Previous studies have found a direct correlation between the egg size and the incubation time (Sinervo 1990), so we predicted a longer incubation time for clutches from supplemented females. The quantity of vitamin D available could stimulate calcium mobilization to the egg shell formation by uterine epithelium (Simkiss 1991; Stinnett et al. 2012), and the use of that calcium by the embryo at the end of incubation (Packard and Packard 1984; Tuan and Ono 1986; Stewart et al. 2009). Thus, we predicted that egg shells of supplemented females would have higher calcium



content being thicker and heavier than those of control females and, probably, this extra-availability of calcium might have an indirect effect increasing hatching rate. Juveniles from supplemented mothers would have bigger reserves of vitamin D inside their eggs, and for this reason, we expected juveniles born from supplemented females to be bigger, have a better condition and higher growth rates than juveniles from control females. About females' responses to chemical cues, we predicted a lower chemosensory response of supplemented females to the males' secretions than the controls because their needs of vitamin D would be covered. We based this prediction on previous studies showing that hungry females have stronger responses than satiated ones (Martín and López 2008).

Material and methods

Study animals

We collected thirty-seven live gravid female Iberian rock lizards (*Iberolacerta cyreni*) by noosing during June 2016 in a 3 km² area around “Puerto de Navacerrada” over 1800 m asl. (Guadarrama Mountains, Central Spain). Lizards were transported to El Ventorrillo field station, 5 km from the capture site, and housed in outdoor individual plastic boxes (60x40x44 cm, length x width x high) until females laid the clutch. The terraria contained coconut fiber as a substrate, a brick for shelter and water *ad libitum*. We daily fed lizards crickets (*Achaeta domestica*) and mealworms (*Tenebrio molitor*) dusted with calcium powder every two days.

Experimental supplementation of the females' diet

We assigned randomly each female to each of three experimental treatments: “Provitamin D” (n=13), “Vitamin D” (n=13) and “Control” (n=12). Each female was subjected to a daily supplementation until they laid the eggs (mean \pm SE= 21 \pm 1 days). Females in the Provitamin treatment and Vitamin treatment were, respectively, daily fed 0.20 μ g of Provitamin D₃ (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) or 0.20 μ g (= 8IU) of Vitamin D₃ (MYPROTEIN, The Hut.com Ltd., UK), both dissolved in 0.25 ml of sunflower oil. Females in the control treatment were fed 0.25 ml of sunflower oil alone, which has not vitamin D content. To ensure that all the lizards ingested the same amount of the supplement solution, we gently handled females and used sterile plastic syringes with a cannula to deliver the oil into their mouth.

Characteristics of the clutch and the juveniles

Every day we inspected females to detect changes in their body shape that could indicate that they had laid eggs. Then, we gently looked for eggs buried in the coconut fiber substrate of



the terraria. After the clutch, the eggs were removed from the female terrarium, measured (see below) and individually located in plastic containers (170 mL) filled with moistened perlite (1:1 proportion of water and perlite) and covered with a lid to keep the humidity. These containers with eggs were maintained in an incubator (FRIOCELL FC-B2V-M/FC404) at 27.5° C until the hatch. Females were released at their original sites of capture after laying the eggs.

Each egg (n=156) was weighed using a digital scale (to the nearest 0.001g). Egg length and width were measured with a digital caliper (to the nearest 0.01 mm). These measurements were used to calculate an ellipsoid as an estimation of egg volume ($V=(4/3)\pi\alpha b^2$, being α and b the half of width and length of the egg respectively Mayhew 1963).

To estimate whether the provitamin and vitamin treatments had any effect in females and in their reproductive parameters, we recorded other potentially relevant variables such as body mass and body condition of the female after the clutch, clutch size, relative clutch mass (calculated as the ratio between the fresh clutch mass and the female mass after she laid the eggs; (Brana et al. 1991)), hatching success, incubation period (number of days between laying the clutch and hatching), and hatching duration within each litter (i.e. number of days between hatching of the first and the last egg) as an indicator of synchrony; Marco and Díaz-Paniagua 2008). Once the juveniles hatched (n=113), we measured the dry mass of the egg shell using a digital scale (to the nearest 0.001 g) and the thickness of the egg shell with a spessimeter (to the nearest 0.01mm).

At birth, we measured snout-vent length (SVL) and tail length (TL) of juveniles with a digital caliper (to the nearest 0.01 mm), and body mass with a digital scale (to the nearest 0.001 g). To estimate body condition, we used the regression residuals of log-transformed body mass and SVL values. We also estimated growth rate until two weeks after the birth by using the formula $\ln[(\text{final mass}/\text{birth mass})/(\text{age in days})]$ (Iraeta et al. 2006). Newborns lizards were released at the sites of the capture of their respective mothers when these measures were done.

Female responses to chemical cues of males

To assess whether females supplemented with Provitamin or Vitamin D changed their chemosensory responses to femoral secretions of males, we used the Tongue-flick (TF) rate, which is a common bioassay of chemical detection in reptiles (Cooper and Burghardt 1990; Cooper 1994). We compared the number of TFs elicited by female lizards in response to stimuli arising from cotton applicators bearing (i) dichloromethane (DCM) (Sigma-Aldrich Chromasol V plus for HPLC, purity >99.9%) as a control, or (ii) a mixture of femoral gland secretions of 20 *I. cyreni* males that were being used in another experiment. We collected the secretions in a 2 ml glass vial that was closed with a Teflon-lined stopper and kept in the freezer (-20°C) until the test. One hour



before starting the assay, the vial with the secretion was thawed at room temperature and refilled with DCM to dissolve the secretions (Khannoon et al. 2010). We prepared stimuli by dipping the cotton swab attached to a long stick (50 cm) inside the corresponding glass vial. Control vials contained only DCM, while secretion vials contained the same volume of DCM with the femoral secretions dissolved. A new swab was used in each trial. To begin a trial, one of the experimenters slowly approached a lizard's cage and carefully moved the cotton swab to a position 2 cm anterior to the lizard's snout. Lizards usually allowed the approach of the swab and the test without fleeing. We recorded latency to the first TF and, since that time, the number of TFs directed to the swab for 60 seconds. Trials were conducted in outdoor conditions, on 20th July, at the end of the experimental supplementation period of females, between 11.00 and 13.00 h (GMT), when lizards were fully active. Every female was exposed to both stimuli, secretion and DCM, and the order of presentation was alternated between them. We let to spent one hour and a half between the first exposition to one stimulus and the second exposition to the other stimuli to allow females to rest and to avoid habituation.

Data analyses

To analyze morphological variables of eggs and juveniles we used Mixed Models with the experimental treatment as a fixed factor and the identity of the mother as a random factor, using the lme4 package (Bates et al. 2015) from R (R Core Team, 2013). Response variables were log-transformed to ensure normal distributions except for count or binomial data where Poisson or Binomial distributions were fixed. Some covariates such as treatment duration or incubation time were included in the models when needed. The best models were chosen following the protocol of Zuur et al. (2009) from a beyond optimal model and based on the Akaike Information Criteria (AIC). In order to evaluate the significance of the models, we compared them with the null models using the Likelihood Ratio Test (lmtest R-package v0.9-36; Zeileis and Hothorn 2002) and only if the model was significant, the parameters for each descriptor variable were computed. Fixed effects significance was tested using ANOVA, and Tukey tests for pairwise comparisons. In those cases, in which canonical assumptions could have been violated, a parametric bootstrap approach was performed and the confidence interval computed to ensure significance. The proportion of variance explained by the effects in each model was calculated using marginal and conditional R^2 (MuMIn R-package; Barton 2018). Variables related to mothers and reproductive biology were analyzed with linear models or generalized models. The model with the lowest AIC was chosen, its explanatory power was evaluated with R^2 and its significance with an F test. In case of statistical significance in the treatment, Tukey's tests were used for pairwise comparisons.



For the chemosensory tests, the experiment design was not orthogonal but of repeated measures. Thus, differences in the number of TFs elicited between treatments were tested using a Repeated Measures Mixed Model (Wang and Goonewardene 2004) with treatment and stimuli as fixed factors and female identity as a random factor. To ensure normality, data were log-transformed.

Results

Reproductive biology and morphometric measures

Relative clutch mass differed significantly among experimental groups (Table 1) being of relatively lesser weight those clutches from the provitamin group (Tukey test: control vs. provitamin: $P=0.027$; control vs. vitamin: $P=0.52$; provitamin vs. vitamin: $P=0.17$) (Fig. 2). We did not find any significant differences among treatments in hatching duration and other mother-related variables such as clutch size, body condition after clutch and clutch hatching success; neither female body mass after laying the clutch, which appeared to be rather explained by the covariate clutch size (Table 1).

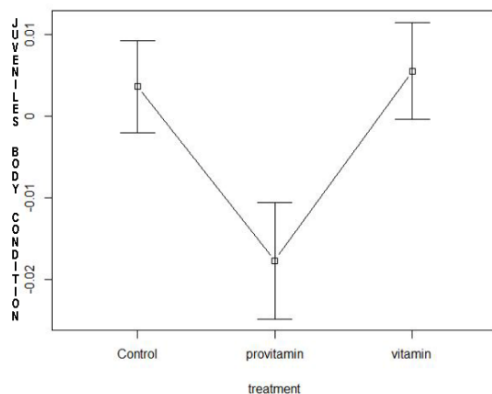


Figure 1 Body condition of juveniles

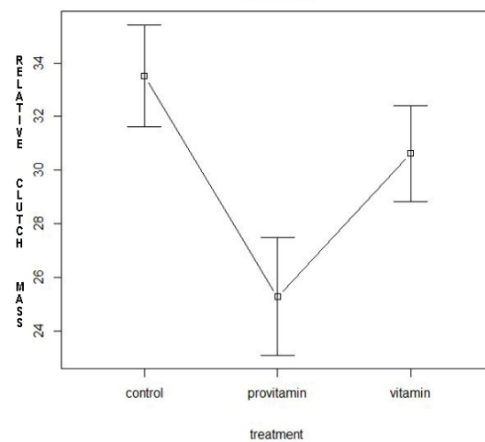
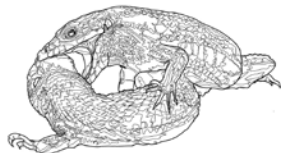


Figure 2 Relative clutch mass

We did not find any significant effect of treatment on morphology of eggs and juveniles (Table 2) but for body condition of juveniles, which was significantly affected by the treatment (Table 2) having worst condition the juveniles born from females in the provitamin group (Tukey test: control vs. provitamin: $P=0.056$; control vs. vitamin: $P=0.97$; provitamin vs. vitamin: $P=0.033$) (Fig.1). Hatching success ($\chi^2=5.33$ $df=2$, $P=0.07$) and juveniles' survivorship ($\chi^2=2.56$, $df=2$, $P=0.28$) did not differ among treatments. As we included in the models other potential relevant covariates,



some of them explained quite a high proportion of the variance. Covariates such as clutch size, incubation time and mother traits like snout-vent length or body mass appeared to be important because their contributions to some models were significant (Tables 1 and 2).

Model LRT Test				Predictors F test			
Response	df	Chisq	P-value	Predictors	df	F.value	P-value
Egg weight	5,2	0.48	0.79				
				Mother mass	1,18.4	0.65	0.43
				Treatment days	1,22.8	1.18	0.29
Egg length	12,7	25,12	0.0007	Clutch size	1,15.6	2.88	0.11
				Mother mass*Clutch size	1,22.5	5.31	0.031
				T. days*Clutch size	1,7.61	6.33	0.037
				Treatment	2,22.45	0.18	0.84
Egg width	7,2	8.82	0.012	Treatment	2,7.07	3.00	0.11
Egg volume	8,5	6.83	0.23				
Egg Shell thickness	7,4	5,22	0.027				
				Treatment days	1,18	2.98	0.101
Egg Shell dry mass	7,4	0.90	0.042	Egg mass	1,25	7.58	0.011
				Treatment	2,18.8	0.06	0.94
				Treatment days	1,20.3	0.16	0.69
				Mother SVL	1,22.8	0.24	0.63
Incubation time	10,7	14.51	0.043	Egg mass	1,71.3	0.0001	0.99
				T. days*Egg mass	1,47	0.13	0.72
				Mother SVL* Egg mass	1,46.9	6.99	0.011
				Treatment	2,19.5	1.43	0.26
				Mother mass	1,21.5	4.71	0.041
Snout-vent length	7,4	15.74	0.0034	Incubation time	1,102	6.96	0.009
				Treatment	2,23.1	2.30	0.12
Tail length	5,2	0.74	0.69				
Body mass	5,2	0.30	0.86				
				Mother SVL	1,19.2	7.49	0.013
Body condition	8,5	19.13	0.0018	Incubation time	1,101	6.39	0.013
				Mother SVL*Incub, Time	1,98.7	3.12	0.080
				Treatment	2,20.7	2.85	0.081
Growth rate	5,2	4.73	0.094				

Table 1 Results of statistical analysis of egg and juveniles traits. All Linear Mixed Models with mother as a random factor



Response	Model F Test			Predictors	F test		
	df	F.value	P-value		df	F.value	P-value
				Clutch size	1,17	10.01	0.006
Body mass after clutch	5,17	2.99	0.040	Treatment	2,17	2.67	0.098
				Clutch Size*Treat.	2,17	1.65	0.222
Body condition after clutch	2,20	0.27	0.77				
Clutch size	2,22	0.32	0.73				
Relative clutch mass	4,20	4.04	0.034	Treatment	2,20	4.04	0.034
Hatching duration	2,22	1.90	0.18				
Clutch hatching success	2,20	1.89	0.18				

Table 2 Results of statistical analysis of reproductive biology and female's state. All with F test for LM except Clutch size and Hatching duration that were analyzed with Wald test to GLM

Responses to chemical cues

We did not find any significant difference in latency to the first TF (F test to Repeated Measures Linear Mixed Model: $F_{6,36.8}=0.97$, $P=0.17$). Thus, females started tongue-flicking at similar times independently of the type of stimulus and the type of dietary supplementation that had received.

However, we found significant differences in TFs directed to the stimuli (F test to Repeated Measures Linear Mixed Model: $F_{5,36.2}=0.97$, $P=0.011$). Significance was found in the treatment factor and its interaction with the stimuli (treatment: $F_{2,25}=4.87$, $P=0.016$; stimuli: $F_{1,25}=0.39$, $P=0.54$; treatment x stimuli: $F_{2,25}=4.11$, $P=0.029$). Pairwise tests revealed that the total number of TFs elicited by the control group to both treatments was higher than in the other experimental groups (control vs. provitamin: $P=0.013$; control vs. vitamin: $P=0.05$; provitamin vs. vitamin: $P=0.81$) (Fig.3). Despite the significant interaction between treatment and stimuli, *post-hoc* comparisons between stimuli inside the treatment revealed no significant differences in each treatment (control DCM vs. secretion: $P=0.67$; vitamin DCM vs. secretion: $P=1.00$; provitamin DCM vs. secretion: $P=0.17$).

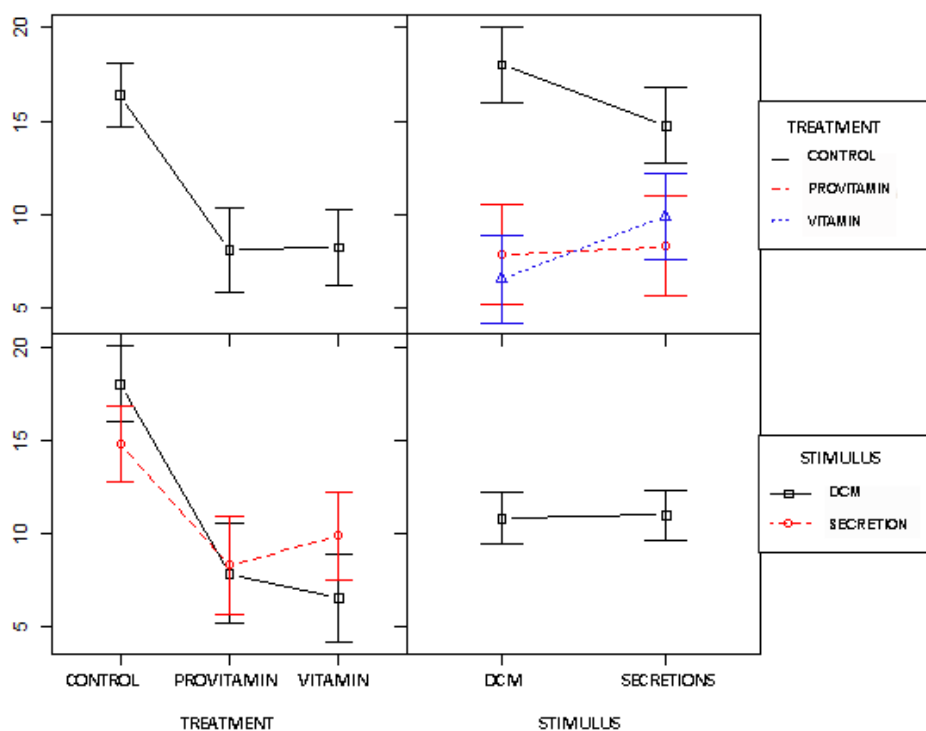


Figure 3 Number of tongue flicks in response to dichloromethane (DCM) as control and male's femoral secretion as stimuli

Discussion:

Overall, our results suggest that there are no benefits from the vitamin D supplement treatment for pregnant females. The lack of significant differences in body condition of mothers after laying the eggs suggests that vitamin D has no effect on mothers' health. In other lizards, it has been shown a clear relationship between egg size and clutch size and incubation time (Sinervo 1990; Sinervo and Licht 1991). As we expected bigger eggs in supplemented females, we compared clutch size and incubation time too, but no significant differences were found. Provitamin D₃ and vitamin D₃ do not seem to participate in the determination of egg shape nor egg size. We just found significant differences in relative clutch mass (RCM), which was lower in the provitamin group. The lack of differences in the other egg variables and maternal body condition does not allow us to speak about differences in maternal investment. We do not know the cause of lower RCM, neither if it implies some kind of disadvantage, nor the relationships with other physiological aspects. New studies should be done to explore the consequences of having a diet "too rich" in provitamin D₃ and the benefit or harmful effects produced because of it.



Due to the vitamin D function in calcium mobilization and egg shell formation, we studied its potential repercussion on egg shell thickness and dry weight but the characteristics of the egg shell were similar across the treatments. If there had been effects on egg shell shape, we would expect correlated effects on hatching rate but the absence of significance was patent too here.

Offspring of the vitamin D group were expected to be bigger, with better body condition and faster growth rates than the controls, but there were no differences between these two groups. However, offspring from mothers in the provitamin treatment had lower body condition than juveniles born from control and vitamin females. Although we cannot show any kind of relationship between the lower RCM and the lower body condition of juveniles, this variable seems to show that too much provitamin D₃ could be disadvantageous. Despite their lower body condition, juveniles from the provitamin D group had similar growth rates than control and vitamin ones. Therefore, growth does not seem to be affected by body condition and energetic reserves. However, new experiments should be made to go deeper into the knowledge about the role of provitamin D₃ in the energy storage in the eggs, the embryos and the juveniles.

Given these results, none of our predictions were correct. Vitamin D does not appear to be a very important resource that requires a supplementary access. On the contrary, it seems that it could be damaging in a certain manner. We could suppose that vitamin D needs of the control females were already naturally covered and because of that, a supplementary contribution was unnecessary and the predicted effects did not appear. The absence of chemosensory responses to the males' secretions by the females could support this idea. Based on previous studies where hungry females responded with higher intensity to males' scents than satiated females (Martín and López 2008), we expected lower responses of supplemented females. Nevertheless, similar responses to male secretion were elicited by all females. However, it was noted a significant difference in the total number of TFs elicited to both stimuli; being lower in supplemented females than in the control females. This could suggest that the exploratory behavior is lower when vitamin D₃ needs are satisfied. The lack of interest in male's scent could be interpreted in the same way of the absence of needs but, it would be also explained because the assay was performed out of the mating season when sexual signals might have no interest for the already pregnant females.

Our results in the chemosensory tests are consistent with previous studies that related hunger with intensity in the response to the scent of male, food and provitamin D₃ (Martín and López 2008). Maybe, the response is dependent on provitamin-vitamin needs or hunger level and, if that is the case, it might explain that *I. cyreni* females prefer those areas marked by males which have higher proportions of provitamin D₃ in their secretions.



The sensory bias hypothesis argues that males could exploit females' requirements or preferences to attract them (Fuller et al. 2005). Males may produce signals attractive to females because, in their origin, that stimuli-signal would have been important to females as, for example, dietary resources (Endler and Basolo 1998). In *I. cyreni*, males supplemented with vitamin D can allocate more provitamin D in their secretions and are preferred by females (Martín and López 2006b). This has been interpreted as an honest signal (Grafen 1990; Kotiaho 2001) because only males of high quality could produce secretions with high proportions of provitamin D (Martín and López 2006b). But, considering the higher response of hunger females to male secretions, it had been suggested that the origin of the signal in this species may be a preexisting sensory bias (Martín and López 2008). That female could set their home ranges according to scent marks left by males of high-quality support this idea (Martín and López 2000; López et al. 2003; Martín and López 2008, 2012). We proposed here that it would be possible that females were not only searching for males but also, or mainly, for food. If this was the case, females would be using scent marks of males as sources of information about the environment. Then, females should benefit from both getting information about resources available and of copulating with high-quality males.

This experiment cannot provide evidence about the signals use of females in the field, but the results suggest that the response to male's secretions could be dependent on the needs of vitamin D; taking on account that supplemented females, whose needs in vitamin D were probably surplus, elicited lower tongue flicks. In addition, we did not find benefits of having an extra access to vitamin D. We assumed a natural deficit of vitamin D represented by control females but, probably, in nature is easy to get enough vitamin D under normal or optimal environmental conditions. Vitamin D might be usually available in enough amounts in the environment and, contrary to our first thinking, it might not be usual that females had a certain deficit of this resource. New studies should be developed to know the actual needs of vitamin D in gravid females.

However, our findings do not discard a pre-existing sensory bias as the origin of the sexual signal. We cannot either ensure that the signal is, current, just sexual and discard a food-bias, considering the results of the previous works. A relevant suggestion that we could extract from our results is that, if the food is enough and the needs of vitamin D are covered, the male signal might be ignored by females. This could mean that the signal might be only effective when the receptor of the signal is able to receive it; being this capability dependent on the physiological utility or need of the chemical at the moment of sending the message. In fact, this could be the reason for the lack of response in tongue flick tests, because the assay was done in July, while the



mating season occurs in May. Maybe the needs of vitamin D are higher during the mating season since just a few weeks of activity had passed after winter (Pérez-Mellado 1982) and the sun synthesis could be difficult.

We conclude that these results allow considering the signal coded by provitamin D₃ just a sexual signal. Despite this, new experiments must be developed to deeper in the knowledge about the origin of the signal and the relationship between receiver-female needs and the potential production of the chemical by producer-males. The question about the pre-existing sensory bias of the females and the exploitation strategy of the males still remains unresolved.

Acknowledgments

We thank "El Ventorrillo" MNCN Field Station for use of their facilities. Financial support was provided by the project MINECO CGL2014-53523-P. The experiments enforced all the present Spanish laws and were performed under license from the Environmental Organisms of Madrid Community where they were carried out.

References

- Alberts AC (1993) Chemical and behaviour studies of femoral gland secretions in iguanid lizards. *Brain Behav Evol* 41:255-260
- Allen ME, Chen TC, Holick MF, Merkel E (1999) Evaluation of vitamin D status in the Green Iguana (*Iguana iguana*): oral administration vs UVB exposure. In: Holick MF, Jung EG (eds) *Biologic Effects of Light 1998: Proceedings of a Symposium Basel, Switzerland November 1–3, 1998*. Springer US, Boston, MA, pp 99-101
- Barton K (2018) MuMIn: Multi-Model Inference. R. Package 1.40.4. In, <https://cran.r-project.org/package=MuMIn>
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67
- Bradbury JW, Vehrencamp SL (2011) *Principles of animal communication*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Bull M, Griffin C, Bonnett M, Gardner M, Cooper S (2001) Discrimination between related and unrelated individuals in the Australian lizard *Egernia striolata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:173-179
- Byrne PG, Keogh JS (2007) Terrestrial toadlets use chemosignals to recognize conspecifics, locate mates and strategically adjust calling behaviour. *Animal Behaviour* 74:1155-1162
- Calsbeek R, Sinervo B (2002) Uncoupling direct and indirect components of female choice in the wild. *PNAS* 99:14897-14902



- Campos SM, Strauss C, Martins EP (2017) In space and time: territorial animals are attracted to conspecific chemical cues. *Ethology* 123:136-144
- Carazo P, Font E, Desfilis E (2011) The role of scent marks in female choice of territories and refuges in a lizard (*Podarcis hispanica*). *J Comp Psychol* 125:362-5
- Clark RW (2007) Public information for solitary foragers: timber rattlesnakes use conspecific chemical cues to select ambush sites. *Behavioral Ecology* 18:487-490
- Cline J (2012) Calcium and vitamin D metabolism, deficiency, and excess. *Top Companion Anim Med* 27:159-64
- Cooper WE, Burghardt GM (1990) A comparative analysis of scoring methods for chemical discrimination of prey by squamate reptiles. *Journal of Chemical Ecology* 16:45-65
- Dawkins MS, Guilford T (1996) Sensory bias and the adaptiveness of female choice. *The American Naturalist* 148:937-942
- Endler JA (1992) Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *The American Naturalist* 139:S125-S153
- Endler JA, Basolo AL (1998) Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 13:415-420
- Fraser DR (1995) Vitamin D. *The Lancet* 345:104-107
- Fuller RC, Houle D, Travis J (2005) Sensory bias as an explanation for the evolution of mate preferences. *The American Naturalist* 166:437-446
- García-Brull PD, Núñez J, Núñez A (1993) The effect of scents on the territorial and aggressive behaviour of laboratory rats. *Behavioral Processes* 29:25-36
- Grafen A (1990) Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* 144:517-546
- Henry HL (2011) Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:531-41
- Holick MF (1995) Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61:638S-645S
- Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* 357:266-281
- Holick MF (2008) Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 66:S182-94
- Iraeta P, Monasterio C, Salvador A, DÍAz JA (2006) Mediterranean hatchling lizards grow faster at higher altitude: a reciprocal transplant experiment. *Functional Ecology* 20:865-872
- Johansson BG, Jones TM (2007) The role of chemical communication in mate choice. *Biol Rev Camb Philos Soc* 82:265-89
- Kavaliers M, Colwell DD (1995) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proceedings: Biological Sciences* 261:31-35



- Kopena R, López P, Martín J, Herczeg G (2011) Vitamin E supplementation increases the attractiveness of males' scent for female European green lizards. *PLoS One* 6:e19410
- Kotiaho JS (2001) Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biological Reviews* 76:365-376
- Krasnoff SB, Dussourd DE (1989) Dihydropyrrolizine attractants for arctiid moths that visit plants containing pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 15:47-60
- Laing CJ, Fraser DR (1999) The vitamin D system in iguanian lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology B*:373-379
- Löfstedt C, Vickers NJ, Roelofs WL, Baker TC (1989) Diet Related Courtship Success in the Oriental Fruit Moth, *Grapholita molesta* (Tortricidae). *Oikos* 55:402-408
- López P, Amo L, Martín J (2006) Reliable signaling by chemical cues of male traits and health state in male lizards, *Lacerta monticola*. *J Chem Ecol* 32:473-88
- López P, Aragón P, Martín J (2003) Responses of female lizards, *Lacerta monticola*, to males' chemical cues reflect their mating preference for older males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:73-79
- López P, Martín J (2005) Female Iberian wall lizards prefer male scents that signal a better cell-mediated immune response. *Biol Lett* 1:404-6
- López P, Muñoz A, Martín J (2002) Symmetry, male dominance and female mate preferences in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52:342-347
- Martín J, López P (2000) Chemoreception, symmetry and mate choice in lizards. *Proc Biol Sci* 267:1265-9
- Martín J, López P (2006a) Links between male quality, male chemical signals, and female mate choice in Iberian rock lizards. *Functional Ecology* 20:1087-1096
- Martín J, López P (2006b) Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards. *Proc Biol Sci* 273:2619-24
- Martín J, López P (2008) Female sensory bias may allow honest chemical signaling by male Iberian rock lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62:1927-1934
- Martín J, López P (2010) Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more oily scents are more attractive. *Chem Senses* 35:253-62
- Martín J, López P (2012) Supplementation of male pheromone on rock substrates attracts female rock lizards to the territories of males: a field experiment. *PLoS One* 7:e30108
- Martín J, López P (2013) Responses of female rock lizards to multiple scent marks of males: effects of male age, male density and scent over-marking. *Behav Processes* 94:109-14



- Martín J, López P (2014) Pheromones and chemical communication in lizards. In: Rheubert JL, Siegel DS, Trauth SE (eds) Reproductive biology and phylogeny of lizards and tuatara. CRC Press, Boca Raton pp 43-77
- Martín J, López P (2015) Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of lizards. *Horm Behav* 68:14-24
- Mayhew WW (1963) Reproduction in the Granite Spiny Lizard, *Sceloporus orcutti*. *Copeia* 1963:144-153
- McGregor PK (1993) Signalling in territorial systems: a context for individual identification, ranging and eavesdropping. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 340:237-244
- Moore AJ (1988) Female preferences, male social status, and sexual selection in *Nauphoeta cinerea*. *Animal Behaviour* 36:303-305
- Narbaitz R, Tsang CPW (1989) Vitamin D deficiency in the chick embryo: effects on prehatching motility and on the growth and differentiation of bones, muscles, and parathyroid glands. *Calcified Tissue International* 44:348-355
- Norman AW (2008) From vitamin D to hormone D - Fundamentals of the vitamin D system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 88:491s-499s
- Packard MJ, Packard GC (1984) Comparative aspects of calcium metabolism in embryonic reptiles and birds. In: Seymour RS (ed) Respiration and metabolism of embryonic vertebrates: Satellite Symposium of the 29th International Congress of Physiological Sciences, Sydney, Australia, 1983. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 155-179
- Penn DJ (2002) The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology* 108:1-21
- Pérez-Mellado V (1982) Datos sobre *Lacerta monticola* Boulenger, 1905 (Sauria: Lacertidae) en el oeste del Sistema Central. Doñana, *Acta Vertebrata* 9:107-129
- Ryan MJ (1990) Signals, species, and sexual selection. *American Scientist* 78:46-52
- Salvador A, Diaz JA, Veiga JP, Bloor P, Brown RP (2007) Correlates of reproductive success in male lizards of the alpine species *Iberolacerta cyreni*. *Behavioral Ecology* 19:169-176
- Simkiss K (1991) Fluxes during embryogenesis. In: Deeming DC, Ferguson MWJ (eds) Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press, Cambridge, pp 47-52
- Sinervo B (1990) The evolution of maternal investment in lizards: an experimental and comparative analysis of egg size and its effects on offspring performance. *Evolution* 44:279-294



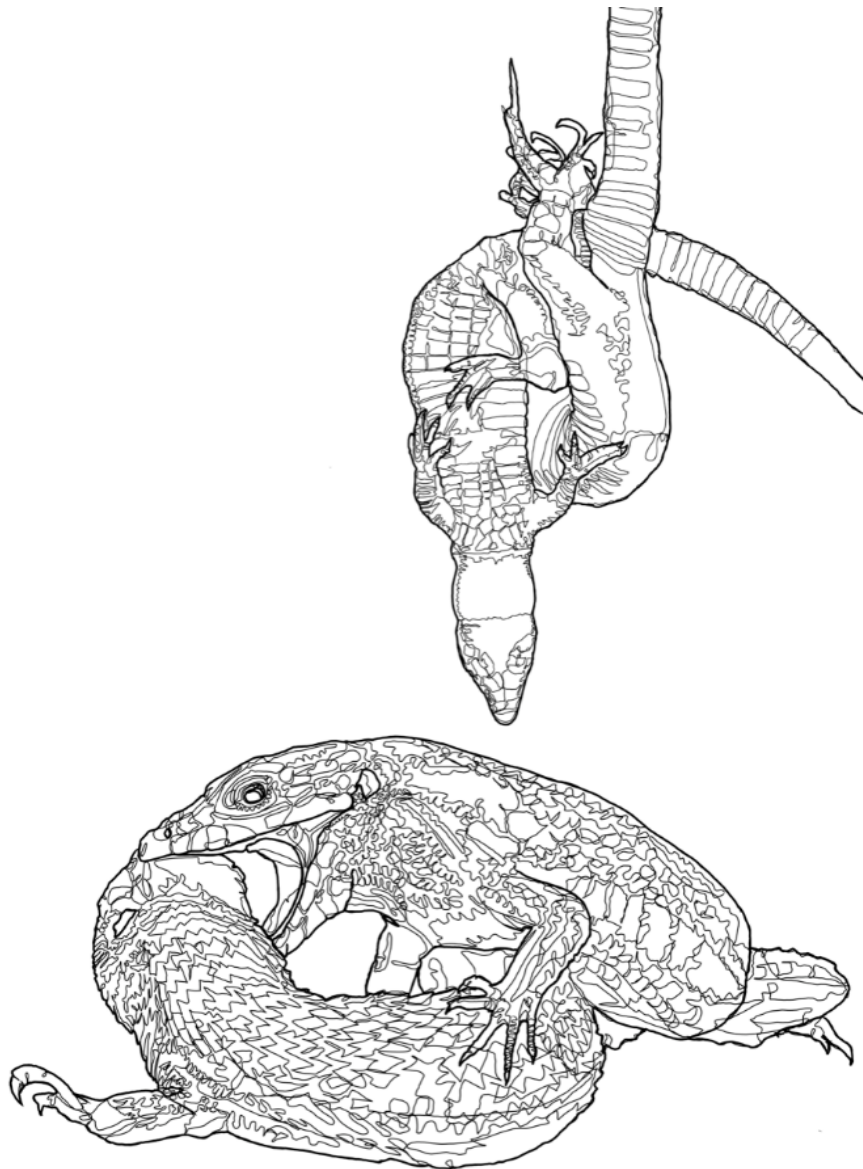
- Sinervo B, Licht P (1991) Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science* 252:1300-1302
- Stewart JR, Ecy TW (2010) Patterns of maternal provision and embryonic mobilization of calcium in oviparous and viviparous squamate reptiles. *Herpetological Conservation and Biology* 5:341-359
- Stewart JR, Ecy TW, Heulin B (2009) Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *J Exp Biol* 212:2520-4
- Stinnett HK, Stewart JR, Ecy TW, Pyles RA, Herbert JF, Thompson MB (2012) Placental development and expression of calcium transporting proteins in the extraembryonic membranes of a placentotrophic lizard. *J Morphol* 273:347-59
- Tuan RS, Ono T (1986) Regulation of extraembryonic calcium mobilization by the developing chick embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 97:63-74
- Valone TJ (1989) Group foraging, public info and patch estimation. *Oikos* 56:357-363
- Wang Z, Goonewardene LA (2004) The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science* 84:1-11
- Zahavi A (1975) Mate selection. A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53:205-214
- Zeileis A, Hothorn T (2002) Diagnostic checking in regression relationships. *R News* 2:7-10
- Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer-Verlag New York



CAPÍTULO 5

Dietary Vitamin D availability in gravid female rock lizard induces anticipatory maternal effects in the offspring

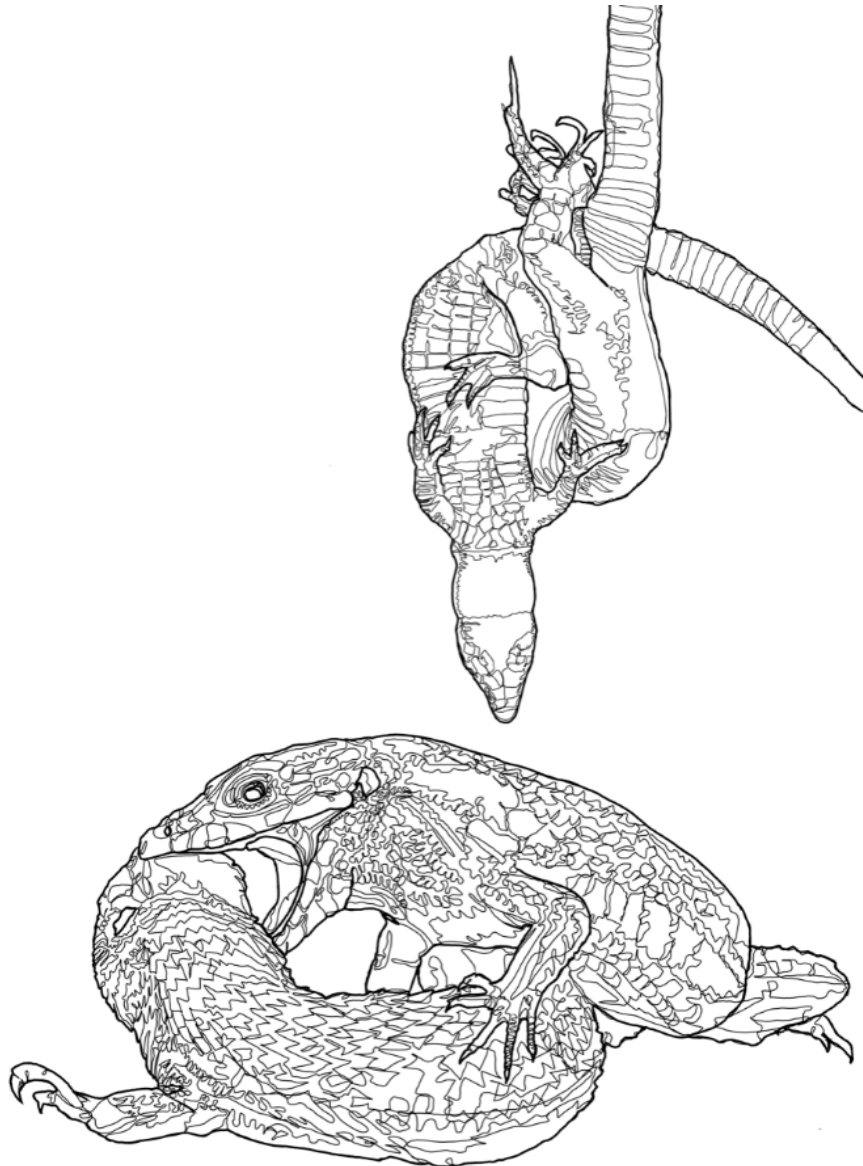
Gonzalo Rodríguez-Ruiz, Pilar López y José Martín



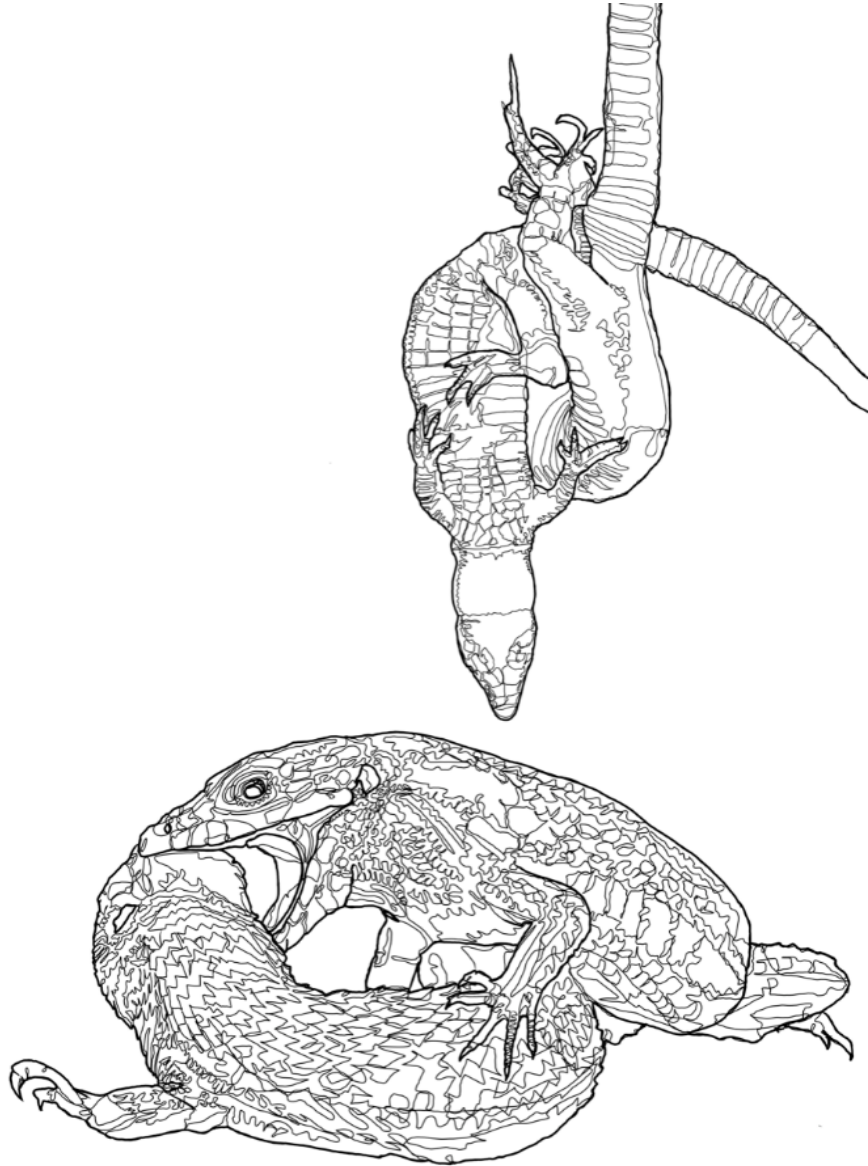
CAPÍTULO 6

Maternal vitamin D₃ supplementation affects offspring state and behavioral predictability in Carpetan rock lizard (*Iberolacerta cyreni*).

Gergely Horváth, Gonzalo Rodríguez-Ruiz, José Martín, Pilar López, Herczeg Gábor



CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

- 1- En los machos de *Iberolacerta cyreni* existe un compromiso entre la producción de alta calidad de señales visuales, con alta proporción de ultravioleta, y señales químicas, con alta proporción de ergosterol, y el mantenimiento del sistema inmune. Solo los machos con un sistema inmune lo suficientemente fuerte podrían asumir el coste de expresar estas señales de manera intensa. Esta circunstancia hace de la coloración ultravioleta y de la producción química de ergosterol señales honestas dependientes de la condición del sistema inmune del macho.
- 2- La reducción experimental de la calidad de las señales sexuales de los machos mediante un desafío inmune no tiene consecuencias aparentes sobre el éxito reproductivo medio de los machos de *I. cyreni*. De manera general, el mayor éxito reproductivo parece ser alcanzado por aquellos machos más grandes. Sin embargo, la existencia de un estado patológico aparente en los machos experimentales parece ser interpretado como un descenso en sus probabilidades de supervivencia, lo que desencadena el desarrollo de una estrategia reproductiva alternativa de “inversión terminal” en la que dedicarían todos sus recursos a la reproducción.
- 3- El incremento de la calidad de las señales sexuales en los machos de *I. cyreni* no asegura por sí solo la obtención de un mayor número de cópulas con las hembras. La competición entre machos y la jerarquía de dominancia juega un papel muy importante en el acceso a las hembras, en la determinación del éxito de cópula y, por lo tanto, en la selección sexual.
- 4- La disponibilidad de provitamina D₃ y de vitamina D₃ en las hembras grávidas de *I. cyreni* no parece ser un factor limitante para el correcto desarrollo de los huevos y las crías, ni para el éxito de eclosión. Dado que el interés de las hembras por las señales químicas desciende cuando las necesidades de provitamina y de vitamina están cubiertas, el potencial sesgo quimiosensorial que habría originado la respuesta de las hembras por las señales químicas de los machos podría haber estado determinado por la existencia de necesidades fisiológicas o cierto nivel de desnutrición.



- 5- La provitamina D₃ y la vitamina D₃ que las madres transmiten a las crías a través del huevo podrían actuar como moléculas informativas acerca de la calidad del ambiente postnatal. En este sentido, la cantidad de provitamina y vitamina que las madres contienen en sus cuerpos es determinante para inducir efectos maternos anticipadores en las crías que condicionarían su capacidad locomotora y su comportamiento de dispersión.

- 6- La existencia de coherencia comportamental y la personalidad de los juveniles de *I. cyreni* podría estar determinada por la información recopilada del ambiente materno y del ambiente postnatal. La generación de una situación de estrés tras la eclosión provoca la aparición de diferencias individuales y la variación de comportamientos en la actividad, el uso de refugio y la asunción de riesgos. La coherencia entre la información proporcionada por el ambiente materno y el ambiente postnatal podría determinar el surgimiento de personalidades o de comportamientos repetibles en los juveniles.



