

“Er de karotenoid røde piggene hos
trepigga stingsild (*Gasterosteus aculeatus*)
en sekundær kjønnskarakter?”

Cesilie Røtnes Amundsen

FS200F Bacheloroppgave

Våren 2009

Fakultet for biovitenskap og akvakultur

Høgskolen i Bodø

Innholdsfortegnelse:

Forord_____	1
Sammendrag_____	1
Abstract_____	1
Introduksjon_____	2
Materiell og metode_____	5
Resultater_____	7
Diskusjon_____	10
Konklusjon_____	12
Referanse_____	12
Vedlegg 1_____	14

Forord

Jeg vil takke Jarle Tryti Nordeide for forslag til oppgave og for god veiledning underveis. Statistikken ble utført av Nordeide.

Sammendrag

Generelt sett er hunner mindre ornamenterte enn hanner. Ornamenterte hunner har blitt sett på som en ikke-adaptiv korrelasjonseffekt av seleksjon på hanner. Det finnes likevel støtte for at hunners ornamentering kan ha utviklet seg på grunn av aktivt valg fra hanner og derfor er et resultat av interseksuell seleksjon. Vi har undersøkt de karotenoid-røde piggene hos hanner og hunner i en populasjon av trepigga stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) i gyteseongen (juni) og fire måneder etter gyting (oktober). Hensikten var å undersøke om de røde piggene er en sekundær kjønnskarakter og om rødfargen signaliserer kvalitet og derfor kan være et resultat av seksuell seleksjon. Resultatene viste at hanner hadde rødere pigger enn hunner både i gyteperioden og fire måneder senere, men forskjellene var små og de rødeste hunnene var rødere enn de blekeste hannene. Stingsilda var like rød i gyteperioden som etter gyteperioden. Fisk infisert av *Schistocephalus solidus* var mindre rød enn de som ikke var infisert. Parasittert stingsild ble bare funnet utenom gytasesongen. Disse resultatene indikerer at røde pigger er en sekundær kjønnskarakter, og at rødfargen signaliserer om stingsilda er parasittert.

Abstract

In general females are less ornamented than males. Ornamented females have been looked upon as a nonadaptive correlation effect from selection

of males. Female ornamentation could also have evolved as a result of male-choice and intersexual selection. We have investigated the red pelvic spines in males and females in a population of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in the spawning season (June) and four months after spawning (October). The purpose was to investigate if red pelvic spines are a secondary sex characteristic and if the colour is signalling quality and therefore could be a result of sexual selection. The result shows that males are more red than females in the spawning season and four months later, but the differences are small and females with the strongest colour are more ornamented than the palest males. The stickleback was just as red in the spawning season as it was after the spawning season. Fish infected with *Schistocephalus solidus* were less red than those which were not infected. Infected fish were only found outside the spawning season. These results indicate that red pelvic spines are a secondary sex characteristic and that the colour red signals if the stickleback is infected with parasites.

Introduksjon

Seksuell seleksjon er et resultat av naturlig seleksjon i henhold til parringssuksess (Campbell & Reece 2005). Denne typen seleksjon kan resultere i seksuell dimorfisme, som er en markert forskjell mellom kjønnene i sekundære kjønnskarakterer. Disse karakterene er ikke direkte assosiert med selve parringen, men gir forskjeller i størrelse, farger og ornamenteringer. Hos vertebrater er det som regel hannen som utvikler sekundære kjønnskarakterer. Det finnes to typer seksuell seleksjon, intraseksuell seleksjon, som gir direkte konkurranse mellom individer av samme kjønn, og interseksuell seleksjon hvor et kjønn (som regel hunnene) velger partner ut fra utseende eller oppførsel (Campbell & Reece 2005).

Sterke farger kan være et eksempel på en sekundær kjønnskarakter (Alcock 2005). I følge "gode gener" hypotesen kan ornamentering hos hanner signalisere til hunner om hans levedyktige gode gener og fortelle om et godt immunforsvar som kan gi arvelig resistans mot parasitter. "Kompatible gener" hypotesen foreslår at ornamentering er et signal som forteller hunnen at hannens gener er ulike fra hennes og vil dermed hindre innavl. Bare friske hanner har råd til å investere i slike ornamenteringer siden de er kostbare å produsere. En ulempe er at ornamentene gjør hannene mer synlige og derfor også mer sårbare for predasjon. Men selv om disse ornamenteringene vil kunne kutte ned på levetiden vil likevel den reproduktive suksessen sikre hannen i konkurranse med andre hanner (Alcock 2005).

Generelt sett i naturen er hanner mer dekorerte enn hunner, men dekorerte hunner finnes også (Amundsen 2000). "Direkte seleksjons" hypotesen foreslår at disse ornamenteringene er et resultat av seksuell seleksjon av hanner. "Genetisk korrelasjons" hypotesen foreslår at hunner er ornamenterte grunnet en ikke-adaptiv genetisk korrelasjon som kommer som en konsekvens av seksuell seleksjon av hanner og at hunner og hanner har de fleste gener felles (Amundsen 2000).

Hos trepigga stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) er den iøynefallende røde buken et resultat av karotenoider som stingsilda spiser (Wedekind et al 1998). Karotenoid fungerer ikke bare som et signal, men har også antioksidant egenskaper. Antioksidanter fjerner skadelige radikaler som er et biprodukt av normale cellulære aktiviteter og danner stabile radikaler som gjennomgår en reaksjon til en ikke-radikal forbindelse (Bender 2008). Karotenoider er med på å styrke immunsystemet og er også en viktig bestanddel i eggene. Hunner med dårlig tilgang på karotenoider vil kunne få dårligere kvalitet på eggene og hannenes spermkvalitet vil kunne minke (G. Britton et al 2008). Hanner med ornamentering vil ha en større mulighet til å få parre seg og dermed også få flere avkom enn hanner med

mindre rød buk. Det er også påvist at rødfargen vil minke hvis hannen får parasitter, derfor er stingsildas rødfarge et ærlig signal om dens helsetilstand (Milinski og Bakker 1990).

I begynnelsen av gytesesongen hevder hannen et territorium hvor han bygger et rede som han lokker hunnene til i håp om at de vil legge eggene sine der. Hannen vil passe på eggene fram til de klekkes (Milinski og Bakker 1990). Det har vist seg at hunnene ikke bare velger hanner ut fra ornamenteringer men også ut fra hvordan boligen hans ser ut. Hanner med ryddige og dekorerte boliger får flere parringer. Dette kan derfor sees på som en forlenget sekundær kjønnskarakter (Östlund-Nilsson og Holmlund).

Hos stingsilda er også hunnene dekorerte med karotenoid-røde pigger (Nordeide 2002). Det var antatt at også stingsild hannene ville velge hunner med kraftig rødfarge, men dette viste seg å ikke være tilfelle. Hanner velger tvert imot heller hunnene med lite eller ingen rødfarge. En av grunnene til dette kan være at hannene forbinder rødfargen med hann-hann aggressive interaksjoner (Nordeide 2002).

Vi vet en del om funksjonen til stingsildas røde buk, men vi vet lite om funksjonen til dens karotenoid røde pigger. Vi ønsket å teste ut om de karotenoid-røde piggene fungerer som en sekundær kjønnskarakter, i så fall vil vi kunne predikere at

1. hannens pigger vil være rødere enn hannens
2. fisk infisert med parasitter vil være blekere enn ikke-infisert fisk, og at
3. piggene vil være rødere i gytesesongen enn ellers i året

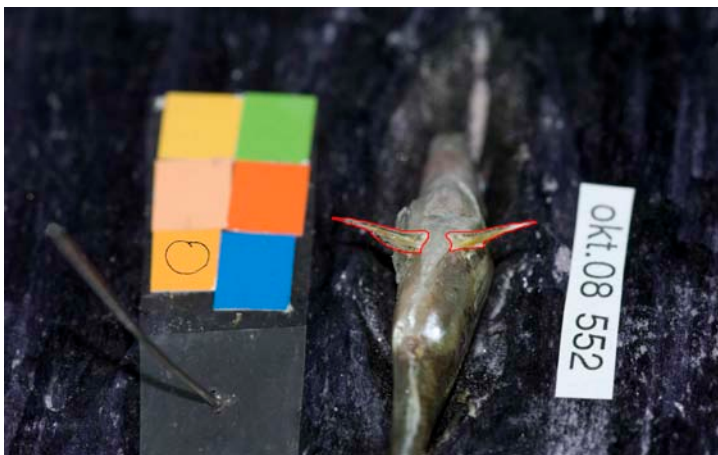
Materiale og metode

Stingsild ble fanget i gytesesongen, 10 og 20 juni, og utenfor gytesesongen, 28 og 29 september 2008, i Nedre Vollvannet (50 x 190 m) i Bodø, Norge. Nedre Vollvann er oligotrofisk, 125 m.o.h. på 67°17'N, 14°25'E. Populasjonen er flerårig og begge kjønn blir kjønnsmodne når de er 2 år (J.T. Nordeide, Fakultetet for biovitenskap og akvakultur, Høgskolen i Bodø, personlig kommunikasjon). Fiskene ble fanget med feller laget av transparente 1,5 liters brusflasker av polyester. Etter innfangning ble fiskene fraktet til Mørkvedbukta forskningsstasjon ved Fakultetet for biovitenskap og akvakultur ved Høgskolen i Bodø, hvor de ble overført til et kar på ca 300 liter. Fiskene ble foret daglig med Chironomidae-larver som er påvist å ikke ha et detektbart innhold av karotenioder (E.S. Egeland, Fakultetet for biovitenskap og akvakultur, Høgskolen i Bodø, personlig kommunikasjon). Fisken hadde skjul å gjemme seg i for å minske stress. De ble oppholdt i karet i 14 dager for å være sikre på at stressnivået etter innfangning hadde blitt redusert og forhåpentligvis ikke hadde påvirket fargen på piggene. Fiskene ble avlivet med en overdose ms-222 og frosset ned på -40 °C. Fisken ble fotografert med Nikon D2X med blitz Nikon Speedlight SB-80DX og linse Nikon ED AF Micro Nikkor 200 mm 1:4D, sammen med en standardisert rød-oransje fargelapp mot en sort bakgrunn. Fisken ble fotografert med ventralsiden opp og piggene ut fra kroppen (Figur 1). Bildene ble analysert med Adobe Photoshop versjon SC3. En linje ble trukket fra rot til spiss på høyre pigg og verdiene av rød (R), blå (B) og grønn (G) ble kvantifisert ut fra pixelene i det merkede området i R-B-G-modulen i Photoshop. Dette ble gjentatt på venstre pigg og på den standardiserte fargelappen. Intensiteten av rødfargen (I_R) ble utregnet vha formelen:

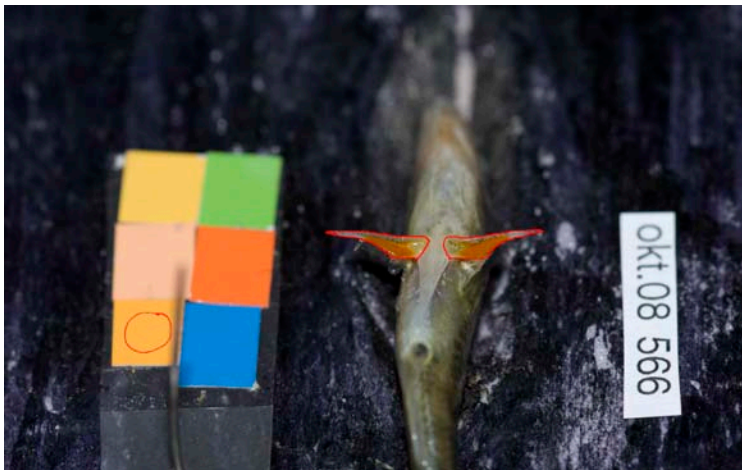
$$I_R = R/R+G+B$$

Gjennomsnitt ble regnet av høyre og venstre pigg, samt snitt av fargelapp fra hvert bilde. For hver fisk ble rødfargen på fiskens pigger justert i henhold til avviket mellom fargelappen i hvert foto og gjennomsnittet av fargelappene på foto av alle fisk. Dette avviket ble deretter justert ved å legge til eller trekke fra rødfargeverdien på fisken.

(a)



(b)



Figur 1: Foto av ventral side av stingsild, med karotenoid-basert rød farge på "pelvic"-pigg. Rødfargen (I_R) ble kvantifisert ut fra merket område. Det ble tatt et gjennomsnitt av høyre og venstre pigg og justert med avvik fra den standardiserte fargelappen. **a)** viser den blekeste fisken, **b)** viser den rødeste fisken.

I tidsrommet januar-februar 2009 ble fiskene målt til nærmeste mm, veid til nærmeste mg, kjønnsbestemt ved inspeksjon av gonadene og aldersbestemt med otolittavlesning. Det ble også sett etter om fisken var gyteklar ved å se på størrelse på eggene. I tillegg ble det sett etter parasitten *S. solidus* ved å inspisere bukhulen, og eventuell vekt av parasitten ble trukket fra vekten av fisken. Totalt ble 120 og 119 fisk undersøkt fra henholdsvis juni og oktober.

Statistiske analyser ble utført med General Linear Models (GLM) og SPSS versjon 15.0. (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). I modellen inkluderte vi alle relevante biologiske parametre (uavhengige parametrene) som potensielt kunne forklare den avhengige parameteren "grad av rød farge på piggene (IR)". Disse uavhengige parametrene er sesong, kjønn, alder, kondisjonsfaktor, lengde, og tilstedeværelse av parasitten *S. Solidus* og deres interaksjoner. Ingen av variablene måtte transformeres for å tilfredsstille krava om uavhengighet, heterogenitet av varians, normalitet av feil, eller linearitet (Grafen & Hails 2002). Deretter fjernet vi sekvensielt uavhengige parametre inntil modellen inkluderte bare parametre hvis videre eliminering ville redusert modellens forklarende styrke.

Forsøket er utført i henhold til nasjonale regler om dyreforsøk. Det ble tatt stor hensyn til fiskens ve og vel under hele forsøket.

Resultater

Av 239 fisk var 12 infisert av *S. solidus*, hvorav alle var fra fisk fanget i oktober. All kjønnsmoden fisk var 2-3 år gamle. Oversikt over vekt, lengde, alder og parasittvekt kan sees i Vedlegg 1.

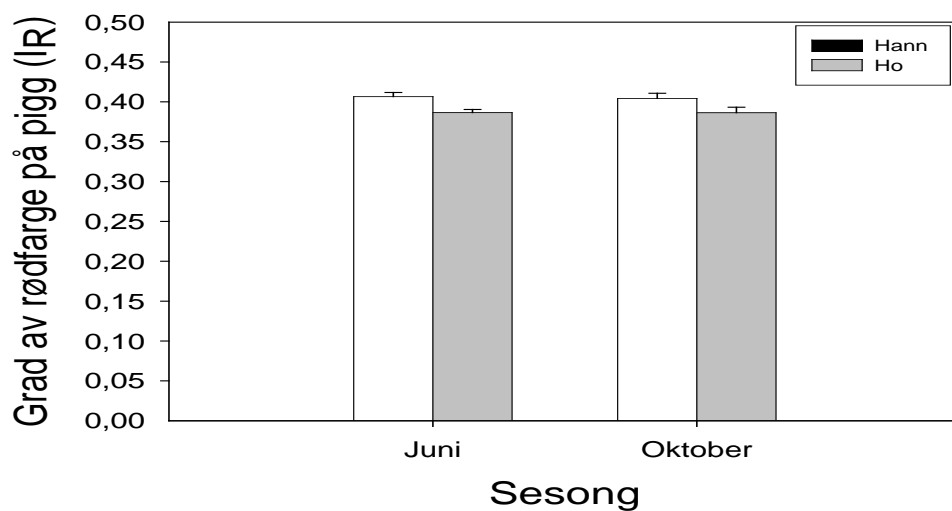
Av de målte variablene (sesong, kjønn, alder, kondisjonsfaktor, lengde, og tilstedeværelse av parasitten *S. solidus*), så er det kun "kjønn" og

"parasitt" (fisker med parasitt versus fisker uten parasitt) som har en signifikant forklarende effekt på rødfarge på piggene. Disse to parametrene forklarte 20 % av variasjonen i rødfarge på piggene (tabell 1). Hanner hadde signifikant rødere pigger enn hunnene (figur 2a). Fisk som var parasitterte var blekere enn ikke-infisert fisk (figur 2b).

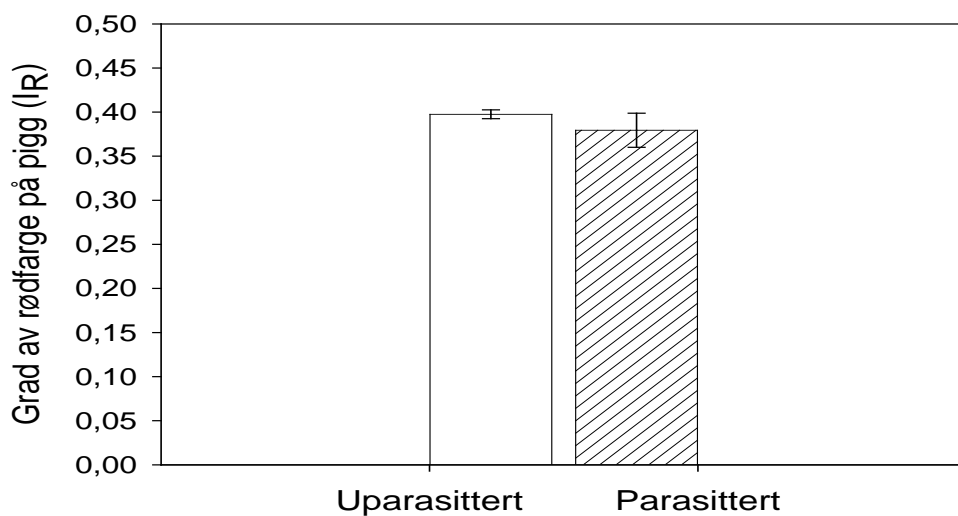
Tabell I. Test statistikk fra GLM type III "sums of square" (SS) med rødfarge på piggen (I_R) som avhengig variabel, og effekt av kjønn ("covariate") og om de er parasittert av *S. solidus* eller ikke ("fixed factor"). Justert $R^2 = 0,20$.

Kilde	SS	d.f.	F	P-verdi
Analysis of variance				
Kjønn	0,025	1	54,818	< 0,001
Parasitt	0,003	1	7,601	0,006
Feil	0,106	236		
Total	37,487	239		

(a)



(b)



Figur 2. Gjennomsnittlig (\pm 95 % konfidensintervall) grad av rødfarge på pig (IR) hos (a) hanner og hunner i (juni) og utenfor (oktober) gytesesongen, og på (b) fisk med (uten parasitt) er kun fisk fra oktober inkludert og kun 12 fisk var parasitert (N = 12) (6 hanner og 6 hunner). De resterende 108 fisk var uparasitert (N = 108).

Diskusjon

Av de uavhengige parametrene var kun kjønn og parasitt signifikant assosiert med den avhengige parametre rødfarge på piggene (I_R). Hanner har rødere pigger enn hunner og individ uten parasitt har rødere pigger enn infisert fisk. Det var ingen forskjell i rødfarge i og utenfor gytesesongen.

En rekke feilkilder kan ha påvirket resultatene. Rødfargen på brystet til stingsild hanner kan forsvinne i løpet av få minutter når fisken blir stresset (J.T. Nordeide, personlig kommunikasjon). Rødfargen på piggene kan også tenkes å bli påvirket av at fisken stresses, selv om dette ikke synes å være tilfelle (J.T. Nordeide, personlig kommunikasjon). Selv om vi reduserte faren for slik effekt av stress på fiskene ved å oppbevare de i kar ved Mørkvedbukta forskningsstasjon i 14 dager etter innfangning og deretter raskt bedøvd, avlivet og dypfryst, kan vi ikke utelukke at fargen på piggene ble påvirket av vår håndtering av fiskene. All fisk ble sjekket for parasitter, men det ble bare funnet 12 fisk som var infiserte. Det kan ikke utelukkes at små parasitter ikke ble oppdaget. En kan derfor ikke se bort fra at fisk med små parasitt kan ha blitt kategorisert som uparasittert. Selv om vi standardiserte fotograferingen av fiskene, kan vi ikke utelukke at fiskene ble liggende i litt ulike posisjoner, eller at blitsen ikke ga identisk lysstyrke på hvert bilde, den standardiserte fargelappen var posisjonert ulikt i forhold til kamera etc. Noen av disse potensielle ulikhetene ble forsøkt tatt hensyn til ved å justere rødfargen hos fisken i forhold til endringer i rødfargeverdien på fargelappen. Kjønnsmodning er vanskelig å sjekke hos hanner da de ikke viser like tydelige tegn på kjønnsmodning som en kan observere hos hunner. Alderen ble sjekket ved otolittavlesning noe som ikke er en eksakt vitenskap og feilavlesninger kan skje. Antakelsen om kjønnsmodning ved 2 års-alderen ble bekreftet

utfra otolittavlesningene, men det kan ikke sees bort fra at det kan være gjort feilberegninger. Selv om flere potensielle feilkilder ikke kan utelukkes, anses de ikke som systematiske feilkilder som påvirker resultatene i en bestemt retning.

Det finnes svært liten forskning på spørsmålene rundt hunners ornamenteringer, og det lille som er gjort av forskning på dette feltet har for det meste vært på fugl (Amundsen 2000). Det finnes sterke indikasjoner på at også hunnene undergår seleksjon for økt uttrykk (Amundsen 2000). Det finnes også gode indikasjoner på at gjensidige ornamenteringer kan ha en signaliserings effekt hos begge kjønn, spesielt i forhold til parring. Andre aspekter har fått lite fokus, en kan likevel tenke seg til at sosial status signalisering kan være like viktig, fordi konkurranse over ikke-seksuelle ressurser er mer balansert mellom kjønnene enn seksuell konkurranse (Kraaijeveld et al 2007). Selv om rødfargen på piggene hos hannene har vist seg å være sterkere enn de vi finner hos hunnene, er forskjellen mellom kjønnene liten og det er ingen tvil om at hunnene også kan ha sterk farge på piggene. Dette studiet viser at parasitter påvirker rødfargen i piggene, dette er tidligere påvist for rødfarge på brystet til stingsild (Milinski og Bakker 1990). Det kan tenkes at hunnens rødfarge viser et ærlig signal til hannene om hennes helsetilstand. På den andre siden ble ingen parasitterte individ påvist i gytesesongen i juni, bare i oktober etter at gytesesongen var over. Få og ingen parasitterte individ i gytesesongen og mange parasitterte fisk i perioden etter gytingen har blitt påvist også tidligere år i denne populasjonen (J.T. Nordeide, personlig kommunikasjon). Hanner som under gyting velger hunner med sterk rødfarge får derfor ingen fordeler av dette valget i form av gode gener (immunforsvar) til sitt avkom. Derimot er det vist en negativ sammenheng mellom rødfarge på hunnens pigger og mengde karotenoid i eggene (Nordeide et al 2006). Ornamenteringene kan heller være en ulempe for hunnen fordi

ressurssene som blir brukt på å opprettholde signaliseringen kan gå utover eggkvaliteten og hvis dette er tilfelle vil hannene heller velge hunner som er mindre røde (Kraaijeveld et al 2007, Nordeide et al 2006).

Det var forventet at rødfargen på piggene skulle bli mindre intens etter gytesesongen, på samme måte som for rødfargen på stingsildhannenes buk. Dette stemte ikke. På en annen side finnes mange eksempler på dyr som har sekundære kjønnskarakterer hele året. Eksempler på dette er påfuglens spektakulære hale, merkverdige horn og snuter hos biller og løvenes store manke (Alcock 2005).

Konklusjon

Dette studiet har vist at stingsildhunner også har sterk rødfargen på piggene, og at forskjellen mellom hanner og hunner er liten. Fargen på piggene vedvarer også etter gytesesongen. Fisk som er infisert med *S. solidus* har en blekere rødfarge enn ikke-infisert fisk. To av tre predikasjoner har fått støtte, noe som tyder på at hypotesen om sekundære kjønnskarakterer stemmer.

Referanser

Alcock, J., 2005. *Animal Behaviour*, Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Amundsen, T. 2000. Why are female birds ornamented? *Trends Ecol. Evol.* **15**: 149-155.

Bender, D.A., 2008. *Nutrition and Metabolism*, CRC Press, Boca Raton.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H., 2008, *Carotenoids Volume 4 natural functions*, Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin.

- Campbell, N. A. & Reece, J. B., 2005. *Biology*, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Grafen, A. & Hails, R., 2002. *Modern Statistics for the Life Sciences*. Oxford University Press, Oxford.
- Kraaijeveld, K., Kraaijeveld-Smit, F.J.L., Komdeur, J., 2007. The evolution of mutual ornamentation, *Anim. Behav.*, **74**: 657-677.
- Milinski, M., & Bakker, T.C.M, 1990. The advantage of being red: sexual selection in the stickleback, *Harwood Academic Publishers*.
- Nordeide, J.T., 2002. Do male sticklebacks prefer female with red ornamentation? *Can. J. Zool.*, **80**: 1344-1349.
- Nordeide, J.T., Rudolfsen, G., Egeland, E.S., 2006. Ornaments or offspring? Female stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) trade off carotenoids between spines and eggs. *J. Evol. Biol.*, **19**: 431-439.
- Wedekind, C., Meyer, P., Frischknecht, M., Niggli, U.A. & Pfander, H. 1998. Different carotenoids and potential information content of red coloration of male three-spined stickleback. *J. Chem. Ecol.* **24**: 787-801.
- Östlund-Nilsson, S. & Holmlund, M., 2004. The artistic three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **53**: 214-220.

Vedlegg 1: Deskriptiv statistikk av parameter-målinger fra fisk

Parameter	N	Min	Max	Snitt	SA
Vekt (g)	239	0,371	3,865	1,123	0,448
Alder (år)	239	1	4	1,97	0,82
Lengde (cm)	239	3,5	7,6	5,1	0,6
Parasitt (g)	12	0,029	0,283	0,19	0,07