



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
ROMA "TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED ECOLOGIA

CICLO XXI

A.A. 2008/2009

**CORTEGGIAMENTO E MECCANISMI DI ISOLAMENTO
RIPRODUTTIVO IN DUE SPECIE CRIPTICHE DI FARFALLE
DEL GENERE *HIPPARCHIA***

Tesi di Dottorato

Manuela Pinzari

Docente Guida: Prof. Valerio Sbordoni
Coordinatore: Prof. Patrizia B. Albertano

A mia madre

Riassunto

Il genere *Hipparchia* Fabricius è uno dei generi tassonomicamente più difficile dei satiridi paleartici. Esso comprende gruppi di taxa con caratteristiche esterne simili, ma con profonde differenze nei genitali maschili e negli androconi. Studi pregressi sul comportamento hanno evidenziato in alcune specie l'esistenza di un corteggiamento articolato per l'accoppiamento. La maggior parte delle volte, le sequenze di corteggiamento rilevate sono comparabili tra specie, ma possono presentare differenze nell'esecuzione e nell'ordine dei moduli comportamentali comuni; in altri casi, invece, sono caratterizzati da moduli esclusivi che presentano solo determinate specie. L'isolamento riproduttivo fra due specie è il risultato di un gran numero di meccanismi, più o meno indipendenti gli uni dagli altri, e l'importanza relativa dei vari fattori può cambiare da un gruppo di specie all'altro. La riproduzione tra specie animali, soprattutto simpatiche e strettamente affini, è comunemente impedita da una serie di fattori ecologici, comportamentali e citogenetici. Tra i meccanismi di isolamento riproduttivo pre-copula, quelli di tipo etologico costituiscono la classe più importante. Il funzionamento di tali meccanismi si basa essenzialmente sull'incompatibilità comportamentale dei segnali scambiati tra gli individui eterospecifici. In generale, in condizioni di allopatria, specie strettamente affini possono permettersi di utilizzare segnali di corteggiamento più generici (i.e., aspecifici), meno costosi e variabili, mentre in condizioni di simpatria la selezione naturale può favorire la diversificazione di atti di corteggiamento e di esibizioni sessuali articolate, mediate dalla scelta femminile, anche laddove non vi sia alcuna ibridazione eterospecifica. Questo lavoro di tesi ha l'obiettivo principale di approfondire lo studio del corteggiamento nelle due specie criptiche, *Hipparchia fagi* ed *H. alcyone*, al fine di comprendere quali stimoli, visivo-comportamentali ed, in misura preliminare, chimici, caratterizzano i due taxa ed assicurano l'accoppiamento tra individui conspecifici. Queste due specie sono simpatiche e sintopiche ad altitudini comprese tra 800 - 1000 m; gli adulti mostrano un periodo di volo sovrapposto (luglio -agosto) e frequentano habitat simili tra

bosco ed aree ecotonali prato-bosco; inoltre sono molto simili nel pattern alare e di difficile determinazione, senza un attento esame delle strutture genitali maschili e femminili. Lo studio del comportamento sessuale in queste due specie è stato eseguito in natura su popolazioni localizzate nei pressi della Pineta (930 m) situata tra le località di Vallemare e Borbona (RI) nel Lazio. Alle osservazioni in natura sono state affiancate osservazioni all'interno di una voliera sia su individui selvatici, che su individui di allevamento, provenienti dalla stessa area di studio, presso i Laboratori di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura dell'Università di Roma Tor Vergata. Questo studio ha rivelato nelle due specie lo stesso sistema nuziale, una poliginia con monandria delle femmine, ed un pattern comportamentale sessuale molto simile: il maschio attende la femmina, posato sui tronchi d'albero come sulle pareti della voliera; al passaggio della femmina, prende volo e la insegue fino alla posa; segue quindi un rituale articolato dalla struttura temporale e dai meccanismi di interazione maschio-femmina analoghi nelle due specie. La sequenza di corteggiamento appare costituita dai sei moduli comportamentali: *Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation*, *Copulation attempt* e *Clasping*, eseguiti nell'ordine dato in entrambe le specie. Il maschio può ottenere l'accoppiamento dopo aver eseguito una sola volta la sequenza di corteggiamento, ma nella maggior parte dei casi, ciò avviene dopo la successione di più sequenze (o di frammenti di essa), probabilmente in risposta alla disponibilità ad accoppiarsi della femmina. Il comportamento della femmina sembra infatti influenzare l'esecuzione delle azioni del maschio, determinando la frammentazione della sequenza e la ripetizione dei singoli moduli o dell'intera sequenza. Nei rituali più articolati, il maschio tende a ricominciare la sequenza di corteggiamento dal *Bowing* o da moduli precedenti e, solo dopo un apparente consenso della femmina, può procedere nella sequenza fino alla copula. Le due specie, inoltre, mostrano un corteggiamento molto simile nelle tempistiche dei sei moduli comportamentali componenti la sequenza. In entrambe, infatti, i moduli iniziali (*Fanning* e *Circling*) e finali (*Copulation attempt* e *Clasping*) mostrano durate comparabili e sono eseguiti in media una sola volta nella sequenza di corteggiamento. I moduli centrali della sequenza

(*Bowing* ed *Antenna orientation*) sono invece replicati molte volte, sempre in associazione, e caratterizzati da durate molto brevi. L'unico carattere comportamentale che distingue le due specie è la frequenza con cui il maschio effettua il *Bowing*: in *H. alcyone* sempre maggiore di quella misurata in *H. fagi*. Questo modulo sembra essere la fase cruciale del corteggiamento, sia per il numero di repliche sia per la sua performance. Nel *Bowing* infatti il maschio afferra e trattiene le antenne della femmina tra le ali anteriori facendole scivolare sulle sue squame androconiali, secretrici di feromoni. Moduli fortemente stereotipati, come il *Bowing*, probabilmente incrementano l'intensità del segnale ormonale rilasciato, assumendo un ruolo importante nella stimolazione della partner ad acconsentire alla copula. Queste osservazioni suggeriscono il coinvolgimento di segnali chimici, oltre che visivo-comportamentali, nell'interazione tra i sessi. Le indagini preliminari sul rilascio dei feromoni mediante l'applicazione del *Naso elettronico* hanno rilevato un simile pattern chimico dei composti volatili emessi dai maschi nelle due specie. Specie affini possono avere una simile composizione chimica del bouquet dei composti rilasciati e differire per la concentrazione relativa degli stessi composti. Non è facile determinare in quale misura le differenze rilevate nelle specie esaminate possano contribuire all'isolamento riproduttivo tra i due taxa, ma differenze quantitative comportamentali sembrano essere sufficienti ad impedire una perfetta sincronizzazione della disponibilità all'accoppiamento in molte specie animali e, soprattutto, in specie affini.

Abstract

Species differences in characters involved in reproductive isolation are candidates for factors that caused speciation. It is not easy to understand whether the species differences that we can detect have been actually involved in speciation, because most species pairs have been accumulating genetic differences since the speciation process was completed often developing multiple reproductive isolating mechanisms. In *Hipparchia* species and in many taxa of Satyrine butterflies, both sexes have evolved complex genitalia that can mechanically impede the copulation between different species while males have scent located in patches or dispersed on their wings, probably pheromone releaser. Surprisingly, in spite of a growing amount of information on morphology and rearing methods of several species, only the works of Tinbergen on *H. semele* and some recent research specifically deal with mating behaviour of the genus *Hipparchia*. Courtship is an important character linked to fitness and can evolve in response to female mate choice, to ensure sex identity and quality of a potential mate. It can also be a major pre-mating isolating mechanism in butterflies and many other species. The aim of this work was to study in detail the reproductive behaviour of two sibling species, *Hipparchia fagi* and *H. alcyone* in order to understand which species-specific, visual, behavioural or chemical stimuli are involved in courtship. These two species are sympatric and syntopic at 800 - 1000 m of altitude; adult flight periods overlap in July and August and take place in similar habitats; the two butterflies have very similar wing patterns and sometimes it is very difficult to recognise the species without the exam of male and female genitalia structures. The behavioural study was conducted daily, both in the wild and in captivity, during the reproductive seasons in some areas near Vallemare (1,100 m a.s.l.) in the Central Appennines (Rieti, Italy). The observations were carried out with captive and reared individuals inside a large outdoor "flight cage" built in the same locality and in the garden of the Laboratori di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura (University of Roma Tor Vergata).

In this study, different aspects of the butterfly reproductive behaviour are described. First, the ethogram and the sequential structure of courtship are showed; second, various parameters of each courtship step are measured; third, the results in *H. fagi* are compared with the behaviour of the species *H. alcyone*; fourth, the mating system of each species is described. Moreover, the male chemical patterns were detected by the application of the *Electronic Nose* and the results in *H. fagi* were compared with those of *H. alcyone*. The study reveals general patterns of sexual behaviour in *H. fagi* and in *H. alcyone*, that are mainly identical in both species: perching strategy, flight pursuit and courtship. Likewise, the two species show a similar polygynous mating system, with female monandry. In both species, the results revealed a highly stereotypic courtship that consists of six steps (*Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation*, *Copulation attempt* e *Clasping*) leading to the copulation. Courtship most likely follows up to the end, once the male has started with the sequence. However, the development of the courtship seems to respond to the female behaviour, reflecting the complexity of the male-female interaction during the whole sequence. In both species courtship sequence seems to mostly be the outcome of the female's reaction: her interruptions can produce fragmented sequences and, more interestingly, can induce the repetition of the sequence around a specific point, with the male persisting in courting the female. Male can mate after displaying the courtship sequence once, but mostly repeats the whole sequence or part of it more than once, restarting from *Bowing* or previous steps, likely waiting for female signals. The behavioural sequential analysis also showed that a male displays the initial and the final phases of the sequence only once, while he can repeat *Bowing* and *Antenna orientation* a lot of times in the same sequence. The comparison between *H. fagi* and *H. alcyone* showed quantitative interesting differences. The frequency of *Bowing* is the unique behavioural character that allows to tell apart the two study species, as *H. alcyone* shows a greater frequency than *H. fagi*. In satyrine butterflies, male androconia provide the necessary cue, probably of chemical nature, for a successful courtship, and the display of *Bowing* is likely of primary importance for the production of male

pheromones. During *Bowing* the male repeatedly bashes or strokes the female's antennae against the androconial scales on his forewing dorsal surface. *Bowing* could convey chemotactic information to the female, and its repetition within a sequence could represent a mechanical stimulation for her, with the secretion from androconial patches on the male's forewings. This phase could be of great importance, as a persistent male could drive a female at first unreceptive to eventually mate. Scents and visual stimuli could have an essential role in mating communication: they could operate synergistically and help the female in her decision of acceptance or rejection of a specific male; they could function as sex-specific signals facilitating sexual identification during courtship. The detection of the butterfly smell by *Electronic Nose* revealed a similar male chemical pattern in both species. In insects and especially in butterflies, pheromones are chemical signals whose composition varies enormously between species and they typically comprise more than one active component. Frequently sympatric species show the same pheromone components, but in different combinations or ratios. In absence of experimental crossability tests between species, it is not possible to be investigate if different visual (i.e., different performance of a male action) or chemical stimuli would change the female response and impede cross-mating. However, the behavioural differences observed in *H. fagi* and *H. alcyone* could act as important discordant cues, in case of encounters with heterospecific females, and could reflect the presence of different chemical cues (not yet identified) between the two species.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 - Il comportamento riproduttivo dei lepidotteri	1
1.1.1 Strategie di incontro tra i due sessi.....	1
1.1.2 Il corteggiamento e le sue funzioni.....	3
1.1.3 Il corteggiamento nei lepidotteri satirini (Satirinae, Nymphalidae).....	7
❖ Il corteggiamento in <i>Hipparchia semele</i> (L., 1758).....	8
❖ Il corteggiamento in altre specie di satirini.....	9
1.1.4 Obiettivi della tesi.....	13
1.2 - Le specie oggetto di studio	15
1.2.1 <i>Hipparchia fagi</i> (Scopoli, 1763).....	17
1.2.2 <i>Hipparchia alcyone</i> (Denis & Schiffermüller, 1775).....	21
2. MATERIALI E METODI	24
2.1 - L'allevamento	24
2.1.1 Ragioni, vantaggi e svantaggi.....	24
2.1.2 Condizioni ed attrezzature di allevamento.....	25
2.1.3 Modalità di gestione degli stadi del ciclo biologico delle specie allevate.....	27
❖ Le piante alimentari e la deposizione delle uova.....	27
❖ Lo stadio larvale e le sue età.....	29
❖ Le pupe.....	31
❖ L'adulto.....	35
2.2 - Lo studio del corteggiamento	38
2.2.1 Area e periodo di studio.....	38
2.2.2 La voliera.....	40
2.2.3 Mezzi di registrazione: la telecamera.....	41
2.2.4 Protocollo sperimentale nella voliera.....	42

2.2.5 Metodi di campionamento e analisi della documentazione video	45
❖ Definizione delle categorie comportamentali	46
❖ Codificazione dei filmati	47
2.2.6 Analisi dei dati comportamentali	50
2.2.6.1 Definizione della sequenza di corteggiamento.....	51
❖ Analisi markoviana delle sequenze.....	51
❖ Ordine dei moduli e loro associazione	53
2.2.6.2 Studio della composizione dei rituali	55
❖ Analisi “fine-inizio sequenza”	55
2.2.6.3 Analisi dei moduli comportamentali.....	56
❖ Numero di occorrenze nella sequenza	56
❖ Durata del singolo modulo	56
2.2.6.4 Studio del Bowing.....	57
❖ Durata del singolo Bowing (d_B), durata totale dei Bowing ($D_{B,s}$) e frequenza del Bowing nella sequenza ($f_{B,s}$)	57
2.3 - Aspetti della biologia riproduttiva nelle specie esaminate	59
2.3.1 La copula	59
2.3.2 Metodi per la determinazione del sistema nuziale nei lepidotteri	59
2.3.3 Metodi di studio dei segnali chimici.....	61
2.3.3.1 Il Naso elettronico.....	62
2.3.3.2 Sperimentazioni nelle farfalle	64
❖ Sperimentazione 2007	67
❖ Sperimentazione 2008.....	69
3. RISULTATI.....	73
3.1 - L'allevamento: dall'uovo all'adulto	73
3.1.1 Note sul comportamento delle larve.....	75
3.1.2 Le pupe ed il sesso.....	78
3.1.3 Fenologia degli adulti.....	79
3.2 - Il corteggiamento in <i>Hipparchia fagi</i>.....	84

3.2.1 La sequenza di corteggiamento	84
3.2.2 I rituali	90
3.2.3 I moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento.....	94
❖ Numero di occorrenze nella sequenza (O_{modulo}).....	94
❖ Durata del singolo modulo (d_{modulo}).....	95
3.2.4 Il <i>Bowing</i>	97
❖ Durata del singolo <i>Bowing</i> (d_B).....	98
❖ Numero di occorrenze del <i>Bowing</i> nella sequenza	100
❖ La frequenza del <i>Bowing</i> (f_B) nella sequenza	104
3.3 - Il corteggiamento in <i>Hipparchia alcyone</i>.....	107
3.3.1 La sequenza di corteggiamento	108
3.3.2 I rituali	112
3.3.3 I moduli comportamentali nella sequenza	117
❖ Numero di occorrenze nella sequenza (O_{modulo}).....	117
❖ Durata del singolo modulo (d_{modulo}).....	118
3.3.4 Il <i>Bowing</i>	120
❖ Durata del singolo <i>Bowing</i>	120
❖ Numero di occorrenze del <i>Bowing</i> nella sequenza	123
❖ La frequenza del <i>Bowing</i> nella sequenza	126
3.4 - Il corteggiamento: <i>Hipparchia fagi</i> vs <i>Hipparchia alcyone</i>.....	130
3.4.1 La sequenza di corteggiamento	130
3.4.2 I moduli comportamentali	130
❖ Durate (d_{modulo}).....	130
❖ Numero di occorrenze (O_{modulo}).....	135
3.4.3 Il <i>Bowing</i>	137
❖ Durata del <i>Bowing</i> (d_B).....	137
❖ Numero di occorrenze del <i>Bowing</i> nella sequenza (O_B).....	138
❖ Frequenza nella sequenza	142

3.5 - Il sistema nuziale.....	145
❖ Numero di accoppiamenti per femmina	145
❖ Numero di accoppiamenti per maschio	147
3.6 - La copula: durata e stato riproduttivo dei maschi	147
3.7 - Indagini preliminari sui segnali chimici.....	155
❖ Prima sperimentazione: 2007.....	155
❖ Seconda sperimentazione: 2008	157
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	162
4.1 - La sequenza di corteggiamento	162
4.2 - Meccanismi di interazione maschio-femmina	164
4.3 - I moduli comportamentali nella sequenza	166
RINGRAZIAMENTI.....	172
APPENDICI.....	173
BIBLIOGRAFIA	198

1. INTRODUZIONE

1.1 - Il comportamento riproduttivo dei lepidotteri

1.1.1 Strategie di incontro tra i due sessi

Nei Lepidotteri l'adulto è la fase riproduttiva del ciclo biologico, durante la quale deve localizzare gli individui conspecifici del sesso opposto per riprodursi. L'attività diurna si divide tra le diverse esigenze dell'individuo alimentari e di termoregolazione, ma gran parte di essa è finalizzata alla ricerca e all'incontro dell'altro sesso.

Come in molte altre specie animali, nei lepidotteri è quasi sempre il maschio a prendere l'iniziativa ricorrendo a diverse strategie per contattare la femmina. Queste possono essere ricondotte a due comportamenti generali, il *patrolling* (ricerca) ed il *perching* (attesa), sebbene non esista in ogni caso una rigida divisione tra le due strategie e tra le specie che le adottano (Scott, 1973). La specie *Pararge aegeria*, per esempio, cambia strategia di ricerca del partner secondo le condizioni ambientali in cui si trova (Van Dyck & Matthysen, 1998; Merckx & Van Dyck, 2004) e *Brintesia circe* adotta entrambe le strategie (Garcia-Barros, 2000).

Nelle specie che adottano la strategia della perlustrazione (*patrolling*), i maschi volano incessantemente ricercando attivamente la femmina. Le farfalle perlustratrici spesso scelgono una porzione del loro habitat, ma non difendono nessun'area in particolare (Scott, 1973; Attenborough & Chinery, 1990).

Tra le specie che adottano il *perching*, ci sono maschi che s'insediano in un'area definita nell'attesa della femmina e controllando il territorio periodicamente la difendono da individui estranei e soprattutto da altri maschi conspecifici. In genere se l'intruso è una femmina al volo d'approccio del maschio segue il volo nuziale e la copula; se l'intruso è un maschio, i due s'innalzano in una "contesa" che può portare alla fuga di uno dei due. Nei satirini i maschi, per es., di *P. aegeria* (Elymniini) difendono solo alcune porzioni

illuminate del bosco che sembrano attrarre le femmine. All'arrivo della partner il maschio residente inizia una danza e, se la sua performance è sufficientemente efficace, la coppia può volare su un albero ed accoppiarsi (Davies, 1978; Berwaerts et al., 2001, 2002;). Recentemente è stata data un'interpretazione diversa alla territorialità di questa specie secondo cui i maschi non eseguono voli per una ricognizione dell'area difesa, ma piuttosto per diminuire la loro temperatura corporea (Bergman et al., 2007), come suggerito anche in un altro ninfalide, *Melitaea trivia* (D. & S., 1775), da Pinzari (2000). Non tutti i maschi sono così ostili nei confronti dei conspecifici, come avviene nelle specie territoriali; alcuni taxa fanno solo uso d'aree di corteggiamento comuni (*lekking* ed *hilltopping*) (Wiklund, 2003). E' frequente osservare i maschi attendere le incursioni femminili per es., su sommità collinari o su altre aree in rilievo (Attenborough & Chinery, 1990). Tra i satirini diverse specie adottano questa strategia (Garcia-Barros, 2000). Il maschio di *Hipparchia semele* L., 1758 aspetta la femmina posato su una pietra ed, al suo passaggio, si impegna in un energico volo di inseguimento (Tinbergen, 1941,1972). Nello stesso modo si comportano i maschi in *H. statilinus* Hufnagel, 1766 ed in *Chazara briseis* L., 1764, mentre in specie più silvicole, come *H. fagi* Scopoli, 1763 ed *H. alcyone* ([D.&S.],1775), essi attendono la partner sui tronchi e sulle fronde degli alberi (Pinzari, 2004; Pinzari, 2009).

Al di là della strategia utilizzata sia i maschi che le femmine devono essere in grado di distinguere tra conspecifici ed altre specie e riconoscere individui del sesso opposto come potenziali partner. La capacità di discernere il proprio partner è risultato di uno scambio di segnali che coinvolgono diversi sensi, la vista, l'udito, l'olfatto ed il tatto. Mentre, nelle falene, l'incontro fra i due sessi è favorito dall'uso di richiami olfattivi, nelle farfalle diurne esso avviene attraverso soprattutto segnali visivi. Anche nei ropaloceri possono entrare in gioco stimoli olfattivi, ma in molte specie sembra che ciò avvenga successivamente, quando maschio e femmina sono a distanza ravvicinata (Boppré, 1984; Wiklund, 2003). Nelle falene la femmina emana feromoni che si propagano, dispersi dal vento, nell'ambiente, attirando il maschio anche da

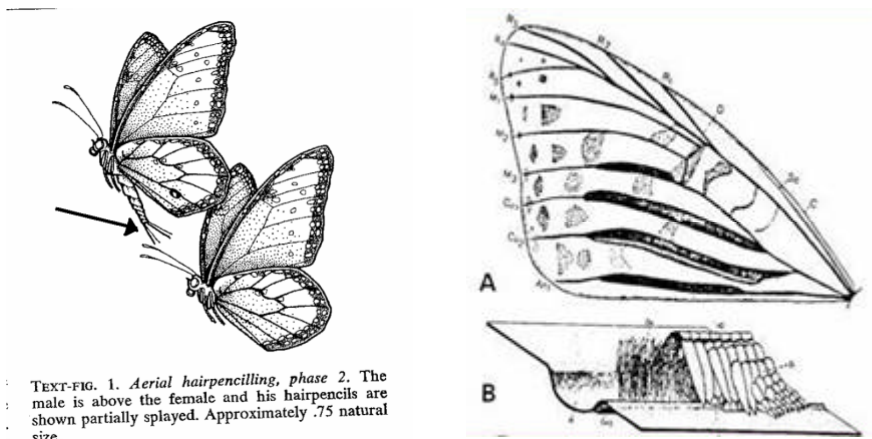
notevole distanza; queste sostanze sono intercettate dalle antenne del maschio, sede d'organi olfattivi, e lo stimolano a volare contro vento seguendo la scia olfattiva fino alla femmina. Nelle farfalle diurne invece stimoli visivi, come il colore ed il pattern delle ali, il movimento e le dimensioni dell'individuo, permettono ai maschi di individuare la potenziale partner (Tinbergen et al., 1941; Magnus, 1958; Rutowski, 2003). Nei satirini le osservazioni in natura e gli esperimenti con gli zimbelli sulla specie *H. semele* condotti da Tinbergen (1941), poi ripetuti in *H. statilinus* da Pinzari (2004), mostrano ampiamente come la sola vista di una farfalla, e di qualsiasi organismo in volo, è sufficiente a stimolare il maschio a dare inizio all'inseguimento nuziale. Tuttavia molti dei voli di approccio vengono spesso rapidamente abbandonati dai maschi di *H. statilinus* ed *H. semele* quando sono scatenati dal passaggio di maschi conspecifici o di altre specie (Tinbergen, 1972; Pinzari, 2009). Gli stimoli ricevuti dopo aver avvicinato l'altro individuo permettono evidentemente al maschio di identificare il partner potenziale conspecifico. Infatti, se il maschio non riceve risposte adeguate dal suo partner sessuale, o è attivamente respinto, la sua tendenza all'esibizione si esaurisce assai presto. Se il maschio invece riceve segnali appropriati all'inseguimento nuziale, in diverse specie di lepidotteri, segue il corteggiamento (Scott, 1973; Rutowski, 1984, 1991).

1.1.2 Il corteggiamento e le sue funzioni

Il corteggiamento è la sequenza dei comportamenti che precedono l'atto sessuale, la copula. Nelle farfalle esso può essere molto semplice, come in *Erebia epipsodea* (Brussard and Ehrlich, 1970) and in *Eurema daira* (Daniels 2007), costituito da pochi eventi, a molto complesso, come in *Hipparchia semele* (Tinbergen, 1941), *Danaus gilippus* (Brower et al., 1965), *H. statilinus* (Manuela Pinzari, 2009), *Leptidea sinapis* and *L. reali* (Friberg et al. 2008), *Bicyclus anynana* (Nieberding et al. 2008) ed in altre specie (Scott, 1973). Il corteggiamento si basa sulla produzione e ricezione di stimoli da parte dei partner sessuali. In molte specie di lepidotteri, all'inizio, il corteggiamento è scatenato da segnali visivi, mentre nelle sue fasi avanzate, sembra essere

governato da segnali chimici (feromoni). In molte specie di insetti sono coinvolte più sostanze nella comunicazione tra gli individui organizzati in una miscela complessa, la cui composizione e le relative proporzioni dei componenti può variare da specie a specie. La composizione dei feromoni sembra essere molto importante nel riconoscimento individuale e nella scelta sessuale (Symonds & Elgar, 2008; Johansson & Jones, 2007) ed i segnali chimici possono essere rilasciati sia dalla femmina sia dal maschio. Nelle femmine gli organi deputati alla secrezione di feromoni sono situati al livello dell'addome, nella membrana tra l'ottavo e nono segmento (Percy & Weatherston, 1971). Le femmine usano i feromoni per attrarre i maschi, ma anche per comunicare la propria recettività. Nei pieridi ed in alcuni satirini, le femmine in posture particolari, con le ali aperte orizzontali e l'addome verso l'alto, sembrano rilasciare feromoni comunicando ai maschi se sono già accoppiate o no (Rutowski, 1978; Wiklund & Forsberg, 1985; Andersson et al., 2000; Pinzari, 2004). Nei maschi gli organi che secernono feromoni possono avere diverse localizzazioni, sui palpi labiali, sulle zampe, nell'addome (organo di Jullien), nei genitali (coremata) e nelle ali (androconia) (Prola & Beer, 1994). Nei maschi di *Danaus gilippus* per es. i feromoni sono rilasciati al livello addominale da strutture simili a setole, gli *Hairpencil*, mentre in *Argynnis paphia* a livello alare da scaglie di copertura specializzate (squame androconiali) riunite in bande (Figura 1).

Nei satirini, molte specie presentano sulle ali le squame androconiali, spesso riunite in patch (Kudrna, 1977) di varia forma, ed in alcune, esistono squame fortemente sclerotizzate a livello addominale nella regione genitale (organo di Jullien, *H. fagi* ed *H. alcyone*, Jullien, 1909).



TEXT-FIG. 1. Aerial hairpencil, phase 2. The male is above the female and his hairpencils are shown partially splayed. Approximately .75 natural size.

Figura 1 - Hairpencil in *Danaus gilippus* (a sinistra);
squame androconiali alari in *Argynnis paphia* (a destra)
(Brower et al., 1965; Magnus, 1958).

Nelle farfalle diurne, come accennato in precedenza, i feromoni sembrano avere un ruolo nel corteggiamento, durante il quale il maschio libera il suo odore nelle vicinanze, o direttamente sopra, le antenne della femmina inviandole dei segnali necessari per il successo dell'accoppiamento (Magnus, 1958; Rutowski, 1978, 1979). In *Danaus gilippus* (Figura 1), per es., il maschio cosparge con “polvere d’amore” (*love dust*) le antenne femminili durante il volo o quando la partner si posa (Brower et al., 1965). In *Hipparchia semele* ed in *H. statilinus* (Figura 2) il maschio cattura le antenne della femmina con le sue ali anteriori strofinandole sui suoi patch androconiali (Tinbergen et al., 1941; Pinzari, 2009).

Le funzioni del corteggiamento sono molteplici, ma riconducibili a due fondamentali: a livello intraspecifico, il corteggiamento assicura una perfetta sincronizzazione sessuale dei due sessi e quindi la piena riuscita della fecondazione; a livello interspecifico, salvaguarda l'accoppiamento tra conspecifici impedendo l'ibridazione tra individui di specie diverse.

La recettività della femmina nelle farfalle è influenzata da molti fattori legati, oltre al proprio stato di maturazione sessuale, alla qualità ed alla persistenza del corteggiatore (Wedell, 2005). Il maschio è quasi sempre più attivo nel corteggiamento ed in quasi tutti i casi meno discriminante, mentre la femmina è

meno disposta ad accettare un maschio, è più selettiva e spesso l'unica in grado di distinguere il partner conspecifico. La femmina riconosce il maschio della sua specie, in *Colias eurytheme* ed in *Pieris protodice*, sulla base di differenze tra i sessi nella riflettanza agli ultravioletti delle ali (Silberglied & Taylor, 1978; Rutowski, 1981), in *Pieris melete* ed in *Colias philodice* utilizza l'odore del maschio (Taylor, 1978; Ohguchi, 1988) ed in *Eurema hecabe* il suo colore (Kobayashi et al., 2001). In queste specie di pieridi l'isolamento riproduttivo quindi sembrerebbe mediato dal riconoscimento del partner conspecifico da parte della femmina, ma in altre specie diversi sono i meccanismi evolutisi per ostacolare l'ibridazione tra due specie.

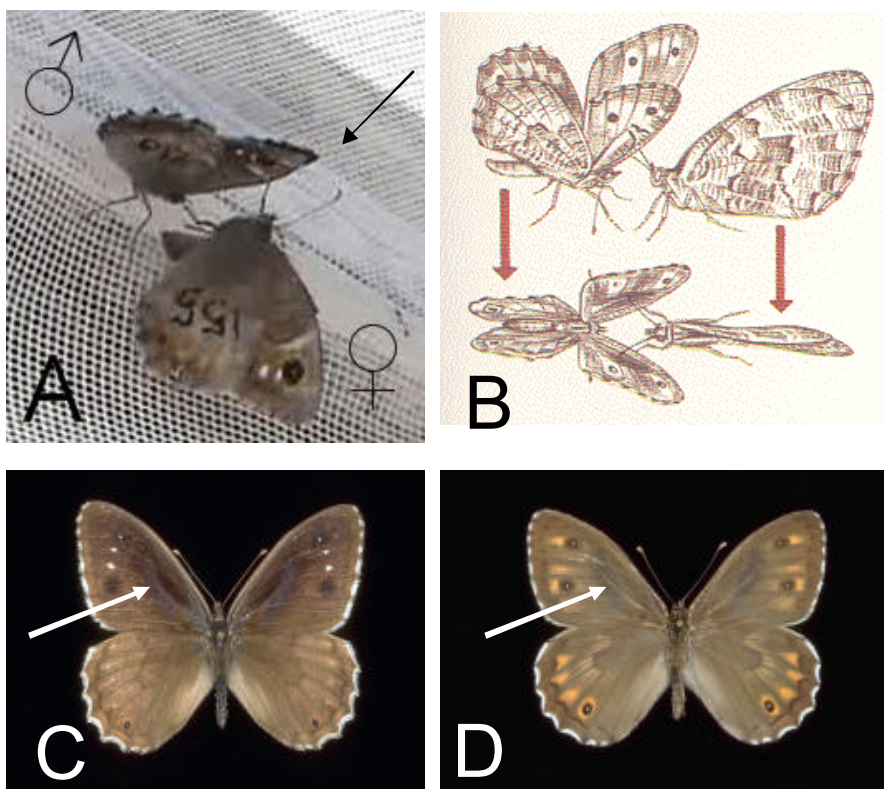


Figura 2 – Durante il corteggiamento il maschio cattura con le ali anteriori le antenne della femmina (A) in *Hipparchia statilinus* (Pinzari, 2009) ed (B) in *H. semele* (Tinbergen et al., 1941) tratto da disegno di Sbordoni e Forestiero (1984); in C e D, è possibile notare gli androconi nel disco cellulare delle ali anteriori in maschi di *H. statilinus* ed *H. semele*.

L'isolamento riproduttivo fra due specie è dovuto di norma ad un gran numero di meccanismi isolanti diversi, più o meno indipendenti gli uni dagli altri, e l'importanza relativa dei vari fattori cambia da un gruppo di specie all'altro. La riproduzione tra specie animali, soprattutto simpatiche e strettamente affini, è comunemente impedita da una serie di fattori ecologici, comportamentali e citogenetici, di solito numerosi per ogni coppia specifica. Tra i meccanismi di isolamento riproduttivo, quelli etologici, basati sul comportamento, costituiscono la classe più importante. Il funzionamento di tali meccanismi si basa essenzialmente sull'incompatibilità comportamentale dei segnali scambiati tra gli individui eterospecifici. In condizioni di allopatria specie strettamente affini possono permettersi di utilizzare segnali di corteggiamento più generali, aspecifici e variabili, mentre in condizioni di simpatria la non specificità dei segnali può portare alla diversificazione di atti di corteggiamento e di esibizioni sessuali articolate, anche laddove non vi sia alcuna ibridazione eterospecifica. In tali circostanze alla maggior precisione e differenziazione dei segnali mediate dalla scelta femminile corrispondono maggior vantaggi selettivi (reinforcement).

1.1.3 Il corteggiamento nei lepidotteri satirini (Satirinae, Nymphalidae)

I lavori disponibili in letteratura condotti sui satirini contribuiscono alla conoscenza soprattutto dell'ecologia e della sistematica delle specie studiate (Verity 1953; Kudrna 1977; Brakefield, 1982a, 1982b; Gotthard et al. 1999; Garcia-Barros 1989, 2000; Garcia-Barros and Martin 1995; Jutzeler et al. 1995, 1997; Jutzeler and Volpe 2001; Russell et al. 2004), tuttavia pochi descrivono in dettaglio il comportamento sessuale (Brussard and Ehrlich 1970; Robertson and Monteiro 2005; Nieberding et al. 2008).

Nei Satirini il comportamento riproduttivo è stato studiato in dettaglio da Niko Tinbergen (1941; 1972) in *Hipparchia semele* nei suoi diversi aspetti, dalla strategia di incontro tra i partner al corteggiamento. Recentemente ricerche sperimentali sono state condotte su altre specie congeneriche di *H. semele* (*H. statilinus*, *H. fagi* ed *H. alcyone*) ed anche in altri satirini contribuendo alla

conoscenza dei rituali di corteggiamento anche in queste specie (Pinzari, 2004). Nei due paragrafi seguenti sono illustrate sinteticamente le fasi principali del corteggiamento risultanti dalle due ricerche.

❖ Il corteggiamento in *Hipparchia semele* (L., 1758)

Il corteggiamento in *H. semele* è stato studiato da Tinbergen ed i suoi collaboratori durante osservazioni ed esperimenti sia in natura che in voliere di grandi dimensioni, costruite allo scopo (Tinbergen et al., 1942). Queste ricerche rivelarono in questa specie l'esistenza di un rituale molto articolato effettuato, dopo un breve inseguimento in volo, alla posa a terra.

Il maschio di *H. semele* si posa vicino, e di solito dietro, alla femmina, e poi procede con movimenti traballanti intorno ad essa fino a posizionarsi davanti a lei (*Circling*). Il corteggiamento reale inizia con un tremolio delle ali, il *Wing quivering*, in cui le ali anteriori del maschio vengono sollevate parecchie volte lentamente, poi velocemente chiuse ed abbassate. Ciascun movimento è sempre un po' più pronunciato del precedente ed avviene con i margini anteriori delle ali distesi ogni volta un poco più in avanti. Il *Wing quivering* viene seguito da due movimenti, che si verificano simultaneamente: lo sventolamento delle ali (*Fanning*) e la rotazione delle antenne (*Antenna spinning*). Nel *Fanning* le ali anteriori sono mantenute in una posizione sollevata ed i loro bordi apicali sono allontanati ed avvicinati aritmicamente velocemente. Durante il *Wing quivering*, le antenne del maschio sono protese orizzontalmente formando un angolo retto con l'asse longitudinale del corpo, ma non appena il *Wing quivering* si evolve nel *Fanning*, le antenne iniziano a compiere un movimento considerevole: tenute completamente rigide, esse compiono un movimento rapido conico descrivendo con le estremità clavate un cerchio (*Antenna spinning*). Entrambe le antenne si muovono in sincronia e nella stessa direzione, cioè indietro - in alto - in avanti - in sotto. Gradualmente il movimento circolare diviene ellittico con il suo asse longitudinale inclinato in avanti ed in alto formando un angolo di 45 gradi con il piano orizzontale. Il movimento verso il basso è chiaramente più veloce di quello verso l'alto. Inoltre le antenne sono gradualmente dirette in avanti. La durata del

Fanning delle ali e della rotazione delle antenne può durare da un secondo a parecchi minuti. L'ultima componente del corteggiamento è l'inchino (*Bowing*). In questo spettacolare display il maschio distende entrambe le paia di ali e porta le ali anteriori molto lontano in avanti così che esse siano completamente separate da quelle posteriori, allo stesso modo piuttosto sollevate. Una volta in questa posizione delle ali inclinata in avanti il maschio chiude le ali di nuovo estremamente lentamente. Nella maggior parte dei casi serra le antenne della femmina tra le proprie ali anteriori. Una volta chiuse le ali, esse vengono tese all'indietro. L'intero movimento dura circa un secondo ed è un perfetto ed elegante finale. Dopo l'inchino il maschio tenta di copulare. Il maschio realizza ciò mediante un movimento veloce laterale vicino alla femmina (*Copulation attempt*) e piega l'addome in avanti e di lato così che l'apparato copulatore sia puntato in avanti per essere agganciato ai genitali femminili (*Clasping*). Non appena il maschio si è attaccato saldamente alla femmina, ruota la parte anteriore del suo corpo fino a che l'intero corpo è di nuovo disteso e sullo stesso piano della femmina. I due animali poi si mantengono nella ben nota posizione copulatoria delle farfalle. Il tentativo di aggancio della femmina spesso segue immediatamente il primo inchino e la sequenza degli elementi del comportamento è di solito la seguente: *Circling*, *Wing quivering*, *Fanning*, *Antenna spinning*, *Bowing*, *Copulation attempt* e *Clasping*.

❖ Il corteggiamento in altre specie di satirini

Il rituale di corteggiamento è stato studiato in alcune specie di satirini in comparazione con *H. semele*, studiata da Tinbergen (1972). Le ricerche sono state condotte negli anni 2003-2004 in Italia sulle specie congeneriche *Hipparchia statilinus*, *H. fagi*, *H. alcyone* e su altri due taxa non affini, *Chazara briseis* e *Brintesia circe* ("Il comportamento riproduttivo nei lepidotteri: *Neohipparchia statilinus* e altri satiridi", Pinzari, 2004).

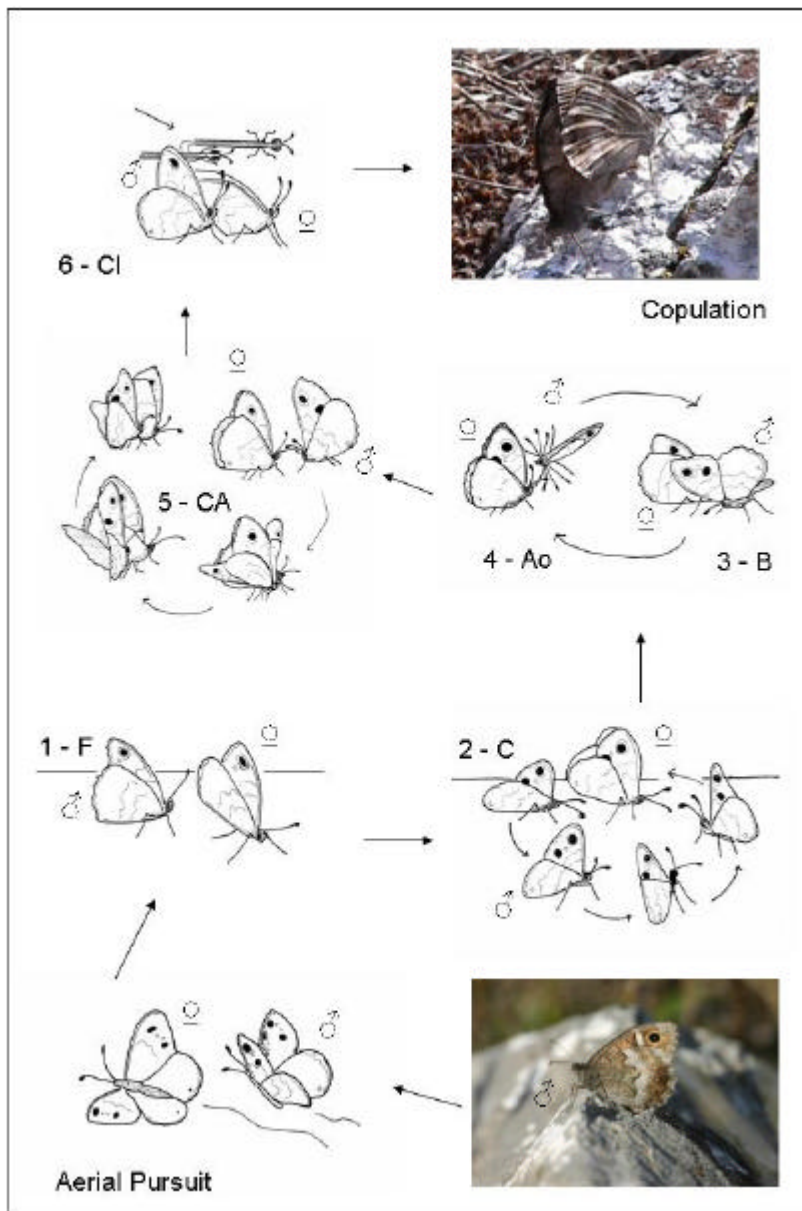



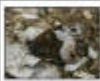



Figura 3 – Sequenza di corteggiamento in *H. statilinus* (Pinzari, 2009).

Le osservazioni, anche in tal caso svolte in natura ed in voliera, hanno evidenziato l'esistenza di un corteggiamento articolato in tutte le specie esaminate. Dal confronto dei rituali delle diverse specie, lo studio rivelò sequenze di corteggiamento comparabili, ma caratterizzate da differenze nell'esecuzione e nell'ordine dei moduli comportamentali comuni e, allo stesso tempo, da moduli esclusivi solo in *H. semele* e *C. briseis* (Figura 4). In Figura 3, è illustrato come esempio il corteggiamento in *H. statilinus* (Pinzari, 2009).

sequenza di corteggiamento

		C			F	An1	B	Ao	RHB	An2	CA	Cl	Cp
		C	Wq	Ao	F	As	B	Ao			CA	Cl	Cp
		F	C				B	Ao			CA	Cl	Cp
		F	C				B	?			CA	Cl	Cp
		?	C				B	?			CA	Cl	Cp
		F	C				B	Ao			CA	Cl	Cp

Hipparchia spp.

Figura 4 - Le sequenze di corteggiamento descritte nelle specie *Chazara briseis*, *Hipparchia semele*, *H. statilinus*, *H. fagi*, *H. alcyone* e *Brintesia circe* (dall'alto verso il basso) (Pinzari, 2004). I moduli della sequenza: F - Fanning; As - Antenna spinning; C - Circling; Wq - wing quivering; B - Bowing; An - Antenna movement; Ao - Antenna orientation; RHB - Repeated Half-bowings; CA - Copulation Attempt; Cl - Clasp; Cp - copula. I punti interrogativi indicano le fasi di corteggiamento dubbie negli studi condotti nel 2004.

In particolare, le differenze tra i rituali delle diverse specie si evidenziano soprattutto all'inizio delle sequenze di corteggiamento. In particolare il *Fanning* è il primo modulo della sequenza nelle specie *Hipparchia statilinus*, *H. fagi* e

Brintesia circe, è il terzo in *H. semele* ed è il secondo in *Chazara briseis* e sembra essere assente in *H. alcyone*. In tutte le sequenze il maschio con uno spostamento circolare (*Circling*) si pone frontale alla femmina. L'Inchino (*Bowing*), seppur diverso nelle modalità di esecuzione, è presente in tutte le sei specie. In quattro specie questo modulo è seguito dallo stesso movimento delle antenne (*Antenna orientation*) (Figura 4). Le antenne che normalmente sono orientate in avanti vengono portate indietro e poi di nuovo in avanti. Moduli esclusivi sono stati rilevati solo in alcune specie: *Wing quivering* in *H. semele* e *Repeated Half-Bowings* in *C. briseis*, (Figura 4). Altri movimenti delle antenne del maschio si rilevano associati ai singoli moduli delle sequenze, fortemente stereotipati e diversi nelle sei specie. In tutte le specie durante il *Bowing* i maschi afferrano con le ali anteriori le antenne della partner portandole probabilmente a contatto con gli androconi presenti sulle loro ali. In Figura 5 è possibile vedere la performance del maschio in *H. fagi*.

Nelle diverse specie inoltre lo studio ha fornito informazioni su altri aspetti comportamentali, come il comportamento di “rifiuto” delle femmine. Dal confronto dei corteggiamenti con e senza successo il comportamento della femmina sembra influenzare l'esecuzione delle azioni del maschio: l'immobilità della femmina è un segnale di consenso all'accoppiamento, mentre comportamenti di fuga e l'apertura delle ali sono segnali di “rifiuto”. Tali comportamenti interrompono ed ostacolano il corteggiamento scoraggiando il maschio.

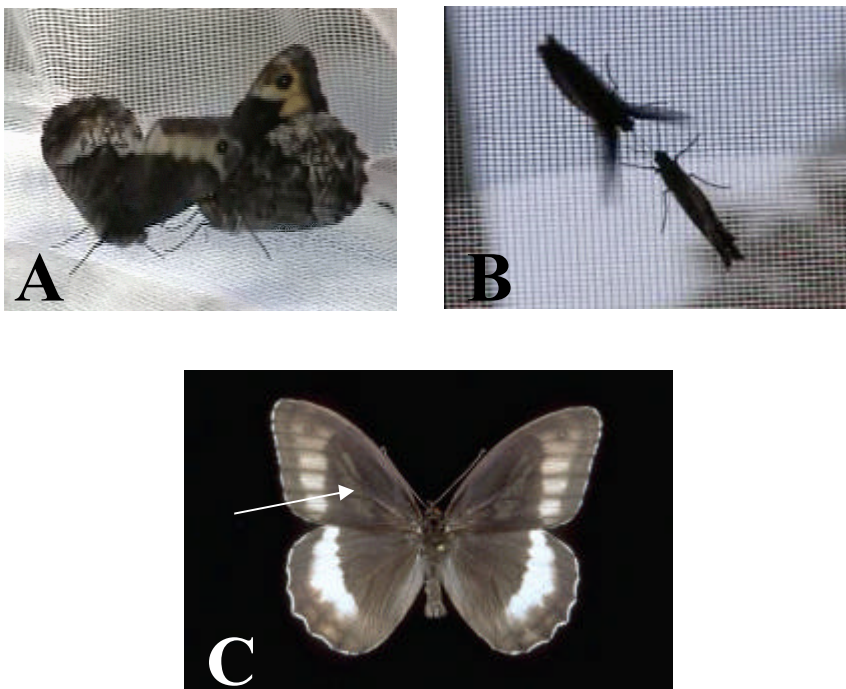


Figura 5 – Il Bowing in *H. fagi*: A, visione laterale; B, visione dall’alto (foto di Manuela Pinzari); C, androconi nel maschio di *H. fagi* (<http://www.ibc.regione.emilia-romagna.it/farnet/webroot/>).

1.1.4 Obiettivi della tesi

Questo lavoro di tesi ha l’obiettivo principale di approfondire lo studio del corteggiamento nelle due specie criptiche, *Hipparchia fagi* ed *H. alcyone*, in condizioni di simpatria e sintopia al fine di comprendere quali stimoli, visivo-comportamentali ed, in misura preliminare, chimici, caratterizzano i due taxa ed assicurano l’accoppiamento di individui conspecifici. Ai fini dello studio del corteggiamento in ciascuna specie si vuole caratterizzare qualitativamente e quantitativamente la struttura temporale del rituale e la sua composizione, nonché le dinamiche di interazione tra maschio e femmina. Inoltre lo studio si

propone di affrontare anche altri aspetti della biologia riproduttiva di queste specie, come il sistema nuziale e la durata degli accoppiamenti.

1.2 - Le specie oggetto di studio

Le specie oggetto di studio in questo lavoro sono parte di una grande sottofamiglia, Satyrinae (Fam. Nymphalidae), cosmopolita e particolarmente numerosa nelle regioni temperate del Vecchio Mondo ben rappresentata nelle regioni più calde d'Europa.

Le specie appartenenti a questo taxon presentano larve, che si nutrono di piante erbacee, e frequentano dai pascoli aperti, ai pendii delle montagne, alle radure dei boschi, ove le piante nutrici possono crescere abbondantemente. Le diverse specie nella fase adulta sono generalmente di medie dimensioni ed alcune sono tra le più grandi farfalle europee. Nonostante la sua vasta diffusione, la sottofamiglia dei Satirini mantiene un aspetto piuttosto omogeneo, con ali generalmente brunastre e varianti tra il nero, il fulvo ed il camoscio, ma bianche con disegni neri nel genere divergente *Melanargia*. Disegni tipici sono gli ocelli postdiscali, dei quali quello in s5 delle ali anteriori è particolarmente costante e spesso si trova all'interno di una macchia od una banda più chiara.

In Italia questo gruppo è rappresentato da circa 79 specie (Balletto & Cassulo, 1995); ed in particolare nell'Italia centrale circa 35 specie di Satirini (Prola et al, 1978), due delle quali, *Hipparchia fagi* (Scopoli, 1763) ed *H. alcyone* (D. & S., 1775), sono studiate in questa ricerca. *Hipparchia fagi* ed *H. alcyone* presentano un'area di distribuzione abbastanza sovrapposta ed è possibile rinvenirle in sintopia a certe altitudini (800 - 1000 m, Prola et al, 1978). Gli adulti mostrano lo stesso periodo di volo (luglio-agosto) e frequentano habitat simili, bosco e zone al margine di esso. *H. fagi* ed *H. alcyone* sono due specie criptiche, molto simili nel pattern alare con forme di transizione dall'una all'altra, talvolta di difficile determinazione (Verity, 1953). Di norma la specie *H. fagi* è di dimensioni maggiori ed in alcune popolazioni costituisce un carattere distintivo importante unito ad altre caratteristiche del pattern alare, ma la certezza della determinazione è assicurata solo da un esame delle strutture genitali femminili e maschili (Verity, 1953; Volpe & Jutzeler, 2001). In particolare, nei maschi è l'organo di Jullien, associato ai genitali, che permette la

distinzione netta delle due specie (Figura 7 e Figura 9), mentre nelle femmine è la forma dell'*ostium bursae*.

Le due specie sono state oggetto di revisione e di studio nel corso degli anni passati (Kudrna, 1977; Balletto & Cassulo, 1995; Karsholt & Razowski, 1996) e diversi lavori sono stati pubblicati allo scopo di definire i caratteri diagnostici per il riconoscimento delle due specie. I più recenti sono quelli relativi allo studio della morfologia delle larve e delle ali degli adulti condotto da Volpe e Jutzeler sulle due specie in Italia centrale (Volpe & Jutzeler, 2001; Jutzeler et al., 2002; Jutzeler et al., 2005; Jutzeler & Volpe, 2006).

In Tabella 1 sono indicati sinteticamente i caratteri distintivi esteriori evidenziati in letteratura, ma le variazioni sono numerose e nessun carattere è quindi veramente determinante.

Inoltre nei paragrafi seguenti sono esposte alcune note conoscitive essenziali sulle singole specie ed illustrati con foto gli stati preimaginali ed imaginali. Le foto di questo capitolo sono state effettuate da Manuela Pinzari e, quelle contrassegnate con un asterisco, sono prese dal sito internet della IBC della Regione Emilia Romagna avente titolo “Farfalle d’Italia e dell’Emilia Romagna” di Roberto Villa e Marco Pellecchia (<http://www.ibc.regione.emilia-romagna.it/farnet/webroot/>). Le immagini relative alla distribuzione delle specie sono tratte dall’opera Lepibase 2.0 in cd-rom di Antti Roine.

Tabella 1 – Scheda comparativa dei caratteri distintivi tra *H. fagi* ed *H. alcyone* (Higgins, 1970; Higgins & Riley, 1983; Leraut, 1990; Volpe & Jutzeler, 2001).

	<i>H. alcyone</i>	<i>H. fagi</i>
Ali, dimensioni.	Lunghezza di aa meno di 33 mm	Lunghezza di aa più di 33 mm
Ali, disegni e colore.	Margine superiore dell'area basale scura irregolare, con la protuberanza diretta al margine sopra l'angolo anale Fascia pd delle psaa nel M ben definita, giallastra Fascia pd delle piap nel M ampia, bianca e mai oscurata Fascia pd delle psaa nella F decisamente giallastra Fascia pd delle piap nella F di colore bianco vivo con macchie brune	Margine superiore dell'area basale scura quasi diritto o appena incurvato, con la protuberanza in n3 e 4 diretta vicino l'angolo anale Fascia pd delle psaa nel M velata e spolverata di scuro con intensità di colore più forte all'apice Fascia pd delle piap nel M bianca, ma quasi sempre con macchie parallele grigie Fascia pd delle psaa nella F bianca, o appena gialla vicino all'apice Fascia pd delle piap nella F fortemente punteggiata di macchie grigie parallele
Strutture genitali.	<i>Uncus</i> snello, gradualmente affusolato ed appuntito all'apice; <i>brachia</i> non lunghe né incurvate.	<i>Uncus</i> con lieve rigonfiamento centrale; <i>brachia</i> lunghe e fortemente incurvate.
Organo di Jullien.	<i>Lamellae</i> ben separate con 5-10 bastoncelli pigmentati piccoli su ciascun lato.	<i>Lamellae</i> sottili fortemente incurvate, ciascuna con 3-5 bastoncelli lunghi e snelli.

Legenda: aa = ali anteriori; pd = postdiscale; psaa = parti superiori delle ali anteriori; piap = parti inferiori delle ali posteriori; M, maschio; F, femmina.

1.2.1 *Hipparchia fagi* (Scopoli, 1763)

L'areale della specie va dalla Francia attraverso l'Europa ed i Balcani fino alla Russia meridionale (Figura 6). Manca nel nord-ovest della Francia, nel centro-sud della Spagna, nel Portogallo, nella Germania settentrionale, Fennoscandia ed isole mediterranee eccetto la Sicilia. E' presente in tutta l'Italia ad eccezione

della Sardegna e dell'Isola d'Elba. Nel centro Italia è abbastanza comune in pianura ed in collina e di solito non supera i 1200 m di altitudine (Prola et al., 1978).

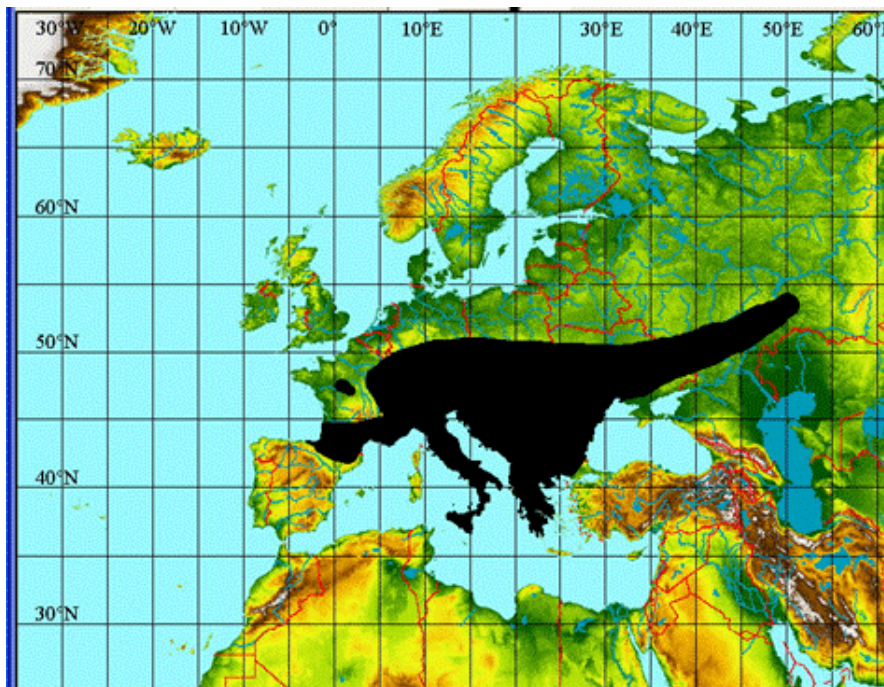


Figura 6 – Areale di *H. fagi*.
(immagine di Antti Roine)

L'uovo viene deposto sulle erbe secche singolarmente, di colore bianco alla deposizione, grigio chiaro poco prima della schiusa della larva.

La specie presenta cinque età larvali, la cui livrea è caratterizzata da un colore di fondo giallo-beige con linee e bande longitudinali bruno chiaro con macchie nere. Le larve si nutrono di diverse graminacee, specialmente Poaceae (Ackery, 1988) del genere *Holcus lanatus e mollis*, *Brachypodium ramosum e pinnatum* e *Festuca ovina* (Verity, 1953; Volpe & Jutzeler, 2001).

La crisalide è di colore bruno scuro con le pteroteche chiare (Verity, 1953) di dimensioni che oscillano tra 1,9-2,0 cm di lunghezza e 8-9 mm di larghezza, è obtecta, libera o interrata superficialmente nel suolo (Volpe & Jutzeler, 2001).

La specie ha una sola generazione e l'adulto, che vola in luglio-agosto, vive tra alberi e cespugli, ove spesso si posa a livello dei tronchi. L'adulto è molto simile a *H. alcyone* dalla quale si distingue a volte con difficoltà (Figura 7).



Figura 7 - *Hipparchia fagi* (Scopoli, 1763)

- 1) Uovo * ; 2) Larva stadio iniziale * ; 3) Larva matura * ; 4) Crisalide * ;
 - 5) Maschio Diritto; 6) M Rovescio; 7) Femmina Diritto; 8) F Rovescio ;
 - 9) M in natura ; 10) F in natura; 11) genitali del M *; 12) organo di Jullien *.
- (Foto senza asterisco Manuela Pinzari)

1.2.2 *Hipparchia alcyone* (Denis & Schiffermüller, 1775)

Questa specie, riportata in altre classificazioni come *Hipparchia hermione* (Kudrna, 1977), è presente in Europa con la sottospecie nominale ed in Marocco con la sottospecie *caroli* Rothschild 1933. Nell'Europa settentrionale è molto localizzata a basse altitudini; è comune in Spagna, Portogallo, Pirenei e Alpi occidentali, a partire da nord: Lituania, Norvegia meridionale, da est Slovacchia e Austria, ma non in Baviera, Ungheria, Alpi orientali, Dolomiti (Figura 8). Nell'Italia centrale è specie molto legata alle catene montuose ove è comune dai 1000 metri in su (Prola et al., 1978).

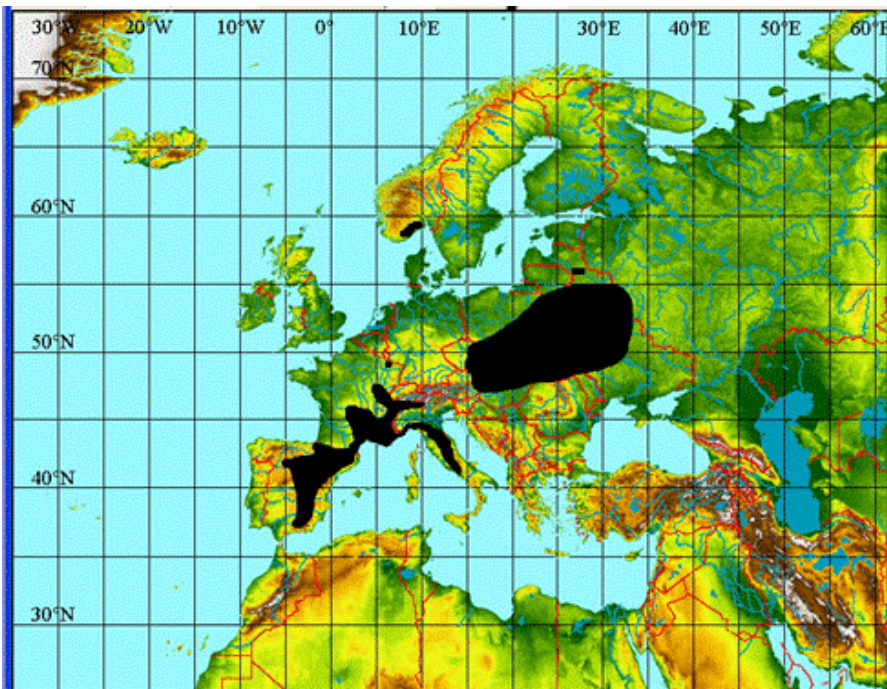


Figura 8 – Areale di *H. alcyone*.
(immagine di Antti Roine)

L'uovo viene deposto sulle erbe secche singolarmente ed è caratterizzato da nervature longitudinali e microstrutture micropilari. L'uovo di *alcyone* è più

grande che in *fagi* e con un numero di nervature maggiore (Volpe & Jutzeler, 2001).

Il bruco è simile a quello di *fagi* con bande subdorsali ed epistigmatali brune, ma con una linea dorsale nera lungo tutto il corpo. La larva si nutre di diverse graminacee, in particolare Poaceae del genere *Brachypodium*, *B. pinnatum*, *Festuca*, *F. ovina*, *Poa* sp.

La crisalide è di colore castagno uniforme e dimensioni tra 1,8-1,9 cm di lunghezza e 8-8,5 di larghezza. Essa giace in posizione orizzontale sotto detriti vegetali e sassi (Verity, 1953; Volpe & Jutzeler, 2001).

La specie ha una sola generazione e in luglio-agosto l'adulto frequenta le zone rocciose. Come già detto è molto simile ad *H.fagi*, ma è generalmente piccola (Figura 9).

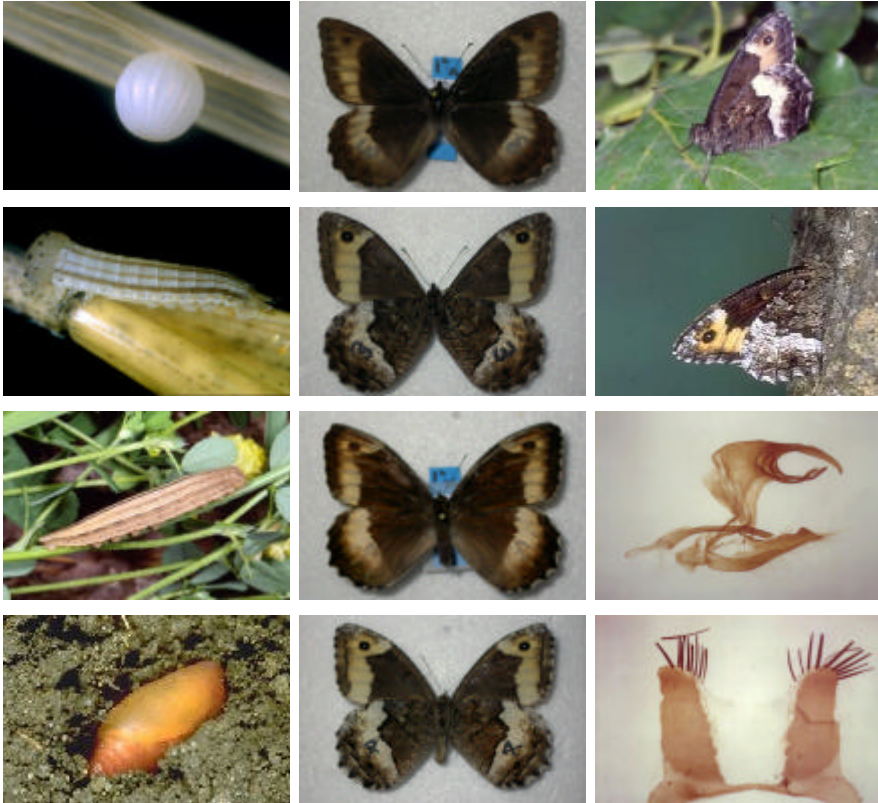


Figura 9- *Hipparchia alcyone* (Denis & Schiffermüller, 1775)

- 1) Uovo * ; 2) Larva Stadio iniziale * ; 3) Larva matura * ; 4) Crisalide * ;
 5) Maschio Diritto; 6) M Rovescio; 7) Femmina Diritto; 8) F Rovescio ; 9) M in
 natura; F in natura; 11) genitali del M*; 12) organo di Julien*.

(Foto senza asterisco Manuela Pinzari)

2. MATERIALI E METODI

2.1 - L'allevamento

2.1.1 Ragioni, vantaggi e svantaggi

Le ricerche condotte in passato sul comportamento riproduttivo in diverse specie di satirini avevano già evidenziato la difficoltà di registrare corteggiamenti e soprattutto con copula. In particolare nelle specie *H. fagi* ed *H. alcyone*, qui oggetto di studio, allora fu possibile osservare rispettivamente solo due e cinque corteggiamenti con copula in due stagioni estive consecutive (Pinzari, 2004). L'osservazione di pochi corteggiamenti con successo è legata alla difficoltà di catturare in natura femmine vergini per la loro probabile monandria come osservato in molte delle specie (Garcia-Barros, 2000).

L'allevamento quindi si è dimostrato l'unico mezzo per ottenere un campione di maschi e soprattutto di femmine vergini utile per lo studio del comportamento riproduttivo nelle specie esaminate. Un allevamento fornisce numerose informazioni sugli individui oggetto di osservazione, come l'età e lo stato riproduttivo, variabili che potrebbero essere molto importanti nella scelta del partner e difficilmente stimabili da individui catturati in natura. Inoltre garantisce la disponibilità di soggetti per lo studio in qualsiasi momento, senza dover affrontare il problema e la difficoltà del reperimento degli individui in natura.

Tuttavia è necessario tenere presente che la realizzazione di un allevamento di farfalle, soprattutto di specie monovoltine, come in questo caso, con l'obiettivo di ottenere dall'uovo un numero di adulti elevato non è facile. Un allevamento di questo tipo è rischioso ai fini di uno studio sugli adulti, perché richiede la pianificazione in estate, con la raccolta delle uova, per vederne i risultati solo l'anno seguente, le larve in primavera e gli adulti nell'estate successiva. Quindi, un allevamento non riuscito può inficiare tutto il piano di studi sul comportamento e determinare una pausa forzata degli esperimenti

nell'attesa della stagione riproduttiva di almeno un anno. Inoltre diverse sono le problematiche di allevamento legate al ciclo biologico di queste farfalle che si riflettono sulla possibilità di portare un individuo fino all'adulto. Un allevamento esige molto tempo per la gestione di tutte le fasi del ciclo biologico della farfalla. La fase più impegnativa è sicuramente quella dello stadio larvale ed è anche la più delicata per la buona riuscita dell'allevamento, perché molte larve non riescono a sopravvivere per cause sia naturali (morte non riuscite) che dovute alla cattività (muffe, funghi, ristagno di feci) riducendo così il numero di individui che potrebbero costituire nei mesi avanti il campione di adulti atteso per lo studio del comportamento sessuale. La fase degli adulti è la più sensibile ai cambiamenti repentini ambientali: una giornata troppo calda può causare la morte di molti individui tenuti in cattività senza un continuo controllo.

Ciononostante una volta portato a regime, il sistema di allevamento fornisce risultati eccellenti e si potrebbe ridurre i rischi di insuccesso e la mole di lavoro con l'impegno di più persone. Le due specie *H. fagi* ed *H. alcyone* sono state già allevate in cattività con successo da Guido Volpe e David Jutzeler (2001, 2002, 2005) per ricerche condotte ai fini sistematici sulla morfologia delle larve e degli adulti. Per l'allestimento dell'allevamento delle specie oggetto di studio si è fatto riferimento a questi e ad altre informazioni raccolte in letteratura (Zangheri, 1970), nonché ad una grande dose di inventiva per la risoluzione dei problemi via via manifestatisi.

L'allevamento pilota è partito nell'estate del 2005 ed è stato predisposto nuovamente l'anno successivo.

2.1.2 Condizioni ed attrezzature di allevamento

L'allevamento pilota è stato allestito nelle sue fasi iniziali, in quota 1000 m circa, nella località di provenienza (Figura 10) degli adulti usati per la raccolta delle uova. Nel mese di settembre una porzione dell'allevamento è stata lasciata in loco nelle condizioni ambientali naturali, una parte trasferita a Roma. Qui è stato collocato in una voliera per uccelli (2 x 5 x 2 metri) collocata nel giardino dei Laboratori di Ecologia Applicata ed Acquacoltura dell'Università di Roma Tor

Vergata. La posizione della voliera all'ombra di alberi d'alto fusto e circondata da siepi ha offerto all'allevamento un ambiente di sviluppo silvicolo abbastanza simile a quello in cui le specie oggetto di studio vivono (Figura 10).

L'allevamento realizzato il secondo anno invece è stato messo in opera direttamente a Roma nella voliera per uccelli. Le pareti di questa sono costituite da rete metallica e pannelli di plexiglas. La rete favorisce la circolazione dell'aria nel locale e quindi il mantenimento delle condizioni di temperatura ed umidità ambientali esterne e nel frattempo ostacola la fuga delle farfalle e l'entrata di possibili predatori, soprattutto di uccelli. Invece, i pannelli di plexiglas posizionati solo sul lato della voliera privo di vegetazione forniscono una protezione all'allevamento dalle piogge e dai forti venti. La voliera è composta da due vani separati con entrate indipendenti in cui in uno è stato alloggiato l'allevamento, nell'altro si sono svolte le diverse fasi di gestione dell'allevamento contenendo tutte le attrezzature di supporto (reti, paletti, vasi, sacchi di terriccio, etc.).



Figura 10 – Località di prelievo delle graminacee e degli adulti, Pineta di Borbona (RI).

2.1.3 Modalità di gestione degli stadi del ciclo biologico delle specie allevate

❖ Le piante alimentari e la deposizione delle uova

Nei mesi precedenti alla stagione riproduttiva delle farfalle sono state coltivate in vaso le piante nutritive delle larve necessarie anche per la deposizione delle uova. Nell'allevamento pilota, le graminacee messe a coltura provenivano da miscele di semi disponibili in commercio. Le miscele contenevano semi di diverse specie tra cui alcune appartenenti ai generi *Festuca* e *Poa*, indicati in letteratura come piante alimentari delle larve. In queste miscele le graminacee erano presenti nelle proporzioni seguenti: *Lolium perenne* L. (10%), *Festuca rubra* L. (30%), *Poa pratensis* L. (8%), *Agrostis tenuis* Sibth. (2%), *Festuca arundinacea* Schreb. (50%). In corso di allevamento le piante preparate risultarono inadatte ed insufficienti per sostenere il ritmo di alimentazione delle larve e fu necessario reperire altre piante. Diverse graminacee furono prelevate direttamente in natura con zolla e sottoposte alle larve. Le specie vegetali positive ai test alimentari sono state determinate dal dr. Valente (Botanico, Dip. Biologia Università di Tor Vergata) ed hanno costituito la fonte alimentare per l'allevamento (vedere nel par.0 in Risultati). Alla fase di preparazione del substrato di graminacee per l'allevamento è seguita quella di raccolta delle uova delle specie oggetto di studio. Per l'allevamento del 2005 sono state prelevate in natura, in luglio ed in agosto, con retino per farfalle, 56 femmine di *H. fagi* e 36 femmine di *H. alcyone*, mentre nel 2006 per il secondo allevamento 53 femmine di *H. fagi* e 31 femmine di *H. alcyone*.

Le femmine catturate sono state trattenute per una giornata in piccole gabbie in compagnia di maschi al fine di verificare il loro stato riproduttivo (vergine o fecondato) favorendo così l'accoppiamento delle femmine eventualmente vergini. In seguito esse sono state riunite in gabbiette per l'allevamento ai fini della deposizione delle uova (Figura 11.1 e Figura 11.2). Durante il periodo di ovideposizione le femmine sono state nutrite con

l'apposizione di spugne imbevute di una soluzione zuccherina (miele, acqua, succo di frutta, aceto) o di frutta marcescente (pesca, albicocca) sulle gabbiette per allevamento (Figura 11.3 e Figura 11.4).

Ciascuna gabbietta per allevamento era composta da un vaso, un sacco di rete e 3-4 paletti per il suo sostegno. Nel vaso sono state coltivate le graminacee su cui le femmine potevano deporre le uova e le larve alimentarsi. Il sacco di rete sostenuto dai paletti ricopriva il ciuffo d'erba delimitando uno spazio in cui le farfalle e le larve potessero muoversi abbastanza liberamente. La rete usata per il sacco è stata scelta diversa a seconda dello stadio del ciclo biologico, simile ad organza nella fase di ovideposizione e nelle prime età larvali (1-2 instar), una rete a maglia fine (2 mm) per le età larvali più avanzate (3-5 instar). La rete del sacco ha avuto la funzione principale di ostacolare la fuga delle femmine depositanti e delle larve poi schiuse, ma anche di impedire l'ingresso di predatori (ragni) e di insetti parassitoidi (imenotteri e ditteri). Sopra ciascun sacco delle gabbiette è stato applicato un cartellino che indicasse la specie, la località di provenienza delle uova e un numero progressivo identificativo della gabbietta.

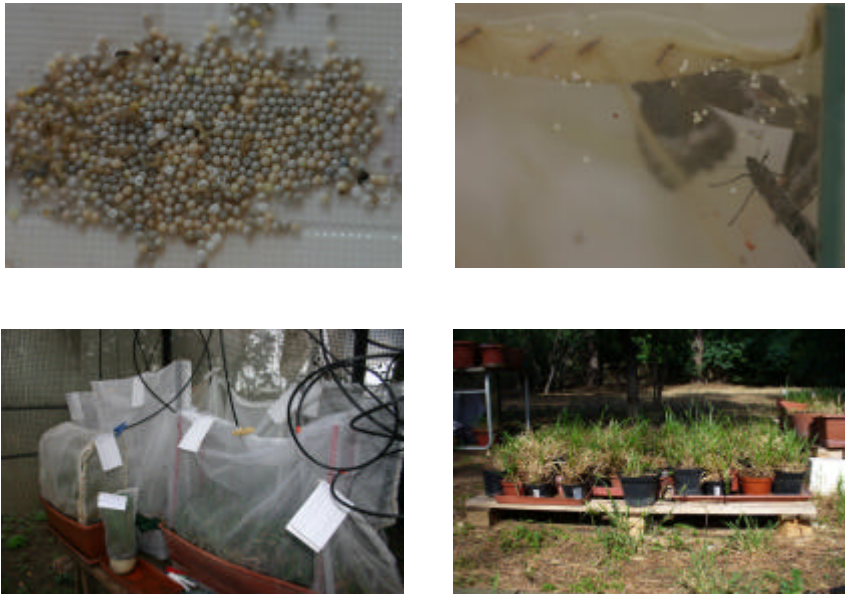


Figura 11 – Le fasi iniziali dell'allevamento, la raccolta delle uova:
 1 – Uova raccolte di *H. fagi*; 2 – Femmine di *H. alcyone* in cattività per la deposizione delle uova sulle piante nutrici; 3, 4 – Le gabbie di allevamento.

❖ Lo stadio larvale e le sue età

Nelle prime età larvali i piccoli bruchi non si alimentano molto e con l'arrivo dei primi freddi entrano nella diapausa invernale (Ekkehard, 1986). Quindi dopo la schiusa delle uova l'allevamento non ha richiesto un grande impegno di lavoro. Almeno una volta a settimana è stato effettuato un controllo finalizzato ad assicurarsi del buono stato delle piante alimentari. Invece nei mesi a ridosso del periodo previsto per l'interruzione della diapausa il controllo delle gabbiette è stato effettuato ogni tre giorni e via via con una frequenza maggiore.

Le larve dei satirini si nutrono di notte (Ekkehard, 1986) quindi per valutare il loro stato di diapausa, le gabbiette sono state controllate con metodi poco invasivi, al calar del sole, con l'uso di torce. Durante questi controlli essendo le larve piuttosto piccole e poco visibili si ricercavano segni di attività dei bruchi che potessero indicare una recente alimentazione. Quando ciò

avveniva la frequenza con cui si monitoravano le gabbiette aumentava di pari passo con il ciclo biologico delle larve in allevamento. Inizialmente sono state eseguite osservazioni solo serali, ogni tre giorni, successivamente è stato necessario compiere controlli più invasivi con manipolazione delle larve almeno una volta al giorno e sempre nella mattina, quando le larve sono inattive. Questa operazione è stata svolta allo scopo di verificare lo stato delle graminacee (verdi o secche), la disponibilità di vegetali per l'alimentazione delle larve, lo stato di igiene dei vasi (eccesso di feci, presenza di muffe), ma anche il successo dell'allevamento sulla base del numero delle larve rinvenuto di volta in volta. L'insufficienza di erbe segnalava la necessità di trasferire le larve in un'altra gabbia.

I bruchi sono stati spostati uno per volta ad un altro vaso contenente piante più rigogliose con l'aiuto di un cucchiaino e delle pinzette (Figura 13.3). Ogni volta che ciò veniva effettuato le larve venivano rimosse dalle piante, riposte in un recipiente di plastica e contate prima di essere trasferite al vaso nuovo. La data di controllo ed il numero di larve rilevato sono stati riportati sul cartellino applicato alla gabbietta, nonché su un diario di allevamento. Durante questa operazione è importante per la sopravvivenza delle larve non trasferirle in fase di muta e non afferrarle per la capsula cefalica.

I vasi sostituiti sono stati sempre collocati all'esterno della voliera per uccelli nel giardino antistante e una volta ricresciute le piante alla bisogna sono stati utilizzati nuovamente per alimentare le larve in allevamento in sostituzione di altri già consumati. Per evitare di usare questi vasi per una specie diversa, essi sono stati etichettati con cartellini che indicassero quale specie se ne fosse nutrita (A = *alcyone*; F = *fagi*) in precedenza.

❖ Le pupe

Allo scopo di ottenere adulti vergini per studiare il comportamento riproduttivo sarebbe stato ideale separare i maschi dalle femmine in allevamento in una fase del ciclo biologico antecedente l'adulto. I caratteri sessuali non sono osservabili nelle larve ed il sesso non è noto quindi prima dello sfarfallamento. Tuttavia in alcune specie di lepidotteri è possibile identificare il sesso di un individuo allo stadio di pupa o crisalide (Jacas & Garrido, 1996; Sanchez-Soto & Nakano, 2004; Genc, 2005; Leskey & Bergh, 2003). Proprio in una delle specie in studio, *Hipparchia alcyone*, i maschi possono essere distinti dalle femmine allo stadio di crisalide per la posizione della loro apertura genitale rispetto al margine posteriore dell'ottavo segmento addominale (Garcia-Barros, 1986). La possibilità di distinguere i sessi in questo stadio immobile del ciclo biologico avrebbe permesso di separare le pupe di maschi e femmine facilmente in due soli recipienti.

Nell'allevamento pilota le crisalidi di *H. fagi* (54 pupe) sono state esaminate allo stereoscopio (Tecnival 2) e disegnate in camera lucida (ingrandimento 1,6 x10) (Figura 12) per individuare i caratteri distintivi dei sessi anche in questa specie, come osservato in *alcyone* da Garcia-Barros (1986).



Figura 12 – Identificazione del sesso nelle pupe.

Alla luce del fatto che le caratteristiche diagnostiche sessuali non sono così inequivocabili e non volendo rischiare di collocare femmine nel recipiente dei maschi e perdere femmine per lo studio del comportamento sessuale, si è preferito procedere alla fine in un altro modo più impegnativo e laborioso, ma più efficace che è stato seguito anche nell'allevamento successivo.

In particolare si è scelto di isolare ciascuna crisalide dalle altre collocandola in un recipiente proprio. Però poiché le crisalidi sono formate nel terreno ed è difficile rintracciare le larve una volta interrate, questa scelta ha richiesto la realizzazione di un altro sistema sperimentale per consentire in condizioni controllate la transizione dallo stadio di larva di ultima età a quello di crisalide senza perderne traccia nel terreno. Quindi sono stati realizzati dei grandi recipienti cilindrici ($\varnothing = 20$ cm) con un sottovaso di fondo (Figura 13.2). Sul loro fondo è stato applicato uno strato di circa 3 cm di terriccio per consentire alle larve di impuparsi.

In questi recipienti sono state trasferite le larve di ultima età ove hanno completato la loro crescita ed effettuato la metamorfosi a crisalide. Le larve di ultima età raggiungono una lunghezza di circa 5 cm, quindi solo le larve più grandi venivano prelevate dalle gabbie di allevamento e trasferite in questi recipienti per anticipare il momento di transizione alla fase di crisalide.

Per valutare quali larve trasferire, durante i controlli e la sostituzione delle piante nutrici, nella gabbie di allevamento, le larve sono state anche misurate. Questa operazione è stata eseguita lasciando camminare le larve su un foglio di carta millimetrata su un piano orizzontale (Figura 13.5). Le larve della lunghezza di circa 3 cm sono state rimosse dalle gabbie e distribuite in questi nuovi contenitori (Figura 13.4). In ciascun recipiente sono stati collocati 10 bruchi al massimo ed applicato un cartellino con annotato la specie ed il numero delle larve presenti nonché altre informazioni utili (come la data di “scomparsa” ovvero di interrimento delle larve, una misura del numero delle pupe neoformate).

Per nutrire le larve in questa fase è stato inserito un piccolo vaso con le piante nutrici fresche (Figura 13.1) in ciascun recipiente. Il vaso di ciascuna

piantina, rivestito di tulle, lasciava fuoriuscire solo il ciuffo d'erba nella parte alta a cui le larve avevano libero accesso. In tal modo le larve potevano alimentarsi ed interrarsi per impuparsi solo nel terriccio esterno di fondo del recipiente (Figura 13.2). Ogni giorno ciascun cilindro è stato controllato, sono state contate le larve presenti ed è stato sostituito il vasetto d'erba.

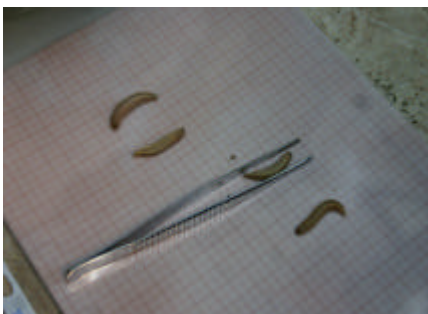


Figura 13 – Alcune delle fasi di gestione dell'allevamento: 1, 2 e 4, recipienti per le larve mature; 3, trasferimento e conta delle larve nella sostituzione del vasetto con le piante nutrici; 5 e 6, manipolazione delle larve mature per la misura della lunghezza.

Una volta interrate le larve, circa 4-5 giorni dopo, il terriccio è stato ispezionato delicatamente con un pennello e le pupe rinvenute trasferite in altri recipienti adeguati per la transizione da crisalide ad adulto, lo sfarfallamento. Questi recipienti sono stati concepiti tenendo presente la necessità degli adulti appena sfarfallati di assumere una posizione verticale per la distensione delle ali (forma cilindrica, $h = 20\text{ cm}$ $\varnothing = 10\text{ cm}$, di rete rigida plastificata a maglia fine, circa 2 mm). Questi cilindri sono stati inseriti e tenuti verticali nelle nicchie di alcuni vassoi (Figura 14.1) e sul loro fondo è stato riposto uno spessore di 3-4 cm di terriccio per accogliere le pupe. All'estremità libera dei cilindri è stata cucita una rete morbida, che consentisse la chiusura e l'apertura dei recipienti per la manipolazione degli adulti neosfarfallati. Le pupe sono state collocate una per cilindro, accompagnate da un cartellino identificativo e ricoperte da un centimetro circa di terra (Figura 14.3). Effettuata questa operazione per tutte le pupe si è atteso lo sfarfallamento. Allo scopo di impedire la disidratazione delle pupe il terriccio presente sul fondo di ciascun recipiente veniva inumidito mediante nebulizzazione di acqua ogni giorno e, nelle giornate calde, anche più volte al dì.



Figura 14 – 1, vassoio con nicchie per i cilindri di sfarfallamento; 2, cilindri di sfarfallamento; 3, cilindri di sfarfallamento inseriti nel vassoio con il fondo di terriccio; 4, cilindri di sfarfallamento contenenti le pupe.

❖ L'adulto

Le pupe sono state controllate ogni giorno in orari il più possibile mattutini (verso le 6.30 – 7.00) poi ogni ora fino a fine giornata nel tentativo di anticipare l'imprevedibile evento di sfarfallamento e di acquisire informazioni sulla fenologia dello sfarfallamento degli adulti.

Al ritrovamento di ciascun adulto sfarfallato, l'individuo è stato marcato sulla pagina inferiore delle ali posteriori con pennarello indelebile applicando una numerazione progressiva (Figura 15).

Per ciascun individuo si è annotato la specie, il numero di marcaggio attribuito, la data di sfarfallamento e l'orario di ritrovamento dell'individuo

sfarfallato, il sesso e qualsiasi altra informazione utile. Il marcaggio delle farfalle consente il riconoscimento degli individui successivamente durante le osservazioni sul comportamento riproduttivo.



Figura 15 – Adulti neosfarfallati di *H. alcyone*: 1 – femmina marcata 1; 2 – maschio sfarfallato male, con esuvia della pupa ancora attaccata all'addome.

Gli adulti neosfarfallati sono stati alloggiati in gabbie, separati per sesso, tenute a temperatura ambiente all'interno della voliera deputata all'allevamento (Figura 16.1 e Figura 16.2). In ciascuna gabbia l'acqua era sempre disponibile per le farfalle mediante un sistema di irrigazione a goccia, mentre la fonte di cibo veniva fornita mediante l'uso di spugne imbevute con una soluzione di acqua e miele oppure frutta marcescente (pesca, albicocche) giorno per giorno (Figura 16.2).

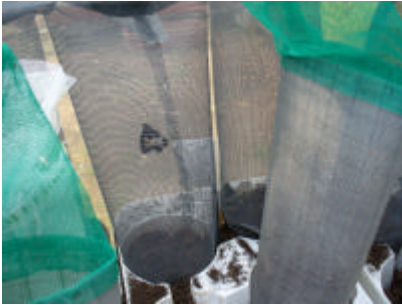


Figura 16 – 1, sfarfallamento degli adulti; 2, Nutrizione degli adulti nei cilindri di sfarfallamento; 3, Nutrizione degli adulti in voliera; 4, fonti alimentari per l'adulto.

2.2 - Lo studio del corteggiamento

2.2.1 Area e periodo di studio

Lo studio del corteggiamento nelle specie *Hipparchia fagi* ed *H. alcyone* è stato effettuato dal 15 luglio al 7 agosto del 2006 in natura, ove le due specie si trovano in sintopia, nei pressi della pineta (930 m) situata tra le località di Vallemare e Borbona (RI) nel Lazio. Data la pressoché nulla probabilità di osservare il corteggiamento di queste specie in natura e la difficoltà di seguire le interazioni tra maschio e femmina nei boschi (Figura 17), alle osservazioni in natura nello stesso periodo sono state affiancate osservazioni in cattività su individui selvatici provenienti dalla stessa zona. Successivamente si è preferito svolgere le osservazioni esclusivamente in cattività, all'interno di una voliera, e su individui di allevamento a causa anche della difficoltà di reperire quotidianamente individui per lo studio ed in particolar modo di femmine vergini.



Figura 17 - La Pineta: 1 - La pineta vista da lontano; 2 - L'ambiente della pineta; 3 - I tronchi irraggiati dal sole posatoi dei maschi; 4 - *Hipparchia alcyone* su tronco in riscaldamento; 5 - L'albero irrorato d'esca (a destra) ; 6 - Il tornante della strada SP16. (Foto Manuela Pinzari)

Quindi le osservazioni sono state realizzate in una voliera costruita presso i Laboratori di Ecologia sperimentale ed acquacoltura dell'Università di Roma Tor Vergata su individui ivi allevati. Le osservazioni sono state condotte dal 20 giugno al 10 luglio del 2006 su *Hipparchia fagi* e dal 30 maggio al 20 luglio su entrambe le specie *fagi* ed *alcyone* nell'anno seguente. Nella Tabella 2 sono evidenziate le quantità di individui delle diverse specie osservati ed i dati più significativi ottenuti in rapporto a quanto osservato in voliera.

Tabella 2 - Individui, rituali e copule osservati in voliera

Specie	Anno	Individui		Osservazioni	
		M	F	Rituali	Copule
<i>H. fagi</i>	2006 A	26	28	103	23
	2007 A	29	38	46	17
	2006 S	44	32	6	3
Totali		99	98	155	43
<i>H. alcyone</i>	2006 S	39	25	13	1
	2007 A	69	86	149	37
	Totali		108	111	162

M, maschi; F, femmine; A, individui allevati; S, individui selvatici.

2.2.2 La voliera

La voliera è stata realizzata modificando un gazebo da campeggio delle dimensioni di 300 x 200 cm di base ed 210 cm di altezza (Figura 18) e dal telaio di sostegno in acciaio. Il gazebo è stato adattato allo scopo forandone la copertura del soffitto e applicando su questo e sulle pareti una rete di colore bianco e di maglia di 2 mm circa. L'apertura praticata sulla copertura del soffitto

ha la funzione di garantire una buona illuminazione per la registrazione del comportamento ed al contempo le condizioni di irraggiamento necessarie per la termoregolazione delle farfalle. La scelta del colore della rete è stata ponderata ai fini della realizzazione di filmati, in quanto il bianco di fondo aumenta il contrasto con i colori delle farfalle durante le osservazioni. La maglia della rete scelta invece impedisce la fuga degli individui e l'entrata di altri insetti durante le osservazioni, ma nello stesso tempo consente il passaggio di aria e l'instaurarsi nella voliera di temperature idonee all'attività delle farfalle. Su un lato della voliera è stata realizzata un'apertura della rete per permettere l'entrata in voliera dell'operatore e facilmente delle attrezzature necessarie per le osservazioni. Questa apertura è caratterizzata da una regione di sovrapposizione del tessuto che fornisce una zona di transizione tra l'interno e l'esterno della voliera che ostacola la fuga dei lepidotteri durante l'entrata e l'uscita dalla gabbia in loro presenza.



Figura 18 – La voliera per le osservazioni sul corteggiamento in cattività.

2.2.3 Mezzi di registrazione: la telecamera

Tra i diversi mezzi utilizzabili per la registrazione delle osservazioni comportamentali si è optato per l'uso di filmati oltre che di descrizioni verbali a causa della rapidità e della complessità dei comportamenti delle farfalle. Sebbene tale mezzo richieda molto tempo sia in fase di registrazione, con tempi di

permanenza nella voliera elevati, che di analisi, con tempi lunghi per codificazione dei filmati, l'esperienza ha mostrato che l'uso dei filmati per questo tipo di studi è l'unico mezzo utilizzabile. I filmati forniscono una documentazione visiva esatta del comportamento e possono essere analizzati più volte, a diverse velocità fino all'analisi dei singoli fotogrammi.

Per la realizzazione dei filmati è stata utilizzata una telecamera digitale della Canon modello MVX1i. La telecamera ha un obiettivo con focale 1,6– 1,8, messa a fuoco TTL ed anche manuale, distanza di messa a fuoco minima di 1m, zoom ottico 10x e zoom digitale 40x/200x, un sensore di immagine CCD con 1,33 mega-pixel, uno stabilizzatore ottico, mirino di 0,55 pollici e pannello LCD di 2,5 pollici, uscita DV out, pacco batteria BP – 512 ricaricabile a ioni di litio con 1 h di autonomia. La telecamera è dotata diversi programmi di registrazione, che utilizzano diverse combinazioni di impostazioni, per motivi di praticità si è impostato il Program AE in modalità “auto” per le riprese in natura e in modalità “sport” per quelle in voliera. I filmati sono registrati su nastro in cassette Mini DV e poi riversati sul Personal Computer in formato digitale AVI attraverso il software Panasonic Motion DV Studio versione 3.5. Le registrazioni sono state montate rispettando la continuità della registrazione in filmati unici della durata di 1h circa ciascuno e compressi nel formato MPG1. La posizione della telecamera rispetto alle farfalle è stata mantenuta possibilmente a circa 1,5 m di distanza per consentire l'uso dello zoom ottico senza dover affrontare problemi di messa a fuoco, dato che la distanza di messa a fuoco minima della telecamera è di 1 m. La telecamera è stata collegata sempre alla rete elettrica per garantire l'autonomia di ripresa oltre la carica della batteria.

Nei tre anni di studio sono state realizzate rispettivamente circa 45 h di filmati su *H. fagi* e 30 h di filmati su *H. alcyone*.

2.2.4 Protocollo sperimentale nella voliera

Le osservazioni preliminari hanno portato alla scelta di effettuare le successive esclusivamente nella mattina, finché le temperature lo hanno permesso. Nel pomeriggio sono state eseguite osservazioni, tuttavia si sono rivelate poco

produttive, poiché gli individui erano attivi in una finestra temporale breve (dalle 16.00 - 18.00). Quindi, le sessioni di registrazione hanno avuto inizio intorno alle 7.30 - 8.00 e termine nell'orario in cui si osservava la completa inattività delle farfalle, che generalmente accadeva intorno alle 15.00. Gli orari di osservazione sono stati talvolta condizionati dal tempo meteorologico di ciascuna giornata: giornate con cielo coperto, con vento o particolarmente fredde non favorivano l'attività delle farfalle.

Per l'avvio delle sessioni di registrazione, in primo luogo venivano sistemati telecamera e materiali di supporto (cavalletto, termoigrometro, elenco degli individui e blocco per appunti), in secondo luogo le gabbie contenenti i maschi e le femmine da introdurre in voliera dopo averli nutriti. All'inizio di ogni periodo di osservazione ed ogni qualvolta è stato ritenuto necessario sono stati registrati sul nastro della telecamera appunti vocali relativi alla sessione di registrazione (il giorno corrente, l'orario di inizio e di fine, misure di temperatura ed umidità e note sulle condizioni meteorologiche) ed ai soggetti coinvolti (il numero di marcatura, il sesso, la data di sfarfallamento e lo stato riproduttivo, cioè se vergine, accoppiato una volta, due volte, etc.).

Gli individui sono stati introdotti in voliera cercando di riprodurre la situazione osservata in natura, dove i maschi sono presenti in gran numero posati sui tronchi d'albero ed attendono il passaggio della femmina. Quindi, in voliera sono stati introdotti un numero variabile di maschi (da due a cinque) e una femmina per volta. Questa modalità di rilascio aveva come obiettivo quello di riprendere un solo evento di corteggiamento e di copula per volta. L'introduzione di più maschi nella voliera aveva invece lo scopo di aumentare la possibilità di incontro tra i due sessi, ma innanzitutto di stimolare l'attività del singolo maschio con la presenza degli altri. Questo peraltro ha permesso anche di riprendere le interazioni fra maschi e la competizione per la femmina. Inizialmente i maschi sono stati prelevati a caso dalle gabbiette e liberati nella voliera, in seguito si è cercato con il procedere delle osservazioni di introdurre maschi di differenti età e "stato riproduttivo"(vergine, accoppiato 1 volta, A2,

A3) per offrire un ampio e variegato spettro di corteggiatori alle femmine così come probabilmente avviene in natura.



Figura 19 – Introduzione di una femmina in voliera

La femmina è stata introdotta rilasciandola delicatamente in volo al centro della voliera (Figura 19). Questo permetteva di simulare l'incontro tra i due sessi osservato in natura stimolando il volo di inseguimento della femmina da parte dei maschi e quindi l'interazione sessuale. Ogni qual volta la femmina si dimostrava non propensa alla copula, cioè si registravano comportamenti di nessuna interazione con i maschi o di ripetuto rifiuto (Tabella 3) del corteggiamento (Pinzari, 2004), veniva rimossa dalla voliera, reintrodotta nelle gabbie di trasporto e sostituita da un'altra femmina. Nei casi in cui il corteggiamento del maschio ha avuto successo con la formazione della copula, la coppia è stata lasciata nella voliera e al fine di prendere nota della sua durata si è attesa la conclusione dell'accoppiamento. A conclusione dell'accoppiamento i due individui sono stati separati ed isolati in gabbie più piccole per successive osservazioni in voliera. Le femmine accoppiate sono state trattenute in apposite gabbiette e nutrite al fine di ottenere le uova per l'allevamento. Alla fine della stagione degli esperimenti tutti gli individui studiati in voliera sono stati conservati per verifiche successive.

Tabella 3 – Etogramma dei comportamenti della femmina durante il corteggiamento nelle due specie oggetto di studio.

	<i>H. fagi</i>	<i>H. alcyone</i>
<i>Open wings</i>		
	La femmina spalanca le ali e le mantiene aperte a 180° orientando il proprio addome verso l'alto.	
<i>Escape</i>	Allontanamento della femmina dal sito di corteggiamento a piedi o in volo.	
<i>Flapping</i>	La femmina apre e chiude le ali	
<i>Standing</i>	La femmina è immobile con le ali chiuse in posizione di riposo.	

(Pinzari, 2004)

2.2.5 Metodi di campionamento e analisi della documentazione video

La raccolta dei dati comportamentali è stata realizzata adottando il metodo di campionamento comportamentale in registrazione continua. Questo metodo permette di osservare un intero gruppo di soggetti (nel mio caso la coppia, maschio e femmina) e di registrare non solo tutte le occorrenze di ciascun modulo comportamentale (frequenze), ma anche i tempi (durate), in cui tali occorrenze si sono verificate, fornendo una documentazione esatta e fedele di ciascun comportamento in esame. Il campionamento comportamentale viene infatti usato principalmente nella registrazione di tipi di comportamento significativi, ma rari, come conflitti ed accoppiamenti, ove è importante registrare ogni occorrenza, e nello studio delle sequenze comportamentali (Martin & Bateson, 1990). Il periodo di campionamento aveva principio quando iniziava l'interazione tra il maschio e la femmina. Il campionamento continuava finché la sequenza di interazione non terminava o non veniva interrotta, e il

successivo campionamento iniziava con un'altra sequenza di interazioni. Una sequenza di interazione veniva considerata terminata, quando gli individui erano lontani ed immobili (Altman, 1974). Il lancio manuale della femmina in volo forniva lo start per una sequenza di interazioni successiva.

I filmati sono stati visionati più volte con finalità diverse e propedeutiche alla raccolta dei dati comportamentali. Per visualizzare i filmati è stato utilizzato il software Adobe Premiere Pro 7.0, che consente di riprodurre i filmati a velocità diverse, anche fotogramma per fotogramma, e rende disponibili i tempi di inizio e di fine dei comportamenti necessari ai fini della loro misura.

L'osservazione preliminare dei filmati è stata finalizzata alla definizione delle categorie comportamentali da misurare, cioè alla distinzione di unità discrete inequivocabilmente riconoscibili tra loro nel flusso continuo di eventi che caratterizza il comportamento degli individui osservati (Martin & Bateson, 1990). In seguito ciascun file video è stato esaminato ancora riproducendo il filmato alla velocità effettiva allo scopo di registrare gli appunti verbali del nastro ed avere un'idea complessiva dell'interazione tra gli individui osservati. Infine la riproduzione dei video a velocità rallentata, fotogramma per fotogramma, è stata necessaria per la codificazione dei filmati (vedi più avanti).

❖ **Definizione delle categorie comportamentali**

Nel presente lavoro per le categorie comportamentali oggetto di misura si fa riferimento per ciascuna specie al repertorio comportamentale del maschio e della femmina descritto ne “Il comportamento riproduttivo di lepidotteri: *Neohipparchia statilinus* e altri Satiridi” (Pinzari, 2004). L'etogramma del corteggiamento è riportato brevemente nella Tabella 5 contenenti anche gli aggiornamenti apportati nel presente studio (indicati con un asterisco). I termini per indicare le diverse categorie comportamentali usati sono quelli adottati da Tinbergen (1941) per la descrizione del corteggiamento nella specie congenerica *Hipparchia semele* e da Pinzari (2009) in *Hipparchia statilinus*.

❖ Codificazione dei filmati

Con la realizzazione dei video, il processo di osservazione è stato quasi completamente sostituito dal filmato che ha richiesto di essere codificato successivamente. La codificazione dei filmati consiste nella trascrizione delle immagini dei filmati in misure quantitative correlate a categorie comportamentali specifiche per mezzo di annotazioni su protocolli sperimentali. E' un procedimento che richiede l'osservazione dei filmati, fotogramma per fotogramma, e quindi molto tempo: a pochi minuti di film possono corrispondere molte ore di analisi.

Tabella 4 - Esempio di protocollo sperimentale usato per la codificazione dei filmati.




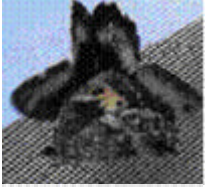
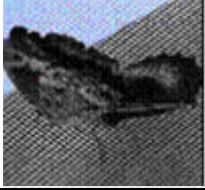

data	Maschi	Femmine	CTG code	Comp	Start	End
30/05/2007	M12	F13	A1	2F	00:17:36:20	00:18:29:10
30/05/2007	M12	F13	A1	2P	00:18:29:11	00:18:56:09
30/05/2007	M12	F13	A1	4B	00:18:56:10	00:18:56:14
30/05/2007	M12	F13	A1	5Ao	00:18:56:15	00:18:56:22
30/05/2007	M12	F13	A1	4B	00:18:56:23	00:18:57:01
30/05/2007	M12	F13	A1	1V	00:18:57:02	00:19:01:24
30/05/2007	M12	M9	A1	1S	00:19:02:00	-
30/05/2007	M8	F13	A2	3C	00:33:32:09	00:33:41:21
30/05/2007	M8	F13	A2	4B	00:33:41:22	00:33:42:02
30/05/2007	M8	F13	A2	5Ao	00:33:42:03	00:33:42:07

Comp, categorie comportamentali in misura: F, fanning; P, inseguimento a piedi; B, bowing; Ao, antenna orientation; V, inseguimento in volo; S, abbandono del corteggiamento. Nelle colonne Start ed End i tempi di inizio e di fine di un comportamento sono espressi in ore, minuti, secondi e venticinquesimi di secondo.

Per la codificazione dei filmati è stato generato un protocollo sperimentale organizzato in forma tabellare, in diversi file Microsoft excel (vedi esempio in Tabella 4), nel modo più adatto per essere analizzati al computer. Per facilitare la raccolta dei dati comportamentali e la successiva analisi a ciascuna categoria comportamentale e a ciascun corteggiamento è stato attribuito un codice alfanumerico. Nel foglio dati, nelle colonne sono state registrate per ciascuna delle categorie comportamentali (ogni riga) la data della sessione di

registrazione, il nome del file video, il numero di marcaggio del maschio e della femmina coinvolti nel corteggiamento, il codice identificativo del corteggiamento, il tempo di inizio e di fine del comportamento codificato. Nelle ultime due colonne a sinistra sono stati registrati anche quali comportamenti sono manifestati dalla femmina in reazione alle azioni del maschio e poi quali dal maschio in reazione alla femmina, nonché tutte le annotazioni utili per il riconoscimento del contesto, in cui si sono svolte le azioni. Le tabelle excel generate nella codificazione dei filmati sono state caricate su un database, che è stato interrogato attraverso la formulazione di query *ad hoc* per la verifica delle diverse ipotesi di studio producendo i campioni di dati da analizzare successivamente.

Tabella 5 - l'etogramma di corteggiamento nelle specie esaminate. (M, maschio, F, femmina)

	<i>H. fagi</i>	<i>H. alcyone</i>
<i>Fanning</i> (F)*	<p>Il M è dietro alla femmina, con le ali anteriori chiuse ed al di fuori delle posteriori, mostrano l'ocello apicale. In tale posizione il M apre e chiude le ali anteriori non oltre un paio di mm di distanza coinvolgendo in parte anche le ali posteriori che rimangono serrate. Il <i>fanning</i> appare complessivamente come una vibrazione delle ali del M. *Anche in <i>H. alcyone</i> è stato osservato.</p>  	
<i>Circling</i> (C)	<p>Dopo il <i>Fanning</i> il M effettua un semigiro sul fianco della F compiendo dei passi laterali ed in tal modo da una posizione posteriore si porta frontalmente ed allineato alla F.</p>  	
<i>Bowing</i> (B)	<p>Il M inchina il suo corpo anteriormente spingendo sulle zampe posteriori; nello stesso tempo porta completamente fuori dalle ali posteriori quelle anteriori, che apre e richiude avvolgendo il capo, le antenne e parte delle ali della femmina; il M richiude le ali anteriori solo dopo averle arretrate all'interno delle posteriori e conclude l'inchino con il ritorno ad una posizione sub-orizzontale del corpo.</p>  	
<i>Antenna Orientation</i> (Ao)*	<p>Durante l'inchino le antenne del M sono orientate in avanti; una volta completata questa azione il M, ancora frontale alla F e con le ali chiuse, porta le sue antenne dapprima indietro sul fianco delle ali e poi di nuovo in avanti. *Anche in <i>H. fagi</i> è stato identificato.</p>  	
<i>Copulation attempt</i> (CA)	<p>Il M ancora frontale alla F apre le ali e mantenendole tali in una posizione inchinata in avanti compie dei passi laterali e si porta di fianco alla F formando con le sue ali un ampio ventaglio; poi il M inserisce l'ala anteriore, che è a contatto col fianco della F, sotto quella posteriore di questa rivelandone l'addome. Il M si porta così dietro alla F, quasi allineato ad essa, ed inizia la fase successiva di <i>Clasping</i>.</p>  	
<i>Clasping</i> (Cl)	<p>Questa è la fase conclusiva del corteggiamento, in cui il M prende contatto con i genitali femminili. Ciò avviene mediante la flessione laterale e l'orientamento in avanti dell'addome del M e la presa tra gli elementi sclerotizzati genitali del M e quelli della F.</p>  	

2.2.6 Analisi dei dati comportamentali

Prima di procedere all'analisi dei dati comportamentali è stato necessario valutare la qualità dei filmati codificati e quindi dei dati raccolti. Questa operazione ha portato all'esclusione di molti dei rituali (Tabella 6) dall'analisi essenzialmente per motivi tecnici (cattiva qualità video per fuori fuoco, telecamera in errore) nonché per casi di discontinuità di registrazione (lunghi fuori campo con registrazione a corteggiamento già iniziato) e quindi del flusso naturale dei comportamenti non ammissibili per un'analisi delle sequenze. Quindi, dei 162 rituali osservati nella specie *Hipparchia alcyone* solo 105 sono stati analizzati. Invece nella specie *Hipparchia fagi* dei 155 registrati è stato possibile utilizzare solo 74 rituali per l'analisi dei dati comportamentali.

Tabella 6 – Campione di rituali utilizzati nell'analisi dei dati comportamentali.

Specie	Individui		Rituals					
			Osservati			Analizzati		
	M	F	S	U	Totale	S	U	Totale
<i>H. fagi</i>	16	26	43	112	155	20	54	74
<i>H. alcyone</i>	29	43	38	124	162	33	72	105

M, maschi; F, femmine; S, rituali con successo; U, rituali senza successo.

Per l'elaborazione dei dati, in ciascuna specie, la dimensione dei campioni varia nei diversi contesti di analisi per la verifica di ogni singola ipotesi, poiché a seconda dei casi è stato possibile considerare un numero più o meno maggiore di osservazioni, di corteggiamenti o di maschi. Il corteggiamento è stato analizzato per ciascuna specie su tre livelli principali: 1) il singolo modulo comportamentale, ovvero ciascuna categoria comportamentale parte della sequenza di corteggiamento; 2) la sequenza di corteggiamento, cioè la successione dei moduli comportamentali; 3) il rituale nel suo complesso, inteso come l'interazione continuativa dall'inizio alla fine tra un maschio ed una femmina in tutte le sue azioni. Su tutti e tre i livelli di analisi i rituali sono stati

anche esaminati distinguendo a seconda del loro esito in corteggiamenti con successo (con copula) e senza successo (senza copula).

La scelta della statistica da utilizzare è stata valutata caso per caso. La maggior parte delle volte si è fatto ricorso alla non parametrica, perché ritenuta più adeguata a dati comportamentali (Gravetter & Wallnau, 1996). La media viene riportata con il suo valore di deviazione standard, mentre la mediana sempre con i valori di minimo e di massimo. I dati comportamentali sono stati analizzati con il software, STATISTICA, versione 6.0.

2.2.6.1 Definizione della sequenza di corteggiamento

❖ Analisi markoviana delle sequenze

Allo scopo di descrivere quantitativamente il rituale sessuale nelle specie *H. fagi* ed *H. alcyone* la sequenza comportamentale di corteggiamento è stata descritta attraverso un'analisi delle sequenze di tipo probabilistico secondo il modello a catena di Markov. Il modello markoviano è un metodo di analisi molto utilizzato nello studio delle sequenze comportamentali ed è stato applicato in diverse specie animali (Haccou & Meelis, 1992). La sua applicazione per lo studio della struttura temporale alle sequenze comportamentali, soprattutto interattive, come in questo studio, consente di evidenziare la presenza di fenomeni comunicativi e di formulare ipotesi plausibili circa il significato di un comportamento (Mainardi, 1992). Secondo questo modello il comportamento animale viene considerato come un insieme di azioni concatenate tra loro in modo non casuale, ma organizzate secondo schemi riconoscibili. Il corteggiamento può essere assimilato ad una catena markoviana di primo ordine, in cui gli eventi futuri dipendono secondo un certo ordine da quelli che li hanno preceduti. Ad ogni transizione da un evento all'altro può essere attribuito un valore di probabilità (frequenza di transizione).

In questo studio sono stati considerati nell'analisi markoviana sia i moduli comportamentali del corteggiamento che alcuni comportamenti manifestati dal maschio nell'interazione della femmina, quali lo stato di

immobilità (I), l'inseguimento a piedi (P) ed in volo (V) della femmina. Ai fini dell'analisi inoltre sono stati esaminati anche l'evento di copula (Cp) e l'abbandono da parte del maschio del corteggiamento (Stop, S) per tenere conto delle transizioni verso esiti positivi o negativi del corteggiamento.

Per procedere all'analisi delle sequenze in primo luogo sono state costruite delle tabelle in cui sono state riportate le occorrenze delle transizioni, cioè il numero di volte in cui una unità di analisi (per es. categoria A) segue l'altra (per es. categoria B). Successivamente, le occorrenze delle transizioni sono state trasformate in valori di probabilità, le frequenze di transizione. Ad ogni transizione da una categoria comportamentale all'altra corrisponde un valore di probabilità (frequenza di transizione, F) (Curkovic et al., 2006). Ciascuna frequenza di transizione è stata calcolata come il rapporto tra il numero di volte osservato che una data categoria comportamentale A transisce ad un'altra B e il numero totale di volte che A occorre come primo modulo della transizione. Le frequenze di transizione sono state calcolate in tutti i corteggiamenti registrati per ciascuna categoria comportamentale in ognuna delle specie esaminate specie.

I risultati di questa analisi vengono rappresentati graficamente attraverso cinetogrammi (Wood et al., 1980; Liimatainen et al., 1992; Nieberding et al., 2008). Nel cinetogramma di ciascuna specie, i moduli comportamentali del corteggiamento sono stati raffigurati con poligoni ovali, mentre gli altri comportamenti non appartenenti al corteggiamento con quadrati. Le transizioni da un evento all'altro sono indicate da frecce a cui sono state associate le rispettive frequenze di transizione espresse in percentuale. Tutte le frequenze di transizione calcolate sono riportate in appendice, ma nel cinetogramma per motivi grafici sono mostrate solo quelle maggiori del 5%. La sequenza di corteggiamento è definita dal percorso individuato dai valori maggiori di probabilità in uscita da ciascun modulo senza considerare i valori di loop.

❖ Ordine dei moduli e loro associazione

Data la complessità delle interazioni di corteggiamento osservata, allo scopo di evidenziare la non casualità delle azioni eseguite dal maschio le sequenze comportamentali sono state analizzate anche tenendo conto della posizione dei singoli moduli nella sequenza di corteggiamento (F,C,B,Ao,CA,Cl) e della lunghezza della sequenza esaminata. Quindi, è stata costruita una matrice (Tabella 7) per ciascuna specie in cui nelle colonne sono stati indicati i moduli comportamentali e la loro posizione normalizzata sulla lunghezza della sequenza, mentre nelle righe le singole sequenze analizzate, ciascuna identificata da un codice corteggiamento (una lettera dell'alfabeto) e un codice sequenza (numero arabo). I valori riportati nelle celle sono risultato del rapporto tra la posizione del modulo considerato nella sequenza (per es. 1 se il modulo è il primo ad essere eseguito) e la lunghezza della sequenza, espressa come il numero totale di moduli costitutivi della sequenza esaminata (per es. 5 se cinque sono i moduli costituiscono quella data sequenza). Laddove alcuni comportamenti sono ripetuti all'interno della sequenza di corteggiamento il rapporto posizione/lunghezza è stato calcolato utilizzando la media delle posizioni di quel dato modulo nella sequenza (vedi il caso dei moduli B ed Ao in Tabella 7). Per ciascun modulo (colonna) sono state calcolate: media e deviazione standard.

Questa analisi dà una misura della non casualità dell'occorrenza dei diversi comportamenti all'interno del rituale di corteggiamento sulla base del fatto che se esiste un ordine le medie dovrebbero essere crescenti e presentarsi nel modo seguente $F < C < B < Ao < CA < Cl$. Le medie sono state confrontate con test t di Student per dati accoppiati fornendo la significatività statistica alle differenze evidenziate tra un modulo ed il successivo. Per semplicità questa analisi verrà indicata successivamente nell'illustrazione dei risultati "analisi dei rapporti posizione/lunghezza".

Invece il grado di associazione tra i moduli della sequenza e quindi la dipendenza stretta di un modulo dai precedenti è stata dimostrata attraverso

un'analisi che, a differenza dell'analisi markoviana, prende in considerazione i moduli precedenti invece dei seguenti.

Tabella 7 – Esempio parziale della matrice dei dati usata per lo studio dell'ordine e dell'associazione dei moduli della sequenza.

Ctg/seq code	F	C	B	Ao	CA	Cl
A-4	1/23	-	$\frac{(2+4+6+8+10+12+14+16+18+20)/10}{23}$	$\frac{(3+5+7+9+11+13+15+17+19+21)/10}{23}$	22/23	23/23
A-5	-	1/19	$\frac{(2+4+6+8+10+12+14+16)/8}{19}$	$\frac{(3+5+7+9+11+13+15+17)/8}{19}$	18/19	19/19
A-6	-	1/21	$\frac{(2+4+6+8+10+12+14+16+18)/9}{21}$	$\frac{(3+5+7+9+11+13+15+17+19)/9}{21}$	20/21	21/21

Ctg/seq code, codice di corteggiamento e sequenza; i moduli della sequenza di corteggiamento: F, fanning; C, circling; B, bowing; Ao, antenna orientation; CA, Copulation attempt; Cl, clasping.

Questa analisi si basa sul concetto di sequenza deterministica secondo cui un modulo comportamentale “Y” non può che essere preceduto sempre dallo stesso modulo “X”. Essa consiste nel calcolo della probabilità che un modulo “Y” sia preceduto da un altro “X” come il rapporto tra il numero di volte che il modulo “Y” è preceduto da “X” ed il numero totale di volte che “Y” è preceduto da tutti i moduli. Il risultato teorico che si attende da tale analisi è che se la sequenza di corteggiamento è vera ciascun modulo comportamentale deve essere preceduto da un altro preciso modulo con una probabilità del 100%. Con l'obiettivo di valutare se l'evento di copula avviene solo dopo l'esecuzione di tutta la sequenza, si è scelto di considerare anche l'accoppiamento in questa analisi. Inoltre è stata inclusa anche la categoria virtuale “start” per stimare la probabilità che un modulo fosse il primo ad essere eseguito in una sequenza. I risultati di

questa analisi sono illustrati schematicamente in disegni per ciascuna specie (vedi cap.5 Figura 35 e Figura 47 nel). Nei disegni i moduli della sequenza di corteggiamento sono rappresentati da rettangoli con ascritte le diverse categorie comportamentali in sigle, *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl). I moduli sono collegati da frecce che si dipartono da ciascun rettangolo verso altri precedenti. A ciascuna freccia è associato un cerchio in cui sono riportate le frequenze osservate per ciascun modulo in valore assoluto (metà superiore) ed in percentuale (metà inferiore). Per semplicità questa analisi verrà indicata successivamente nell'illustrazione dei risultati "analisi delle precedenze".

2.2.6.2 Studio della composizione dei rituali

❖ Analisi "fine-inizio sequenza"

L'osservazione preliminare dei rituali aveva già messo in evidenza delle differenze macroscopiche sulla successione degli eventi di corteggiamento: rituali molto lunghi e rituali molto brevi. Allo scopo di approfondire quindi l'interazione tra maschio e femmina, ciascun rituale è stato esaminato nuovamente sulla base della sequenza individuata (F,C,B,Ao,CA,Cl) nelle precedenti analisi. Senza tenere conto del numero delle occorrenze dei moduli nella sequenza, i rituali sono stati separati in unità di sequenza (o frammenti di essa) componenti (vedi i dettagli in Risultati) secondo le seguenti modalità. Data la sequenza 1, gli eventi successivi sono considerati appartenenti ad una nuova sequenza, la sequenza 2, se la sequenza 1 è completa (F,C,B,Ao,CA,Cl) o nel caso di sequenze frammentarie se un modulo della sequenza è seguito da comportamenti del maschio non appartenenti al corteggiamento, come l'inseguimento in volo (V) o a piedi (P) della femmina, che ne interrompono l'esecuzione. Moduli uguali e contigui sono stati considerati parte della stessa sequenza. Una volta individuate le sequenze costituenti ciascun rituale, sono state contate le transizioni dall'ultimo modulo di una sequenza a quello iniziale della sequenza successiva allo scopo di esaminare se il maschio segue o meno

uno schema fisso nella interazione con la partner. I risultati per ciascuna specie sono stati rappresentati schematicamente in rappresentazioni grafiche realizzate *ad hoc* (Figura 36 e Figura 48 nel Cap.5 dei risultati).

2.2.6.3 Analisi dei moduli comportamentali

Ai fini della descrizione del rituale specifico e della comprensione delle differenze tra le specie esaminate, la sequenza di corteggiamento è stata esaminata nelle sue componenti unitarie, i moduli comportamentali. In particolare per ciascun modulo sono state compiute due tipi di misure di comportamento, il numero di occorrenze nella sequenza ($O_{\text{modulo, sequenza}}$) e la durata (d_{modulo}). In questa analisi sono state considerate tutte le sequenze di corteggiamento frammentarie e complete. L'analisi statistica è stata realizzata distinguendo e confrontando i dati tra i corteggiamenti con e senza successo allo scopo di evidenziare differenze legate al successo dei corteggiamenti con test U di Mann-Whitney.

❖ Numero di occorrenze nella sequenza

Il $O_{\text{modulo, sequenza}}$ è dato dal numero totale di volte che il maschio effettua un modulo nella sequenza di corteggiamento. Quindi per esempio per la sequenza 1 completa "F-C-B-Ao-B-Ao-B-Ao-B-Ao-CA-Cl" il maschio ha eseguito una sola volta il *Fanning* ($O_{F,1} = 1$), il *Circling* ($O_{C,1} = 1$), il *Copulation attempt* ($O_{CA,1} = 1$) ed il *Clasping* ($O_{Cl,1} = 1$), infine quattro volte il *Bowing* ($O_{B,1} = 4$) e l'*Antenna orientation* ($O_{Ao,1} = 4$). Data l'esistenza anche di sequenze frammentarie il numero dei campioni non coincide con il numero di sequenze, ma varia da modulo a modulo ed il valore medio di O_{modulo} è stato calcolato ovviamente solo sulle sequenze in cui il modulo è stato osservato.

❖ Durata del singolo modulo

La d_{modulo} è stata calcolata per differenza dai tempi di inizio e di fine di ciascun modulo registrati durante la codificazione dei filmati. Questa misura è stata realizzata facilmente, poiché ciascun modulo comportamentale è un'entità

discreta che non si sovrappone con gli altri. Tuttavia mentre per i moduli *Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation* e *Copulation attempt* il tempo di fine del comportamento è individuabile sulla base della definizione di ciascuna categoria comportamentale, per il *Clasping*, modulo conclusivo della sequenza, è stato necessario definire quando questo comportamento ha termine nei corteggiamenti con e senza successo ai fini della misurazione della sua durata. In particolare il *Clasping* ha inizio con la flessione dell'addome ed il suo inserimento tra le ali della femmina per avere accesso ai genitali femminili, ma ha termine nei corteggiamenti con successo con l'inizio della copula, mentre nei corteggiamenti senza successo con il ritorno dell'addome nella posizione naturale, tra le ali posteriori del maschio.

2.2.6.4 Studio del Bowing

❖ **Durata del singolo Bowing (d_B), durata totale dei Bowing ($D_{B,s}$) e frequenza del Bowing nella sequenza ($f_{B,s}$)**

Alla luce dei risultati ottenuti nelle analisi di definizione della sequenza di corteggiamento (vedi i dettagli in Risultati), per l'esame dei moduli comportamentali è stato approfondito lo studio del *Bowing* in ciascuna specie. In particolare è stata misurata la frequenza del *Bowing* ($f_{B,s}$), cioè il numero di occorrenze di questo modulo nell'unità di tempo (secondi). Per ciascuna sequenza f_B è stata calcolata come il rapporto tra le grandezze $O_{B,s}$ e $D_{B,s}$. La prima è stata già definita in precedenza (par.2.2.6.3, Tabella 8), la seconda $D_{B,s}$ è una grandezza derivata, data dalla somma delle durate ($d_{B,n}$) di tutti i *Bowing* (n) presenti in ciascuna sequenza (s).

Tabella 8 – Specchietto riassuntivo delle grandezze misurate nello studio del *Bowing*.

Grandezze misurate	Formule
Durata totale dei <i>Bowing</i> nella sequenza	$D_{B,s} = \sum d_{B,i,s} , \quad i = 1,2,..n$
Numero di occorrenze del <i>Bowing</i> nella sequenza	$O_{B,s} = \sum o_{B,s}$
Frequenza del <i>Bowing</i> nella sequenza	$f_{B,s} = O_{B,s}/D_{B,s}$

B, Bowing;; s, sequenza, d, durata, o, occorrenza

Al fine di valutare se le sequenze frammentarie potessero mascherare le informazioni ricercate le misure O_B , d_B e $f_{B,s}$ sono state analizzate distinguendo i campioni di dati in quattro classi: tutte le sequenze registrate (frammentarie e complete insieme), solo le sequenze complete, le sequenze complete con e senza copula (Tabella 9).

Tabella 9 – le sequenze di corteggiamento considerate complete alla luce dell’analisi markoviana e delle “precedenze”.

	Senza copula	Con copula
Sequenze complete	F-C-B-Ao-CA-Cl	F-C-B-Ao-CA-Cl-Cp
	F-B-Ao-CA-Cl	F-B-Ao-CA-Cl-Cp
	C-F-B-Ao-CA-Cl	C-F-B-Ao-CA-Cl-Cp
	C-B-Ao-CA-Cl	C-B-Ao-CA-Cl-Cp
	B-Ao-CA-Cl	B-Ao-CA-Cl-Cp

Dettagli sono illustrati nei Risultati al par.3.2.2.

2.3 - Aspetti della biologia riproduttiva nelle specie esaminate

2.3.1 La copula

I corteggiamenti che hanno avuto successo hanno ottenuto l'accoppiamento con la femmina, la copula. In questi casi al fine di misurare la durata di questo evento la coppia è stata lasciata nella voliera dopo la formazione della copula e si è attesa la sua conclusione, rappresentata dal distacco dei due individui. Per ciascuna coppia in copula sono state annotate le seguenti informazioni: la data di osservazione dell'evento, il numero di marcaggio e la specie degli individui coinvolti, l'orario di inizio e di fine dell'accoppiamento (in ore e minuti). Per ogni specie è stata effettuata la statistica descrittiva delle durate delle copule. In una prima analisi la durata media delle copule è stata determinata considerando tutte le copule osservate includendo anche dati raccolti negli anni precedenti al dottorato 2003-2005 (Pinzari, 2004). Successivamente, poiché lo studio delle durate delle copule che coinvolgevano individui di allevamento ha evidenziato una variabilità apparentemente legata all'individuo, si è preferito analizzare le durate di queste copule separatamente da quelle che coinvolgevano individui catturati in natura.

2.3.2 Metodi per la determinazione del sistema nuziale nei lepidotteri

La maggior parte degli studi documentati in letteratura per la determinazione dei sistemi nuziali nelle farfalle prevede osservazioni dirette in natura, esperimenti in laboratorio con individui catturati o misure indirette mediante dissezione soprattutto di femmine (Drummond, 1984).

Le osservazioni in natura compiute in passato (Pinzari, 2004) sulle specie oggetto di studio avevano evidenziato la difficoltà di seguire queste farfalle silvicole durante gli inseguimenti ed i corteggiamenti spesso effettuati ad altezze elevate e tra le chiome degli alberi. In virtù di ciò in questo studio il sistema nuziale è stato stabilito mediante la combinazione di due metodologie: la conta delle spermatofore negli addomi delle femmine di popolazioni naturali

(Lederhouse et al.,1989) ed osservazioni sul comportamento di maschi e femmine di allevamento in condizioni di cattività (Lauwers & Van Dyck, 2006).

La conta delle spermatofore si basa sull'assunto che un maschio durante la copula trasferisca una spermatofora alla femmina, che l'inseminazione della femmina richieda la presenza della spermatofora e che la spermatofora persista in una forma riconoscibile nel *corpus bursae* (o bursa copulatrice) della femmina. La presenza di una o più spermatofore nel *corpus bursae* consente di valutare il numero di volte che la femmina si è accoppiata. E' noto che in alcune specie di lepidotteri la conta delle spermatofore può sottostimare il reale numero di accoppiamenti per femmina a causa della possibile dissoluzione o riassorbimento delle spermatofore ed anche la possibilità di fecondare una femmina senza formazione di spermatofore (Drummond, 1984). Tuttavia, la persistenza del *collum* della spermatofora, proprio perché fortemente sclerotizzato, può essere utilizzato in quei casi in cui la spermatofora è stata completamente dissolta, riducendo questa sottostima. Nella conta delle spermatofore sono state esaminate complessivamente 65 femmine collezionate in anni precedenti in natura nell'area di studio. A causa della difficoltà nella distinzione delle due specie esclusivamente sul pattern alare, soprattutto nelle femmine, nell'indagine delle spermatofore è stato necessario dedicare del tempo anche ad un esame attento delle strutture genitali femminili per il riconoscimento delle specie secondo i caratteri diagnostici noti in letteratura (Kudrna, 1977; Coutsis, 1983; Volpe & Jutzeler, 2001). I genitali sono stati esaminati allo stereoscopio e talvolta disegnati con camera lucida (25x e 50x) ai fini dell'identificazione della specie. Questo studio ha evidenziato il campione per la conta delle spermatofore come costituito da 45 femmine di *H. fagi* e 20 di *H. alcyone*. A ciascun esemplare è stato asportato l'addome e sottoposto a macerazione in una soluzione di KOH al 10% (Coutsis, 1984) a freddo per almeno 7 ore. Nelle femmine esaminate l'addome è stato portato via per intero dal corpo al fine di evitare di danneggiare l'apparato genitale femminile e quindi la borsa copulatrice, che ne occupa tutta la sua lunghezza. Nella maggior parte dei casi l'esame delle spermatofore è stato realizzato senza manipolare la borsa

copulatrice osservandone semplicemente il contenuto. In alcuni casi è stato necessario lacerare la borsa per visionare il contenuto oppure colorarla per evidenziare la forma o il *collum* della spermatofora. La colorazione è stata realizzata con Mercurocromo assoluto per circa 5 minuti in ammollo. Al termine dell'esame delle spermatofore i genitali femminili sono stati conservati in glicerina all'interno di provette da PCR (0.2 ml) corredate agli esemplari in collezione.

Le osservazioni sul comportamento sessuale degli individui in voliera, effettuate ai fini della registrazione dei corteggiamenti, hanno permesso di stabilire il numero di accoppiamenti per individuo. In particolare l'introduzione nella voliera di più maschi di differente stato riproduttivo (vergine o accoppiato) ha permesso di osservare più eventi di copula per lo stesso individuo e quindi di valutare il numero di accoppiamenti per maschio. Invece, il numero di copule per femmina è stato stabilito facendo lasciare in voliera la femmina dopo la fine della copula.

2.3.3 Metodi di studio dei segnali chimici

Nelle specie oggetto di studio, come è stato già illustrato, i maschi presentano sulla superficie delle ali anteriori androconi, che producono feromoni sessuali. Di norma queste sostanze sono altamente volatili in grado di richiamare partner a distanze di chilometri nei lepidotteri notturni (Prola & Beer, 1994). Tra i lepidotteri diurni in alcune specie di pieridi il maschio sembra liberare passivamente il suo odore che viene riconosciuto solo dalle femmine conspecifiche funzionando come meccanismo di isolamento riproduttivo (Andersson et al., 2007).

Al fine di comprendere se possa esistere un meccanismo di isolamento riproduttivo pre-copula di tipo chimico, sono state effettuate delle indagini utilizzando un nuovo strumento, il *Naso elettronico*. Questo è un dispositivo ideato dal gruppo di ricerca del prof. D'Amico del Dipartimento di Ingegneria Elettronica in collaborazione con il Prof. Paolesse del Dipartimento di Scienze e Tecnologie chimiche dell'Università di Roma Tor Vergata. I campi di

applicazione del *Naso elettronico* sono stati finora i più svariati dall'industria alimentare alla medicina, dal monitoraggio ambientale a quello dei processi industriali, dal campo automobilistico a quello dell'individuazione degli esplosivi (Di Natale et al., 1997, 1998, 2001, 2004; Paolesse et al. 2006). Questo lavoro sulle farfalle rappresenta la prima applicazione nell'ambito della zoologia.

2.3.3.1 Il Naso elettronico

Il *Naso elettronico* è un sistema complesso in grado di riconoscere odori semplici e/o complessi nello stesso modo con cui opera il sistema olfattivo umano. Esso permette il riconoscimento dell'odore nel suo insieme, senza considerare specificamente i vari componenti presenti, fornendo una firma caratteristica della miscela di composti volatili misurati.

Lo strumento si compone di una matrice di otto sensori chimici non selettivi. Questa caratteristica permette di avere una selettività diffusa a diverse specie chimiche. Il principio di traduzione è basato sulla rilevazione di variazione di massa di molecole gassose. I trasduttori di massa utilizzati sono delle microbilance al quarzo QMB (Quartz Crystal Microbalances), ricoperti con differenti materiali sensibili (metallo-porfirine). Ciascun materiale fornisce ad ogni sensore una diversa selettività. La frequenza di oscillazione dei quarzi è di 20 Mhz.

In generale l'analita viene adsorbito sulla superficie del quarzo, la variazione di massa determina una variazione di frequenza rispetto al suo stato fondamentale. Per lo stesso analita ogni sensore risponderà in maniera differente fornendo differenti variazioni di frequenza e quello che si ottiene è un pattern caratteristico per quell'analita. Le risposte date da questo sistema, quando è soggetto alla misura di un ambiente chimico, sono otto valori (uno per ogni sensore) di variazione di frequenza che vengono elaborati ed interpretati dal computer connesso al naso elettronico.

Come già anticipato le membrane chimiche, depositate sui quarzi, sono costituite da metallo porfirine, cioè macrocicli tetrapirrolici con i quattro atomi di azoto che coordinano al loro centro atomi di metallo. Esse contribuiscono alla

selettività e sensibilità dei sensori nei confronti di determinate specie chimiche a seconda della natura del metallo centrale e dei sostituenti periferici. I metalli agiscono come catalizzatori quando vengono co-ordinati nella porfirine e la selettività dei sensori segue il principio “hard-soft acid base”, secondo cui gli acidi forti preferiscono legarsi a basi forti e viceversa. Quindi, queste sostanze sono in grado di coordinare in modo non specifico e reversibile le sostanze volatili. La struttura del naso elettronico è costituita da una camera di misura dove sono alloggiati i sensori e un sistema idraulico (micropompa e microvalvola) per il flussaggio del campione gassoso all’interno della camera. I materiali che entrano in contatto con il campione sono chimicamente inerti in modo da non interagire con il campione stesso.

Per permettere il desorbimento dei sensori in genere si utilizza un gas inerte (azoto) o aria deumidificata. Il gas di riferimento viene utilizzato per stabilire una linea base per la risposta dei sensori.

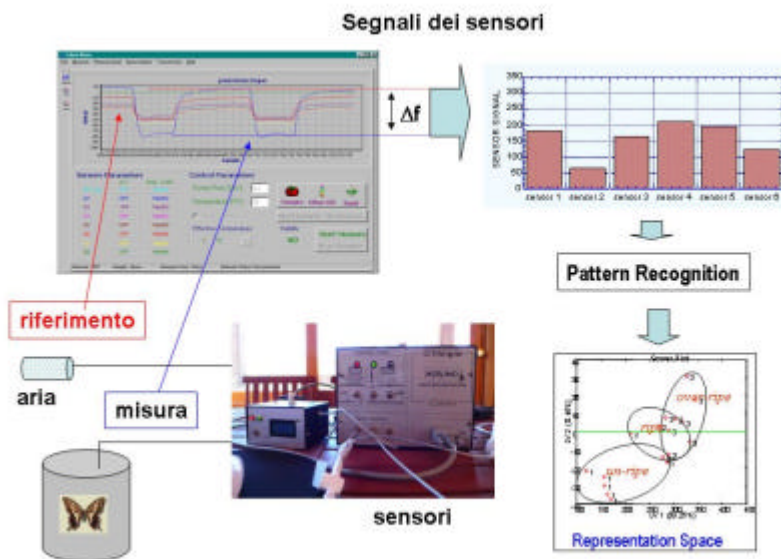


Figura 20– Processo di campionamento del Naso elettronico.

In generale la fase di misura del sistema consiste nella fase di adsorbimento dei sensori. Dopo un certo tempo si raggiunge un equilibrio tra il numero di molecole adsorbite e desorbite (condizione di stabilità). La successiva fase di pulizia consiste nel desorbimento totale delle molecole precedentemente adsorbite. I tempi di misura e pulizia dipendono dal campione analizzato (in genere il tempo di misura è tre volte il tempo di pulizia).

La condizione di regime viene raggiunta in un tempo che varia da pochi secondi fino ad alcuni minuti a seconda delle condizioni operative e dell'odorante sotto esame. La misura si conclude iniettando nuovamente nella camera il gas di riferimento, ripulendo, così, il materiale attivo (il film di metallo porfirine sui quarzi) che costituisce i sensori e riportando la loro risposta alla linea base.

Il processo di campionamento viene descritto sinteticamente nel disegno in Figura 20e prevede l'alternarsi di una fase di misura ed una di pulizia dei sensori nelle tempistiche valutate a seconda campione misurato. In genere la fase di pulizia ha una durata tre volte quella di misura.

Per la sperimentazione sulle farfalle, il naso elettronico utilizzato consiste dei seguenti otto sensori Cu buti. TPP (sensore 1), Co buti. TPP (sensore 2), Zn buti. TPP (sensore 3), Mn buti. TPP, (sensore 4), Fe buti. TPP (sensore 5), Sn buti. TPP (sensore 6), Ru buti. TPP (sensore 7) e Cr buti. TPP (sensore 8). Per il campionamento sono state usate tecniche senza pre-concentrazione dell'odorante da spazio di testa in condizioni dinamiche.

L'analisi statistica delle misure ottenute con il naso elettronico vengono in genere trattate con analisi multivariata.

2.3.3.2 Sperimentazioni nelle farfalle

Sono state effettuate due sperimentazioni con il naso elettronico: la prima nell'estate del 2007 con individui di allevamento della specie *H. fagi*, allestita presso i laboratori di Chimica e di Ingegneria elettronica dell'Università di Tor Vergata; la seconda, nel 2008, su individui selvatici di entrambe le specie *H. fagi* ed *H. alcyone* (Figura 21, Tabella 10) nella località di studio, Vallemare (RI).

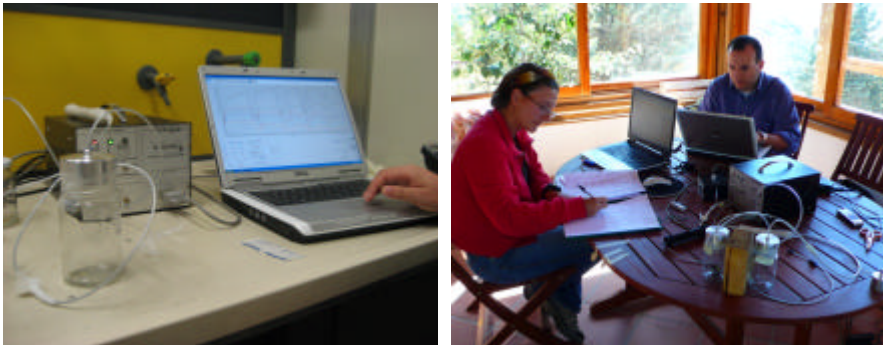


Figura 21 – Prima sperimentazione in laboratorio (2007); Seconda sperimentazione nella località di studio in condizioni seminaturali. (2008).

Le prima sperimentazione ha avuto lo scopo di valutare l'applicabilità del naso elettronico alle farfalle allo scopo di questa ricerca e quindi anche di definire le condizioni sperimentali ottimali per le misure. La seconda invece rappresenta la prima campagna di misure i cui risultati, seppur ancora preliminari, sono riportati in questa tesi (vedere par. 3.7 - nel cap.5 dei risultati).

Nelle sperimentazioni sono state sottoposte allo strumento individui allo stadio adulto e vivente all'interno di barattoli di vetro (314 ml) chiusi ermeticamente con parafilm solo per il tempo della misura da un campionatore ($\varnothing = 6,5$ cm). Il barattolo contenente la farfalla veniva collegato allo strumento attraverso due tubicini inseriti a livello del campionatore di metallo fissato sulla sommità del recipiente (Figura 22). Uno dei tubicini porta l'aria nel barattolo, l'altro l'aspira confluendole verso la camera di misura ai sensori del naso. Nella fase di misura e di pulizia il percorso dell'aria nei tubi e nello strumento viene controllato automaticamente attraverso una valvola facendo arrivare ai sensori ora aria sintetica pulita ora aria con il campione di composti volatili da misurare.

Gli individui sono stati manipolati il meno possibile sia in allevamento che durante la loro cattura, nonchè durante la preparazione per le misure allo strumento. Questa attenzione è stata riposta al fine di evitare contaminazioni dell'odorante poi sottoposto allo strumento. Gli individui, maschi e femmine, sia provenienti da allevamento che catturati in natura, sono stati tenuti

separatamente in gabbiette singole con cibo a disposizione in attesa della preparazione per le misure al naso elettronico. Alla fine della stagione di misure, tutti gli individui sono stati conservati per l'esame dei caratteri diagnostici ai fini di una corretta determinazione delle specie.

Tabella 10 – Individui sottoposti al naso elettronico nelle due sperimentazioni 2007 e 2008.

Sperimentazione	<i>H. fagi</i>		<i>H. alcyone</i>	
	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine
2007	8	-	-	-
2008	23	2	25	2

In attesa della misura le farfalle venivano inserite già nei barattoli di vetro e chiuse al loro interno con una retina (Figura 22) che permette il ricambio d'aria nel recipiente ed allo stesso tempo impedisce la fuga dell'individuo. Alla fine della sessione delle misure gli individui venivano riposti in gabbiette separate.

Ciascun barattolo è stato etichettato con una numerazione progressiva attribuita a ciascun individuo al momento dello sfarfallamento o della cattura in natura. Si è cercato per quanto possibile di utilizzare per ciascun individuo sempre lo stesso barattolo nelle diverse sessioni di misura. In ogni caso, i barattoli sono stati sempre sterilizzati con bollitura in acqua distillata e lasciati asciugare capovolti per ovviare di falsare la risposta dello strumento per problemi di contaminazione con odori diversi.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati raccolti in entrambe le sperimentazioni poiché esse rappresentano le prime applicazioni condotte sulle farfalle i dati raccolti sono stati esaminati sotto un aspetto sensoristico ai fini della valutazione della capacità discriminatoria del naso elettronico. Quindi sono state considerate tutte le misure effettuate anche quelle ripetute per ciascun individuo.

I dati sono stati analizzati sia qualitativamente (box plot) che attraverso analisi delle componenti principali (PCA) utilizzando il Software Matlab 7.0.

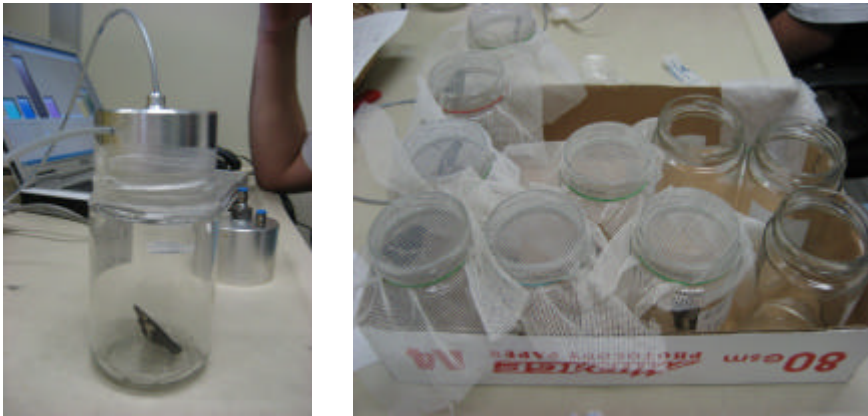


Figura 22 – Un maschio di *H. fagi* durante la fase di misura al naso elettronico (sinistra); individui in attesa delle prove (destra).

❖ Sperimentazione 2007

Le prime prove hanno permesso di stabilire il protocollo di misura sulla base della risposta dello strumento riguardo ai parametri ambientali (temperatura) strettamente legati all'attività vitali delle farfalle ed ai parametri comportamentali (movimento, interazione con la partner). Ciascun individuo è stato misurato almeno tre volte al fine di valutare la ripetibilità delle misure .

L'effetto della temperatura è stato studiato valutando la risposta dello strumento sottoponendo ad esso maschi di *H. fagi* in tre condizioni di temperatura differenti: OUT, IN e SUN. In particolare nella condizione OUT gli individui venivano tenuti in attesa della misura alla temperatura ambiente all'esterno del laboratorio all'ombra e misurati in un locale adiacente a porte aperte cosicché la temperatura fosse quella esterna (in media $T_{OUT} = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nella condizione IN gli individui venivano tenuti e misurati all'interno del laboratorio ad una temperatura media di 24°C . Nella condizione SUN le farfalle venivano misurate dopo esposizione all'irraggiamento solare. La temperatura durante le prove è stata in media 30°C . In queste prove sono stati utilizzati quattro maschi e per ciascun di essi sono state effettuate tre misure.



Figura 23 – Prove sull'effetto del movimento: individuo non perturbato (sinistra); individuo soggetto a perturbazione (destra).

Sulla base delle osservazioni comportamentali sul corteggiamento il movimento è stato ritenuto un fattore che avrebbe potuto influenzare il rilascio dei composti volatili e quindi la risposta dello strumento. Per tale motivo sono state realizzate delle prove ad hoc che tenessero conto di questo aspetto. L'effetto del movimento è stato esaminato, valutando la risposta dei sensori in fase di misura, sottoponendo gli individui allo strumento in due condizioni diverse: assenza di perturbazione e presenza di perturbazione. La perturbazione, realizzata attraverso l'agitazione del recipiente contenente l'individuo, sollecitava il suo movimento (battito delle ali) nel barattolo (Figura 23) simulando così grossolanamente le azioni di corteggiamento. Per ciascun maschio sono state effettuate quattro prove ad una temperatura ambiente costante di circa 30 °C: due senza perturbazione (a maschio fermo) e due con perturbazione (maschio in movimento). In queste misure sono stati utilizzati gli stessi individui delle prove precedenti ed in particolare quattro maschi di *H. fagi* dell'allevamento.

Tabella 11 – Naso elettronico: tempi di misura e pulizia (minuti) adottati nelle diverse prove.

Sperimentazione	Prove	Tempo di pulizia	Tempo di misura
2007	IN,OUT,SUN	10'	3'
	NO/SI perturbazione	10'	3'
2008	Maschi	10,5'	2,3'
	Coppie	14'	3,5'

❖ Sperimentazione 2008

Sulla base delle condizioni sperimentali definite nella sperimentazione precedente, nel 2008 è stata messa in opera la prima campagna di misure con il naso elettronico al fine di caratterizzare il pattern chimico delle due specie di lepidotteri oggetto di studio e perseguire lo scopo di questa ricerca. Le misure sono state realizzate nella località di studio a temperature ambientali senza perturbazione degli individui. In particolare sono stati svolti esperimenti sui maschi ($N_a = 24$, *H. alcyone*; $N_f = 20$, *H. fagi*) ed alcune prove preliminari sulle coppie maschio-femmina ($N_a = 2$; $N_f = 2$).

La misura dei maschi ha l'obiettivo di caratterizzare il pattern chimico delle due specie e di rilevare delle differenze tra di esse, allo scopo di verificare se esiste un meccanismo di isolamento chimico tra le due specie. Sono state effettuate tre misure per ciascun maschio. In Tabella 11 sono indicate le tempistiche relative alle fasi di misura e di pulizia dei sensori. Tutti gli individui sono stati misurati all'interno di barattoli di vetro trattati come nella precedente sperimentazione. I maschi sono stati sottoposti al naso elettronico uno alla volta e le misure sono state realizzate consecutivamente alternando gli individui della

stessa specie. Il processo di campionamento per i maschi è riassunto nella Figura 24.

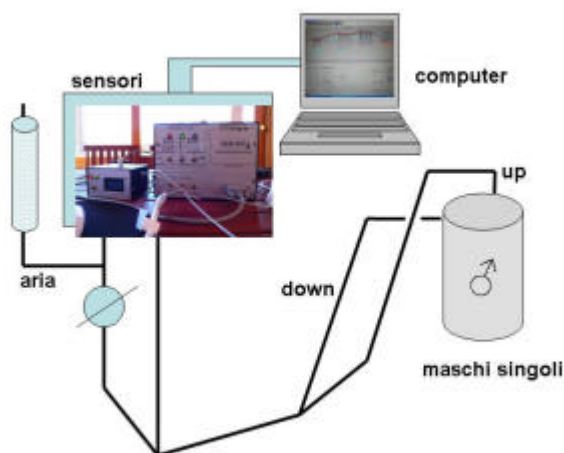


Figura 24 - Set sperimentale per la misura dei maschi singoli.

La misura delle coppie invece si propone di indagare lo scambio dei segnali chimici tra i due sessi, verificando l'effetto della vista e dell'odore sulle risposte dei sensori. Per queste misure è stato necessario allestire un set sperimentale ad hoc differente a seconda delle condizioni testate. Il maschio e la femmina sono stati collocati in due barattoli separati collegati in modo differente a seconda del set sperimentale messo in atto. Ciascuna coppia è stata misurata per tre volte in ciascuno dei diversi set sperimentali. Gli individui sono stati posti in tre condizioni differenti indicate come: 1) NO-COM e NO-VISTA (Figura 25); 2) COM e NO-VISTA (Figura 27) e 3) COM -VISTA (Figura 26). In tutte le condizioni, lo strumento ha misurato sempre la somma degli odori provenienti dai due barattoli. In dettaglio, nel primo caso, maschio e femmina non si vedono e l'uno non può percepire l'odore dell'altra e viceversa. Nel secondo caso gli individui ancora non hanno possibilità di vedersi per la presenza della barriera

interposta tra i due barattoli, ma questi sono collegati attraverso un tubicino e quindi il maschio può percepire olfattivamente la presenza della femmina e viceversa. Nel terzo caso i barattoli sono collegati con un tubicino e la barriera tra essi non è presente, quindi maschio e femmina possono vedersi e sono anche in comunicazione aerea.

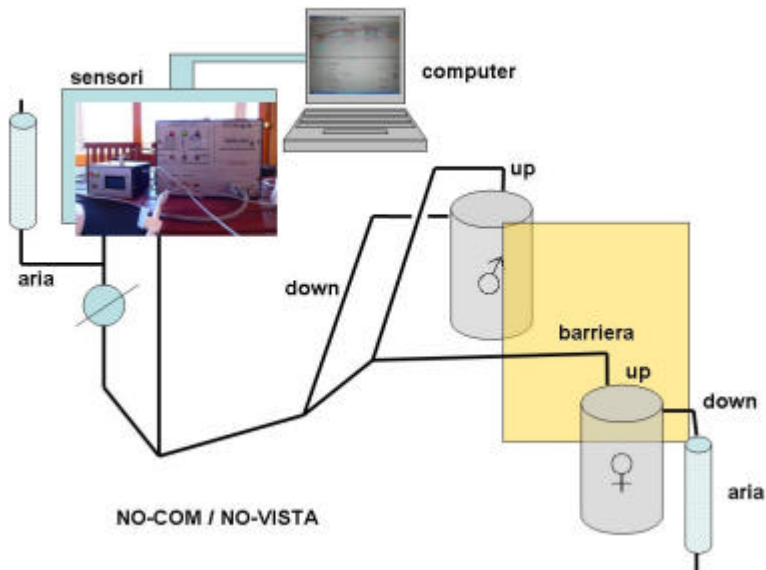


Figura 25 – Set sperimentale per la misura delle coppie, NO-COM e NO-VISTA.

Il set sperimentale usato in 2 e 3 è lo stesso usato, ma la barriera interposta tra i barattoli che in 2 è fissa, in 3 è stata tolta al momento della misura e ripristinata in fase di pulizia. Questo è stato fatto al fine di evitare una perdita di efficacia dello stimolo visivo rappresentato dalla vista del partner.

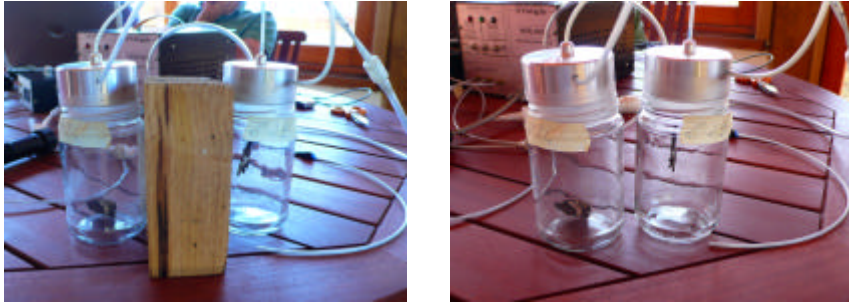


Figura 26 – Prove al naso elettronico sulle coppie: in assenza (destra) ed in presenza (sinistra) di barriera alla vista del partner.

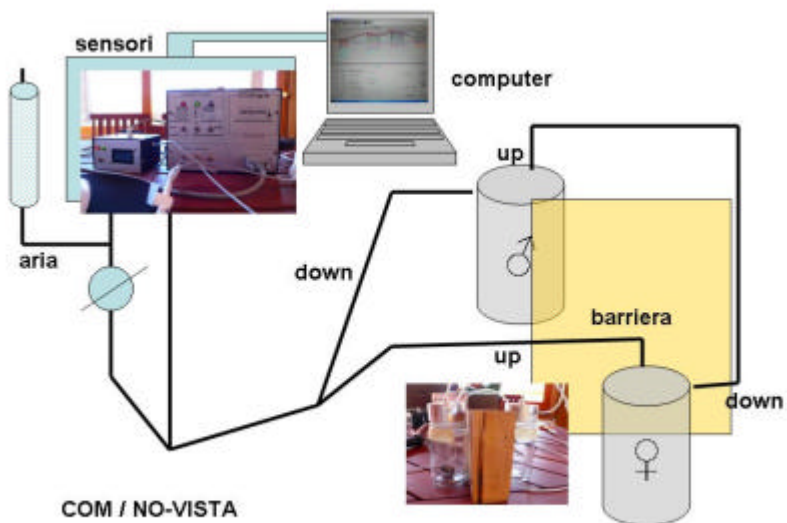


Figura 27 – Set sperimentale per la misura delle coppie, COM/NO-VISTA.
Il set COM/VISTA è identico, ma si rimuove la barriera tra i barattoli.

3. RISULTATI

3.1 - L'allevamento: dall'uovo all'adulto

L'allevamento pilota 2005-2006 si è basato su un numero di individui pari approssimativamente a 2157 di *H. alcyone* e 694 di *H. fagi*, comprendente uova e larve di primo stadio. Questa verifica dello stock di partenza tuttavia sottostima il numero reale, in quanto altre uova sono state deposte successivamente dalle femmine presenti in allevamento. In seguito, il conteggio delle uova e delle larve di primo stadio è stato evitato per paura di danneggiare il corion delle uova o le piccole larve e quindi non è stato possibile stimare il numero effettivo. La manipolazione degli individui è stata limitata alle età larvali più avanzate. Dell'allevamento pilota solo le larve di *H. fagi*, trasferite a Roma, sono sopravvissute ed in particolare 58 hanno raggiunto l'ultima età larvale, solo 56 lo stadio di pupa e 54 quello di adulto (26 maschi e 28 femmine). Nel 2006 l'allevamento di *H. alcyone* non ha prodotto buoni risultati, solo una larva è diventata adulta (una femmina). Tuttavia l'esperienza condotta ha fornito informazioni per migliorare tecnicamente la gestione di allevamento di queste specie di satirini (vedi paragrafo "Note sul comportamento delle larve") utili per il tentativo nell'anno seguente.

Nell'allevamento 2006-2007 si è preferito non manipolare né le uova né le larve alla schiusa nel mese di agosto di raccolta, per cui non è stato possibile stabilire lo stock delle uova di partenza, ma al 16 gennaio 2007, in stadi più avanzati delle larve, il conteggio effettuato ha evidenziato la presenza in allevamento di circa 286 larve di *H. alcyone* e 277 di *H. fagi*. Molte delle larve nel corso dell'allevamento non sono sopravvissute, ma i risultati sono stati in ogni caso eccellenti, consentendo di studiare il comportamento riproduttivo in entrambe le specie. Le condizioni di allevamento hanno portato fino all'adulto 67 individui (29 maschi e 38 femmine) di *H. fagi* e 155 individui (69 maschi e 86 femmine) di *H. alcyone*.

Il ciclo biologico delle specie in allevamento è descritto schematicamente nel disegno in Figura 28.

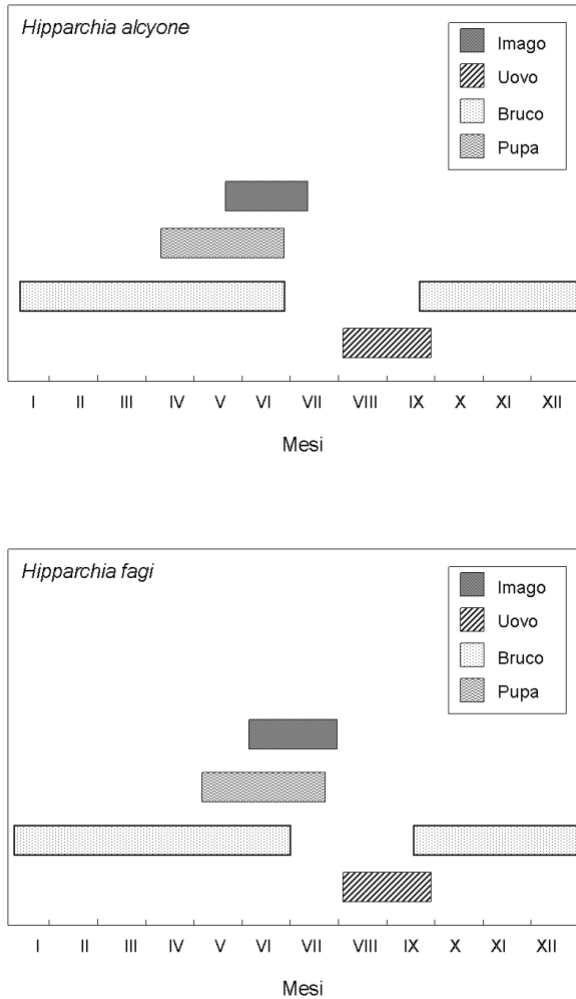


Figura 28 – Rappresentazione schematica della fenologia del ciclo biologico delle specie oggetto di studio in allevamento a Roma Tor Vergata.

Alla fine di agosto le femmine di *H. fagi* ed *H. alcyone* trattenute in allevamento hanno deposto le loro uova singolarmente sulle erbe presenti nelle gabbie, ma

anche sulla rete del sacco di copertura e su qualsiasi substrato a loro disposizione. In *H. fagi* ed *H. alcyone* le uova deposte si sono schiuse dopo circa 10 giorni e gli individui hanno trascorso diversi mesi allo stadio di larva, da agosto-settembre a maggio-giugno, circa un mese allo stadio di pupa (in aprile-maggio) e circa due mesi allo stadio di adulto (in giugno-luglio) (Figura 28).

3.1.1 Note sul comportamento delle larve

Le larve di prime età alla schiusa mangiano completamente il corion del proprio uovo e subito ricercano un qualsiasi supporto verticale su cui arrestarsi, in allevamento uno spillo, un filo di tessuto della rete, un filo d'erba. I bruchi presentano attività diurna e notturna quando sono di età precoce (1-2 instar), prevalentemente notturna in età più avanzate (4-5 instar). Durante i periodi di inattività le larve sostano alla base delle graminee con il capo rivolto verso la parte basale della pianta e la "coda" bifida verso l'alto. La colorazione e la livrea delle larve, nonché la posizione assunta nel ciuffo d'erba rendono gli individui in questo stadio perfettamente mimetizzati con le foglie basali secche delle piante nutrici (Figura 29.4). Per alimentarsi le larve risalgono le foglie delle graminacee e si nutrono dei lembi fogliari apicali per poi riscendere e trascorrere i momenti di inattività alla base delle piante.

Queste osservazioni sono state molto utili in fase di realizzazione dell'allevamento fornendo informazioni di cui tenere conto per favorire il benessere e la sopravvivenza delle larve. In particolare, per consentire alle larve di compiere queste migrazioni verticali sui fili d'erba si è preferito fornire piante in vivo piuttosto che graminacee recise ricreando dei microambienti di prato. Fornire foglie recise non costituiva una buona alternativa alle piante radicate, poiché esse subivano velocemente un essiccamento non costituendo più un appetibile pasto per le larve che non se ne nutrivano.

Durante l'allevamento pilota le piante nutrici coltivate allo scopo di alimentare lo stadio larvale di queste farfalle si sono rivelate insufficienti a sostenere il ritmo di alimentazione nelle età larvali avanzate. Questo inconveniente ha costretto alla ricerca di piante in natura per permettere alle

larve di completare la loro crescita. Il prelievo delle graminacee in natura è sembrato una buona alternativa alle piante coltivate da seme per risolvere l'emergenza, soprattutto perché in letteratura le larve dei satirini vengono indicate come abbastanza polifaghe. In realtà le larve di entrambe le specie hanno manifestato delle preferenze alimentari non nutrendosi di alcune delle essenze vegetali presentate loro (*Hordeum* sp.). Dopo diversi tentativi solo alcune delle piante prelevate negli ambienti frequentati dagli adulti in estate fornirono una buona fonte di alimentazione per i bruchi in allevamento. Le graminacee prelevate in natura, con cui sono state alimentate le larve, sono state determinate come *Poa pratensis* L., *Poa trivialis* L., *Dactylis glomerata* L. e *Festuca pratensis* var. *appenninica* Huds. ed hanno costituito le piante alimentari per l'allevamento nell'anno seguente. Inoltre è stato possibile osservare un altro comportamento di questo stadio durante le manipolazioni, a cui le larve sono state soggette per le operazioni di gestione dell'allevamento. In particolare le larve hanno manifestato un comportamento molto simile alla "tanatosi" manifestata da molti insetti come strategia antipredatoria. Se disturbate, esse si lasciano cadere dalle foglie a terra e ritirando i segmenti si irrigidiscono assumendo una forma a semiluna. In questo stato il bruco si mantiene immobile apparendo simile ad un seme, sia per la sua colorazione giallo-senape sia per la sua postura.



Figura 29 – 1, crisalide di *H. fagi*; 2, larva di *H. alcyone*; 3, “coda” bifida in larva di *H. fagi*, carattere tipico delle larve dei satirini; 4, larve di *H. fagi* alla base dei ciuffi d’erba durante il giorno; 5, larva di *H. fagi* durante la muta; 6, crisalide di *H. alcyone*; 7, larva di *H. fagi*. (Foto di Manuela Pinzari)

3.1.2 Le pupe ed il sesso

Le larve di quinta età si interrano sotto circa un centimetro di terriccio, ivi creano una camera mediante la produzione di seta e si impupano (Figura 29.1). In *H. alcyone* la pupa obteata libera presenta sulla sua cuticola fortemente sclerotizzata già gli abbozzi delle aperture genitali. Queste sono localizzate negli ultimi segmenti addominali e permettono di identificare il sesso allo stadio di crisalide. L'osservazione delle crisalidi in *H. fagi* ha permesso di evidenziare la presenza degli abbozzi genitali e quindi la possibilità di identificare il sesso delle pupe anche in questa specie (Figura 30). Il carattere diagnostico del sesso è la posizione dell'apertura genitale rispetto al bordo posteriore dell'ottavo urite e la distanza di questa al bordo anteriore, come in *H. alcyone* (Garcia-Barros & Martin, 1991). Tuttavia il riconoscimento del sesso in questo stadio, non è del tutto affidabile, perché non sempre sono ben distinguibili i margini dei segmenti addominali d'interesse per valutare con sicurezza le posizioni delle aperture genitali. Il confronto tra il rapporto sessi determinato allo stadio di pupa e quello effettivo allo sfarfallamento degli adulti evidenzia la possibilità di un errore di valutazione dei caratteri diagnostici (17%, N = 54 individui) non tollerabile per uno studio del comportamento riproduttivo.

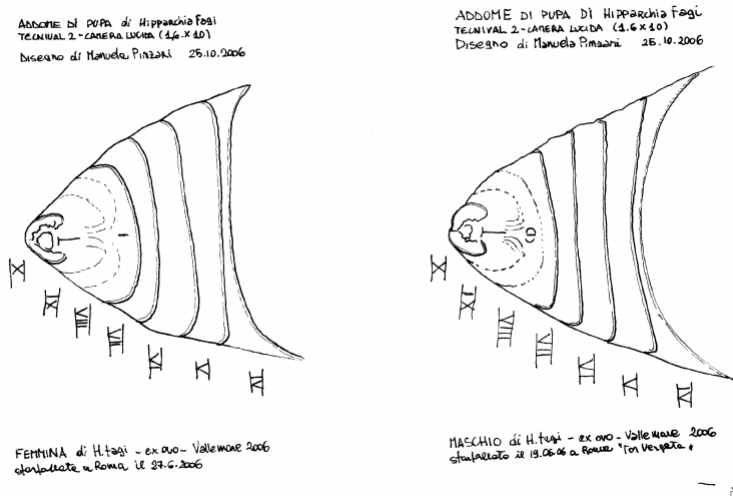


Figura 30 - Pupa in *Hipparchia fagi*, addome nella femmina (a sinistra) e nel maschio (a destra).

3.1.3 Fenologia degli adulti

Le condizioni di allevamento hanno portato fino all'adulto nell'estate del 2006 54 individui (26 maschi e 28 femmine) di *H. fagi*, nel 2007 67 individui (29 maschi e 38 femmine) della stessa specie e 155 individui (69 maschi e 86 femmine) di *H. alcyone*.

Lo sfarfallamento degli adulti di *H. fagi* in tutte e due gli anni di allevamento si è verificato dalle prime settimane di giugno emergendo dal terreno sempre nella mattina. Gli adulti nati nel 2006 ed appartenenti alla stessa ovatura sono sfarfallati nel giro di 15 giorni circa (Figura 31), mentre lo sfarfallamento di quelli del 2007 (Figura 32), di ovature diverse, si è distribuito su un periodo più ampio, sino a metà luglio. In entrambe le stagioni di allevamento i maschi di *H. fagi* hanno cominciato ad emergere prima delle femmine, fenomeno abbastanza diffuso nei lepidotteri con il termine di protandria. Questo è stato osservato anche in *H. alcyone* (Figura 33).

Lo sfarfallamento degli adulti delle specie in allevamento ha subito una variazione rispetto alla fenologia degli adulti osservabile in natura nell'area di

studio. In natura come abbiamo detto in precedenza *H. alcyone* ed *H. fagi* volano nei mesi di luglio ed agosto, la prima compare prima della seconda che talvolta prolunga il suo periodo di volo anche in settembre. In cattività invece si verifica un anticipo nello sfarfallamento in entrambe le specie di circa un mese (giugno-luglio), ma si mantiene il ritardo dello sfarfallamento di *H. fagi* rispetto a *H. alcyone*.

Figura 31 – Sfarfallamento degli adulti in *H. fagi* in allevamento del 2007

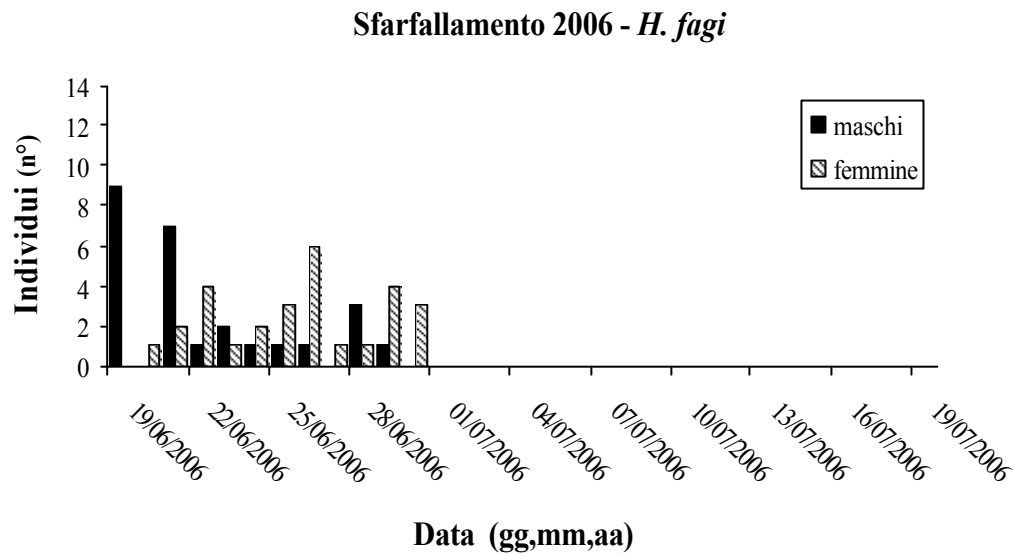


Figura 32 – Sfarfallamento degli adulti in *H. fagi* in allevamento del 2007.

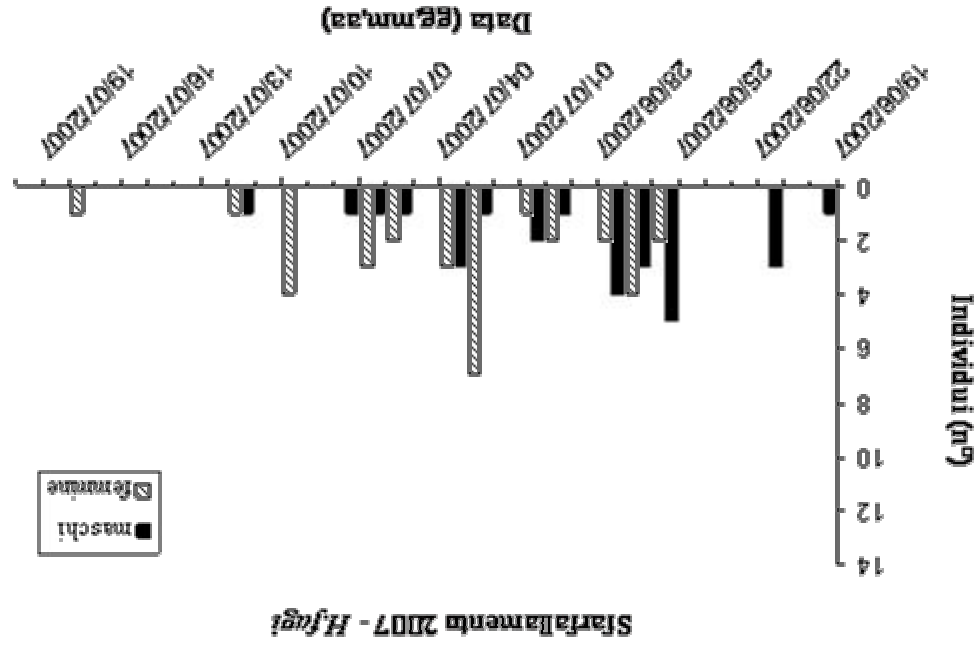
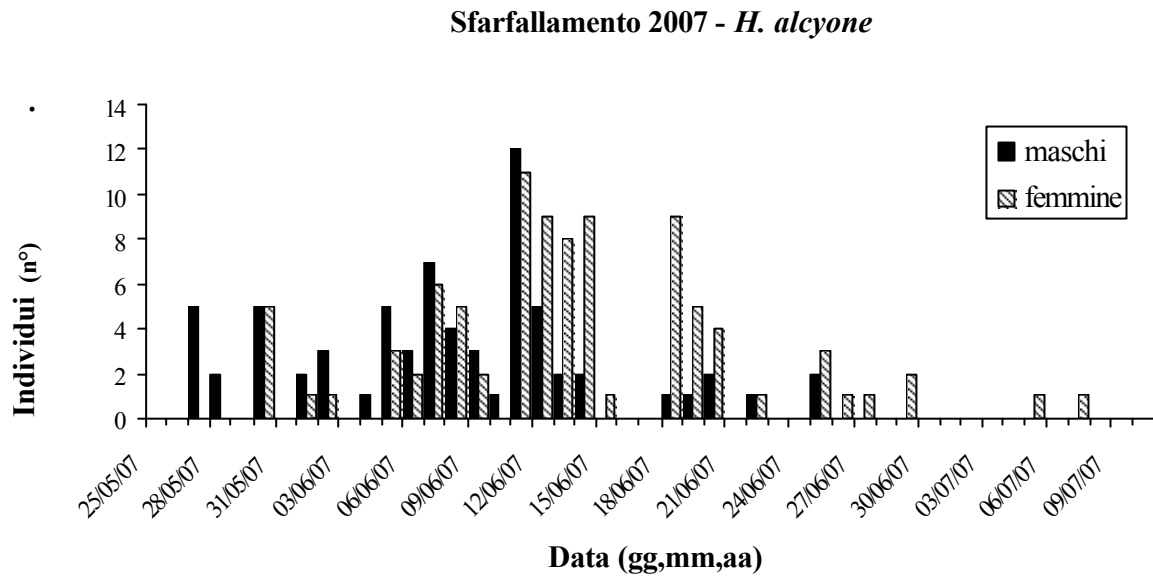


Figura 33 - Sfarfallamento degli adulti in *H. alcyone* in allevamento.



3.2 - Il corteggiamento in *Hipparchia fagi*

Un totale di 155 corteggiamenti sono stati registrati sulla specie *Hipparchia fagi*, ma solo 74 corteggiamenti sono stati utilizzati per la descrizione quantitativa del rituale sessuale in questa specie. Dei corteggiamenti esaminati 20 hanno ottenuto successo (*corteggiamenti con copula*), mentre 54 sono terminati con l'abbandono del corteggiamento da parte del maschio (*corteggiamenti senza copula*).

3.2.1 La sequenza di corteggiamento

Sulla base degli studi precedenti (Pinzari, 2004) la sequenza di corteggiamento in *H. fagi* si componeva di cinque moduli comportamentali (*Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Copulation attempt* e *Clasping*). L'osservazione dei corteggiamenti registrati negli anni di dottorato ha messo in luce l'esistenza di un modulo della sequenza, che non era ancora stato evidenziato, portando quindi a completamento l'etogramma del rituale in questa specie. In particolare, il maschio effettua un movimento stereotipato delle antenne, denominato *Antenna orientation*, dopo il *Bowing*, come rilevato anche in altre specie congeneriche (Pinzari, 2009). La descrizione dettagliata di questo modulo è riportata nell'etogramma in Tabella 5 (par. 2.2.5 nei Materiali e metodi).

In questa specie il corteggiamento è formato quindi dai seguenti sei moduli comportamentali *Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation*, *Copulation attempt* e *Clasping*, effettuati in successione secondo l'ordine dato. Questa sequenza di corteggiamento viene descritta quantitativamente sia dall'analisi markoviana delle sequenze che dall'analisi dei "rapporti posizione/lunghezza". In particolare nella prima analisi l'ordine di esecuzione dei diversi moduli comportamentali viene mostrato dai maggiori valori di probabilità di transizione da un modulo ad un altro (vedi in APPENDICE 3 e APPENDICE 4). Questi sono rappresentati nel cinetogramma in Figura 34 in corrispondenza delle frecce nere più spesse. Infatti la probabilità di transire dal *Fanning* al *Circling* è del 63%, dal *Circling* al *Bowing* del 77%, dal *Bowing*

all'Antenna orientation del 96%, dall'Antenna orientation al Copulation attempt del 7% ed infine da quest'ultimo modulo al Claspig del 80%. I risultati deboli per le transizioni Ao-CA e dalla sequenza verso la copula (Cl-Copula) saranno approfonditi più avanti nell'analisi delle "precedenze".

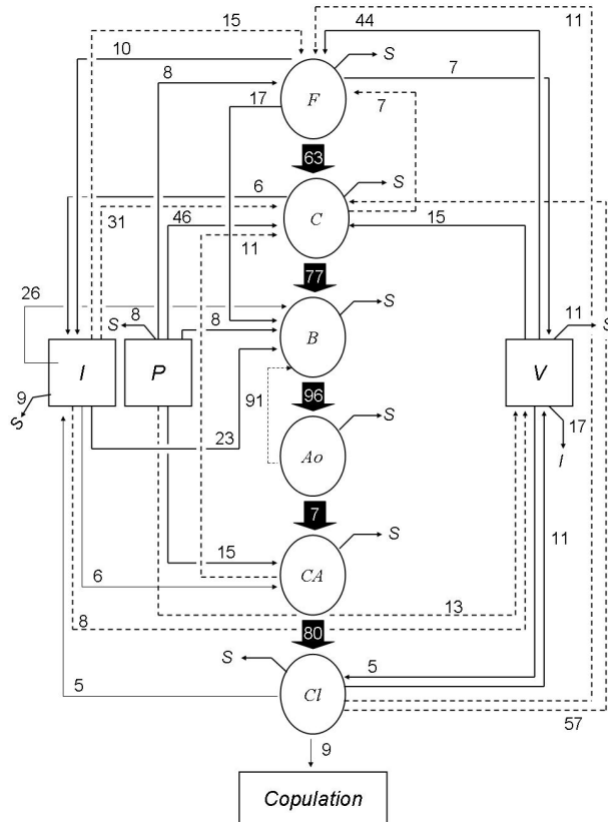


Figura 34 – Cinetogramma del corteggiamento in *H. fagi*. Per ciascun modulo comportamentale della sequenza di corteggiamento (nei cerchi) e per gli altri comportamenti maschili considerati (nei quadrati) sono indicate le probabilità di transizione (%) ad un altro comportamento in corrispondenza delle frecce. Le linee continue e quelle tratteggiate indicano rispettivamente la direzione della transizione in avanti ed indietro rispetto all'avanzare della sequenza di corteggiamento. Nel disegno sono state riportate le probabilità maggiori del 5%. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Claspig* (Cl); altri comportamenti del maschio: *Immobilità* (I), *Stop* (S), *Inseguimento a piedi* (P), *Inseguimento in volo* (V).

La sequenza di corteggiamento è la stessa sia nei corteggiamenti con che senza successo (test U di Mann-Whitney non significativi, APPENDICE 8).

L'analisi markoviana dei corteggiamenti rivela anche altri due aspetti molto interessanti del corteggiamento, che saranno approfonditi più avanti (par.3.2.3). Il primo riguarda la presenza di ripetizioni consecutive della coppia di moduli *Bowing* ed *Antenna orientation*, il secondo è dato dalla possibilità una volta portata a termine la sequenza con il *Clasping* di ricominciare il corteggiamento generando una sorta di loop di sequenza (*Clasping-Circling*, 57% di probabilità di transizione, Figura 34). Questo ultimo aspetto sarà esaminato nello studio dei rituali dall'analisi "fine-inizio sequenza" più avanti illustrata.

Inoltre esaminando anche le transizioni tra i moduli del corteggiamento ed altri comportamenti del maschio, come il *Volo*, l'*Immobilità*, l'*Inseguimento a piedi* o l'*Abbandono (Stop)*, si evidenzia che innanzitutto essi non fanno parte della sequenza di corteggiamento, ma si possono intercalare in essa in qualsiasi momento (vedi cinetogramma in Figura 34). In genere il *Volo* rappresenta l'inizio della interazione tra il maschio e la femmina, in cui si forma la coppia. Ad esso, solo alla posa, segue il corteggiamento a partire dal *Fanning* con una probabilità del 44% (Figura 34). Tuttavia il *Volo (V)*, come l'*Inseguimento a piedi*, può verificarsi anche a corteggiamento iniziato, perché la femmina può fuggire al corteggiatore scatenando un ulteriore inseguimento. Il *Volo* è stato registrato con una probabilità maggiore dopo il *Fanning* ed il *Clasping* rispetto alle altre fasi del corteggiamento (APPENDICE 3), mentre l'*Inseguimento a piedi (P)* dopo il *Clasping*. Per quanto riguarda l'abbandono (*Stop, S*) del corteggiamento questo si può osservare in corrispondenza di ogni fase della sequenza (Tabella 12). Se consideriamo solo le transizioni verso questo evento nel 30% dei casi circa la sequenza viene interrotta definitivamente durante l'inseguimento in volo (*Volo*), nel 20% dopo lo stato di *Immobilità*, nel 20% dopo il *Bowing*, nel 9% dopo il *Circling* o dopo l'*Antenna orientation* (Tabella 12). Nell'analisi dei "rapporti posizione/lunghezza" la sequenza di corteggiamento (F-C-B-Ao-CA-CI) viene confermata dall'andamento crescente dei valori medi calcolati per ciascun

modulo (Tabella 13). Il *Fanning* risulta il primo modulo della sequenza, perché presenta un rapporto posizione/lunghezza, pari a $0,22 \pm 0,33$, in media minore dei valori ottenuti per gli altri moduli comportamentali. Il *Circling* invece occupa la seconda posizione nella sequenza, poiché il valore medio rispettivo si colloca in mezzo ai valori relativi ai moduli *Fanning* e *Bowing*. Un discorso analogo può essere fatto per gli altri moduli comportamentali. Complessivamente i moduli comportamentali con valori medi dei rapporti posizione/lunghezza più bassi occupano le posizioni iniziali della sequenza di corteggiamento ed all'aumentare dei valori medi si collocano i moduli successivi. Anche l'inferenza statistica attribuisce valenza statistica all'ordine dei moduli evidenziato (test t di Student per dati dipendenti per ciascuna coppia di moduli confrontati positivi, $p < 0,0001$, in APPENDICE 1 ed APPENDICE 2).

Tabella 12 – Abbandono del corteggiamento in corrispondenza di un modulo della sequenza in *H. fagi*.

Da	A	N	%
F	S	1	1.85
C	S	5	9.26
B	S	11	20.37
Ao	S	5	9.26
CA	S	1	1.85
Cl	S	3	5.56
I	S	11	20.37
P	S	1	1.85
V	S	16	29.63
Totale		54	100

Transizioni dai moduli della sequenza di corteggiamento allo Stop (S)

Al fine di definire la sequenza di corteggiamento, l'analisi delle "precedenze" prende in considerazione l'associazione stretta tra un modulo ed il suo precedente. Questa analisi delle sequenze scioglie i dubbi sui valori bassi di

probabilità evidenziati nell'analisi markoviana per la transizione Ao-CA ed evidenzia la possibilità di ottenere la copula al 100% solo dopo il *Clasping* nonché dopo la successione dei moduli precedenti a ritroso fino al *Bowing*.

Tabella 13 – Ordine di esecuzione dei moduli comportamentali del corteggiamento nell'analisi dei rapporti posizione/lunghezza in *H. fagi*.

Moduli	N	Media	Deviazione Standard
<i>F</i>	165	0.22	0.33
<i>C</i>	357	0.25	0.34
<i>B</i>	350	0.52	0.10
<i>Ao</i>	337	0.56	0.07
<i>CA</i>	257	0.94	0.08
<i>Cl</i>	221	1.00	0.00

Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl).

Questa analisi, infatti, supporta solo parzialmente la sequenza di corteggiamento dal *Bowing* fino al *Clasping* (B-Ao-CA-Cl) con valori prossimi al 100% di probabilità (Figura 35). Mentre per le fasi iniziali della sequenza i risultati disattendono l'aspettativa teorica, poiché il *Bowing* è preceduto dal *Circling* con una probabilità del 9,13% e quest'ultimo modulo dal *Fanning* con una probabilità del 36,54%. Esaminando in dettaglio i risultati di questa analisi nel disegno in Figura 35 si può notare che i valori bassi di probabilità che il *Bowing* sia preceduto dal *Circling* e che questo lo sia dal *Fanning*, sono legati all'esistenza, in aggiunta alla sequenza F-C-B-Ao-CA-Cl, di altri tre casi osservati: 1) la successione C-B-Ao-CA-Cl ove il *Fanning* è assente; 2) la catena è la seguente F-B-Ao-CA-Cl, in cui il *Circling* è assente; 3) sia *Fanning* che *Circling* mancano e la catena si presenta così, B-Ao-CA-Cl. Quindi sembrerebbe che i moduli *Fanning* e *Circling* non abbiano un ruolo essenziale nella sequenza di corteggiamento proprio perché non sempre vengono effettuati. In realtà l'assenza del *Circling* (casi 2 e 3) può essere ricondotta ad un contesto specifico della interazione maschio-femmina. Infatti, l'assenza del *Circling* è stata

osservata sempre quando il corteggiamento ha avuto inizio con il maschio già in posizione frontale alla partner. Questo lascia supporre che il *Circling*, con cui il maschio si porta frontalmente alla femmina, possa avere una funzione di orientamento nei confronti della partner, non necessario se la posizione frontale è stata già raggiunta. Il caso 1 invece si collega ai risultati ottenuti nell'analisi markoviana, ove il *Clasping* con una probabilità del 57% transisce al *Circling* ricominciando la sequenza di corteggiamento, senza effettuare il *Fanning* e dando luogo alle catene del tipo C-B-Ao-CA-Cl.

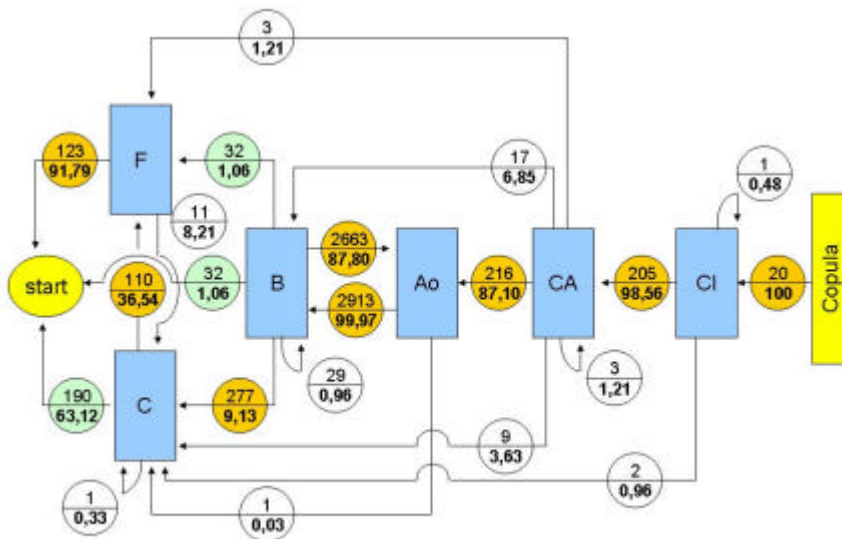


Figura 35– Schema riassuntivo dei risultati dell'analisi delle “precedenze” in *H. fagi*: nei rettangoli sono indicati i moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl), e la copula; le frecce che si dipartono da ciascun rettangolo indicano quali moduli sono precedenti; nei cerchi associati alle frecce sono riportate le frequenze osservate per ciascun modulo in valore assoluto (metà superiore) ed in percentuale (metà inferiore). Lo start è una categoria virtuale che indica l'inizio della interazione. I cerchi in arancione evidenziano la sequenza F-C-B-Ao-CA-Cl, in verde le transizioni F-B, start-B e start-C, in bianco quelle considerate trascurabili per i valori di probabilità.

3.2.2 I rituali

L'analisi markoviana nei paragrafi precedenti aveva già mostrato che il maschio potesse ripetere alcuni moduli (loop interno alla sequenza di corteggiamento tra la coppia *Bowing* e *Antenna orientation*) o l'intera sequenza (loop di sequenza, dal *Clasping* verso il *Circling*). Maggiori informazioni al riguardo vengono fornite dalla osservazione ulteriore delle interazioni tra maschio e femmina alla luce della sequenza di corteggiamento definita. Questo studio approfondito dei rituali ha evidenziato che il 93% di questi si presenta in modo molto articolato, caratterizzato dalla successione di più di una sequenza o frammenti di essa (catene) talora anche intervallato da voli ed inseguimenti (Tabella 14). In pochi casi (7%) il maschio ha eseguito una singola sequenza di corteggiamento (F-C-B-Ao-CA-CI), ma nel 80% dei casi la singola sequenza è stata sufficiente per ottenere la copula.

Tabella 14 – Composizione dei corteggiamenti in *H. fagi*.

Corteggiamento	Singola sequenza	Più sequenze	Totali
Con successo	4	16	20
Senza successo	1	53	54
Totali	5	69	74

Nei 74 rituali esaminati sono state individuate 453 catene di moduli, comprendenti sequenze regolari e frammenti di essa di varia lunghezza (Tabella 14). Di tutte le catene, il 14,1% sono costituite da sei moduli, la maggior parte sono parziali e composte da un numero minore di moduli comportamentali: catene da 1 modulo, da 2 moduli, da 3 moduli, da 4 moduli e da 5 moduli (Tabella 15), la cui composizione è più varia ed apparentemente irregolare nelle catene formate da pochi moduli, più simile e tendente alla sequenza F-C-B-Ao-CA-CI nelle catene con più di 3 moduli (Tabella 16).

Le 453 catene individuate nei rituali esaminati hanno costituito la base dati per l'analisi "fine-inizio sequenza". I risultati sono illustrati nel disegno in Figura 36, ove i moduli della fila superiore sono i finali di una sequenza (o frammento di essa) e quelli della fila inferiore sono gli iniziali della sequenza (o frammento di essa) successiva.

Tabella 15 – Lunghezza delle catene in *H. fagi*

Catene	N	%
1MODULO	72	15,9
2MODULI	55	12,1
3MODULI	73	16,1
4MODULI	63	13,9
5MODULI	126	27,8
6MODULI	64	14,1
Totali	453	100.0

Sei moduli = sequenza

Come si può vedere, ad ogni modulo della sequenza superiore corrispondono quasi tutti i moduli della sequenza inferiore (successiva). Questo lascerebbe dedurre che non esiste alcuna struttura nel comportamento del maschio e che sia del tutto casuale da dove il maschio ricominci il suo corteggiamento dopo una interruzione. Risulta invece evidente che nei casi (36,9%) in cui il maschio giunge a conclusione della sequenza, al *Clasping*, dà inizio alla sequenza di corteggiamento nuovamente a partire dal *Circling*, come già suggerito dall'analisi markoviana (Figura 36). Ma esaminando in dettaglio tutte le transizioni (N = 379) tra i moduli finali ed iniziali delle sequenze in successione è possibile individuare quattro casistiche generali a cui ricondurre le transizioni osservate. Infatti, tenendo presente la sequenza di corteggiamento FC-B-Ao-CA-CI il maschio può riprendere a corteggiare rispetto al modulo a cui ha interrotto la sequenza (fila superiore, Figura 36) eseguendo nella sequenza successiva (fila inferiore, Figura 36): a) un modulo successivo, ma saltando uno o

più moduli; b) il modulo immediatamente successivo, cioè continua la sequenza precedente; c) lo stesso modulo; d) i moduli precedenti. Il caso “d” è quello maggiormente rappresentato (86,3% dei casi) e come si vede in Figura 36: il maschio riprende a corteggiare la partner preferibilmente dal *Bowing* o dai moduli precedenti, *Fanning* e *Circling*, e mai dall'*Antenna orientation*.

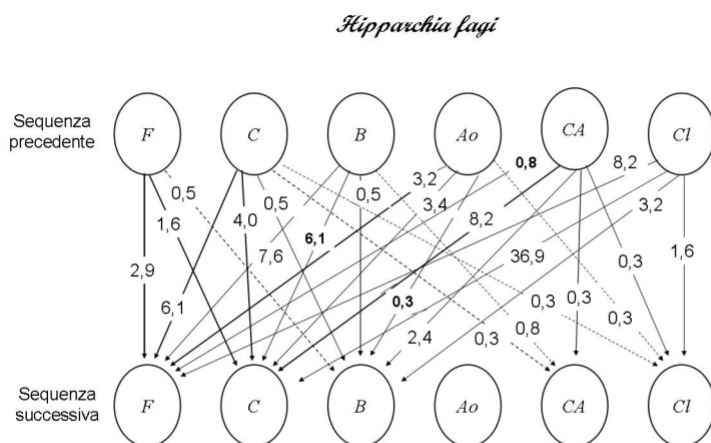


Figura 36– Risultati dell’analisi “fine-inizio” sequenza in *H. fagi*. In corrispondenza delle frecce sono indicati i casi osservati (%) delle transizioni dall’ultimo modulo di una sequenza (o frammento di essa) nella fila superiore a quello iniziale della sequenza (o frammento di essa) successiva nella fila inferiore. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl). Con le frecce dalla linea continua sono indicate le transizioni in accordo con il concetto di sequenza, con quelle dalla linea tratteggiata le transizioni in disaccordo.

Le transizioni ricondotte ai casi “b” (2,4% dei casi) e “c” (9,2% dei casi) probabilmente rappresentano errori di valutazione nella identificazione delle sequenze poi usate per questa analisi, ma sono comunque molto esigue in numero (APPENDICE 11). Tuttavia queste sono in accordo con il concetto di

sequenza a dispetto delle transizioni ricondotte al caso “a”. Anche queste rappresentano pochi eventi (2,1% dei casi) e sono certamente attribuibili a difficoltà di interpretazione dei filmati e possono essere quindi trascurate.

Tabella 16 – Composizione dei corteggiamenti in *Hipparchia fagi*.

CATENE 1 MODULO			CATENE 4 MODULI		
	N	%		N	%
-F	19	26.39	-F-C-B-Ao	24	38.10
-C	41	56.94	-F-C-B-CA	1	1.59
-CA	1	1.39	-F-B-Ao-CA	6	9.52
-Cl	11	15.28	-C-F-B-Ao	2	3.17
Totali	72	100.00	-C-B-Ao-CA	16	25.40
			-B-Ao-CA-Cl	14	22.22
			Totali	63	100.00

CATENE 2 MODULI			CATENE 5 MODULI		
	N	%		N	%
-F-C	14	25.45	-F-C-B-Ao-CA	6	4.76
-F-CA	1	1.82	-F-B-Ao-CA-Cl	6	4.76
-C-F	3	5.45	-C-B-Ao-CA-Cl	114	90.48
-C-B	5	9.09	Totali	126	100.00
-C-CA	8	14.55			
-C-Cl	2	3.64			
-B-Ao	16	29.09			
-CA-Cl	6	10.91			
Totali	55	100.00			

CATENE 3 MODULI			CATENE 6 MODULI		
	N	%		N	%
-2F-3C-4B	4	5,48	-F-C-B-Ao-CA-Cl	60	93,75
-2F-3C-6E	1	1,37	-C-F-B-Ao-CA-Cl	4	6,25
-2F-4B-5An	14	19,18	Totali	64	100.00
-3C-2F-6E	2	2,74%			
-3C-4B-5An	46	63,01			
-3C-4B-6E	2	2,74			
-4B-5An-6E	3	4,11			
-4B-6E-7CA	1	1,37			
Totali	73	100.00			

In carattere grassetto le catene riconducibili alla sequenza F-C-B-Ao-CA-Cl regolare.

3.2.3 I moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento

Lo studio del corteggiamento condotto a livello delle sue unità costituenti, i moduli comportamentali, permette di caratterizzare il corteggiamento in questa specie e di analizzare in dettaglio i segnali visivo-comportamentali rilasciati dal maschio nella interazione con la femmina.

❖ Numero di occorrenze nella sequenza (O_{modulo})

Lo studio delle occorrenze dei moduli nella sequenza mostra che ciascun modulo viene in media effettuato una sola volta all'interno della sequenza ad eccezione dei moduli centrali, *Bowing* ed *Antenna orientation* (Tabella 17). L'intervallo di variazione del numero di occorrenze del *Bowing* e dell'*Antenna orientation* nella sequenza è piuttosto ampio (Figura 37 e Figura 38) da 1 a circa 40 volte, ma la maggior parte dei dati per entrambi i moduli si distribuisce tra 1 e 20 occorrenze circa. Questi moduli vengono eseguiti più volte nella sequenza ed in un numero di volte pressoché equivalente. Nel 76% delle sequenze, in cui il *Bowing* è stato osservato, il maschio esegue questo modulo in media 8,80 volte nella sequenza, mentre nel 73% delle sequenze l'*Antenna orientation* 8,78 volte (Tabella 17).

Tabella 17 – Numero di occorrenze dei moduli nella sequenza in *H. fagi*

	F	C	B	Ao	CA	Cl
Sequenze (%)	36,87	78,37	76,16	73,29	55,63	48,12
N_{moduli}	167	355	345	332	252	218
Media (\pm DS)	1,00 (\pm 0,00)	1,00 (\pm 0,05)	8,80 (\pm 5,28)	8,78 (\pm 5,06)	1 (\pm 0,11)	1 (\pm 0,06)
Min – Max	1 - 1	1 - 2	1 - 43	1 - 39	1 - 2	1 - 2

Nella prima riga i moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl). I valori percentuali relativi alle sequenze indicano in quante sequenze o frammenti di essa ciascun modulo è stato osservato ($N_{\text{seq}} = 453$).

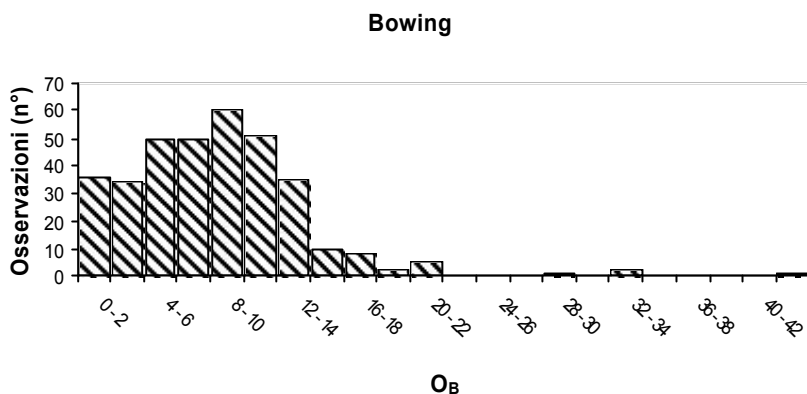


Figura 37 - Numero di occorrenze del Bowing (O_B) nella sequenza di corteggiamento in *H. fagi*.

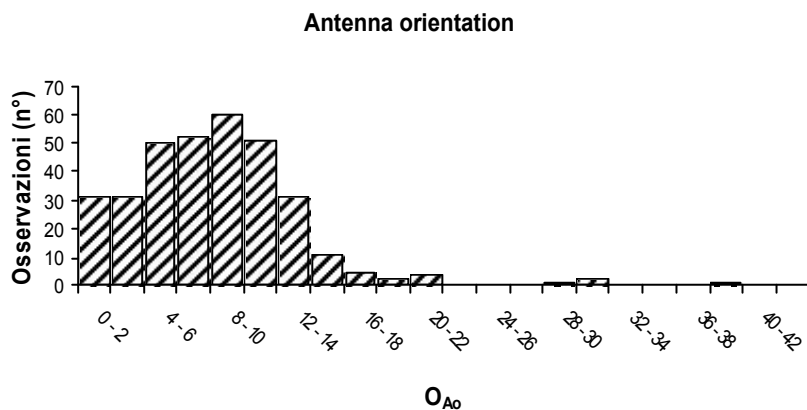


Figura 38 - Numero di occorrenze dell'Antenna orientation (O_{Ao}) nella sequenza di corteggiamento in *H. fagi*.

❖ **Durata del singolo modulo (d_{modulo})**

I moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento in *H. fagi* presentano durate medie diverse (Tabella 18). In particolare, andando dall'esterno verso l'interno della sequenza, i moduli più periferici, *Fanning* e *Clasping*, hanno durate medie relativamente elevate (diversi secondi), *Circling* e

Copulation attempt durate medie quasi dello stesso ordine di grandezza (1-2 secondi) ed infine i moduli centrali, *Bowing* ed *Antenna orientation*, durate medie di pochi centesimi di secondo. Inoltre questi ultimi, come si può vedere nei grafici boxplot in Figura 39, mostrano valori di durata più costanti e distribuiti strettamente intorno alla mediana, a differenza degli altri moduli che si distribuiscono in un range di variazione più ampio.

Tabella 18 – Durata dei moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento in *H. fagi*.

Modulo	N	Media	Mediana	Min	Max	Dev. Std.
F	179	8.27	6.56	0.08	60.24	8.55
C	375	1.90	0.76	0.04	34.12	4.20
B	3238	0.31	0.28	0.04	2.96	0.16
Ao	3084	0.15	0.16	0.04	8.16	0.16
CA	246	1.25	1.04	0.04	5.36	0.86
Cl	225	3.44	2.60	0.08	21.32	3.16

Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl); N, numero dei moduli misurati; Le durate dei diversi moduli sono espresse in secondi.

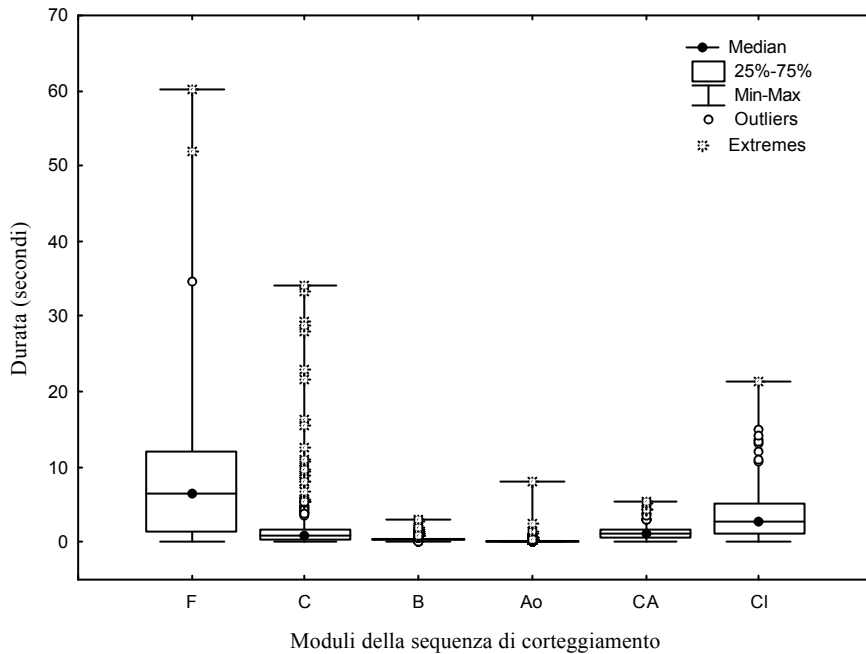


Figura 39 – Durata dei moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento in *H. fagi*.

3.2.4 Il Bowing

La presenza del loop *Bowing-Antenna orientation* mostrato dall'analisi markoviana delle sequenze e la variabilità di questi moduli nel numero di occorrenze nella sequenza hanno portato a focalizzare l'attenzione di questa ricerca sul modulo del *Bowing* e sulla sua funzione nel corteggiamento. Di seguito sono riportati i risultati relativi alla durata (d_B), il numero di occorrenze nella sequenza (O_B) e la frequenza (f_B) del *Bowing* in *H. fagi*. A differenza delle analisi precedenti dei moduli comportamentali il *Bowing* è stato analizzato esclusivamente nelle sequenze complete, poiché le sequenze frammentarie potrebbero falsare i risultati e rendere difficile la loro interpretazione. Quindi per ciascuna delle grandezze misurate a partire dal campione totale dei dati, indicato come “tutte le sequenze”, è stato generato un sottocampione rappresentato dalle “sequenze complete”. Inoltre allo scopo di valutare se gli individui che hanno ottenuto la copula mostrano un pattern comportamentale differente da quelli che

non hanno avuto successo le sequenze complete sono state distinte in “sequenze con copula e senza copula” e comparate.

❖ **Durata del singolo *Bowing* (d_B)**

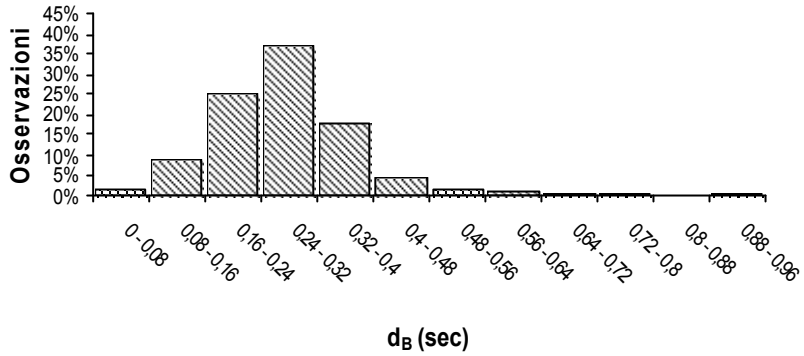
L'esclusione delle sequenze frammentarie dall'analisi delle durate del *Bowing* determina una variazione della media verso valori più bassi di durata ed una riduzione della varianza del campione da “tutte le sequenze” a “sequenze complete” (Tabella 19, Figura 40): in questa specie il *Bowing* è caratterizzato da una durata (d_B) di $0,26 \pm 0,08$ secondi nelle “sequenze complete”. Il confronto delle durate del *Bowing* di sequenze complete sulla base della riuscita del corteggiamento (Figura 41) mostra una differenza statisticamente significativa tra le sequenze con e senza copula (test U di Mann-Whitney $N_U=183$, $N_S = 1749$, $U = 129035$, $Z = -4,32$, $p = 0,000016$). In particolare la durata media del *Bowing* nelle sequenze che non ottengono la copula è maggiore di quella osservata nelle sequenze con copula (Tabella 19).

Tabella 19 - Durata del singolo *Bowing* nelle diverse categorie di sequenze.

		N	Media	Mediana	Min	Max	Dev.St.
Sequenze analizzate	Tutte	3035	0,37	0,28	0,04	2,96	2,61
	Complete (C.)	1932	0,29	0,28	0,04	2,96	0,11
	C. senza copula	1749	0,29	0,28	0,04	2,96	0,11
	C. con copula	183	0,26	0,28	0,08	0,48	0,08

Le durate sono espresse in secondi; N, numero dei *Bowing* .

Bowing in tutte le sequenze



Bowing nelle sequenze complete

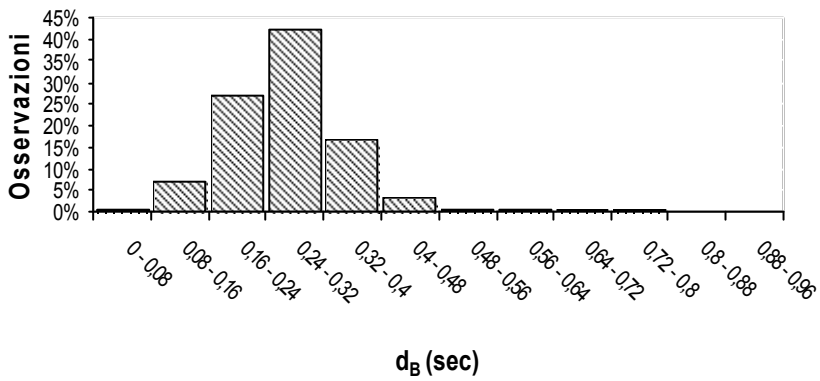


Figura 40– Durata del singolo *Bowing* in tutte le sequenze registrate ($N_{B,f} = 3033$) (in alto) e solo nelle sequenze complete ($N_{B,f} = 1932$) (in basso) in *H. fagi*.

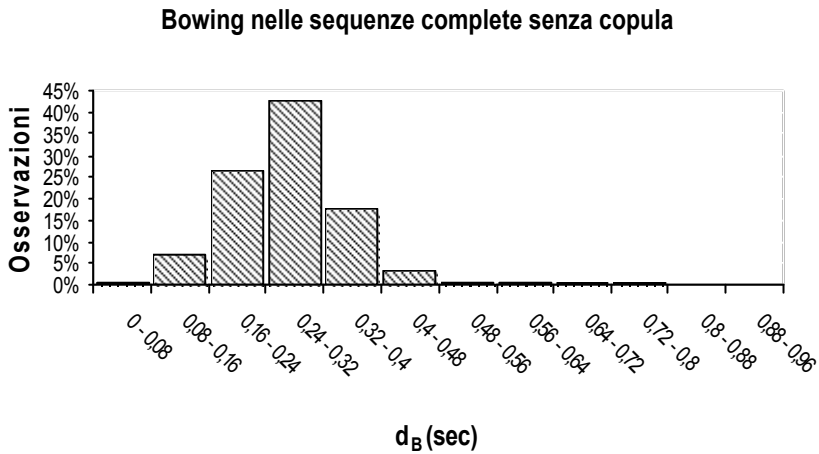
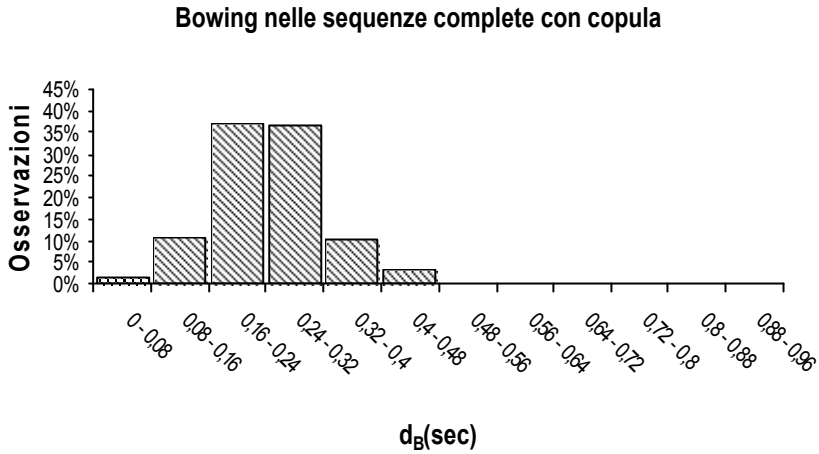


Figura 41 – Durata del singolo *Bowing* nelle sequenze complete con copula ($N_{B,f} = 183$) (in alto) e nelle sequenze complete senza copula ($N_{B,f} = 1749$) (in basso) in *H. fagi*.

❖ **Numero di occorrenze del *Bowing* nella sequenza**

L'esclusione delle sequenze frammentarie dall'analisi del numero delle occorrenze del *Bowing* (O_B) nella sequenza si traduce in una moderata riduzione dell'intervallo di variazione ed in un aumento del valore medio di O_B (Tabella 20) nelle "sequenze complete". Come si può vedere in Figura 42 nella distribuzione di frequenza del O_B nelle "sequenze complete" diminuiscono soprattutto i casi di

catene con poche ripetizioni di *Bowing* (a sinistra della curva) assumendo una forma quasi normale con una media pari a $9,75 \pm 4,79$ *Bowing* nella sequenza (Figura 42). Il confronto tra le sequenze con e senza copula non rileva differenze statisticamente significative (Test U di Mann-Whitney n.s., $p = 0,89$) sebbene il maschio sembri effettuare in media un numero di *Bowing* minore quando ottiene la copula (Tabella 20).

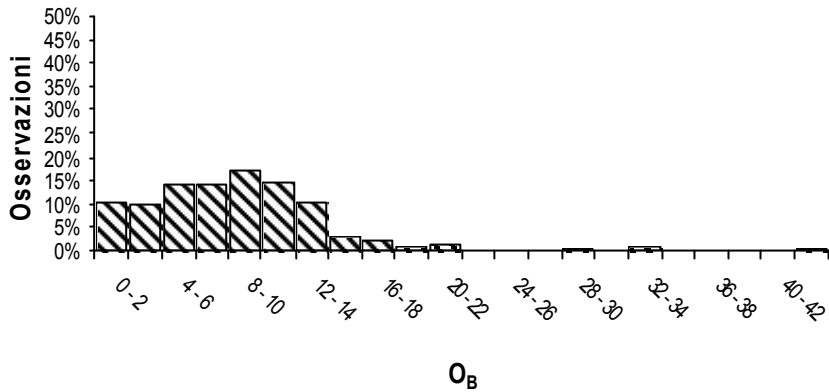
Tabella 20 - Numero di occorrenze del *Bowing* nelle diverse categorie di sequenza

		N	Media	Mediana	Min	Max	Dev.St.
Sequenze analizzate	Tutte	381	8,80	9,00	1,00	43,00	5,28
	Complete (C.)	197	9,75	9,00	1,00	33,00	4,79
	C. senza copula	177	9,81	9,00	1,00	33,00	4,95
	C. con copula	20	9,15	9,00	2,00	15,00	3,05

N, le dimensioni del campione di Q_B coincidono con il numero delle sequenze nelle diverse categorie.

Nelle “sequenze complete con copula” nel 45% dei casi il *Bowing* viene effettuato tra le 8-10 volte nella sequenza e non si osservano sequenze con più di 14-16 *Bowing*. Invece nelle “sequenze complete senza copula” i valori di Q_B si distribuiscono in percentuali quasi equivalenti (circa 15%) nel range da 4 a 12 *Bowing* nella sequenza, ma ci sono sequenze, seppur esigue in numero, in cui il maschio ha effettuato *Bowing* in numero maggiore (Figura 43).

Bowing in tutte le sequenze



Bowing nelle sequenze complete

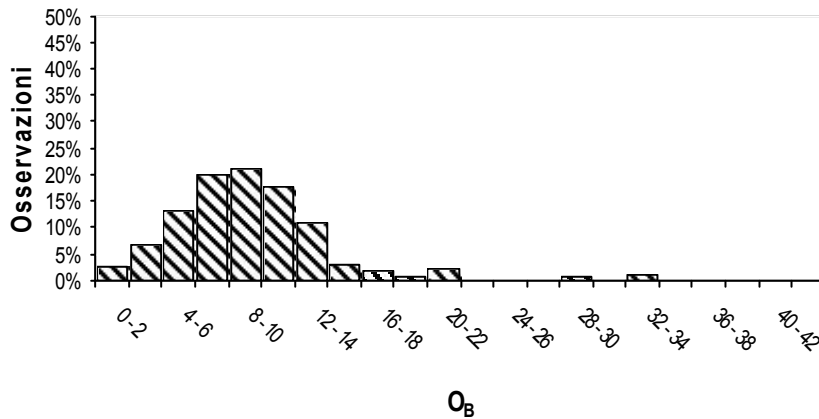
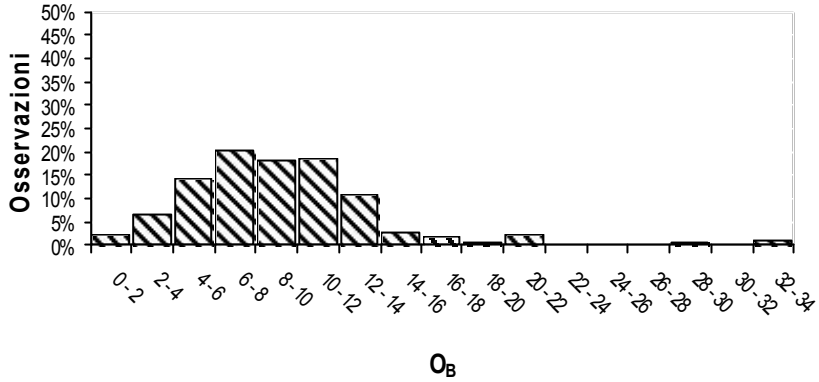


Figura 42 - Numero di occorrenze del *Bowing* in tutte le sequenze registrate ($N_{B,f} = 381$) (in alto) e in tutte le sequenze complete ($N_{B,f} = 197$) (in basso).

Bowing nelle sequenze senza copula



Bowing nelle sequenze con copula

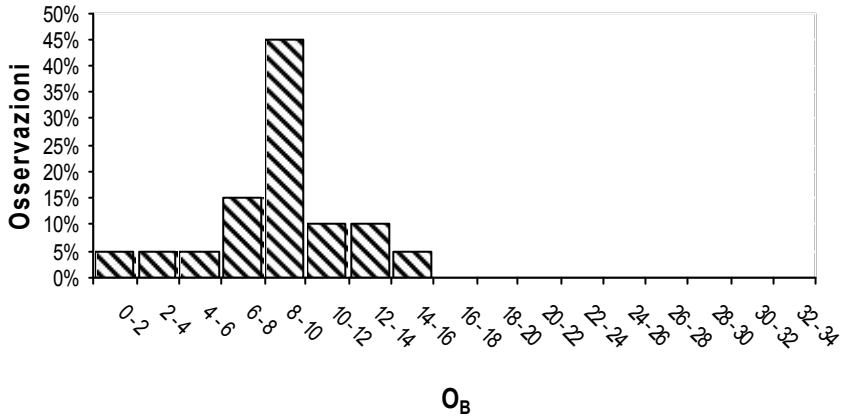


Figura 43 – Numero di occorrenze del *Bowing* in sequenze complete senza copula ($N_{B,f} = 177$) (in alto) e con copula ($N_{B,f} = 20$) (in basso) in *H. fagi*.

❖ La frequenza del *Bowing* (f_B) nella sequenza

Lo studio della frequenza del *Bowing* mette in relazione le due grandezze misurate per questo modulo la durata (d_B) ed il numero di occorrenze (O_B) nella sequenza di corteggiamento rapportando questo alla somma delle durate dei *Bowing* ($D_{B,s}$) eseguiti in ciascuna sequenza. Nella Tabella 21 sono riportati i valori medi delle grandezze coinvolte nel calcolo della frequenza del *Bowing* distinti per i diversi campioni di analisi.

Tabella 21 –Valori medi delle grandezze utilizzate nel calcolo della frequenza f_B del *Bowing*.

		$\overline{d_B}$ (s)	$\overline{D_B}$ (s)	$\overline{O_B}$ (n°)	$\overline{f_B}$ (s ⁻¹)
Sequenze analizzate	Tutte	0,30	2,69	8,80	3,64
	Complete (C.)	0,29	2,85	9,75	3,58
	C. senza copula	0,29	2,89	9,81	3,52
	C. con copula	0,26	2,41	9,15	4,03

$\overline{d_B} = (\sum d_{B,n})/n$ durata media del *Bowing*;

$\overline{D_B} = (\sum D_{B,s})/s$ durata media della somma delle durate dei *Bowing* nella sequenza;

$\overline{O_B} = (\sum O_{B,s})/s$ numero medio di occorrenze del *Bowing* nella sequenza;

$\overline{f_B} = (\sum f_{B,s})/s = (\sum O_{B,s}/D_{B,s})/s$ frequenza media del *Bowing*.

Come si può vedere dai valori in Tabella 22 considerando “tutte le sequenze” o solo le “sequenze complete” il valore medio della frequenza del *Bowing* nella sequenza di corteggiamento non varia molto e si aggira intorno ai 3,6 s⁻¹. L'esclusione delle sequenze frammentarie ha un effetto sulla dispersione dei dati, che nelle “sequenze complete” si distribuiscono tra 1 e 8 s⁻¹ (Figura 44) con il 60% di valori localizzati tra 3 e 4 *Bowing* al secondo (Tabella 22).

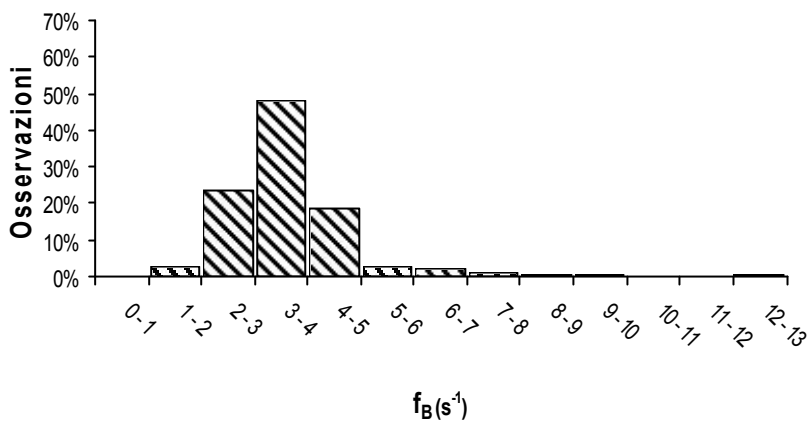
Tabella 22 - Frequenza del *Bowing* f_B (s^{-1}) nelle diverse categorie di sequenza in *H. fagi*.

Sequenze analizzate	N	Media	Mediana	Min	Max	Dev.St.
Tutte	343	3,64	3,57	1,39	12,50	1,21
Complete (C.)	197	3,58	3,53	1,46	7,14	0,71
C. senza copula	178	3,52	3,50	1,46	7,14	0,66
C. con copula	20	4,03	3,83	2,61	7,14	0,98

N, le dimensioni del campione di f_B coincidono con il numero delle sequenze nelle diverse classi di analisi.

Dal confronto delle sequenze complete con e senza successo (Figura 45) si rileva una frequenza del *Bowing* in media minore nei corteggiamenti che non hanno ottenuto l'accoppiamento (Tabella 22, test U di Mann-Whitney, $N_S = 20$, $N_U = 178$, $U = 1193$, $Z = 2,41$, $p=0,016$, $Z_{adj} = 2,41$, $p_{adj} = 0,016$). Nelle sequenze che hanno ottenuto la copula il maschio ha effettuato il *Bowing* con una frequenza pari a $4,03 s^{-1}$.

Frequenza del *Bowing* in tutte le sequenze



Frequenza del *Bowing* nelle sequenze complete

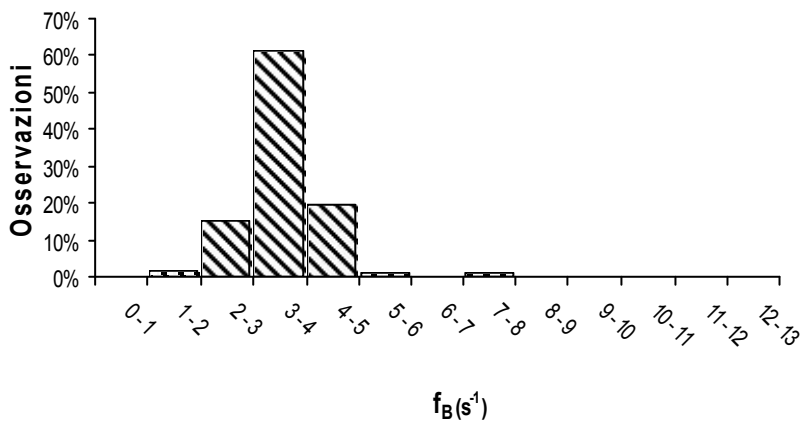


Figura 44 – Frequenza del *Bowing* nella sequenza: in alto, in tutte le sequenze ($N_{B,f} = 381$), in basso, nelle sequenze complete ($N_{B,f} = 197$) in *H. fagi*.

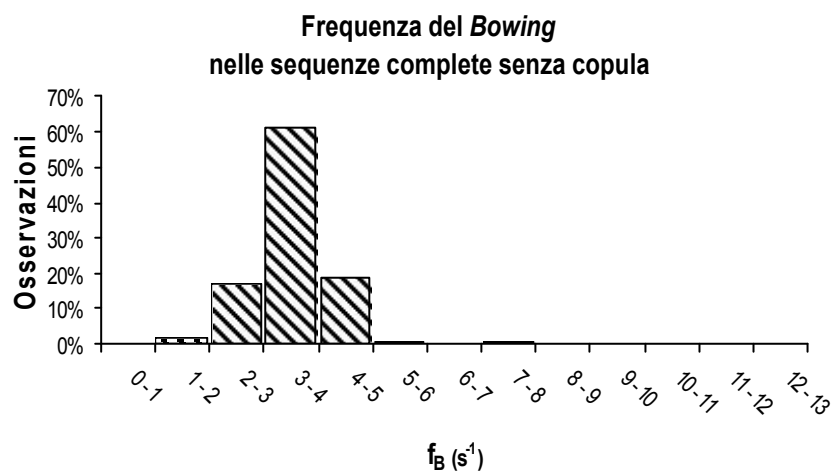
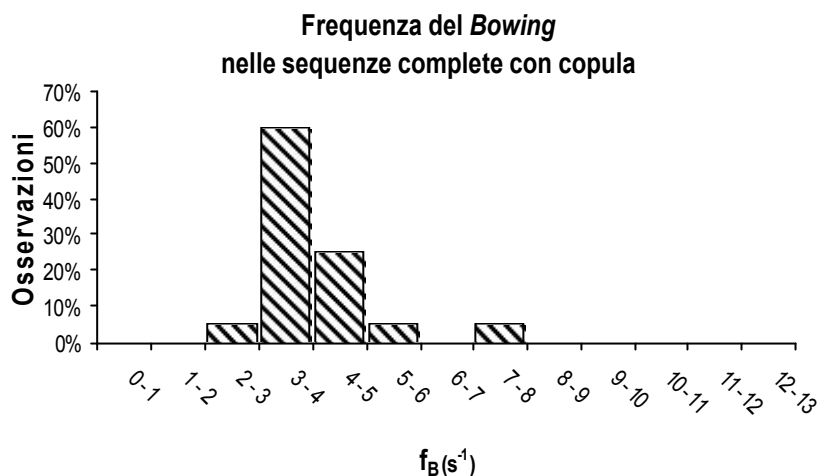


Figura 45– Frequenza del *Bowing* in sequenze complete senza copula ($N_{B,f} = 177$) (in alto) e con copula ($N_{B,f} = 20$) (in basso) in *H. fagi*.

3.3 - Il corteggiamento in *Hipparchia alcyone*

Un totale di 162 corteggiamenti sono stati registrati sulla specie *Hipparchia alcyone*, ma solo 105 sono stati utilizzati nelle diverse analisi per la descrizione quantitativa del rituale sessuale in questa specie. Dei corteggiamenti esaminati

33 hanno avuto successo (*corteggiamenti con copula*), mentre 72 non hanno raggiunto l'accoppiamento e sono terminati con l'abbandono del corteggiamento da parte del maschio (*corteggiamenti senza copula*).

3.3.1 La sequenza di corteggiamento

Il corteggiamento in *H. alcyone* descritto da Pinzari (2004) si componeva di cinque moduli comportamentali (*Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation*, *Copulation attempt* e *Clasping*). L'osservazione dei corteggiamenti registrati negli anni di dottorato ha permesso di completare l'etogramma del rituale anche in questa specie evidenziando l'esistenza del *Fanning*. La descrizione dettagliata di questo modulo in questa specie è riportata nell'etogramma in Tabella 5, ma esso non differisce nelle sue modalità di esecuzione dallo stesso modulo eseguito in *H. fagi*.

Alla luce di quanto osservato in *H. alcyone*, il corteggiamento è composto quindi di sei moduli comportamentali *Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation*, *Copulation attempt* e *Clasping*, come osservato anche nella specie *Hipparchia fagi*. I diversi moduli vengono effettuati secondo l'ordine individuato dall'analisi markoviana come si può vedere nel cinetogramma in Figura 46 dai valori maggiori di probabilità in uscita dai moduli. In particolare la probabilità di transire dal *Fanning* al *Circling* è del 60%, dal *Circling* al *Bowing* del 74%, dal *Bowing* all'*Antenna orientation* del 98%, dall'*Antenna orientation* al *Copulation attempt* del 9% ed infine da quest'ultimo modulo al *Clasping* del 73% (vedi in APPENDICE 14 e APPENDICE 15). L'analisi markoviana dei corteggiamenti rivela anche in questa specie la presenza di un loop della coppia dei moduli *Bowing* ed *Antenna orientation* come evidenzia l'elevata probabilità di transire da Ao a B (Figura 46). Inoltre, una volta portata a termine la sequenza con il *Clasping*, la possibilità che il maschio ricominci il corteggiamento è molto elevata a partire dal *Circling* (60%). Tuttavia anche qui emergono valori di probabilità bassi per le transizioni Ao-CA (9%) e Cl-Copula (11%) che sembrano non supportare rispettivamente la sequenza di corteggiamento (F-C-B-Ao-CA-Cl) e la necessità della successione dei sei moduli comportamentali per

ottenere l'accoppiamento. Dal confronto tra i corteggiamenti con e senza successo non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di transizioni da un modulo ad un altro e quindi in termini di sequenza (test U Mann-Whitney negativi, $0,25 < p < 1,00$, vedi in APPENDICE 16, APPENDICE 17, APPENDICE 18).

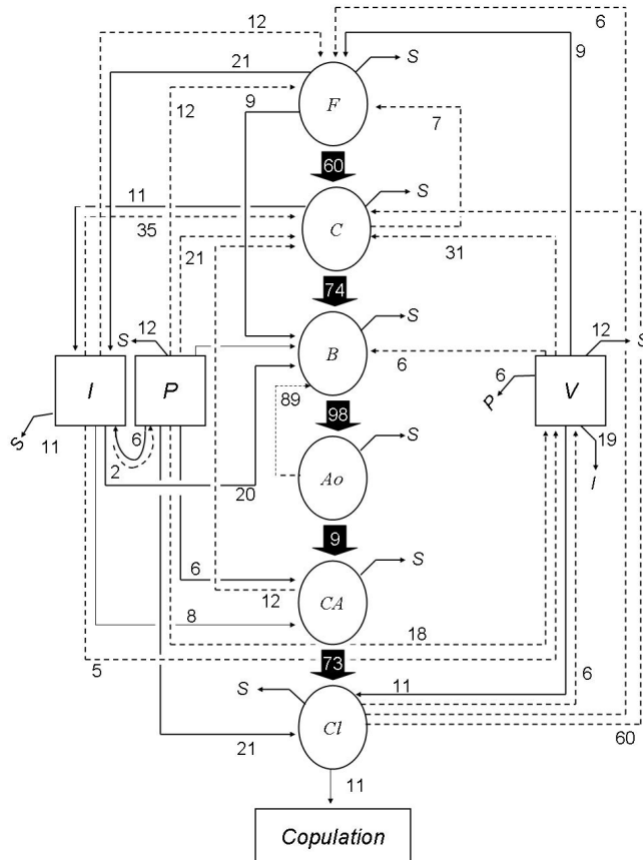


Figura 46 – Cinetogramma del corteggiamento in *H. alcyone*.

Per ciascun modulo comportamentale della sequenza di corteggiamento (nei cerchi) e per gli altri comportamenti maschili considerati (nei quadrati) sono indicate le probabilità di transizione (%) ad un altro comportamento in corrispondenza delle frecce. Le linee continue e quelle tratteggiate indicano rispettivamente la direzione della transizione in avanti ed indietro rispetto all'avanzare della sequenza di corteggiamento. Nel disegno sono state riportate le probabilità maggiori del 5%. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasp* (Cl); altri comportamenti del maschio: *Immobilità* (I), *Stop* (S), *Inseguimento a piedi* (P), *Inseguimento in volo* (V).

Includendo nell'analisi markoviana anche i comportamenti del maschio *Volo*, *Immobilità* ed *Inseguimento a piedi*, si evidenzia che essi non fanno parte della sequenza di corteggiamento, ma possono interrompere in qualsiasi momento (vedi in APPENDICE 14 e APPENDICE 15) temporaneamente la sequenza di corteggiamento o portare all'abbandono, *Stop* (Figura 46). Questi comportamenti sono stati osservati sia in corteggiamenti con successo che senza successo. L'abbandono (*Stop*, *S*) del corteggiamento si può osservare in corrispondenza di ogni fase della sequenza, ma soprattutto in corrispondenza del *Circling* (Tabella 23). Più frequentemente il maschio abbandona il corteggiamento di una femmina durante il suo inseguimento in volo (*Volo*), dopo una fase di *Immobilità*.

Tabella 23 – Abbandono del corteggiamento in corrispondenza di un modulo della sequenza in *H. alcyone*.

Da	A	N	%
F	S	1	1.39
C	S	8	11.11
B	S	6	8.33
Ao	S	3	4.17
CA	S	3	4.17
Cl	S	5	6.94
I	S	24	33.33
P	S	4	5.56
V	S	18	25.00
Totale		72	100.00

Transizioni dai moduli della sequenza di corteggiamento allo Stop (S)

Come in *H. fagi*, anche l'analisi dei rapporti "posizione/lunghezza" supporta la sequenza di eventi F-C-B-Ao-CA-Cl: i moduli comportamentali con valori medi dei rapporti più bassi occupano le posizioni iniziali della sequenza di corteggiamento ed all'aumentare dei valori medi si collocano i moduli successivi (Tabella 24). Tutti i test t di Student per dati dipendenti risultano statisticamente significativi per ciascuna coppia di moduli confrontati con $p < 0,0001$ (vedi in APPENDICE 13 e APPENDICE 12) attribuendo valenza statistica all'ordine dei moduli evidenziato.

Tabella 24 – Ordine di esecuzione dei moduli comportamentali del corteggiamento nell’analisi dei rapporti “posizione/lunghezza” in *H. alcyone*.

Moduli	N	Media	Deviazione Standard
<i>F</i>	96	0.27	0.35
<i>C</i>	412	0.28	0.36
<i>B</i>	378	0.51	0.10
<i>Ao</i>	361	0.56	0.08
<i>CA</i>	344	0.94	0.10
<i>Cl</i>	285	1.00	0.02

Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl).

L’analisi delle “precedenze” mostra risultati analoghi a quelli già illustrati nella specie *H. fagi*. In particolare, il corteggiamento termina con la copula con probabilità elevate, prossime al 100%, secondo l’aspettativa teorica (vedi par.2.2.6.1 in Materiali e metodi), ma dopo la successione di quattro moduli B-Ao-CA-Cl (valori nei cerchi in arancione tra questi moduli, Figura 47). Molto elevati sono infatti i valori di probabilità che l’*Antenna orientation* sia preceduto dal *Bowing* (quasi 100%), che il *Copulation attempt* sia preceduto dall’*Antenna orientation* (88%) e che il *Clasping* sia preceduto dal *Copulation attempt* (97%). Si evidenzia ancora la presenza del loop dei moduli B-Ao e la possibilità che i moduli iniziali *Fanning* e *Circling* non vengano sempre effettuati dal maschio (F precede C, 19,02%, C precede B, 9,51%). Anche in questa specie è possibile rilevare in aggiunta alla sequenza di corteggiamento regolare F-C-B-Ao-CA-Cl (Figura 47, valori di probabilità indicati nei cerchi in arancione) casi in cui F e C possano non essere presenti (cerchi verdi) dando luogo alle successioni di moduli seguenti: 1) F-B-Ao-CA-Cl (F precede B, 0,40%), 2) GB-Ao-CA-Cl (“start” precede C, 80,67%) e 3) B-Ao-CA-Cl (“start” precede B, 1,60%). Il primo ed il terzo caso sono riconducibili al contesto di interazione che, come osservato in *fagi*, fa riferimento all’orientamento già frontale del maschio ad inizio corteggiamento: l’esecuzione del *Circling* sembrerebbe anche qui del tutto superflua e quindi tale modulo probabilmente non viene eseguito. Il secondo

caso è in accordo con quanto rilevato nell'analisi markoviana ove le transizioni *Clasping* verso *Circling* sono caratterizzate da valori di probabilità molto elevate, denotando l'eventualità di poter ricominciare il corteggiamento una volta terminata la sequenza senza eseguire il *Fanning*.

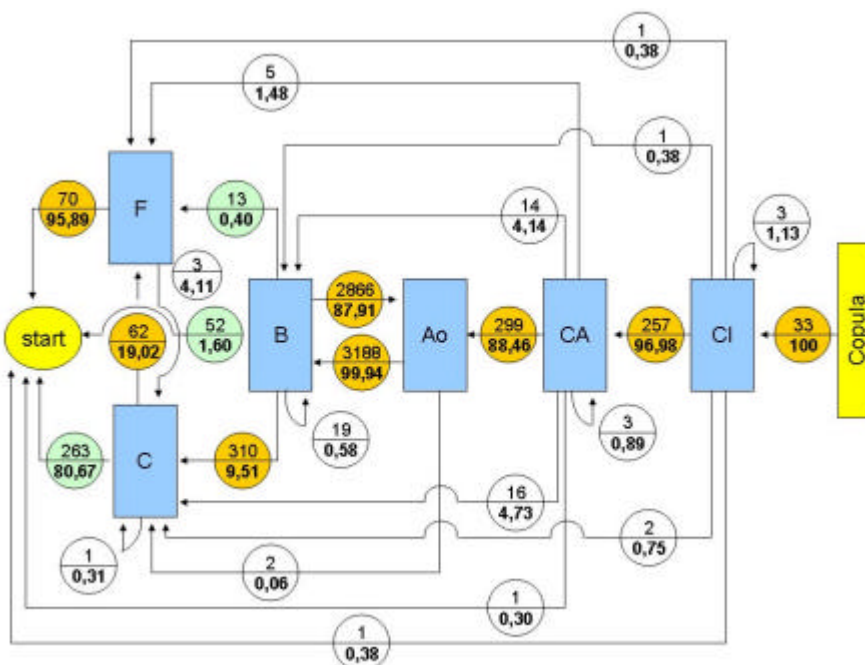


Figura 47– Schema riassuntivo dei risultati dell'analisi delle “precedenze” in *H. alcyone*: nei rettangoli sono indicati i moduli della sequenza di corteggiamento: Fanning (F), Circling (C), Bowing (B), Antenna orientation (Ao), Copulation attempt (CA), Clasping (Cl), e la copula; le frecce che si dipartono da ciascun rettangolo indicano quali moduli sono precedenti; nei cerchi associati alle frecce sono riportate le frequenze osservate per ciascun modulo in valore assoluto (metà superiore) ed in percentuale (metà inferiore). Lo start è una categoria virtuale che indica l'inizio della interazione. I cerchi in arancione evidenziano la sequenza F-C-B-Ao-CA-Cl, in verde le transizioni F-B, start-B e start-C, in bianco quelle considerate trascurabili per i valori di probabilità.

3.3.2 I rituali

L'osservazione dei rituali alla luce della sequenza definita (F-C-B-Ao-CA-Cl) ha evidenziato, anche in *Hipparchia alcyone*, che ciascuno di essi può essere scomposto in una o più sequenze componenti (Tabella 25). Nella maggior parte

dei casi (89,5%) i rituali sono molto complessi e costituiti dalla successione di più sequenze differentemente composte e lunghe (catene). Nel 10,5% dei casi il corteggiamento è rappresentato da una singola sequenza del tipo F-C-B-Ao-CA-CI e si conclude sempre con la copula.

Tabella 25 – Composizione dei corteggiamenti in *H. alcyone*.

Corteggiamento	Singola sequenza	Più sequenze	Totali
Con successo	11	22	33
Senza successo	20	52	72
Totali	31	74	105

I 105 corteggiamenti esaminati sono stati scomposti in 531 catene di moduli. Di queste solo il 7,3% sono costituite da sei moduli e quindi sono riconducibili alla sequenza di corteggiamento definita; la maggior parte delle catene è costituita da un numero minore di moduli comportamentali da uno a cinque (Tabella 26).

Tabella 26 – Lunghezza delle catene in *H. alcyone*

Catene	N	%
1MODULO	114	21.5
2MODULI	45	8.5
3MODULI	66	12.4
4MODULI	93	17.5
5MODULI	174	32.8
6MODULI	39	7.3
Totali	531	100.0

Sei moduli = sequenza

Inoltre anche la loro composizione in moduli è varia ed appare caratterizzata da alcune irregolarità nell'ordine di esecuzione degli eventi comportamentali rispetto alla sequenza di corteggiamento nota. Queste però vanno diminuendo

dalle catene di pochi moduli a quelle formate da un numero di moduli maggiore (Tabella 27). Le irregolarità rilevate potrebbero essere frutto della difficile interpretazione delle sequenze di corteggiamento soprattutto nei casi di rituali fortemente contrastati e interrotti dalla femmina. L'effetto del comportamento della femmina sul corteggiamento si traduce molto probabilmente nella ripetizione dei moduli o della sequenza o di frammenti di essa come si osserva nei risultati dell'analisi successiva.

L'analisi "fine-inizio" sequenza si basa sulle 531 catene di moduli individuate nei rituali esaminati ed i risultati sono illustrati nel disegno in Figura 48 ed in dettaglio, in APPENDICE 21.

Tabella 27 – Composizione dei corteggiamenti in *Hipparchia alcyone*.

CATENE 1 MODULO			CATENE 4 MODULI		
	N	%		N	%
-F	13	11.40	-F-C-B-Ao	4	4.30
-C	73	64.04	-F-C-B-CA	2	2.15
-B	1	0.88	-F-B-Ao-CA	3	3.23
-CA	3	2.63	-C-B-Ao-CA	46	49.46
-Cl	24	21.05	-B-Ao-CA-Cl	38	40.86
Totali	114	100.00	Totali	93	100.00

CATENE 2 MODULI			CATENE 5 MODULI		
	N	%		N	%
-F-C	5	11.11	-F-C-B-Ao-CA	10	5.75
-F-B	1	2.22	-F-B-Ao-CA-Cl	7	4.02
-F-CA	5	11.11	-C-F-B-Ao-CA	1	0.57
-F-Cl	1	2.22	-C-B-Ao-CA-Cl	156	89.66
-C-F	2	4.44	Totali	174	100.00
-C-B	8	17.78			
-C-CA	6	13.33			
-C-Cl	2	4.44			
-B-Ao	6	13.33			
-B-CA	1	2.22			
-CA-Cl	8	17.78			
Totali	45	100.00			

CATENE 6 MODULI					
	N	%		N	%
-F-C-B-Ao-CA-Cl	39	100.00			
Totali	39	100.00			

CATENE 3 MODULI					
	N	%		N	%
-F-C-B	1	1.52	-C-B-CA	3	4.55
-F-C-CA	1	1.52	-C-CA-Cl	9	13.64
-F-B-Ao	1	1.52	-B-Ao-CA	7	10.61
-C-B-Ao	43	65.15	-B-Ao-Cl	1	1.52
Totale	66	100.00			

In carattere grassetto le catene tendenti alla sequenza F-C-B-Ao-CA-Cl nelle percentuali più elevate.

Hipparchia alcyone

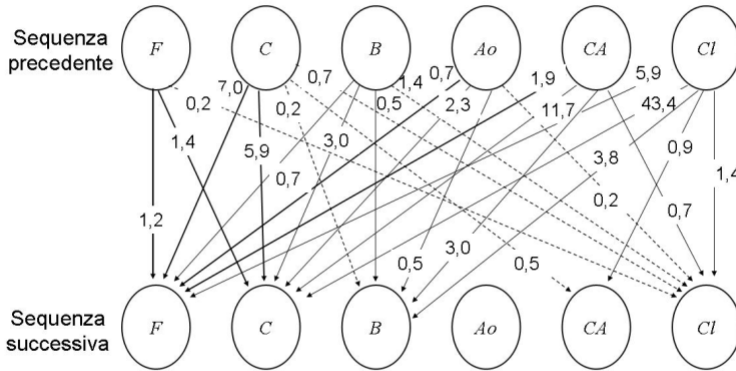


Figura 48 – Risultati dell’analisi “fine-inizio” sequenza in *H. alcyone*. In corrispondenza delle frecce sono indicati i casi osservati (%) delle transizioni dall’ultimo modulo di una sequenza (o frammento di essa) nella fila superiore a quello iniziale della sequenza (o frammento di essa) successiva nella fila inferiore. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl). Con le frecce dalla linea continua sono indicate le transizioni in accordo con il concetto di sequenza, con quelle dalla linea tratteggiata le transizioni in disaccordo.

Come si può vedere in Figura 48, anche in questa specie, nel disegno ad ogni modulo della sequenza superiore corrispondono, attraverso le diverse frecce, quasi tutti i moduli della sequenza inferiore (successiva) e nel 43,4% il maschio giunge alla conclusione della sequenza, al *Clasping*, e poi dà di nuovo inizio al corteggiamento a partire dal *Circling*, come ha suggerito in precedenza l’analisi markoviana (par.2.2.6.1). Tuttavia esaminando le transizioni (N = 426) tra i moduli finali ed iniziali delle sequenze in successione è possibile individuare, come in *H. fagi*, le stesse quattro casistiche più generali, a cui rimandare le transizioni osservate (vedi in APPENDICE 22). Il maschio può riprendere a corteggiare eseguendo nella sequenza successiva (fila inferiore, Figura 48): a) nel

3,0% dei casi, un modulo successivo a quello a cui si interrotto saltando uno o alcuni dei moduli della sequenza non rispettandone l'ordine (F-C-B-Ao-CA-CI); b) nel 2,3% il modulo immediatamente successivo, cioè continua la sequenza precedente; c) nel 9,6%, lo stesso modulo; d) nel 85,0% i moduli precedenti. Il caso "d" è quello maggiormente rappresentato e, come si vede in Figura 48 dalle frecce dalla linea continua, il maschio riprende a corteggiare la partner preferibilmente dal *Bowing* o dai moduli precedenti, *Fanning* e *Circling*, e mai dall'*Antenna orientation*. Le transizioni ricondotte alle altre casistiche possono essere considerate trascurabili, come suggerito nella stessa analisi in *H. fagi*.

3.3.3 I moduli comportamentali nella sequenza

❖ Numero di occorrenze nella sequenza (O_{modulo})

In questa specie sono stati rilevati risultati analoghi ad *H. fagi* riguardo al numero di occorrenze dei moduli nella sequenza (Tabella 28): infatti il maschio effettua in media una sola volta i moduli *Fanning*, *Circling*, *Copulation attempt* e *Clasping*, mentre più volte *Bowing* ed *Antenna orientation*.

Tabella 28 – Numero di occorrenze dei moduli nella sequenza in *H. alcyone*

	F	C	B	Ao	CA	CI
Sequenze (%)	18,08	77,40	71,75	68,55	65,16	53,67
N _{moduli}	96	411	381	364	346	285
Media (±DS)	1,00(± 0,00)	1,00 (± 0,05)	8,56 (± 5,40)	8,77 (± 5,31)	1,01 (± 0,08)	1,01 (± 0,10)
Min – Max	1 - 1	1 - 2	1 - 25	1 - 25	1 - 3	1 - 2

Nella prima riga i moduli della sequenza: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (CI). I valori percentuali relativi alle sequenze indicano in quante sequenze o frammenti di essa (N_{seq} = 531) ciascun modulo è stato osservato.

L'intervallo di variazione del numero di occorrenze del *Bowing* e dell'*Antenna orientation* nella sequenza è equivalente ed abbastanza ampio da 1 a 25 volte nella sequenza (Figura 49 e Figura 50). La similarità tra le distribuzioni di

frequenza di O dei due moduli è legata probabilmente all'associazione dei due moduli nelle ripetizioni (loop B-Ao) nella sequenza.

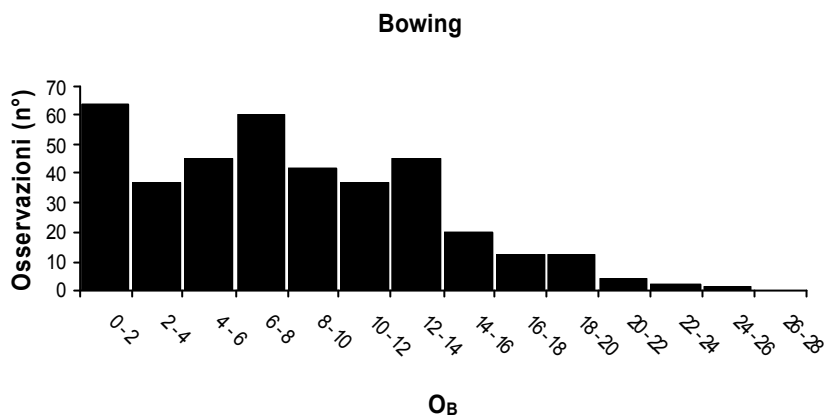


Figura 49 - Numero di occorrenze del Bowing, O_B ($N_{B,a} = 345$) nella sequenza di corteggiamento in *H. alcyone*.

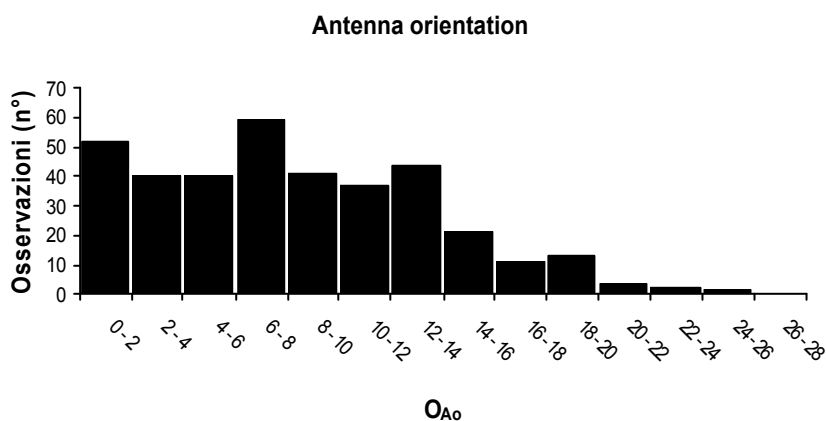


Figura 50- Numero di occorrenze dell'Antenna orientation, O_{Ao} ($N_{Ao,a} = 364$) nella sequenza di corteggiamento in *H. alcyone*.

❖ **Durata del singolo modulo (d_{modulo})**

I moduli iniziali e finali della sequenza di corteggiamento presentano durate maggiori in termini di diversi secondi ed anche una maggiore variabilità rispetto

ai moduli centrali, dalle durate di pochi decimi di secondo (Figura 51 e Tabella 29).

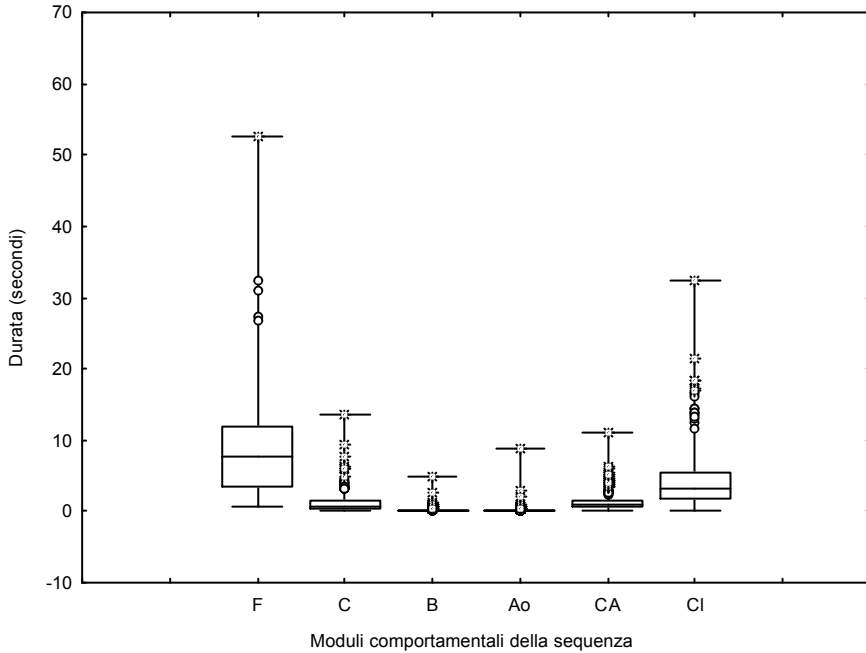


Figura 51– Durata dei moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento in *H. alcyone*. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (CI).

Tabella 29 – Durata dei moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento in *H. alcyone*.

Modulo	N	Media	Mediana	Min	Max	Dev. Std.
F	96	9,53	7,70	0,60	52,60	8,33
C	412	1,19	0,80	0,04	13,52	1,30
B	3261	0,20	0,20	0,04	4,96	0,11
Ao	3191	0,12	0,12	0,04	8,92	0,18
CA	348	1,28	1,00	0,04	11,08	1,11
CI	288	4,39	3,16	0,16	32,28	4,00

Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (CI); N, numero dei moduli misurati; Le durate dei diversi moduli sono espresse in secondi.

3.3.4 Il Bowing

Per le stesse ragioni esposte in *H. fagi* anche in *H. alcyone* il *Bowing* è stato analizzato in modo più approfondito nelle sue caratteristiche durata (d_B) e numero di occorrenze nella sequenza (O_B), nonché la sua frequenza. Le analisi statistiche sono state realizzate prendendo in considerazione solo le “sequenze complete”. Quindi, come illustrato in *H.fagi*, per ciascuna delle grandezze misurate, dal campione “tutte le sequenze” è stato generato il sottocampione delle “sequenze complete”. Queste sono state studiate anche separatamente in “sequenze con copula e senza copula” e comparate.

❖ Durata del singolo *Bowing*

Nelle “sequenze complete” il range di variazione delle durate del singolo *Bowing* si ridimensiona a destra della mediana (Tabella 30) rispetto al campione iniziale dei dati (tutte le sequenze), ma la durata media del singolo *Bowing* (d_B) non varia mantenendosi sul valore di $0,20 \pm 0,08$ secondi (Figura 52). Non si rilevano differenze statisticamente significative nelle “sequenze complete con copula e senza copula” (test U di Mann-Whitney $N_U = 1981$, $N_S = 369$, $U = 353417$, $Z = 1,01$, $p = 0,31$) che suggeriscano l’esistenza di pattern comportamentale tipico delle sequenze con successo (Figura 53).

Tabella 30 - Durata del singolo *Bowing* nelle diverse categorie di sequenza in *H. alcyone*.

		N	Media	Mediana	Min	Max	Dev.St.
Sequenze analizzate	Tutte	3261	0,20	0,20	0,04	4,96	0,11
	Complete (C.)	2350	0,20	0,20	0,04	2,56	0,08
	C. senza copula	1981	0,20	0,20	0,04	2,56	0,08
	C. con copula	369	0,20	0,20	0,04	1,00	0,07

Le durate sono espresse in secondi; N, numero dei *Bowing* nelle diverse categorie di sequenza.

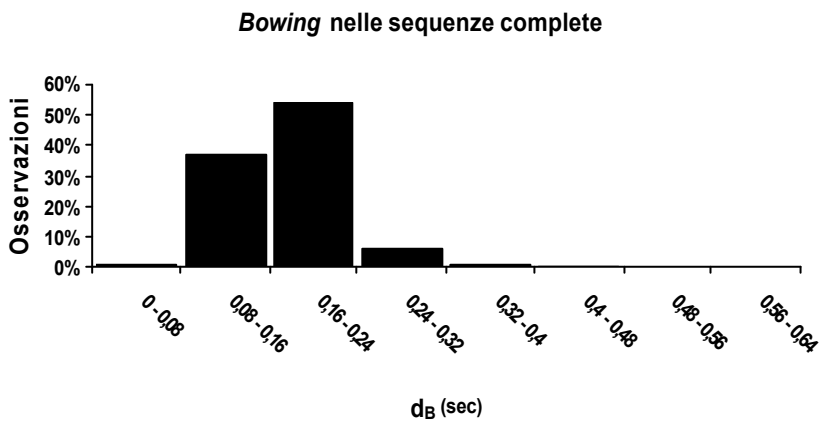
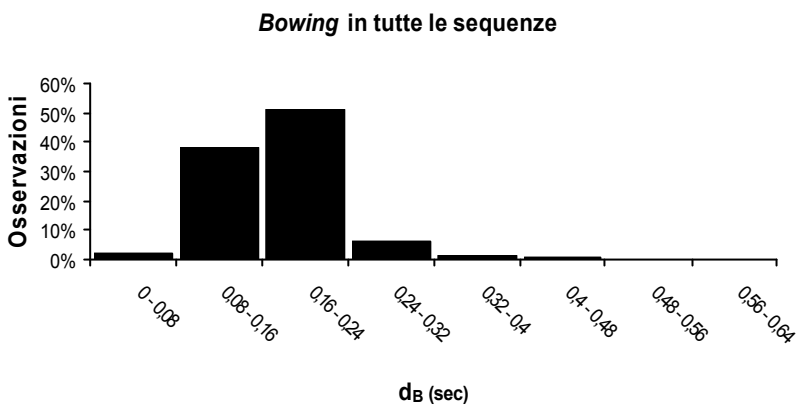


Figura 52 – Durata del singolo *Bowing* in tutte le sequenze registrate ($N_{B,a} = 3261$) (in alto) e solo nelle sequenze complete ($N_B = 2350$) (in basso) in *H. alcyone*.

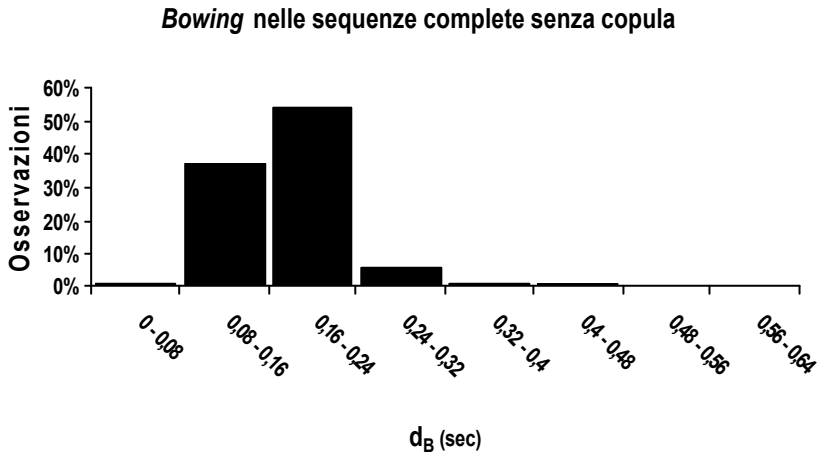
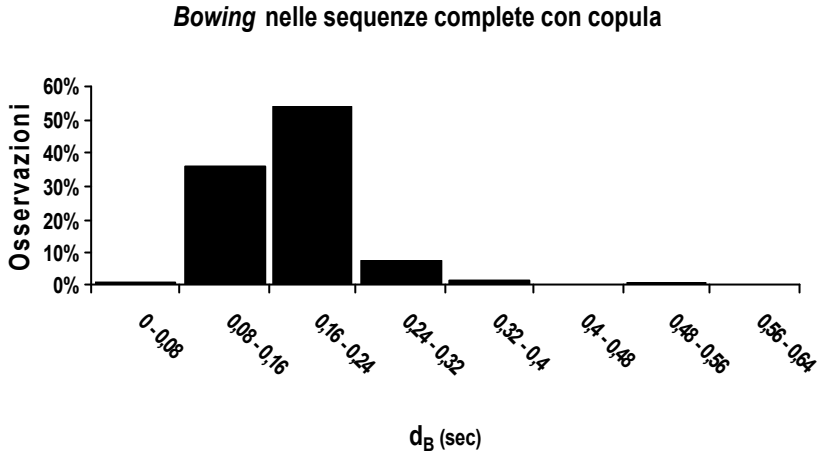


Figura 53 – Durata del singolo *Bowing* nelle sequenze complete con copula ($N_B = 369$) (in alto) e nelle sequenze complete senza copula ($N_B = 1981$) (in basso) in *H. alcyone*.

❖ **Numero di occorrenze del *Bowing* nella sequenza**

L'analisi delle "sequenze complete" evidenzia un valore medio di O_B pari a 9,77 \pm 4,96 volte nella sequenza, pur mantenendosi quasi lo stesso range di variazione osservato nel campione iniziale "tutte le sequenze" (Tabella 31, Figura 54).

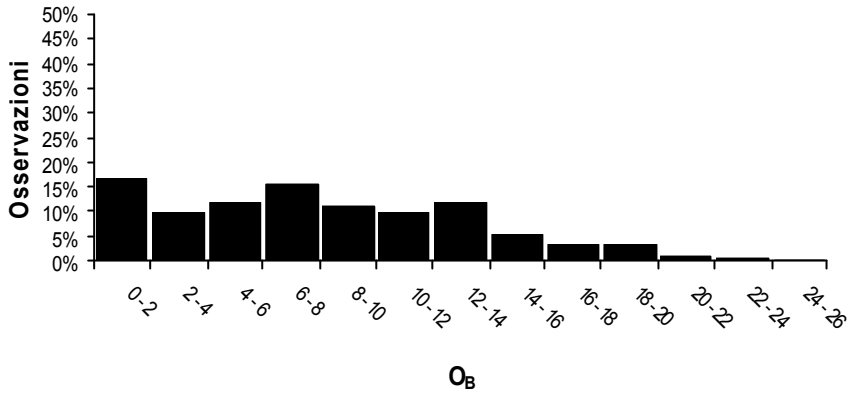
Tabella 31 - Numero di occorrenze del *Bowing* nelle diverse categorie di sequenza in *H. alcyone*.

	N	Media	Mediana	Min	Max	Dev.St.
Tutte	345	8,56	8,00	1,00	25,00	5,40
Sequenze Complete (C.)	239	9,77	9,00	1,00	24,00	4,96
Sequenze analizzate C. senza copula	208	9,44	9,00	1,00	24,00	4,96
C. con copula	31	11,90	12,00	5,00	21,00	4,51

N, le dimensioni del campione di O_B esaminato coincidono con il numero delle sequenze nell'analisi delle occorrenze.

Se si esaminano il numero di occorrenze di questo modulo nelle "sequenze complete" distinguendole in base all'esito del corteggiamento (Figura 55) si può notare che il maschio effettua in media un numero di *Bowing* maggiore nelle sequenze con copula ($O_{B,S} = 11,90 \pm 4,51$ volte nella sequenza) che in quelle senza copula ($O_{B,U} = 9,44 \pm 4,96$ volte) (test U di Mann-Whitney, $N_S = 31$, $N_U = 208$, $U = 2368$, $Z = -2,39$, $p = 0,017$).

Bowing in tutte le sequenze



Bowing nelle sequenze complete

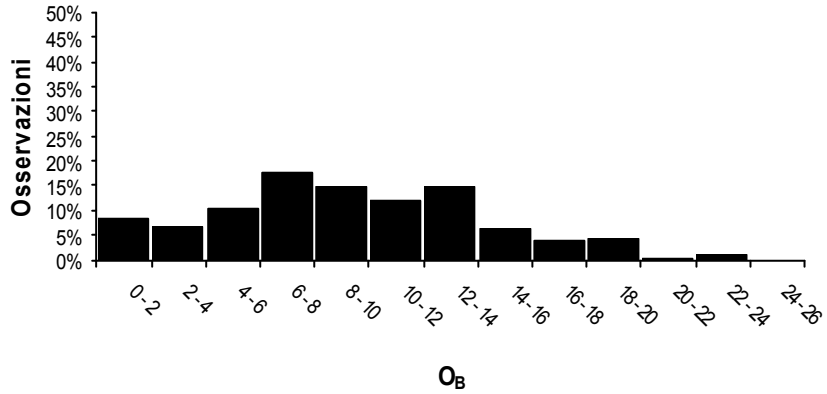


Figura 54 - Numero di occorrenze del *Bowing* in tutte le sequenze registrate ($N_B = 345$) (in alto) e in tutte le sequenze complete ($N_B = 239$) (in basso) in *H. alcyone*.

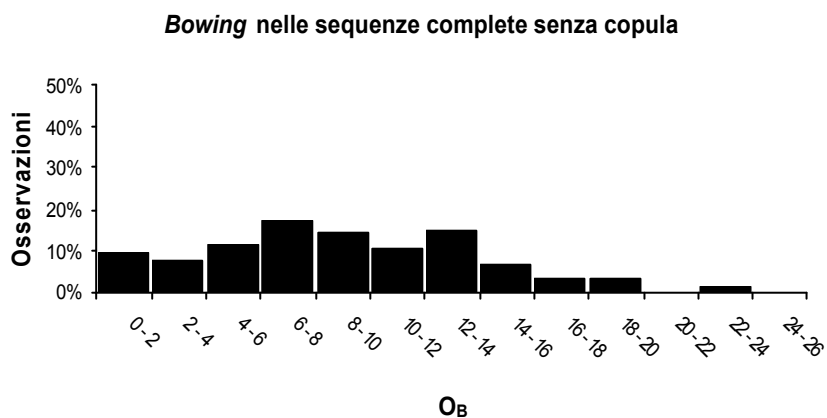
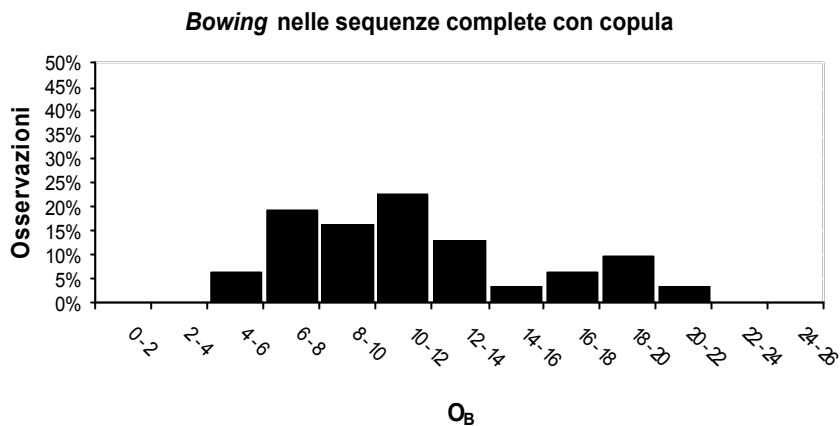


Figura 55– Numero di occorrenze del *Bowing* in sequenze complete senza copula ($N_B = 208$) (in alto) e con copula ($N_B = 31$) (in basso) in *H. alcyone*.

❖ La frequenza del *Bowing* nella sequenza

Lo studio della frequenza del *Bowing* mette in relazione le due grandezze misurate per questo modulo la durata (d_B) ed il numero di occorrenze (O_B) nella sequenza di corteggiamento rapportando questo alla somma delle durate dei *Bowing* ($D_{B,s}$) eseguiti in ciascuna sequenza. Nella Tabella 32 sono riportati i valori medi delle grandezze coinvolte nel calcolo della frequenza del *Bowing* distinti per i diversi campioni di analisi.

Tabella 32 – Valori medi delle grandezze utilizzate nel calcolo della frequenza del *Bowing* (f_B) in *H. alcyone*.

		$\overline{d_B}$ (s)	$\overline{D_B}$ (s)	$\overline{O_B}$ (n°)	$\overline{f_B}$ (s ⁻¹)
Sequenze analizzate	Tutte	0,20	1,71	8,56	5,16
	Complete (C.)	0,20	1,93	9,77	5,11
	C. senza copula	0,20	1,86	9,44	5,11
	C. con copula	0,20	2,40	11,90	5,01

$\overline{d_B} = (\sum d_{B,n})/n$ durata media del *Bowing*;

$\overline{D_B} = (\sum D_{B,s})/s$ durata media della somma delle durate dei *Bowing* nella sequenza;

$\overline{O_B} = (\sum O_{B,s})/s$ numero medio di occorrenze del *Bowing* nella sequenza;

$\overline{f_B} = (\sum f_{B,s})/s = (\sum O_{B,s}/D_{B,s})/s$ frequenza media del *Bowing*.

L'analisi statistica delle frequenze del *Bowing* in questa specie rivela che il maschio esegue il *Bowing* con una frequenza media intorno ai 5 s⁻¹, valore che si mantiene costante sia che si analizzino “tutte le sequenze” che solo le “sequenze complete” (Tabella 33). Solo il range di variazione di O_B , seppur sempre molto, si riduce a sinistra della mediana nelle “sequenze complete” (Figura 56).

Tabella 33 - Frequenza del *Bowing* f_B (s^{-1}) nelle diverse classi di sequenza in *H. alcyone*.

Sequenze analizzate	N	Media	Mediana	Min	Max	Dev.St.
Tutte	378	5,16	5,00	0,39	10,71	1,20
Complete (C.)	239	5,11	5,00	1,92	10,71	1,03
C. senza copula	211	5,11	5,00	1,92	10,71	1,05
C. con copula	31	5,01	4,88	3,38	6,85	0,87

N, le dimensioni del campione di f_B coincidono con il numero delle sequenze nelle diverse classi di analisi.

Nelle sequenze complete con e senza successo (Figura 57) si rileva una differenza statisticamente significativa tra le frequenze nelle due classi di analisi: in particolare la frequenza del *Bowing* è in media maggiore nei corteggiamenti che non hanno ottenuto l'accoppiamento (test U di Mann-Whitney, $N_S = 31$, $N_U = 178$, $U = 426$, $Z = 7,51$, $p < 0,0001$). Nelle sequenze che hanno avuto successo il maschio ha eseguito il *Bowing* con una frequenza media pari a $5,01 s^{-1}$.

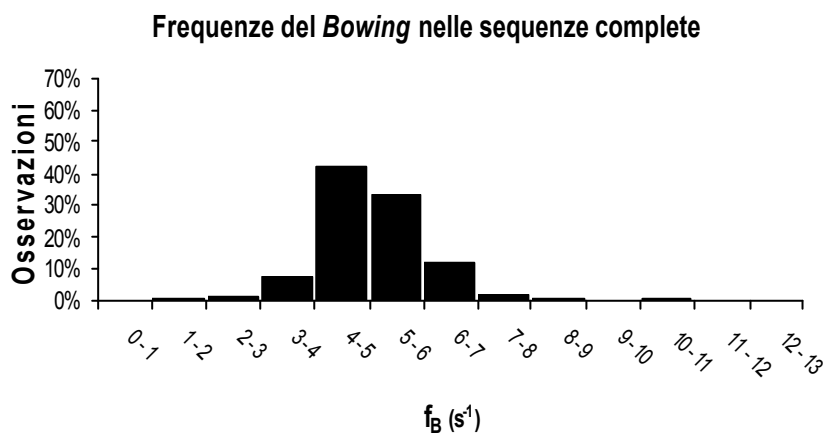
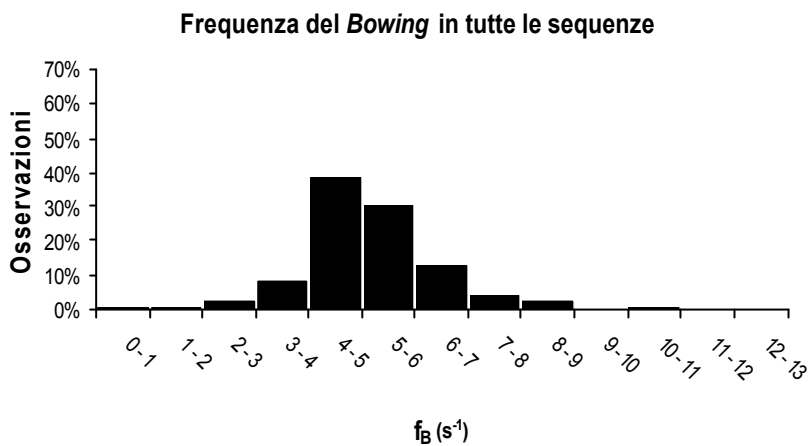
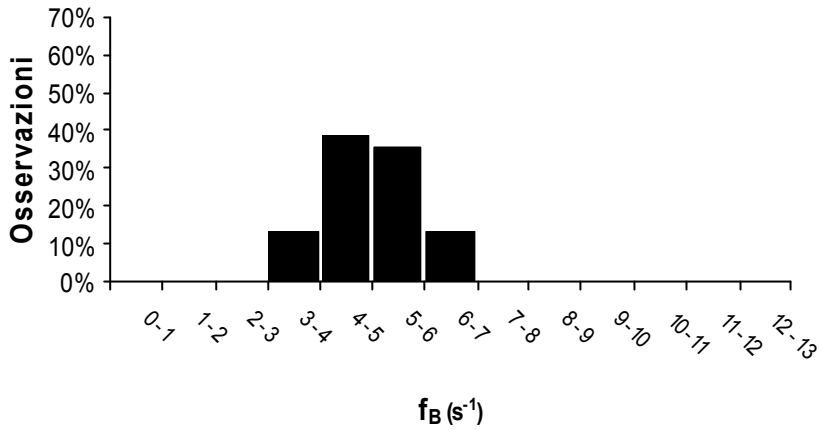


Figura 56 – Frequenza del *Bowing* in “tutte le sequenze” registrate ($N_B = 345$) (in alto) e nelle “sequenze complete” ($N_B = 239$) (in basso) in *H. alcyone*.

Frequenza del Bowing nelle sequenze con copula



Frequenza del Bowing nelle sequenze complete senza copula

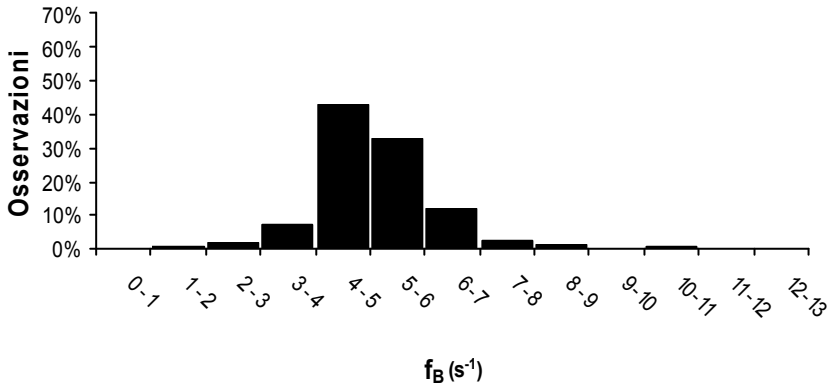


Figura 57 – Frequenza del *Bowing* in sequenze complete senza copula ($N_B = 208$) (in alto) e con copula ($N_B = 31$) (in basso) in *H. alcyone*.

3.4 - Il corteggiamento: *Hipparchia fagi* vs *Hipparchia alcyone*

3.4.1 La sequenza di corteggiamento

Sebbene già sia evidente l'elevata similarità in termini di sequenza di corteggiamento tra le due specie dal semplice confronto dei rispettivi cinetogrammi la sequenza è stata comparata esaminando le frequenze di transizione osservate tra i sei moduli comportamentali. Come ci si aspettava l'inferenza statistica ha evidenziato che le due specie non differiscono in termini di sequenza di corteggiamento. In entrambe il maschio esegue il corteggiamento dal *Fanning* sino al *Clasping* (Tabella 34).

Tabella 34 – Sequenza di corteggiamento a confronto nelle due specie, Test U di Mann-Whitney

Transizioni	N _a	N _f	Mediana _a	Mediana _f	U	Z	p
F-C	57	104	1,00	1,00	2964	0,00	1,00
F-B	9	28	1,00	1,00	126	0,00	1,00
C-B	306	274	1,00	1,00	41922	0,00	1,00
B-Ao	362	331	8,00	9,00	59834	0,03	0,98
Ao-B	334	323	8,00	8,00	51571	0,97	0,33
Ao-CA	298	216	1,00	1,00	32184	0,00	1,00
CA-CI	256	205	1,00	1,00	26240	0,00	1,00

Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (CI);

3.4.2 I moduli comportamentali

Le due specie sono state confrontate in merito alla durata ed alle occorrenze dei sei moduli comportamentali esaminando “tutte le sequenze” registrate.

❖ Durate (d_{modulo})

In *H. alcyone* il maschio effettua un *Bowing* in media di durata minore rispetto a quanto osservato in *H. fagi* (Figura 59, $d_{B,a} = 0,20 \pm 0,11$ s; $d_{B,f} = 0,30 \pm 0,15$ s) e lo

stesso vale per il modulo *Antenna orientation* (Figura 59, $d_{Ao,a} = 0,12 \pm 0,18$ s; $d_{Ao,f} = 0,15 \pm 0,007$ s) (Tabella 35, test U di Mann-Whitney).

Tabella 35 - Test U di Mann-Whitney, differenze nella durata dei moduli comportamentali nella sequenza tra le due specie *H. fagi* ed *H. alcyone*.

Modulo	Mediana _a	N _a	Min _a	Max _a	Mediana _f	N _f	Min _f	Max _f	U	Z	P
F	7,70	96	0,60	52,60	7,68	167	0,08	60,24	7552	0,78	0,4346
C	0,80	412	0,04	13,52	0,78	356	0,04	34,12	72734	-0,20	0,8444
B	0,20	3261	0,04	4,96	0,28	3033	0,04	2,96	1755649	44,29	<0,0001
Ao	0,12	3191	0,04	8,92	0,12	2913	0,04	2,36	2984919	-24,18	<0,0001
CA	1,00	348	0,04	11,08	1,04	255	0,12	5,36	42547	-0,86	0,3885
Cl	3,16	288	0,16	32,28	2,84	219	0,12	21,32	28450	1,89	0,0590

N, numero di osservazioni, Min e Max, minimum e maximum nei rituali delle due specie. Le durate sono espresse in secondi.

Invece per quanto riguarda le durate degli altri moduli della sequenza analoghi nelle due specie non si rilevano differenze statisticamente significative. Infatti come si può osservare nei grafici in Figura 58 e Figura 60, le distribuzioni di frequenza delle durate dei moduli iniziali, *Fanning* e *Circling*, e finali, *Copulation attempt* e *Clasping*, delle due specie sono completamente sovrapposte.

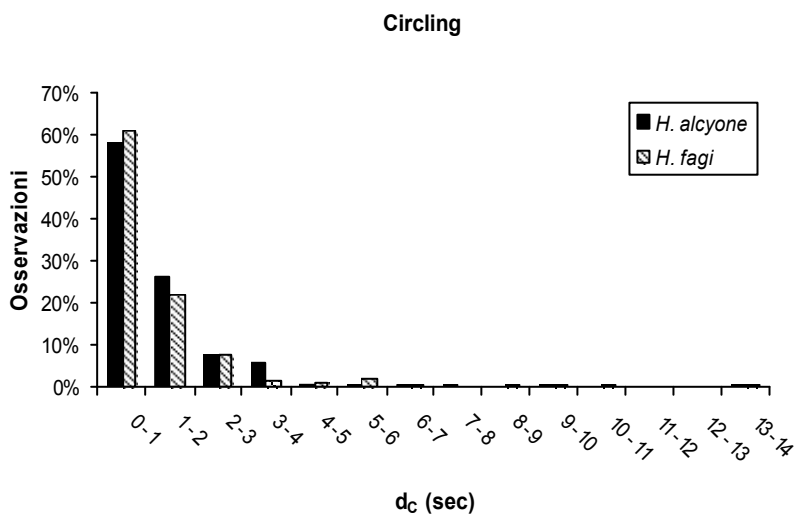
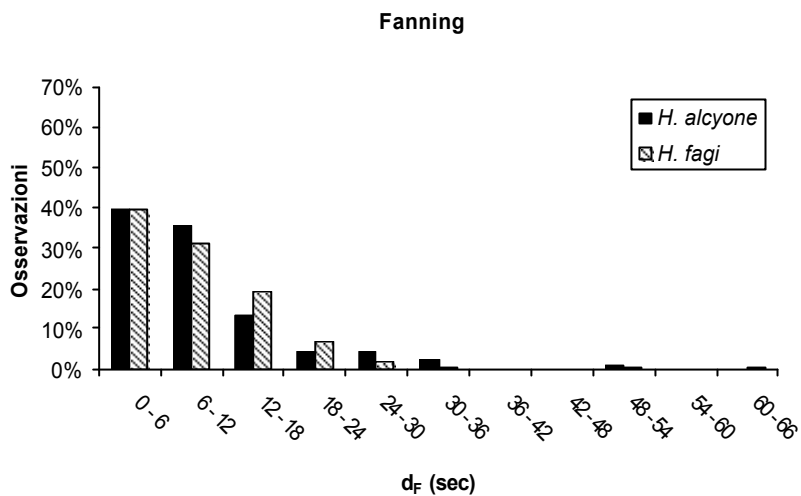


Figura 58 –Durata del *Fanning* ($N_{F,a} = 96$; $N_{F,f} = 167$) e del *Circling* ($N_{C,a} = 412$; $N_{C,f} = 356$) in *H. fagi* ed in *H. alcyone*.

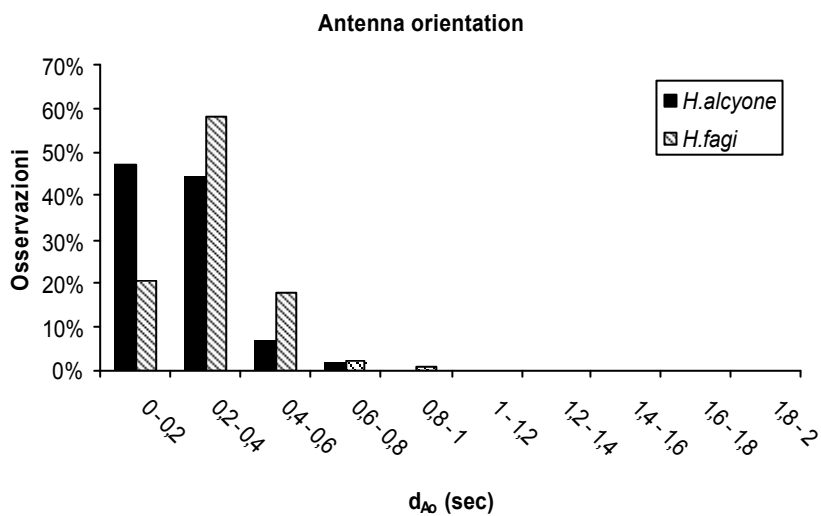
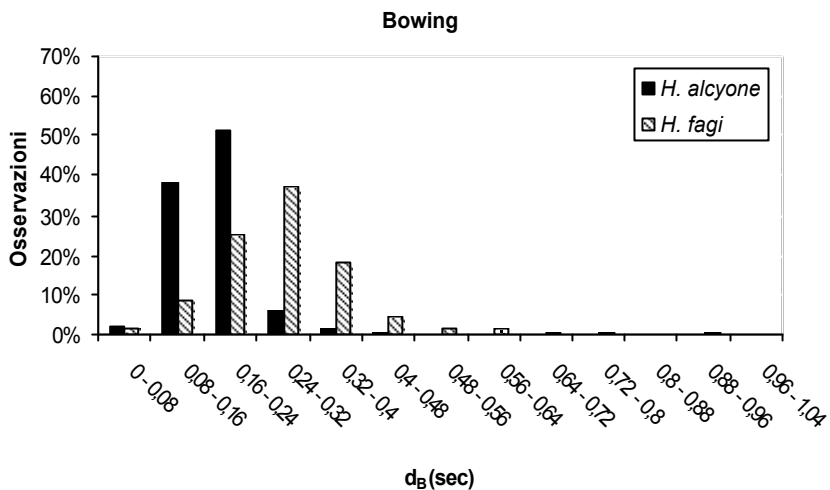


Figura 59 – Durata dei moduli *Bowing* ($N_{B,a} = 3261$; $N_{B,f} = 3033$) ed *Antenna orientation* ($N_{A0,a} = 3191$; $N_{A0,f} = 2913$) in *H. fagi* ed in *H. alcyone*.

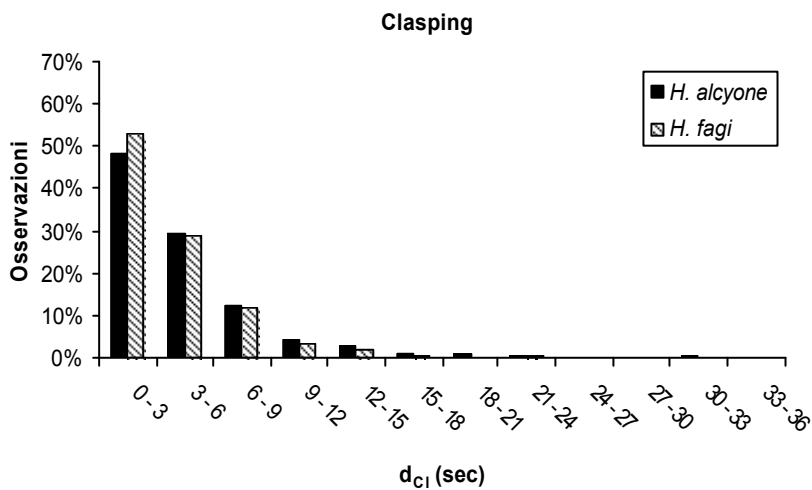
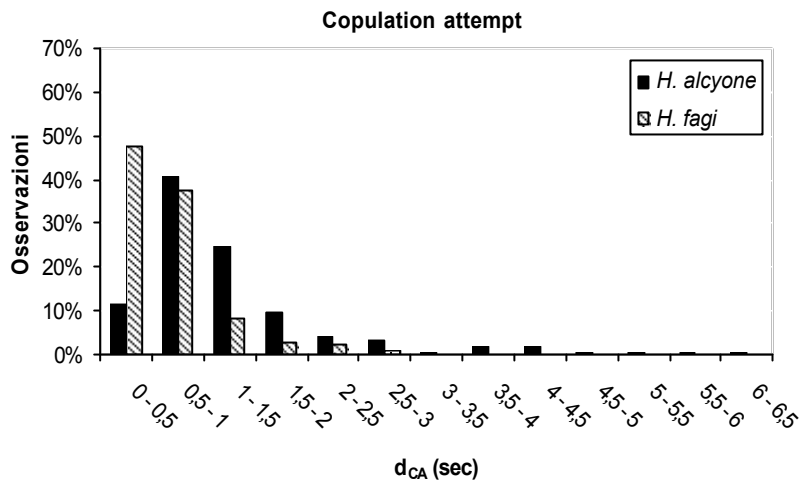


Figura 60 – Durata dei moduli *Copulation attempt* ($N_{CA,a} = 348$; $N_{CA,f} = 255$) e *Clasping* ($N_{CI,a} = 288$; $N_{CI,f} = 219$) nel confronto tra le specie.

❖ **Numero di occorrenze (O_{modulo})**

In entrambe le specie i moduli *Fanning*, *Circling*, *Copulation attempt* e *Clasping* vengono eseguiti in media una sola volta nella sequenza (test U di Mann-Whitney non significativi, Tabella 37), a differenza dei moduli *Bowing* ed *Antenna orientation*. Questi moduli sono replicati diverse volte nella sequenza sia in *H. alcyone* che in *H. fagi* (Tabella 36). Esaminando in merito “tutte le sequenze”, il range di variazione delle occorrenze dei due moduli è più ampio in *alcyone* piuttosto che in *fagi*. Tuttavia le loro curve di distribuzione di frequenza sono ben sovrapponibili e quindi, come per gli altri moduli, a questo livello di analisi “tutte le sequenze”, anche O_B e O_{Ao} sembrerebbero non discriminanti le due specie (Figura 61e Figura 62).

Tabella 36 – Numero di occorrenze dei moduli comportamentali (O_{moduli}) nella sequenza nelle due specie.

Specie	Moduli	N	Media	Min	Max	Dev.st.
<i>H. alcyone</i>	F	96	1,00	1,00	1,00	0,00
	C	411	1,00	1,00	2,00	0,05
	B	381	8,56	1,00	25,00	5,40
	Ao	364	8,77	1,00	25,00	5,31
	CA	346	1,01	1,00	2,00	0,08
	CI	285	1,01	1,00	2,00	0,10
<i>H. fagi</i>	F	167	1,00	1,00	1,00	0,00
	C	355	1,00	1,00	2,00	0,05
	B	345	8,80	1,00	43,00	5,28
	Ao	332	8,78	1,00	39,00	5,06
	CA	252	1,01	1,00	2,00	0,11
	CI	218	1,00	1,00	2,00	0,07

Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (CI).

Tabella 37 - Test U di Mann-Whitney, differenze nel numero di occorrenze dei moduli comportamentali in tutte le sequenze registrate tra le due specie *H. fagi* ed *H. alcyone*.

Modulo	Mediana _a	N _a	Min _a	Max _a	Mediana _f	N _f	Min _f	Max _f	U	Z	P
F	1,00	96	1,00	1,00	1,00	167	1,00	1,00	8016	0,00	1,00
C	1,00	411	1,00	2,00	1,00	355	1,00	2,00	72925	-0,01	0,99
B	8,00	381	1,00	25,00	9,00	345	1,00	43,00	64057	-0,59	0,56
Ao	8,00	364	1,00	25,00	9,00	332	1,00	39,00	60424	0,00	1,00
CA	1,00	346	1,00	2,00	1,00	252	1,00	2,00	43329	-0,13	0,90
CI	1,00	285	1,00	2,00	1,00	218	1,00	2,00	30881	0,11	0,91

N, numero di osservazioni, Min e Max, minimum e maximum nei rituali delle due specie.

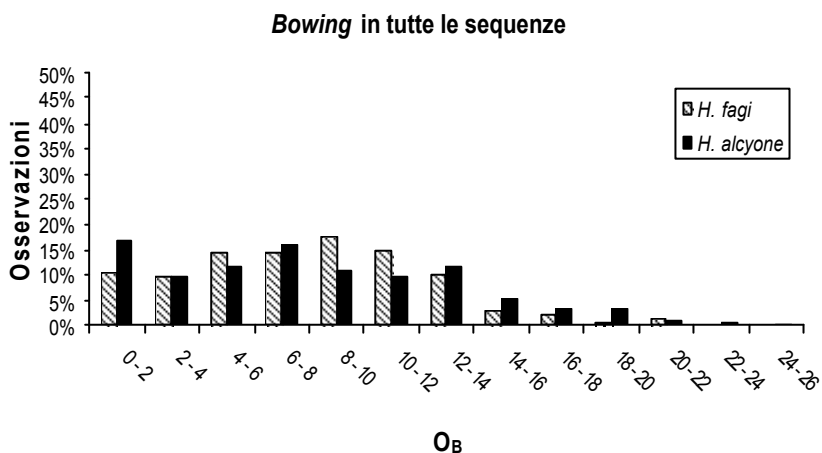


Figura 61 – Numero di occorrenze nella sequenza del *Bowing* (O_B) ($N_{B,a} = 381$; $N_{B,f} = 345$) nelle due specie a confronto.

Antenna orientation in tutte le sequenze

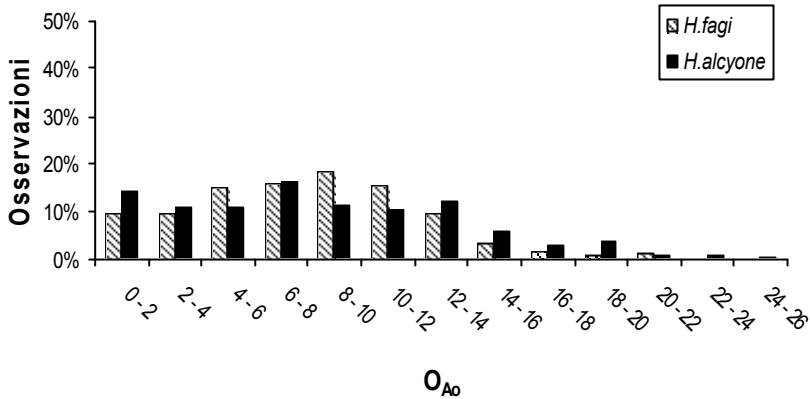


Figura 62- Numero di occorrenze nella sequenza del dell' *Antenna orientation* (O_{Ao}) ($N_{Ao,a} = 364$; $N_{Ao,f} = 332$) (in basso) nelle due specie a confronto.

3.4.3 Il Bowing

Nello studio del *Bowing* per ricercare differenze tra le due specie sono stati analizzati durata (d_B), numero di occorrenze nella sequenza (O_B) e frequenza (f_B) considerando solo le “sequenze complete”.

❖ Durata del *Bowing* (d_B)

L'analisi comparativa evidenzia una differenza nella durata del singolo *Bowing* nelle “sequenze complete” tra le due specie esaminate (Figura 63). In particolare in *H. fagi* questo modulo è caratterizzato da una durata maggiore ($d_{B,f} = 0,20 \pm 0,11$ s) di *H. alcyone* ($d_{B,a} = 0,20 \pm 0,008$ s). Questa differenza viene mostrata anche se le due specie si confrontano in merito distinguendo le sequenze con e senza copula (Tabella 38, Figura 64).

Tabella 38 – Durata del *Bowing* (d_B) nella sequenza: *H. alcyone* vs *H. fagi*.

Sequenze analizzate	<i>H. alcyone</i>				<i>H. fagi</i>				U	Z	p
	N	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max			
Complete	2350	0,20	0,04	2,56	1932	0,28	0,04	2,96	175564944,29	<0,0001	
C. senza copula	1981	0,20	0,04	2,56	1749	0,28	0,04	2,96	75513737,63	<0,0001	
C. con copula	369	0,20	0,04	1,00	183	0,28	0,08	0,48	54921236,05	<0,0001	

Test U di Mann-Whitney per dati indipendenti.

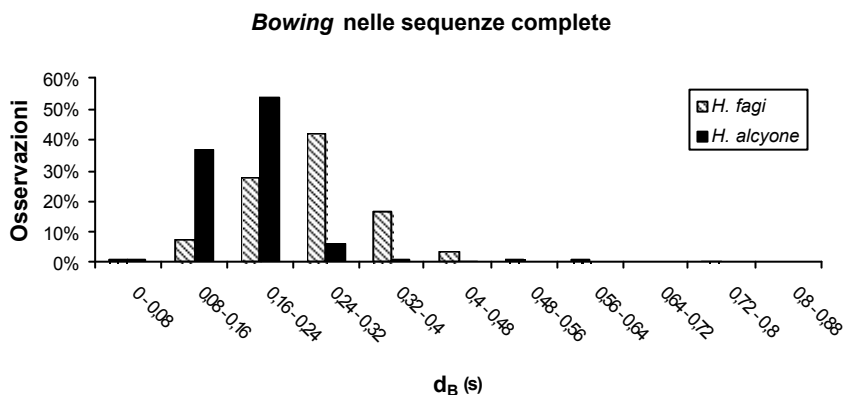


Figura 63 – Durata del *Bowing* (d_B) ($N_{B,a}=2350$; $N_{B,f}=1932$) nelle sequenze complete nelle due specie.

❖ Numero di occorrenze del *Bowing* nella sequenza (O_B)

L'analisi comparativa del numero di occorrenze del *Bowing* non mostra differenze tra le due specie esaminando le “sequenze complete”. Infatti come si può vedere in Figura 65, le curve di distribuzione di frequenza di O_B nelle due specie sono completamente sovrapposte. Lo stesso risultato si ottiene nell'analisi di O_B nelle sequenze complete senza copula (Figura 66). Invece dal confronto delle sequenze che hanno ottenuto la copula le due specie differiscono nel numero di occorrenze del *Bowing* nella sequenza (Tabella 39, test U di Mann-Whitney).

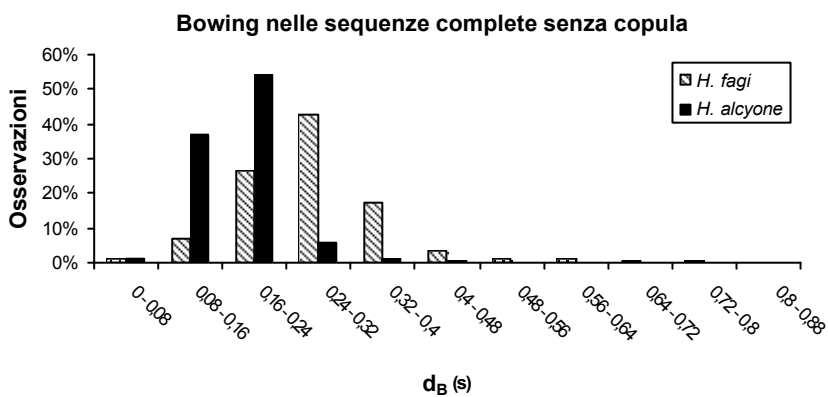
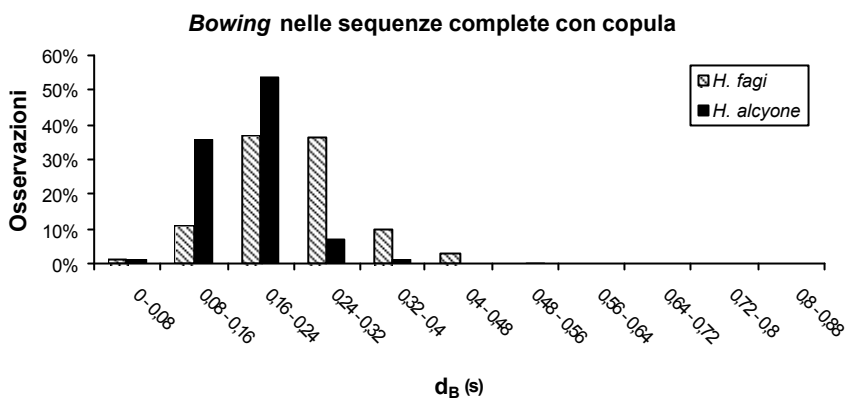


Figura 64 – Durata del *Bowing* (d_B) nelle sequenze complete con (NB,a = 369 ; NB,f = 183) e senza copula (NB,a = 1981 ; NB,f = 1749) nelle due specie.

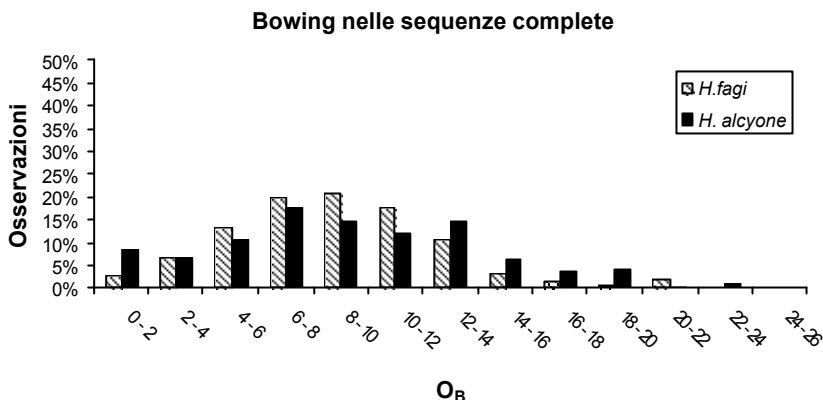


Figura 65 – Numero di occorrenze del *Bowing* (O_B) nella sequenza nelle due specie nelle sequenze complete ($N_{B,a} = 2350$; $N_{B,f} = 1932$).

Tabella 39 – Numero di occorrenze del *Bowing* (O_B) nella sequenza: *H. alcyone* vs *H. fagi*.

Sequenze analizzate	<i>H. alcyone</i>				<i>H. fagi</i>				U	Z	p
	N	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max			
Complete	239	9,00	1,00	24,00	197	9,00	1,00	33,00	22842	-0,53	n.s.
C. senza copula	208	9,00	1,00	24,00	177	9,00	1,00	33,00	18158	0,23	n.s.
C. con copula	31	12,00	5,00	21,00	20	9,00	2,00	15,00	206	-2,02	0,04

Test U di Mann-Whitney per dati indipendenti.

In particolare il maschio di *H. alcyone* effettua un numero di *Bowing* in media maggiore (Figura 66, $O_{B,a} = 11,90 \pm 4,51$ volte nella sequenza) di quanto osservato in *H. fagi* ($O_{B,f} = 9,15 \pm 3,05$ volte nella sequenza).

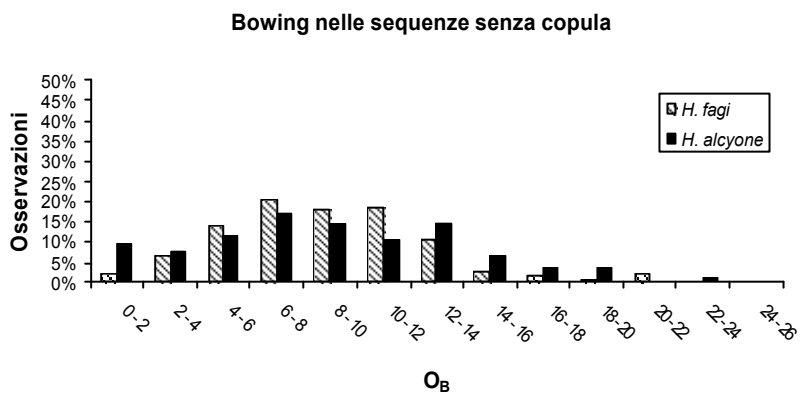
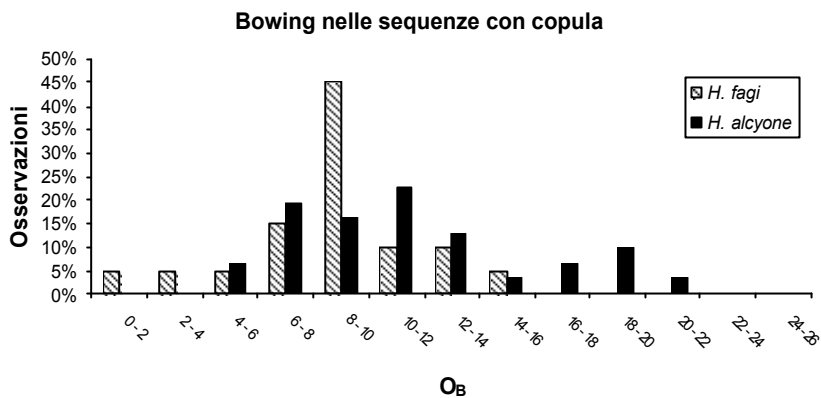


Figura 66– Numero di occorrenze del *Bowing* (O_B) nella sequenza nelle due specie nelle sequenze complete con ($N_{B,a} = 31$; $N_{B,f} = 20$) e senza copula ($N_{B,a} = 208$; $N_{B,f} = 177$).

❖ Frequenza nella sequenza

L'analisi comparativa della frequenza del *Bowing* nelle “sequenze complete” evidenzia ancora differenze tra le due specie oggetto di studio (Figura 67). In particolare, in *H. alcyone* il maschio esegue questo modulo in media con una frequenza maggiore ($f_{B,a} = 5,11 \pm 1,03 \text{ s}^{-1}$) rispetto a quanto osservato in *H. fagi* ($f_{B,f} = 3,57 \pm 0,71 \text{ s}^{-1}$).

Tabella 40 – Frequenza del *Bowing* nella sequenza di corteggiamento: *H. alcyone* vs *H. fagi*.

Sequenze analizzate	<i>H. alcyone</i>				<i>H. fagi</i>				U	Z	p
	N	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max			
Complete	239	5,00	1,92	10,71	197	3,53	1,46	7,14	3920	14,98	<0,0001
C. senza copula	211	5,00	1,92	10,71	178	3,50	1,46	7,14	2752	14,51	<0,0001
C. con copula	31	4,88	3,38	6,85	20	3,83	2,61	7,14	119	3,68	<0,0001

Test U di Mann-Whitney per dati indipendenti.

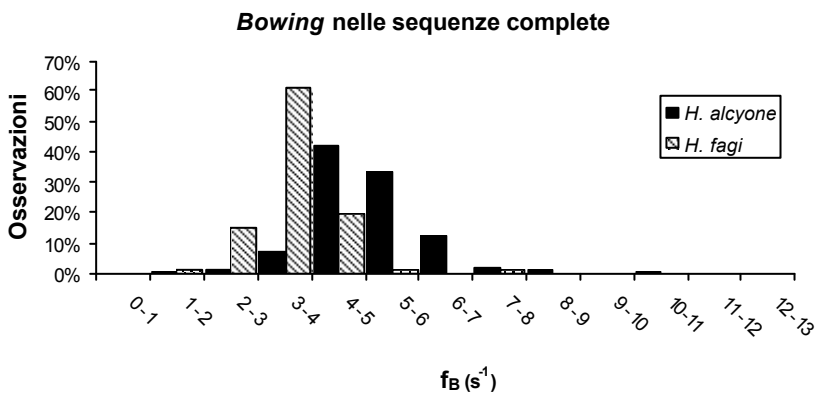
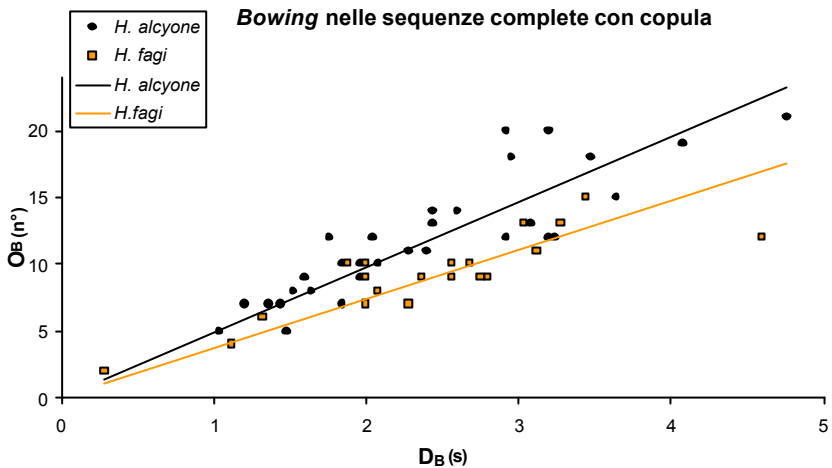


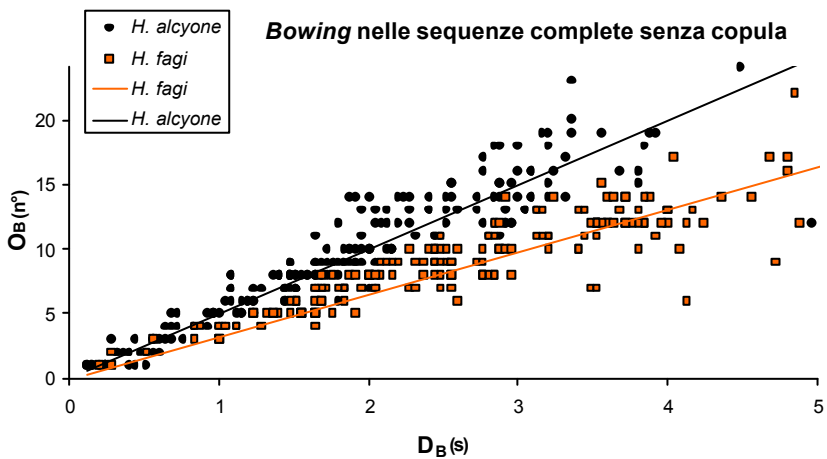
Figura 67 – Frequenza del *Bowing* nelle sequenze complete ($N_{B,a}=239$; $N_{B,f}=197$).

Questa differenza si rileva anche dalla comparazione delle due specie tra le frequenze del *Bowing* nelle sequenze con e senza copula (test U di Mann-Whitney, Tabella 40). Il grafico in Figura 68 fornisce un'idea della variabilità della frequenza del *Bowing* nelle due specie nelle “sequenze complete con e senza copula” plottando $D_{B,s}$ (la somma delle durate dei *Bowing* osservati nella sequenza) ed $O_{B,s}$ (il numero di occorrenze del modulo nella medesima sequenza). La pendenza della retta di correlazione non è altro che la frequenza media del *Bowing*.

Questo grafico mostra inoltre data la variabilità di O_B e di D_B che non è importante quanto tempo il maschio dedica al *Bowing* né quanti *Bowing* effettuati nella sequenza, ma è rilevante con quale frequenza fa questo modulo. La frequenza del *Bowing* è la stessa in media nelle sequenze con e senza successo e caratterizza ciascuna specie.



H. alcyone: $r = 0,8819$, $p < 0,0001$; $R_2 = 0,6521$; $O_B = 3,6796 * D_B$
H. fagi: $r = 0,8542$, $p < 0,0001$; $R_2 = 0,7488$; $O_B = 4,8901 * D_B$



H. alcyone: $r = 0,9313$, $p < 0,0001$; $R_2 = 0,8617$; $O_B = 4,9786 * D_B$
H. fagi: $r = 0,9274$, $p < 0,0001$; $R_2 = 0,8385$; $O_B = 3,2652 * D_B$

Figura 68 – Frequenza del *Bowing* nelle sequenze complete con copula ($N_{B,a} = 31$; $N_{B,f} = 20$) (in alto) e senza copula ($N_{B,a} = 208$; $N_{B,f} = 177$) (in basso): *H. alcyone* vs *H. fagi*.

3.5 - Il sistema nuziale

Il sistema nuziale è stato determinato attraverso l'esame dei genitali femminili, esaminando il contenuto della bursa copulatrice, che accoglie lo sperma del maschio (spermatofora) dopo la copula, e lo studio del comportamento sessuale nelle due specie in voliera (numero di accoppiamenti per individuo).

❖ Numero di accoppiamenti per femmina

La dissezione degli addomi femminili ha rivelato la presenza di un materiale granulare di colore giallo all'interno della bursa copulatrice (*corpus bursae*) nel 6,67% in *fagi* e nel 10% in *alcyone*. Solo in alcune femmine di *fagi* non è stato rinvenuto alcun contenuto nella bursa e quindi probabilmente la femmina esaminata era vergine prima della cattura. Nella maggior parte dei casi, sia in *H. fagi* (86,67%), che in *H. alcyone* (90,00%) nelle borse è stata trovata una singola spermatofora (Tabella 41).

Le spermatofore occupano tutto il volume del *corpus bursae* ricalcandone la forma a borraccia. La loro massa si estende in parte anche nel *ductus bursae* dando luogo ad un *collum* che ne segue perfettamente le curve. All'interno del *corpus bursae* le spermatofore rinvenute appaiono piuttosto dure alla pressione e dalla forma ben conservata in entrambe le specie. Il colore delle spermatofore è molto variabile da giallo crema, a bruno chiaro, a bruno scuro, ma esso non caratterizza le due specie in cui sono state osservate tutte le gradazioni di tono.

I risultati dell'esame delle spermatofore nelle due specie suggeriscono la monandria delle femmine in *H. fagi* e confermano quella rilevata da Garcia-Barros (2000) nella specie *H. alcyone* nelle sue ricerche in Spagna.

Dalle osservazioni sul comportamento nella voliera sugli individui di allevamento la maggior parte delle femmine (95% *H. fagi*, 92% *H. alcyone*) si è accoppiata una volta deponendo dopo pochi giorni le uova. Solo nel 5% in *fagi* e nell'8% in *alcyone* delle femmine è stato possibile osservare eventi di accoppiamento multiplo con maschi diversi.

Tabella 41 - Contenuti rinvenuti nella bursa copulatrice delle femmine nell'esame delle spermatofore.

Specie		Materiale granulare giallo	Spermatofora assente	Spermatofora singola	FF
<i>H. fagi</i>	N	3	3	39	45
	%	6,67	6,67	86,67	100
<i>H. alcyone</i>	N	2	0	18	20
	%	10,00	0	90,00	100

In particolare tre femmine di *H. alcyone* e due di *H. fagi* sono state coinvolte in un secondo evento di copula con un maschio differente. Però è importante notare che in tutti i casi osservati il primo accoppiamento o viene subito interrotto appena il maschio raggiunge la posizione di copula oppure è molto breve. Questo lascia supporre che l'accoppiamento potrebbe non avere avuto successo con il trasferimento dello sperma. Il secondo accoppiamento di queste femmine invece ha una durata più lunga (Tabella 42) e comparabile con i dati registrati per le copule di altri individui.

Tabella 42 - Accoppiamenti multipli delle femmine nelle specie esaminate.

Data	Specie	Maschio	Femmina	Copula	
				Durata	Ordine di occorrenza
5/6/2007	<i>H. alcyone</i>	M8	F29	22''*	I°
5/6/2007		M12	F29	54'	II°
14/6/2007		M44	F129	2'	I°
14/6/2007		M30	F129	7h 11'	II°
13/6/2007		M76	F102	13'	I°
13/6/2007		M98	F102	58'	II°
28/6/2006	<i>H. fagi</i>	M1	F37	*	I°
30/6/2006		M11	F37	2h 47'	II°
27/6/2006		M1	F25	*	I°
28/6/2006		M4	F25	1h 40'	II°

* l'accoppiamento si è interrotto nel momento in cui la coppia ha raggiunto la posizione classica di copula dei lepidotteri; non è possibile calcolare una durata della copula.

❖ Numero di accoppiamenti per maschio

Le osservazioni in voliera hanno permesso di evidenziare accoppiamenti multipli dei maschi in entrambe le specie e quindi la capacità dei maschi di accoppiarsi più volte nell'arco della loro esistenza (*H. fagi*: 2-6 volte, *H. alcyone*: 2-5 volte) con femmine diverse. Nove sono i maschi coinvolti in più copule in *H. fagi* ed otto in *H. alcyone* (Tabella 42).

Il numero multiplo di accoppiamenti per maschio e la presenza di un sola spermatofora nelle femmine rinvenute nelle popolazioni naturali suggeriscono la poliginia come sistema nuziale evolutosi in entrambe le specie esaminate, tuttavia si rende necessario approfondire i casi apparentemente eccezionali degli accoppiamenti multipli osservati in alcune femmine.

3.6 - La copula: durata e stato riproduttivo dei maschi

Nelle ricerche condotte in passato, durante la tesi di laurea, pochi sono stati i casi di copule ottenute con individui catturati (sei *H. fagi* e sette *H. alcyone*) proprio per la difficoltà di reperire individui vergini in natura (Pinzari, 2004), risultati simili ed esigui sono stati raggiunti anche negli anni di dottorato con individui selvatici (tre *H. fagi* ed una *H. alcyone*). Invece, le osservazioni su individui di allevamento hanno permesso di conseguire migliori risultati ed osservare complessivamente 40 copule in *H. fagi* e 37 in *H. alcyone*.

Sulla base di tutte le copule osservate in questi anni di ricerca (Tabella 43) in *H. fagi* una copula può avere una durata media di $3,58 \pm 1,66$ ore e in *H. alcyone* di $2,02 \pm 2,41$ ore.

Durante lo studio delle durate delle copule si è notato che le copule di uno stesso maschio hanno durate diverse, ma soprattutto che queste tendono in media ad aumentare con il numero di accoppiamenti conseguiti nel tempo dall'individuo stesso (Tabella 44 e Tabella 45).

Tabella 43 - Copule osservate nelle specie esaminate.

Specie	Anno	Individui	Copule
<i>H. fagi</i>	2006	allevati	23*
	2007	allevati	17
	2006	catturati in natura	3
	2004	catturati in natura	2**
	2005	catturati in natura	4**
Totale			49
<i>H. alcyone</i>	2007	allevati	37
	2006	catturati in natura	1
	2003	catturati in natura	1**
	2004	catturati in natura	4**
	2005	catturati in natura	2**
Totale			45

*Per tre delle copule osservate non è stato possibile determinare la durata

**Tesi di laurea 2004 - Manuela Pinzari

Tabella 44 – Accoppiamenti multipli di maschi in *H. fagi*.

Specie	Maschio	Femmina	Copule	Durata	
<i>H. fagi</i>	4	10	I°	2h 20'	
		24	II°	2h 56'	
		25	III°	1h 40'	
		31	IV°	7h 40'	
		41	V°	9h 25'	
		44	VI°	7h 53'	
	6	17	I°	2h 15'	
		18	II°	3h 02'	
	15	21	I°	2h 35'	
		39	II°	4h 44'	
	16	20	I°	2h 37'	
		29	II°	3h 59'	
	30	54	I°	2h 14'	
		53	II°	3h 45'	
		143	166	I°	3h 16'
	157	171	200	II°	4h 18'
		169	III°	6h 31'	
		193	I°	2h 47'	
	160	181	II°	3h 02'	
		181	I°	3h 12'	
159		II°	6h 50'		

Per ciascuna coppia identificata dai numeri di marcaggio attribuiti agli individui sono indicati l'ordine di occorrenza e la durata delle copule.

Tabella 45 – Accoppiamenti multipli di maschi di *H. alcyone*.

Specie	Maschio	Femmina	Copule	Durata
<i>H. alcyone</i>	121	151	I°	1h 04'
		163	II°	2h 53'
	71	72	I°	1h 19'
		115	II°	6h 47'
	3	14	I°	53'
		13	II°	2h 27'
		4	III°	1h 20'
	30	84	I°	1h 11'
		95	II°	3h 58'
		129	III°	7h 11'
	12	29	I°	54'
		36	II°	14h 44'
		65	III°	1h 36'
		83	IV°	7h 37'
	8	19	I°	1h 12'
		15	II°	1h 30'
		29	III°	22''
		31	IV°	1h 06'
		63	V°	2h 33'
	5	16	I°	1h 27'
		77	II°	1h 26'
48	97	I°	2h 12'	
	153	II°	2h 38'	

Per ciascuna coppia identificata dai numeri di marcaggio attrivuiti agli individui sono indicati l'ordine di occorrenza e la durata delle copule.

Durante le osservazioni, la maggior parte dei maschi ha ottenuto la copula solo una volta, tuttavia nei pochi casi di accoppiamenti multipli osservati è stato possibile evidenziare questo fenomeno in modo più o meno evidente. Nei casi di maschi che hanno conseguito due copule al massimo la durata della 2° copula è sempre maggiore della 1° nel 87,5 % dei casi osservati in *H. alcyone* (N = 8) e nel 100% dei casi in *H. fagi* (N = 8). Inoltre le durate delle copule di maschi non vergini durano in media quasi il doppio di quelle di maschi vergini in *H. fagi* e quasi il triplo in *H. alcyone* (Tabella 46, Test U di Mann-Whitney).

Tabella 46 - Differenze in media nella durata della copula tra copule di maschi vergini (campione a) e copule di maschi non vergini (campione b). Test U di Mann-Whitney.

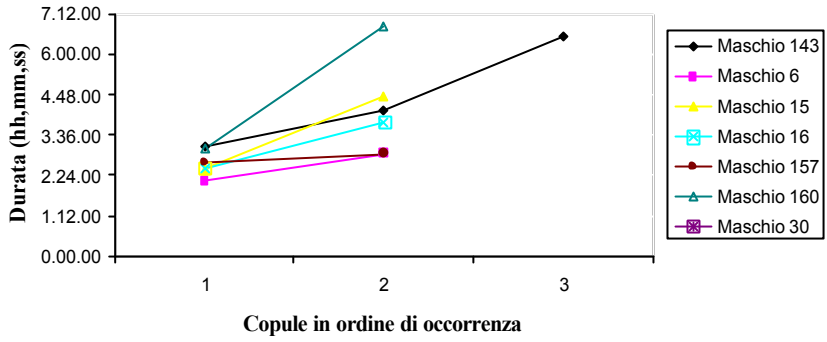
Species	Sample a					Sample b					U	Z	P
	Media	Mediana	N _a	Min _a	Max _a	Media	Mediana	N _b	Min _b	Max _b			
<i>H. fagi</i>	178'	167'	24	119'	306'	303'	258'	13	100'	565'	65	-2,90	0.004
<i>H. alcyone</i>	79'	75'	22	53'	134'	226'	150'	14	66'	884'	56	-3,18	0.001

Le durate sono espresse in minuti; N, numero delle copule osservate; Min, durata minima e Max, massima delle copule osservate.

Questo fenomeno è ben evidente per esempio, nel caso del maschio 4 in *H. fagi*, che ha collezionato ben sei accoppiamenti (Figura 69) ed ha trascorso in copula dalle due ore e mezza circa nel suo primo accoppiamento alle 7-9 ore negli ultimi accoppiamenti.

In *H. alcyone* invece questo andamento crescente delle durate delle copule è netto nel maschio 30, che ha ottenuto tre copule, mentre è debolmente crescente in media nei casi dei maschi 8 e 12 che hanno conseguito cinque e quattro copule rispettivamente (Figura 70 e Figura 71). E' bene sottolineare però che la seconda copula del maschio 12, della durata di 14 ore, si è verificata circa un'ora dopo la prima ed è terminata intorno alle 15.00 del giorno seguente, trascorrendo in accoppiamento tutta la notte. Invece la terza copula del maschio 8, dalla durata molto breve, rappresenta uno dei rari casi osservati di copule interrotte dopo poco tempo con femmine che poi si sono accoppiate nuovamente (vedi par. 3.5 -).

Accoppiamenti multipli di maschi in *H. fagi*



Accoppiamenti multipli del maschio 4 - *H. fagi*

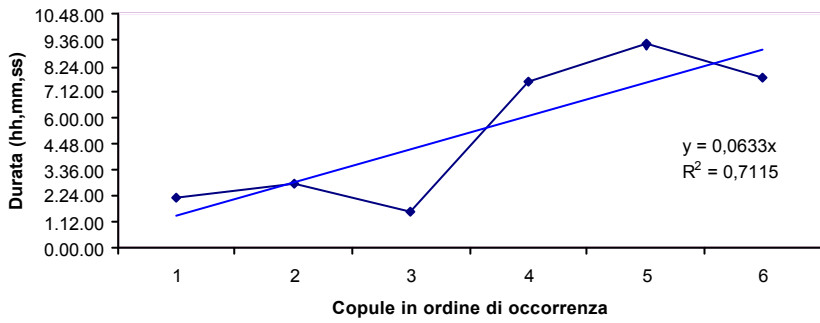
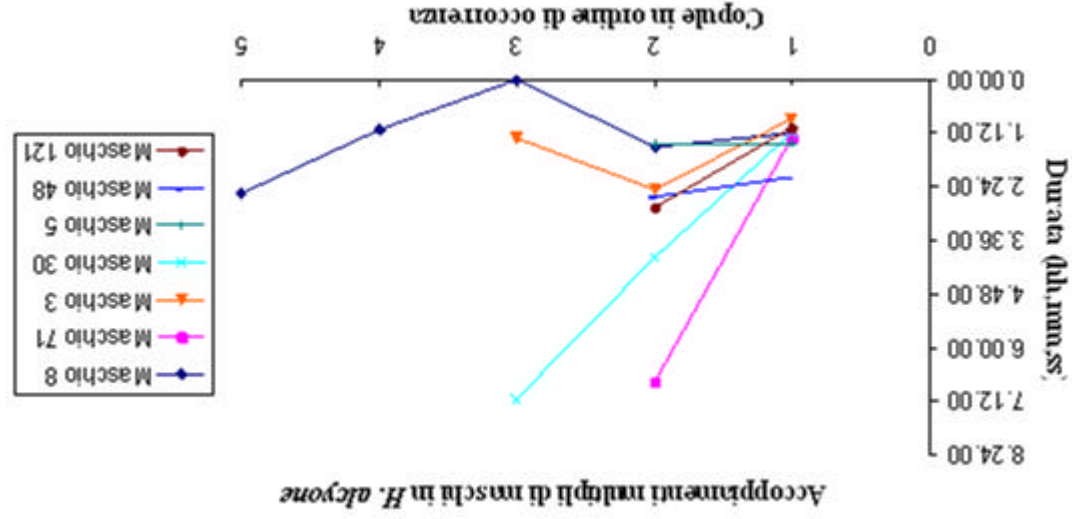
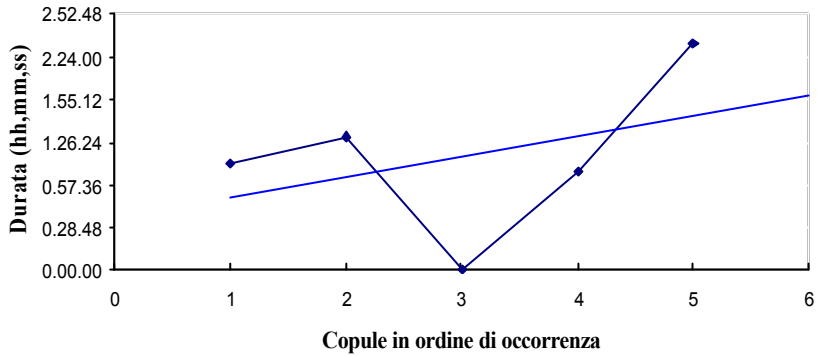


Figura 69 – Durate delle copule di accoppiamenti multipli di maschi con femmine diverse nell'ordine di occorrenza: in tutte le copule osservate (in alto), nelle copule del maschio 4 (in basso), in *H. fagi*.

Figura 70 – Durate di accoppiamenti multipli di maschi con femmine diverse nell'ordine di occorrenza in *H. alyone*.



Accoppiamenti multipli del maschio 8 - *H. alcyone*



Accoppiamenti multipli del maschio 12 - *H. alcyone*

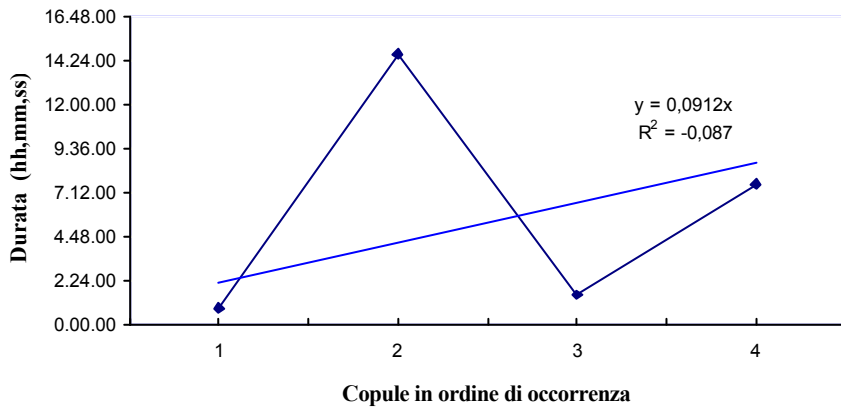


Figura 71 – Durate delle copule di accoppiamenti multipli con femmine diverse nell'ordine di occorrenza dei maschi 8 (in alto) ed 12 (in basso) in *H. alcyone*.

Data l'osservazione di accoppiamenti multipli dalle durate crescenti con lo stato riproduttivo del maschio, in primo luogo, le durate delle copule degli individui allevati sono state analizzate separatamente da quelle degli individui catturati in natura dei quali non è possibile valutare lo stato riproduttivo iniziale (vergini e non vergini). In secondo luogo, per calcolare la durata media delle copule sono

state considerate solo le prime copule di ciascun maschio per ciascuna specie (Tabella 47).

Tabella 47 - Durata media delle copule nelle specie esaminate.

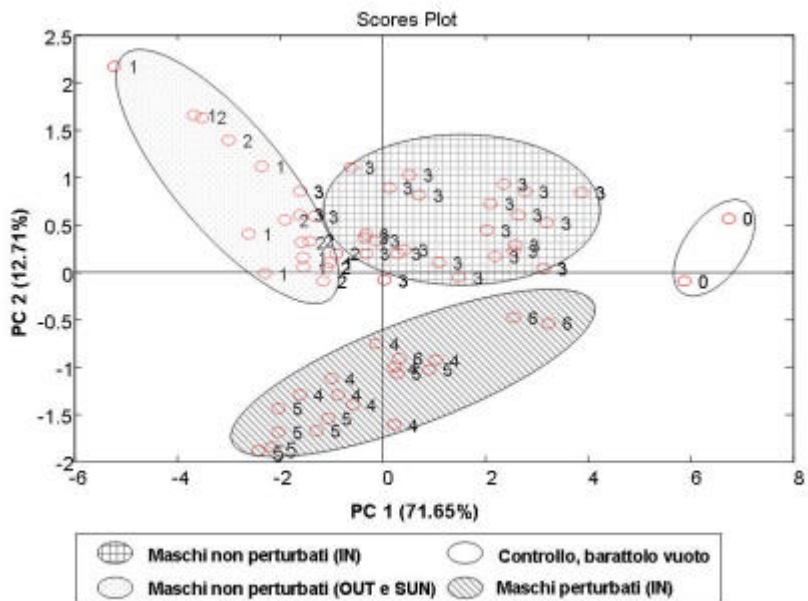
	N	Media	Dev.Std.	Minimum	Maximum
<i>H. fagi</i>					
Tutte le copule osservate	46	3,58h	1,66h	1,7h	9,4h
Prime copule di un maschio	26	3,17h	1,05h	2,0h	6,8h
<i>H. alcyone</i>					
Tutte le copule osservate	45	2,02h	2,41h	22''	14,7h
Prime copule di un maschio	22	1,30h	0,56h	120''	2,2h

In *H. fagi* la copula ha una durata media maggiore di *H. alcyone* (Test U di Mann-Whitney, $N_a = 22$, $N_f = 26$, $U = 6,5$, $Z = -5,8$, $p < 0,00001$).

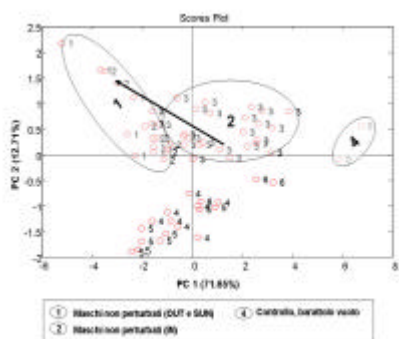
3.7 - Indagini preliminari sui segnali chimici

❖ Prima sperimentazione: 2007

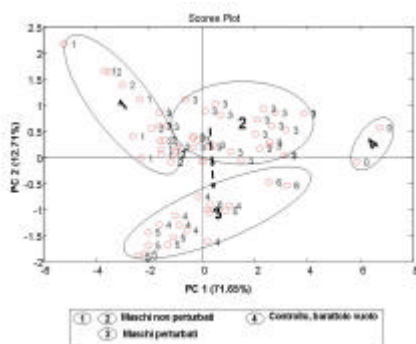
La prima sperimentazione con il naso elettronico ha evidenziato in primo luogo che lo strumento è sensibile ai composti volatili emessi dalle farfalle. In secondo luogo ha fornito informazioni utili per valutare il protocollo sperimentale di misura per le successive indagini. Per verificare l'effetto della temperatura e del movimento sulle risposte dei sensori i maschi di *H. fagi* sono stati misurati con il naso elettronico in tre condizioni di temperatura, IN (24°C), OUT (28°C) e SUN(30°C), ed in due stati diversi (perturbato e non perturbato), in cui l'individuo veniva agitato o meno meccanicamente (vedi par. 2.3.3.2 in Materiali e Metodi). L'analisi delle componenti principali (PCA) su queste misure suggerisce che sia parametri ambientali che comportamentali possono influenzare il pattern chimico rilevato dai sensori del naso elettronico. Infatti in Figura 72-A, ove è illustrato il diagramma risultante dalla PCA, i diversi campioni di misure si raggruppano in quattro cluster differenti a seconda delle condizioni sperimentali a cui gli individui sono stati sottoposti (vedi par. 2.3.3.2 in Materiali e Metodi). Esaminando in dettaglio e separatamente i cluster individuati dalla PCA possiamo notare che (Figura 72-B). la prima componente (71,96%) distingue i dati relativi ai maschi non perturbati in condizioni OUT e SUN (cluster 1), dai maschi non perturbati in condizioni IN (cluster 2). Quindi è possibile che la risposta dello strumento vari con la temperatura (rappresentata dalla freccia). Inoltre (Figura 72-C) la seconda componente (14,29%) distingue le misure dei maschi perturbati IN (cluster 3) da quelle dei maschi non perturbati IN, SUN e OUT (cluster 1 e 2). Lo strumento quindi sembrerebbe rilevare in modo differente il pattern chimico di maschi perturbati e non perturbati (Figura 72-C, freccia tratteggiata) lasciando supporre che la perturbazione, cioè il movimento degli individui, possa avere un ruolo nel rilascio dei composti volatili. L'analisi multivariata inoltre colloca in posizione periferica rispetto ai cluster più grandi le misure relative al barattolo vuoto di controllo (Figura 72-A).



- A -



- B -



- C -

Figura 72 – Risultati dell’analisi delle componenti principali sulle misure effettuate con il naso elettronico nella prima sperimentazione del 2007. Sopra (A) i sei cluster distinti a seconda delle condizioni sperimentali, a cui gli individui sono stati sottoposti; sotto effetto della temperatura (B) e del movimento (C) sulle risposte dei sensori

❖ Seconda sperimentazione: 2008

Nella seconda sperimentazione con il naso elettronico, sono state effettuate misure sui maschi e su coppie delle due specie, *H. fagi* ed *H. alcyone*.

L'analisi statistica delle risposte del naso elettronico ai composti volatili emessi dai maschi ha evidenziato l'esistenza di un pattern chimico molto simile nelle due specie su tutti gli otto sensori (Figura 73).

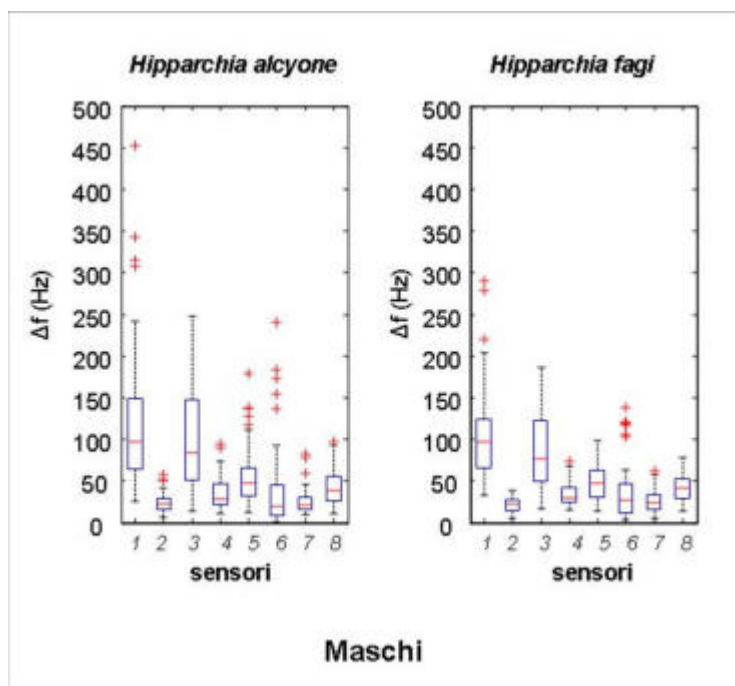


Figura 73 – Pattern chimico dei maschi nelle due specie, *H. alcyone* (sinistra) ed *H. fagi* (destra). Media \pm deviazione standard, intervallo di confidenza 95%

Invece dall'analisi qualitativa delle misure effettuate sulle coppie maschio-femmina tutti i sensori forniscono una risposta in media differente tra i due set sperimentali COM e NO-COM in ciascuna delle due specie (Figura 74).

La comparazione delle due specie per set sperimentale mediante l'Anova ad un criterio di classificazione (Figura 75) rivela differenze statisticamente

significative tra le risposte dei sensori 1 (Cu.tpp), 3 (Zn.Tpp), 4 (Mn.Tpp), 7 (Fe.Tpp) ($\alpha = 0,01$). Quindi sembrerebbe che l'effetto della comunicazione e non comunicazione tra le coppie sia maggiormente distinto dai sensori 1, 3, 4 e 7 caratterizzati da una maggiore capacità discriminativa (Figura 75, Anova ad una via, vedere in APPENDICE 23 e APPENDICE 24 i dettagli dell'analisi). Le PCA seguenti sono state effettuate solamente sulle risposte dei sensori più discriminanti (1, 3, 4, 7).

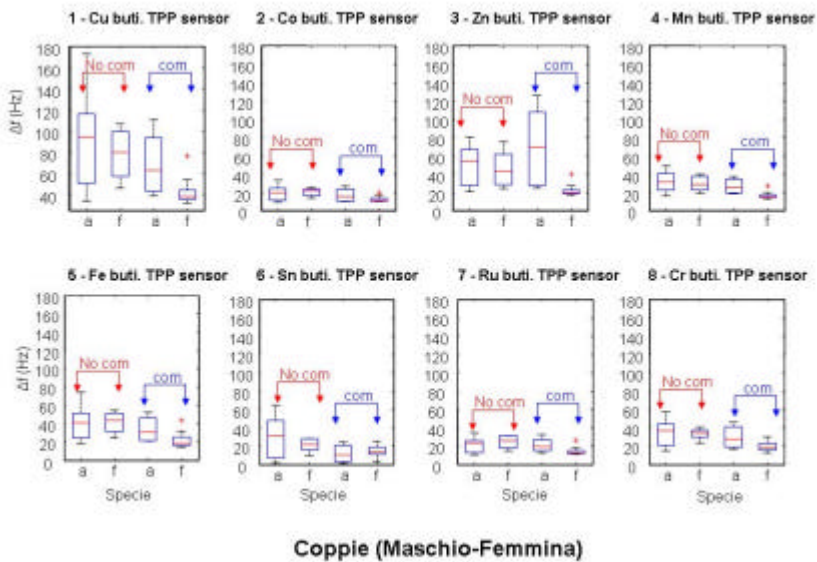


Figura 74 - Risposte di ogni singolo sensore per campioni relativi a specie diverse, con procedura di comunicazione e non comunicazione. Nei box plot sono indicate media \pm deviazione standard, intervallo di confidenza 95%; le specie: a, *H. alcyone*; f, *H. fagi*.

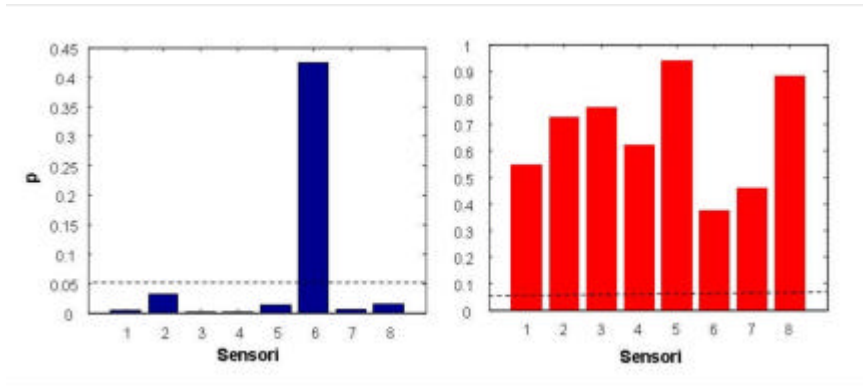


Figura 75 - Capacità discriminatoria dei sensori delle due specie in COM (sinistra); Capacità discriminatoria dei sensori delle due specie in NO-COM (destra). Nei grafici sono rappresentati i livelli di significatività per ciascun sensore risultanti dall'Anova ad una via.

Per valutare l'effetto della vista tra i due sessi sulle risposte dei sensori sono state condotte delle misure alla presenza/assenza di una barriera tra i barattoli contenenti maschio e femmina in condizioni di comunicazione (COM-VISTA e COM-NOVISTA). Per verificare l'esistenza di differenze tra le due specie in esame nella risposta dei sensori in questi due set è stata fatta un'unica PCA illustrata nel grafico in Figura 76. La PCA non ha messo in evidenza differenze nel pattern chimico in nessuna delle due specie tra le condizioni COM-VISTA e COM-NOVISTA. Quindi nell'analisi seguente i dati relativi a questi due set sperimentali per ciascuna specie sono considerati equivalenti ed analizzati insieme come un unico campione di misure, indicato come COM.

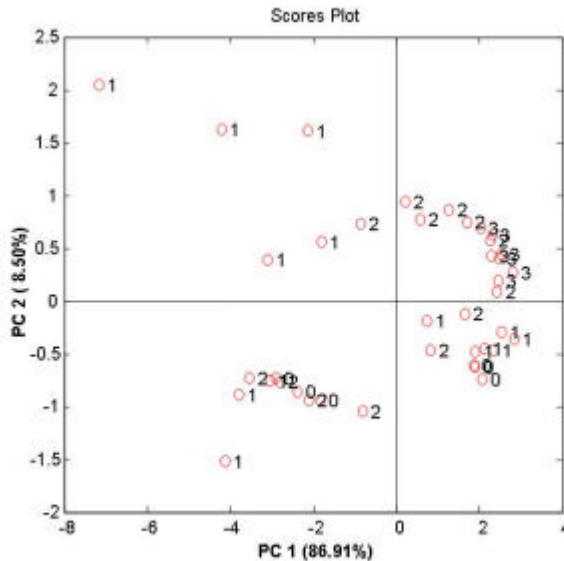


Figura 76 – Analisi (PCA) delle misure relative alle coppie nelle condizioni COM-VISTA e COM-NOVISTA nelle due specie: *H. alcyone*, label 0 (vista) ed 1 (novista); *H. fagi*, label 2 (novista) e 3 (vista). L'analisi evidenzia un effetto nullo dello stimolo visivo sulle risposte dei sensori.

Per stabilire l'effetto della comunicazione tra i due sessi e quindi dell'odore sul comportamento degli individui sono state condotte delle misure ponendo i barattoli in comunicazione (COM) e non (NO-COM). Per verificare l'esistenza di differenze tra le due specie in esame sono state fatte due PCA, una con i dati relativi al set NO-COM e l'altra con le misure del set COM. Nel primo caso (Figura 77-A), quando gli individui misurati non sono in comunicazione aerea (NO-COM), i dati si distribuiscono in modo casuale nello spazio delle caratteristiche; lo strumento sembrerebbe quindi non discriminare tra coppie appartenenti alle due diverse specie. Al contrario, la PCA (Figura 77-B) condotta sulle misure relative al set ove gli individui sono in comunicazione aerea (COM) permette di evidenziare tre gruppi: 1) le misure relative ad una coppia di *H. alcyone*; 2) le misure relative ad una seconda coppia di *H. alcyone*; 3) le misure relative alle due coppie di *H. fagi*. La prima componente principale permette di distinguere le misure prese su *H. fagi* (cluster 3) da quelle sulla prima coppia *H.*

alcyone (cluster 1), mentre la seconda componente principale da quelle sulla seconda coppia (cluster 2). Il naso elettronico dunque sembrerebbe rilevare delle differenze tra le due specie solo in condizioni COM. Data la scarsità di dati disponibili, i risultati di questa elaborazione non sono comunque risolutivi e necessitano certamente di ulteriori elaborazioni e dell'incremento dei campioni misurati.

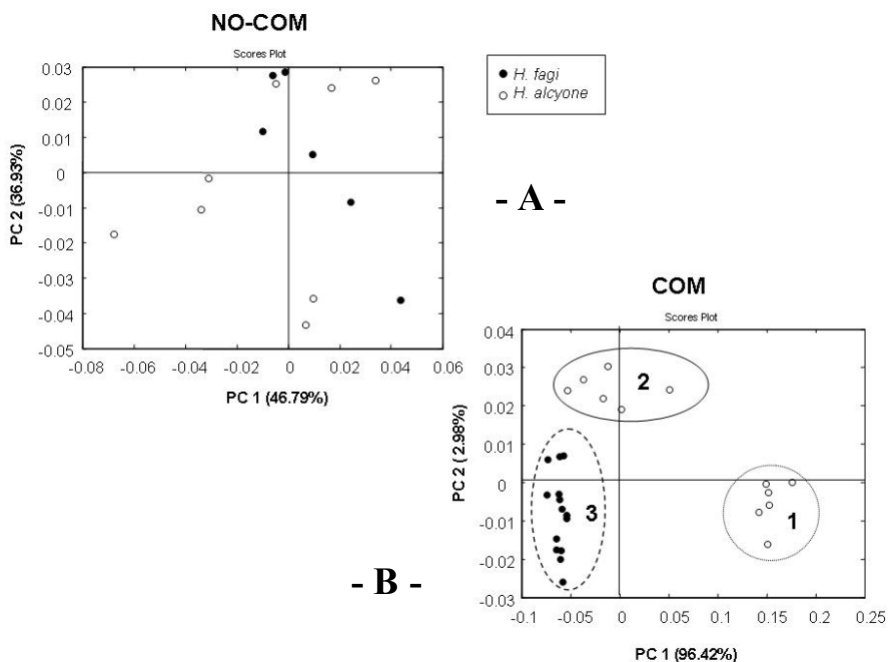


Figura 77 – Analisi dei dati PCA delle misure relative alle coppie nelle condizioni NO-COM (A) e COM (B). Il cerchio con linea tratteggiata individua il cluster 3 relativo a *H. fagi*, quelli con linea continua indicati con 1 e 2 i cluster relativi ad *H. alcyone*.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo studio rivela nelle due specie lo stesso sistema nuziale, la poliginia con monandria delle femmine, ed un pattern comportamentale sessuale molto simile: il maschio attende la femmina, posato sui tronchi d'albero come sulle pareti della voliera; al passaggio della femmina le prende volo e la insegue fino alla posa; a questa segue un rituale articolato dalla struttura temporale e dai meccanismi di interazione maschio-femmina analoghi.

4.1 - La sequenza di corteggiamento

In particolare, il corteggiamento nelle specie esaminate si compone di sei moduli comportamentali *Fanning*, *Circling*, *Bowing*, *Antenna orientation*, *Copulation attempt* e *Clasping*, eseguiti nell'ordine dato (Figura 78).

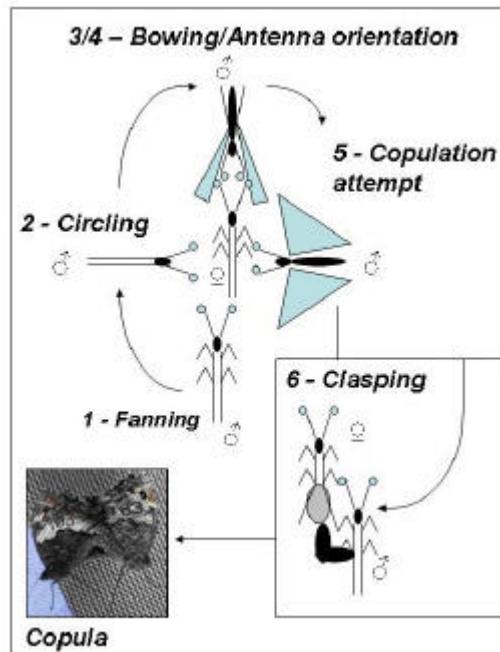


Figura 78 – Disegno schematico del corteggiamento nelle due specie esaminate. Da 1 a 6, i moduli comportamentali della sequenza di corteggiamento.

La successione di questi sei moduli costituisce la sequenza di corteggiamento fondamentale in entrambe le specie, sebbene vi siano rari casi in cui le fasi iniziali, *Fanning* e *Circling*, non vengono effettuate. L'assenza dei moduli nella sequenza, almeno per il *Circling*, appare legata al contesto di interazione con la femmina ed alla sua funzione nel corteggiamento. Infatti, il *Circling* è un'azione di orientamento rispetto alla partner e quando non viene eseguito il maschio si trova ad iniziare il rituale di corteggiamento già in posizione frontale alla femmina. In questa situazione quindi non sembra necessaria l'esecuzione del *Circling*. Questa osservazione assume un significato interessante perché presuppone che il maschio sia in grado di percepire la sua posizione nello spazio rispetto alla femmina e di modificare il suo comportamento all'occorrenza. Il *Fanning* invece rappresenta il primo evento della sequenza di corteggiamento nella maggior parte dei casi, in entrambe le specie, ed è eseguito dopo il *Volo* nuziale e dopo fasi di *Immobilità* (vedere cinetogrammi, Figura 34 e Figura 46). Esso appare come una vibrazione complessiva del maschio estesa alle ali e si potrebbe ipotizzare che la sua performance possa essere necessaria per riscaldare la muscolatura alare, poi coinvolta nel rituale, come avviene in lepidotteri eteroceri prima del volo. Il *Volo* probabilmente raffredda il maschio (Pinzari, 2000) ed alla posa il maschio rimane fermo dietro alla femmina probabilmente per mancate condizioni di temperatura corporee ottimali per la sua attività di corteggiamento. Il *Fanning* potrebbe fornire lo start per il corteggiamento. Nella specie congenerica, *H. semele*, ove il *Fanning* viene effettuato frontalmente alla femmina, Tinbergen (1972) suggerisce che esso possa generare un flusso d'aria intermittente ricco di feromoni, emessi dagli androconi, sulle antenne della femmina, ma nelle specie esaminate questo sembrerebbe improbabile dato che il maschio si trova ad effettuare questo modulo dietro alla partner lontano dalle sue antenne. Tuttavia, la funzione di questo modulo nelle specie esaminate non è ancora chiara ed è difficile giustificare sulla base delle osservazioni la sua assenza nella sequenza di corteggiamento. Per quanto riguarda i moduli successivi, *Bowing* ed *Antenna orientation*, essi sono le azioni centrali della sequenza di corteggiamento implicate molto probabilmente in uno scambio di

segnali chimici (vedi più avanti). Infatti, in entrambe le specie è possibile osservare nel primo modulo (*B*), il maschio afferrare con le proprie ali anteriori le antenne della femmina, come osservato in altre specie congeneriche (Tinbergen, 1941; Pinzari, 2004, 2009); nel secondo (*Ao*) ruotare ed orientare le sue antenne avanti ed indietro davanti al capo della partner. I moduli finali del corteggiamento invece portano il maschio all'approccio alla copula. Il *Copulation attempt* è essenzialmente un'azione di orientamento rispetto alla femmina, simile al *Circling*, che permette al maschio di prendere posizione per il contatto con i genitali femminili nel successivo *Clasping*. Sia in *H. fagi* che in *H. alcyone*, questi moduli sono eseguiti con le stesse modalità.

Le due specie quindi non sembrano differire qualitativamente nella composizione della sequenza di corteggiamento.

4.2 - Meccanismi di interazione maschio-femmina

Lo studio dei rituali nel loro complesso mostra simili meccanismi di interazione maschio-femmina nelle due specie esaminate. In particolare, i rituali si presentano nella maggior parte dei casi molto articolati e composti da una o più sequenze di corteggiamento (o frammenti di essa) eseguite in successione ed anche intervallate da voli ed inseguimenti dietro alla femmina. Il maschio può ottenere l'accoppiamento dopo aver eseguito una sola volta la sequenza di corteggiamento, ma nella maggior parte dei casi solo dopo la successione di più di una sequenza e di frammenti di essa. La frammentazione della sequenza è facilmente riconducibile al comportamento della femmina nei casi in cui essa manifesta comportamenti di rifiuto (segnali visivo-comportamentali), che interrompono ed ostacolano l'esecuzione della sequenza del maschio. Invece, laddove la femmina rimane immobile (*Standing*) ed, apparentemente acconsenziente, subisce le azioni del maschio, le ripetizioni sia di singoli moduli sia dell'intera sequenza da parte del maschio lasciano supporre che vi siano segnali non visivo-comportamentali, probabilmente chimici, che influenzano le azioni del corteggiatore. In questi casi il maschio, sia se interrotto nel mezzo del corteggiamento che a sequenza completata (al *Clasping*), tende a ricominciare la

sequenza di corteggiamento dal *Bowing* o da moduli precedenti (Figura 79). Il maschio quindi, potrebbe ripetere il singolo modulo, o la sequenza, o parte di essa, perché sta attendendo un segnale di consenso da parte della femmina, privo del quale non può proseguire nel corteggiamento. Questo segnale di consenso della femmina sembrerebbe essere rilasciato dopo il *Bowing* ed il movimento delle antenne (Ao) e permette al maschio di proseguire nella sequenza al *Copulation attempt*, al *Clasping* e poi alla copula. Il corteggiamento tuttavia non ha successo anche se il maschio procede nella sequenza e quindi possa avere ricevuto questo segnale di consenso dopo il *Bowing*, ma al *Clasping* ricomincia daccapo rimettendosi di fronte alla femmina (*Circling*). Molti dei rituali sono caratterizzati dal succedersi di sequenze complete, in cui il maschio ricomincia daccapo la sequenza di corteggiamento, dopo il *Clasping*. Questo lascia pensare che anche al termine della sequenza vi sia un altro momento di verifica della disponibilità della femmina ad accoppiarsi, segnalata dalla femmina in qualche modo. Le osservazioni mostrano che quando la sequenza di corteggiamento arriva a copula, la femmina rimane immobile e permette al maschio di avere accesso al suo addome. Mentre nei corteggiamenti senza successo la femmina ostacola il *Clasping* allontanandosi o sottraendo il suo addome all'approccio del maschio. Deve esistere quindi, un secondo ed ultimo segnale di consenso, rilasciato dalla femmina durante il *Clasping*, in assenza del quale il maschio non può ottenere la copula (Figura 79). Quando il corteggiamento ha successo con l'accoppiamento, gli individui permangono in copula per un tempo paragonabile nelle due specie, sebbene la durata della copula in *H. fagi* sia maggiore che in *alcyone*. Inoltre, come rilevato anche in *Pararge aegeria* (Lauwers & Van Dyck, 2006), le durate delle copule di maschi non vergini durano di più di quelle di maschi vergini. Le prime hanno una durata che è il doppio delle seconde in *H. fagi* e quasi il triplo in *H. alcyone* (par. 3.6 -).

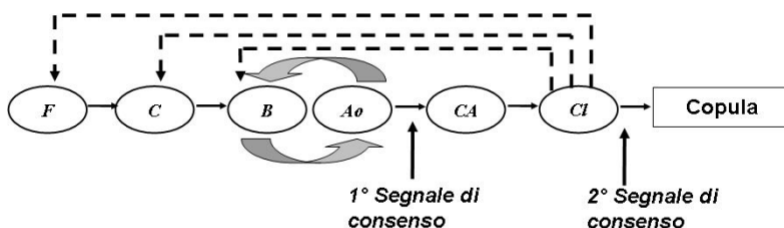


Figura 79 – Possibile posizione dei segnali di consenso della femmina nella sequenza di corteggiamento in entrambe le specie esaminate.

4.3 - I moduli comportamentali nella sequenza

Dallo studio dettagliato dei moduli componenti la sequenza di corteggiamento si evidenzia che le due specie non differiscono per le durate dei moduli *Fanning*, *Circling*, *Copulation attempt* e *Clasping*, né per il loro numero di occorrenze nella sequenza. In entrambe infatti, i moduli iniziali (*Fanning* e *Circling*) e finali (*Copulation attempt* e *Clasping*) sono eseguiti in media una sola volta nella sequenza di corteggiamento. Al contrario i moduli centrali (*Bowing* ed *Antenna orientation*) sono replicati molte volte e sempre in associazione. Il numero di occorrenze del *Bowing* e dell'*Antenna orientation* nella sequenza è molto variabile da sequenza a sequenza e da maschio a maschio in ciascuna specie. Tuttavia le misure O_B e O_{Ao} non caratterizzano le due specie, in cui in media i due moduli sono ripetuti circa nove volte nella sequenza di corteggiamento. Questi due moduli inoltre, sono caratterizzati da durate molto brevi (pochi centesimi di secondo) rispetto agli altri moduli della sequenza di corteggiamento, contraddistinti invece da durate di diversi secondi. Le durate del *Bowing* e

l'Antenna orientation sono diverse nelle due specie esaminate: più brevi in *H. fagi* che in *H. alcyone*. Questi due moduli, *Bowing* ed *Antenna orientation*, sembrano essere le fasi cruciali del corteggiamento, sia per il fatto che vengono ripetute diverse volte, sia per il fatto che il *Bowing* in particolare coinvolge le ali anteriori del maschio, caratterizzate da squame androconiali secrete di feromoni sessuali. Come in *H. semele* (Tinbergen, 1941) infatti, durante il *Bowing*, nelle specie esaminate il maschio afferra le antenne della femmina e probabilmente le porta a contatto con le sue squame androconiali (Figura 2 in cap.1).

Come già accennato, le squame androconiali sono presenti in molte specie di lepidotteri pieridi e ninfalidi (Tinbergen et al., 1942; Rutowski, 1980; Scoble, 1992; Rauser and Rutowski, 2003) associate sempre alla produzione di odori. Spesso tale odore è chiaramente avvertibile anche per il poco sensibile naso umano, per es. in *Pieris napi* i maschi sono caratterizzati da un profumo di limone (Andersson et al., 2007) ed in *H. semele* di cioccolato (Tinbergen, 1998). Diverse funzioni assumono i feromoni nei lepidotteri. A livello intraspecifico, in alcune specie, essi intervengono nella stimolazione della femmina inducendola ad acconsentire all'accoppiamento; in altre forniscono alla partner informazioni sulle qualità del maschio corteggiatore influenzando la scelta femminile; in altre ancora facilitano il riconoscimento sessuale del partner (Rutowski, 1984; Dussourd et al., 1991; Iyengar et al., 2001; Andersson et al., 2007; Costanzo & Monteiro, 2007).

Nelle specie esaminate è probabile che moduli fortemente stereotipati, come il *Bowing*, incrementino l'intensità del segnale chimico rilasciato attraverso il contatto con le antenne della partner, come osservato in diverse specie di lepidotteri tortricidi citati in Curkovic et al. (2006). Il *Bowing* assume un ruolo importante probabilmente nella stimolazione della partner ad acconsentire alla copula. In *H. fagi* ed *H. alcyone*, infatti, la femmina seppur vergine, non acconsente sempre immediatamente al corteggiamento del maschio, ma spesso solo dopo diversi tentativi, dopo diverse ripetizioni della coppia di moduli B-Ao o di diverse sequenze di corteggiamento in successione. Queste

osservazioni fanno pensare che la femmina abbia bisogno di essere stimolata al fine di raggiungere una soglia di consenso. Questa soglia potrebbe essere legata al trasferimento di una definita quantità di feromoni da parte del maschio durante l'intero corteggiamento. La durata del singolo *Bowing* fornisce una indicazione del tempo di contatto delle antenne femminili con gli androconi maschili e quindi del trasferimento dei feromoni, mentre il numero di occorrenze di questo modulo nella sequenza esprime il numero di operazioni di trasferimento di queste sostanze. Assumendo che nel *Bowing* il maschio debba trasferire alla femmina una certa quantità di feromoni perché acconsenta alla copula, dalle osservazioni il maschio di *H. alcyone* sembra effettuare un *Bowing* molto più veloce (durata breve) del maschio di *H. fagi*, invece più lento (durata lunga). Per raggiungere la stessa quantità di feromoni trasferita alla partner *H. alcyone* dovrebbe fare molti *Bowing*, al contrario di *H. fagi* che ne dovrebbe fare un numero di repliche minore. Questo è ciò che si realizza proprio nelle sequenze, che hanno ottenuto l'accoppiamento. Nelle sequenze con esito positivo infatti la durata del *Bowing* è in *H. fagi* sempre maggiore di *H. alcyone*, mentre il numero di occorrenze di questo modulo è in *H. fagi*, minore. Questi risultati permettono, seppur marginalmente, di discriminare le due specie. L'altro carattere comportamentale che distingue le due specie viene evidenziato dall'analisi comparativa della frequenza, con cui il maschio effettua il *Bowing*. In tutte le sequenze di corteggiamento osservate (complete e frammentarie) *H. alcyone* mostra in media una f_B sempre maggiore di quella misurata in *H. fagi*. Non è facile determinare in quale misura questa differenza possa contribuire all'isolamento riproduttivo tra le due specie, ma differenze quantitative comportamentali sembrano essere sufficienti ad impedire una perfetta sincronizzazione delle disponibilità all'accoppiamento in molte specie animali e soprattutto in specie affini. In altri satirini (Pinzari, 2004, 2009), specie congeneri differiscono nella sequenza di corteggiamento fornendo alle femmine un segnale visivo-comportamentale esclusivo (Figura 80). In varie di *Drosophila* sono state rilevate differenze quantitative, piuttosto che qualitative nel pattern comportamentale sessuale, che però sembrano essere sufficienti ad impedire

l'ibridazione tra specie diverse (Liimatainen et al., 1992; Marin, 1994; Yamada et al., 2008). Per valutare se la differenza riscontrata tra le due specie possa avere un ruolo come barriera riproduttiva sarà necessario eseguire degli esperimenti di cross-mating alla luce della dettagliata descrizione del corteggiamento presentata in questo lavoro.

Le indagini svolte mediante l'applicazione del *Naso elettronico* hanno rivelato un pattern chimico dei composti volatili emessi dai maschi molto simile delle due specie. Questo risultato non sorprende molto, data la stretta parentela tra le due specie esaminate. Negli insetti miscele di composti sono coinvolte nell'interazione tra gli individui (Prola & Beer, 1994) e spesso specie affini possono avere una simile composizione chimica del bouquet dei composti rilasciati, ma differire per la concentrazione relativa degli stessi composti componenti la miscela. Queste differenze in diverse specie di lepidotteri possono essere sufficienti per impedire l'accoppiamento tra specie diverse permettendo il riconoscimento del partner conspecifico (Andersson, 1994; Symonds & Elgar, 2008).

I risultati ottenuti sulle coppie maschio-femmina sottoposte al *Naso elettronico* sembrano evidenziare delle differenze nel pattern chimico delle due specie quando maschio e femmina possono percepire reciprocamente l'uno l'odore dell'altro, prova che qualcosa è cambiato nell'ambiente chimico di misura. L'ipotesi interpretativa di questo fenomeno più plausibile è che la femmina possa avere emesso una risposta chimica in presenza del maschio conspecifico. Nei pieridi le femmine sembrano rilasciare feromoni comunicando ai maschi se sono già accoppiate o no (Rutowski, 1978; Wiklund & Forsberg, 1985; Andersson et al., 2000). Tuttavia, data la scarsità di dati disponibili sulle coppie, i risultati non sono comunque risolutivi e necessitano certamente di ulteriori elaborazioni e dell'incremento dei campioni misurati.

I risultati del naso elettronico riportati in questa tesi rappresentano le prime esperienze di applicazione di questo strumento in Zoologia e all'indagine sui segnali chimici in queste specie di lepidotteri. Per l'identificazione delle sostanze volatili emesse dai maschi sono tuttora in corso analisi di campioni

estratti dalle squame androconiali delle due specie con Gas-cromatografia e Spettrometria di massa in collaborazione con il dipartimento di Scienze e Tecnologie chimiche dell'Università di Roma Tor Vergata.

Questo studio del corteggiamento infine ha permesso di mettere a punto una metodologia per quantificare differenze nella sequenza di comportamento, e a definire una procedura di analisi ed elaborazione dei dati etologici a scopo comparativo. L'analisi comparativa del corteggiamento in un campione di specie congeneri di *Hipparchia* e generi affini potrebbe essere importante a chiarire il significato filogenetico o ecologico, delle barriere riproduttive tra le specie considerate.

Figura 81 - Sequenze di corteggiamento in diverse specie di satirini in comparazione (Pinzari, 2004). Nella tabella sono incluse anche le specie *H. fagi* ed *H. alcyone*, il cui etogramma è stato aggiornato in questo lavoro.

Specie	F	C	Wq	Ao	F	As	B	Ao	RHB	An	CA	Cl	Cp
<i>H. stantonia</i>													
<i>H. vanele</i> (Teuberger et al, 1942)													
<i>C. julesis</i>													
<i>H. fagi</i>													
<i>H. alcyone</i>													
<i>B. elice</i>													

RINGRAZIAMENTI

Per l'opportunità data di proseguire lo studio del corteggiamento nelle farfalle e di respirare l'aria di questo difficile, ma meraviglioso mondo della ricerca

Prof. Valerio Sbordoni

Per l'incantevole disegno in copertina, nonché per lo stimolante, seppur animato, confronto di idee

Mario Pinzari

Per l'elaborazione dei dati ed il supporto informatico e per il sostegno morale

Giuseppe Farina

Per l'esperienza con il Naso elettronico

Dr. Di Rao

Prof. Paolesse

Dr. Santonico

Prof. D'Amico

Dr. Pennazza

Prof. Di Natale

Per la disponibilità e gli utili commenti

Dr. Lucarelli

Dr.sa Baldari

Dr.sa Carosi

Dr. Gratton

Dr.sa Fabiani

Prof.sa Cesaroni

Per "sostituto" allevatore di farfalle ed inaffiatore di piante

Mario Pinzari

Alessandro Murgante

Dr.sa Deodati

Per la determinazione delle specie graminacee

Dr. Valente

APPENDICI

APPENDICE 1 – analisi dei rapporti “posizione/lunghezza” in *H. fagi*: Test t di student per dati dipendenti.

Moduli	Media	Dev. St.	N	D	D Dv. Std.	t	g.l.	p
F	0.15	0.22						
C	0.23	0.31	120	-0.086702	0.192239	-4.941	119	0.000003
F	0.06	0.06						
B	0.54	0.10	127	-0.480698	0.049529	-109.375	126	0.000000
F	0.05	0.04						
Ao	0.56	0.05	122	-0.505583	0.025736	-216.990	121	0.000000
F	0.07	0.11						
CA	0.97	0.02	88	-0.902418	0.106243	-79.680	87	0.000000
F	0.04	0.01						
CI	1.00	0.00	70	-0.960723	0.009847	-816.311	69	0.000000
C	0.23	0.31						
F	0.15	0.22	120	0.086702	0.192239	4.941	119	0.000003
C	0.10	0.10						
B	0.53	0.10	288	-0.432612	0.047364	-155.006	287	0.000000
C	0.08	0.05						
Ao	0.56	0.06	276	-0.479372	0.027074	-294.152	275	0.000000
C	0.09	0.10						
CA	0.96	0.03	218	-0.866547	0.098987	-129.253	217	0.000000
C	0.07	0.05						
CI	1.00	0.00	183	-0.932649	0.051826	-243.443	182	0.000000
B	0.54	0.10						
F	0.06	0.06	127	0.480698	0.049529	109.375	126	0.000000
B	0.53	0.10						
C	0.10	0.10	288	0.432612	0.047364	155.006	287	0.000000
B	0.51	0.06						
Ao	0.56	0.07	337	-0.049189	0.059408	-15.200	336	0.000000
B	0.48	0.04						
CA	0.95	0.04	238	-0.471157	0.028749	-252.832	237	0.000000
B	0.48	0.03						
CI	1.00	0.00	202	-0.524031	0.032340	-230.297	201	0.000000
Ao	0.56	0.05						
F	0.05	0.04	122	0.505583	0.025736	216.990	121	0.000000
Ao	0.56	0.06						
C	0.08	0.05	276	0.479372	0.027074	294.152	275	0.000000

APPENDICE 2 – **Analisi dei rapporti “posizione/lunghezza”** in *H. fagi*: Test t di Student per dati dipendenti (*continua*).

Moduli	Media	Dev. St.	N	D	D Dv. Std.	t	g.l.	p
Ao	0.56	0.07						
B	0.51	0.06	337	0.049189	0.059408	15.200	336	0.000000
Ao	0.54	0.03						
CA	0.95	0.03	234	-0.418308	0.040673	-157.327	233	0.000000
Ao	0.53	0.02						
CI	1.00	0.00	201	-0.472173	0.015203	-440.329	200	0.000000
CA	0.97	0.02						
F	0.07	0.11	88	0.902418	0.106243	79.680	87	0.000000
CA	0.96	0.03						
C	0.09	0.10	218	0.866547	0.098987	129.253	217	0.000000
CA	0.95	0.04						
B	0.48	0.04	238	0.471157	0.028749	252.832	237	0.000000
E	0.95	0.03						
Ao	0.54	0.03	234	0.418308	0.040673	157.327	233	0.000000
CA	0.93	0.08						
CI	1.00	0.00	208	-0.067953	0.082512	-11.877	207	0.000000
CI	1.00	0.00						
F	0.04	0.01	70	0.960723	0.009847	816.311	69	0.000000
CI	1.00	0.00						
C	0.07	0.05	183	0.932649	0.051826	243.443	182	0.000000
CI	1.00	0.00						
B	0.48	0.03	202	0.524031	0.032340	230.297	201	0.000000
CI	1.00	0.00						
Ao	0.53	0.02	201	0.472173	0.015203	440.329	200	0.000000
CI	1.00	0.00						
CA	0.93	0.08	208	0.067953	0.082512	11.877	207	0.000000

APPENDICE 3 – **Analisi markoviana**, probabilità di transizione da un modulo comportamentale ad un altro in *H. fagi*.

DA	A	N	PCT	DA	A	N	PCT
F	F	1	0.60%	CA	F	2	0.78%
	C	105	62.87%		C	28	10.98%
	B	28	16.77%		B	7	2.75%
	CA	2	1.20%		CA	1	0.39%
	I	17	10.18%		Cl	205	80.39%
	P	1	0.60%		I	5	1.96%
	S	1	0.60%		P	1	0.39%
	V	12	7.19%		S	1	0.39%
F Totale		167	100.00%	CA Totale	V	5	1.96%
C	F	25	7.02%			255	100.00%
	C	5	1.40%	Cl	F	25	11.42%
	B	274	76.97%		C	125	57.08%
	Ao	1	0.28%		B	7	3.20%
	CA	8	2.25%		Cl	1	0.46%
	Cl	1	0.28%		Cp	20	9.13%
	I	22	6.18%		I	11	5.02%
	P	1	0.28%		P	3	1.37%
	S	5	1.40%		S	3	1.37%
	V	14	3.93%		V	24	10.96%
C Totale		356	100.00%	Cl Totale		219	100.00%
B	F	14	0.46%	I	F	21	15.33%
	C	9	0.30%		C	42	30.66%
	B	15	0.49%		B	36	26.28%
	Ao	2913	95.98%		CA	9	6.57%
	CA	11	0.36%		Cl	4	2.92%

Moduli della sequenza di corteggiamento: Fanning (F), Circling (C), Bowing (B), Antenna orientation (Ao), Copulation attempt (CA), Claspings (Cl); altri comportamenti del maschio: Immobilità (I), Stop (S), Inseguimento a piedi (P), Inseguimento in volo (V).

APPENDICE 4 – **Analisi markoviana**, probabilità di transizione da un modulo comportamentale ad un altro in *H. fagi* (*continua*)

DA	A	N	PCT	DA	A	N	PCT
B	I	38	1.25%	I	P	1	0.73%
	P	4	0.13%		S	11	9.49%
	S	11	0.36%		V	13	8.28%
	V	20	0.66%	I Totale		137	100.00%
B Totale		3035	100.00%	P	F	1	7.69%
Ao	F	6	0.21%		C	6	46.15%
	C	9	0.31%		B	1	7.69%
	B	2656	91.15%		CA	2	15.38%
	CA	216	7.41%		S	1	7.69%
	I	12	0.41%		V	2	15.38%
	P	1	0.03%	P Totale		13	100.00%
	S	5	0.17%				
	V	9	0.31%	V	Cl	8	5.06%
AoTotalle		2914	100.00%		I	27	17.09%
V	F	69	43.67%		P	1	0.63%
	C	23	14.56%		S	17	10.76%
	B	7	4.43%	V Totale		158	100.00%
	Ao	6	3.80%				
	CA	69	43.67%				

Moduli della sequenza di corteggiamento: Fanning (F), Circling (C), Bowing (B), Antenna orientation (Ao), Copulation attempt (CA), Claspings (Cl); altri comportamenti del maschio: Immobilità (I), Stop (S), Inseguimento a piedi (P), Inseguimento in volo (V).

APPENDICE 5 – **Analisi markoviana**, transizioni da un modulo ad un altro osservate in corteggiamenti con e senza copula in *H. fagi*.

Corteggiamento senza copula			Corteggiamento con copula		
DA	A	N	DA	A	N
F	C	80	F	C	24
	B	15		B	13
	CA	2		I	5
	I	12	F Totale		42
	P	1			
	S	1			
F Totale		111			
C	F	6	C	F	5
	C	1		B	92
	B	182		CA	2
	Ao	1		CI	1
	CA	5		I	4
	I	18	C Totale		104
	P	1			
	S	5			
C Totale		219			
B	B	10	B	B	5
	Ao	1830		Ao	1083
	CA	5		CA	6
	I	29		I	9
	P	3		P	1
	S	11	B Totale		1104
B Totale		1888			
Ao	B	1679	Ao	B	977
	CA	125		CA	91
	I	7		I	5
	S	5		P	1
Ao Totale		1816	Ao Totale		1074

APPENDICE 6 – **Analisi markoviana**, transizioni da un modulo ad un altro osservate in corteggiamenti con e senza copula in *H. fagi* (continua).

Corteggiamento senza copula			Corteggiamento con copula		
DA	A	N	DA	A	N
<u>CA</u>	CI	119	<u>CA</u>	CA	1
	I	4		CI	86
	S	1		I	1
CA Totale		124		P	1
			CA Totale		89
<u>CI</u>	CI	1	<u>CI</u>	Cp	20
	I	10		I	1
	S	3		P	3
CI Totale		14	CI Totale		24
<u>I</u>	F	3	<u>I</u>	F	1
	C	14		C	2
	B	20		B	12
	CA	5		CA	4
	CI	3		CI	1
	I	19		V	1
	P	1	I Totale		21
	S	11			
	V	1			
I Totale		77			
<u>P</u>	C	2	<u>P</u>	B	1
	CA	1		CA	1
	S	1	P Totale		2
P Totale		4			

APPENDICE 7 – **Analisi markoviana**, transizioni da un modulo ad un altro osservate in corteggiamenti con e senza copula in *H. fagi* (*continua*).

Corteggiamento senza copula			Corteggiamento con copula		
DA	A	N	DA	A	N
<u>V</u>	F	53	<u>V</u>	F	15
	C	11		C	12
	B	3		B	4
	CA	1		CA	5
	CI	4		CI	4
	I	22		I	5
	P	1		V	1
	S	17	<u>V Totale</u>		46
<u>V Totale</u>	V	3			
		115			

APPENDICE 8 – **Analisi markoviana:** Test U di Mann-Whitney, transizioni da un modulo ad un altro, corteggiamenti con e senza copula a confronto in *H. fagi*.

Transizioni	N_S	N_U	U	Z	p-level
2F-3C	15	41	260,00	-0,88	0,38
2F-4B	3	10	7,00	1,35	0,18
2F-I	4	7	10,50	-0,66	0,51
3C-2F	2	5	3,00	0,77	0,44
3C-4B	20	48	432,50	0,64	0,52
3C-6E	1	4	0,00	0,00	1,00
3C-7CA	0	0	0,00	0,00	1,00
3C-I	2	14	9,00	0,79	0,43
3C-I	2	14	9,00	0,79	0,43
4B-4B	3	4	5,00	-0,35	0,72
4B-5An	20	49	416,50	0,97	0,33
4B-6E	5	5	10,00	0,52	0,60
4B-I	3	16	23,00	0,11	0,91
4B-Isp	1	2	0,00	0,00	1,00
5An-4B	20	49	410,00	1,06	0,29
5An-I	1	7	0,00	0,00	1,00
5An-6E	20	31	301,00	-0,17	0,86
6E-7CA	20	29	279,50	-0,21	0,83
6E-I	1	4	0,00	0,00	1,00

Note: il test non evidenzia differenze tra i due gruppi U-ctg e S-ctg per ciascuna transizione. Per i dettagli e le spiegazioni vedere in Risultati par.3.2.1.

APPENDICE 9 – Analisi delle “precedenze”, probabilità che un modulo comportamentale della sequenza di corteggiamento sia preceduto da un altro in *H. fagi*.

Mod	Prec	N	%	Mod	Prec	N	%
F	C	11	8.21	CA	F	3	1.21
	start	123	91.79		C	9	3.63
F Totale		134	100.00		B	17	6.85
					Ao	216	87.10
C	F	110	36.54		CA	3	1.21
	C	1	0.33	CA Totale		248	100.00
	start	190	63.12				
C Totale		301	100.00	Cl	C	2	0.96
					CA	205	98.56
B	F	32	1.06		Cl	1	0.48
	C	277	9.13	Cl Totale		208	100.00
	B	29	0.96				
	Ao	2663	87.80	Ao	C	1	0.03
	start	32	1.06		B	2913	99.97
B Totale		3033	100.00	Ao Totale		2914	100.00
				8Cp	7CA	20	100.00
				8Cp			
				Totale		20	100.00

Mod, modulo in esame; Prec, azione precedente il modulo in esame. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl); start, inizio dell'interazione.

APPENDICE 10 – **Analisi “fine-inizio” sequenza**, transizioni dall’ultimo modulo di una sequenza (o frammento di essa) a quello iniziale della sequenza (o frammento di essa) successiva in *Hipparchia fagi*.

Modulo finale	Modulo iniziale			
Da	A	N	%	Casi
F	F	11	2,90	c
	C	6	1,58	b
	B	2	0,53	a
C	F	23	6,07	d
	C	15	3,96	c
	B	2	0,53	b
	CA	1	0,26	a
	Cl	1	0,26	a
B	F	29	7,65	d
	C	23	6,07	d
	B	2	0,53	c
	CA	3	0,79	a
Ao	F	12	3,17	d
	C	13	3,43	d
	B	1	0,26	d
	Cl	1	0,26	a
CA	F	3	0,79	d
	C	31	8,18	d
	B	9	2,37	d
	CA	1	0,26	c
	Cl	1	0,26	b
Cl	F	31	8,18	d
	C	140	36,94	d
	B	12	3,17	d
	Cl	6	1,58	b
Totale		379	100,00	

APPENDICE 11– Analisi “fine-inizio” sequenza in *Hipparchia fagi* (continua).

	Modulo iniziale				Totali	
	Caso a	Caso b	Caso c	Caso d		
Modulo finale	F	2	6	11	-	19
	C	2	2	15	23	42
	B	3	-	2	52	57
	Ao	1	-	-	26	27
	CA	-	1	1	43	45
	CI	-	-	6	183	189
	Totali	8	9	35	327	379
	%	2,11	2,37	9,23	86,28	100,00

Legenda della tabella

Modulo iniziale della sequenza successiva:

- Caso a, un modulo successivo, ma non rispetta l'ordine di sequenza;
- Caso b, un modulo immediatamente successivo secondo sequenza;
- Caso c, lo stesso modulo;
- Caso d, modulo precedente.

(per la spiegazione vedere par. 3.2.2 in Risultati)

APPENDICE 12 – Analisi dei rapporti “posizione/lunghezza” in *H. alcyone*:

Test t di Student per dati dipendenti

Moduli	Media	Dev. St.	N	D	D	Dv. Std.	t	g.l.	p
F	0.13	0.21							
C	0.22	0.28	65	-0.084168	0.172608	-3.931	64	0.000210	
F	0.07	0.09							
B	0.54	0.10	69	-0.463710	0.045963	-83.804	68	0.000000	
F	0.06	0.05							
Ao	0.56	0.07	65	-0.506058	0.029984	-136.070	64	0.000000	
F	0.10	0.13							
CA	0.97	0.03	68	-0.875436	0.127997	-56.400	67	0.000000	
F	0.05	0.07							
CI	1.00	0.00	47	-0.947384	0.073106	-88.843	46	0.000000	
C	0.22	0.28							
F	0.13	0.21	65	0.084168	0.172608	3.931	64	0.000210	
C	0.10	0.11							
B	0.52	0.10	313	-0.417424	0.066560	-110.952	312	0.000000	
C	0.08	0.07							
Ao	0.56	0.08	299	-0.481124	0.040118	-207.374	298	0.000000	
C	0.10	0.11							
CA	0.95	0.07	275	-0.845928	0.149968	-93.541	274	0.000000	
C	0.09	0.09							
CI	1.00	0.00	214	-0.912476	0.093712	-142.441	213	0.000000	
B	0.54	0.10							
F	0.07	0.09	69	0.463710	0.045963	83.804	68	0.000000	
B	0.52	0.10							
C	0.10	0.11	313	0.417424	0.066560	110.952	312	0.000000	
B	0.49	0.06							
Ao	0.56	0.08	361	-0.066631	0.069768	-18.146	360	0.000000	
B	0.48	0.05							
CA	0.95	0.05	313	-0.473658	0.045531	-184.049	312	0.000000	
B	0.47	0.04							
CI	1.00	0.00	244	-0.531501	0.044179	-187.925	243	0.000000	
Ao	0.56	0.07							
F	0.06	0.05	65	0.506058	0.029984	136.070	64	0.000000	
Ao	0.56	0.08							
C	0.08	0.07	299	0.481124	0.040118	207.374	298	0.000000	

APPENDICE 13 – **Analisi dei rapporti “posizione/lunghezza”** in *H.alcyone*: Test t di Student per dati dipendenti (*continua*)

Moduli	Media	Dev. St.	N	D	D Dv. Std.	t	g.l.	p
Ao	0.56	0.08						
B	0.49	0.06	361	0.066631	0.069768	18.146	360	0.000000
Ao	0.54	0.05						
CA	0.95	0.05	307	-0.410755	0.068937	-104.400	306	0.000000
Ao	0.53	0.03						
CI	1.00	0.00	243	-0.473845	0.025844	-285.807	242	0.000000
CA	0.97	0.03						
F	0.10	0.13	68	0.875436	0.127997	56.400	67	0.000000
CA	0.95	0.07						
C	0.10	0.11	275	0.845928	0.149968	93.541	274	0.000000
CA	0.95	0.05						
B	0.48	0.05	313	0.473658	0.045531	184.049	312	0.000000
E	0.95	0.05						
Ao	0.54	0.05	307	0.410755	0.068937	104.400	306	0.000000
CA	0.92	0.10						
CI	1.00	0.00	257	-0.083541	0.098167	-13.643	256	0.000000
CI	1.00	0.00						
F	0.05	0.07	47	0.947384	0.073106	88.843	46	0.000000
CI	1.00	0.00						
C	0.09	0.09	214	0.912476	0.093712	142.441	213	0.000000
CI	1.00	0.00						
B	0.47	0.04	244	0.531501	0.044179	187.925	243	0.000000
CI	1.00	0.00						
Ao	0.53	0.03	243	0.473845	0.025844	285.807	242	0.000000
CI	1.00	0.00						
CA	0.92	0.10	257	0.083541	0.098167	13.643	256	0.000000

APPENDICE 14 – **Analisi markoviana**, probabilità di transizione da un modulo comportamentale ad un altro in *H. alcyone*.

DA	A	N	%	DA	A	N	%
F	C	58	60.42	CA	F	5	1.44
	B	9	9.38		C	43	12.36
	CA	4	4.17		B	11	3.16
	I	20	20.83		CA	2	0.57
	P	2	2.08		CI	256	73.56
	S	1	1.04		I	11	3.16
	V	2	2.08		P	5	1.44
F Totale		96	100.00	S	3	0.86	
				V	12	3.45	
				CA Totale		348	100.00
C	F	29	7.04	CI	F	17	5.92
	C	3	0.73		C	172	59.93
	B	306	74.27		B	14	4.88
	Ao	2	0.49		CA	3	1.05
	CA	11	2.67		CI	3	1.05
	CI	1	0.24		Cp	33	11.50
	I	45	10.92		I	14	4.88
	P	2	0.49		P	9	3.14
	S	8	1.94		S	4	1.39
	V	5	1.21		V	18	6.27
C Totale		412	100.00	CI Totale		287	100.00
B	C	6	0.18	I	F	21	12.07
	B	7	0.21		C	61	35.06
	Ao	3186	97.70		B	35	20.11
	CA	11	0.34		Ao	1	0.57

Moduli della sequenza di corteggiamento: Fanning (F), Circling (C), Bowing (B), Antenna orientation (Ao), Copulation attempt (CA), Claspig (CI); altri comportamenti del maschio: Immobilità (I), Stop (S), Inseguimento a piedi (P), Inseguimento in volo (V).

APPENDICE 15 – **Analisi markoviana**, probabilità di transizione da un modulo comportamentale ad un altro in *H. alcyone* (*continua*).

DA	A	N	%	DA	A	N	%
B	I	29	0.89	I	CA	14	8.05
	P	2	0.06		CI	6	3.45
	S	6	0.18		P	4	2.30
	V	14	0.43		S	22	12.64
B Totale		3261	100.00		V	10	5.75
Ao	F	2	0.06	I Totale		195	100.00
	C	6	0.19	P	F	4	12.12
	B	2858	89.56		C	7	21.21
	CA	298	9.34		B	1	3.03
	I	17	0.53		CA	2	6.06
	S	3	0.09		CI	7	21.21
	V	5	0.16		I	2	6.06
AoTotal		3191	100.00		S	4	12.12
V	F	13	9.70	V	6	18.18	
	C	43	32.09	P Totale		33	300.00
	B	9	6.72	V	I	26	19.40
	CA	3	2.24		P	8	5.97
	CI	15	11.19		S	17	12.69
					V Totale		139

Moduli della sequenza di corteggiamento: Fanning (F), Circling (C), Bowing (B), Antenna orientation (Ao), Copulation attempt (CA), Claspig (CI); altri comportamenti del maschio: Immobilità (I), Stop (S), Inseguimento a piedi (P), Inseguimento in volo (V).

APPENDICE 16 – **Analisi markoviana**, transizioni da un modulo ad un altro, osservate in corteggiamenti con e senza copula in *H. alcyone*.

Corteggiamento senza copula			Corteggiamento con copula		
DA	A	N	DA	A	N
F	C	36	F	C	21
	B	7		B	2
	CA	3		CA	1
	I	12		I	8
	P	2	F Totale		32
	S	1			
F Totale		61			
C	F	3	C	B	94
	C	1		Ao	1
	B	212		CA	4
	Ao	1		I	5
	CA	7		C Totale	
	Cl	1			
	I	40			
	P	2			
	S	8			
C Totale		275			
B	B	5	B	B	2
	Ao	2066		Ao	1120
	CA	6		CA	5
	I	27		I	2
	P	2		B Totale	
	S	6			
B Totale		2112			
Ao	B	1850	Ao	B	1008
	Ao	2		CA	105
	CA	193		I	4
	I	13	Ao Totale		1117
	S	3			
Ao Totale		2061			

APPENDICE 17 – **Analisi markoviana**, transizioni da un modulo ad un altro, osservate in corteggiamenti con e senza copula in *H. alcyone* (continua).

Corteggiamento senza copula			Corteggiamento con copula		
DA	A	N	DA	A	N
CA	Cl	159	CA	CA	2
	I	9		Cl	97
	P	4		I	2
	S	3		P	1
CA Totale		175	CA Totale		102
Cl	Cl	3	Cl	Cp	33
	I	12		I	2
	P	8	CA Totale		35
	S	4			
Cl Totale		27			
I	F	2	I	F	2
	C	16		C	7
	B	25		B	6
	Ao	1		Cl	1
	CA	12		I	3
	Cl	2		I Totale	
	I	18			
	P	4			
	S	22			
I Totale		102			
P	C	2	P	F	1
	B	1		C	2
	Cl	4		Cl	2
	I	1		I	1
	S	4		P Totale	
P Totale		12			

APPENDICE 18 - Analisi markoviana, transizioni da un modulo ad un altro, osservate in corteggiamenti con e senza copula in *H. alcyone* (continua).

Corteggiamento senza copula		
DA	A	N
<u>V</u>	F	11
	C	32
	B	7
	Cl	12
	I	21
	P	5
	S	17
	V	2
V Totale		107

Corteggiamento con copula		
DA	A	N
<u>V</u>	F	2
	C	11
	B	2
	CA	3
	Cl	3
	I	5
	P	3
	V	1
V Totale		30

APPENDICE 19 – **Analisi markoviana**: Test U di Mann-Whitney, transizioni da un modulo ad un altro, corteggiamenti con e senza copula a confronto in *H. alcyone*.

Transizioni	N _S	N _U	U	Z	p
2F-3C	12,00	22,00	122,00	-0,36	0,72
2F-4B	2,00	5,00	3,00	-0,77	0,44
2F-6E	1,00	2,00	0,00	0,00	1,00
3C-4B	27,00	62,00	775,00	-0,55	0,58
3C-6E	3,00	6,00	7,50	0,39	0,70
3C-5An	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
4B-5An	32,00	66,00	928,50	0,97	0,33
4B-6E	4,00	4,00	6,00	-0,58	0,56
5An-4B	32,00	63,00	923,50	0,67	0,51
5An-6E	32,00	51,00	693,50	-1,15	0,25
6E-7CA	32,00	44,00	613,50	-0,95	0,34

Note: il test non evidenzia differenze tra i due gruppi U-ctg e S-ctg per ciascuna transizione. Per i dettagli e le spiegazioni vedere in Risultati par.3.3.1.

APPENDICE 20 – **Analisi delle “precedenze”**, probabilità che un modulo comportamentale della sequenza di corteggiamento sia preceduto da un altro in *H. alcyone*.

Mod	Prec	N	%	Mod	Prec	N	%
F	C	3	4.11	Ao	C	2	0.06
	start	70	95.89		B	3188	99.94
F Totale		73	100.00	Ao Totale		3190	100.00
C	F	62	19.02	CA	F	5	1.48
	C	1	0.31		C	16	4.73
	start	263	80.67		B	14	4.14
C Totale		326	100.00		Ao	299	88.46
B	F	13	0.40		CA	3	0.89
	C	310	9.51	CA Totale		1	0.30
	B	19	0.58	Cl	F	1	0.38
	Ao	2866	87.91		C	2	0.75
	start	52	1.60		B	1	0.38
B Totale		3260	100.00		CA	257	96.98
8Cp	7CA	20	100.00		Cl	3	1.13
8Cp Totale		20	100.00		start	1	0.38
				Cl Totale		265	100.00

Mod, modulo in esame; Prec, azione precedente il modulo in esame. Moduli della sequenza di corteggiamento: *Fanning* (F), *Circling* (C), *Bowing* (B), *Antenna orientation* (Ao), *Copulation attempt* (CA), *Clasping* (Cl); *start*, inizio dell'interazione.

APPENDICE 21 – **Analisi “fine-inizio” sequenza**, transizioni dall’ultimo modulo di una sequenza (o frammento di essa) a quello iniziale della sequenza (o frammento di essa) successiva in *Hipparchia alcyone*.

Modulo finale	Modulo iniziale			
Da	A	N	%	casi
F	F	5	1,17	c
	C	6	1,41	b
	Cl	1	0,23	a
C	F	30	7,04	d
	C	25	5,87	c
	B	1	0,23	b
	CA	2	0,47	a
	Cl	3	0,70	a
B	F	3	0,70	d
	C	13	3,05	d
	B	2	0,47	c
	CA	6	1,41	a
Ao	F	3	0,70	d
	C	10	2,35	d
	B	2	0,47	d
	Cl	1	0,23	a
CA	F	8	1,88	d
	C	50	11,74	d
	B	13	3,05	d
	CA	3	0,70	c
	Cl	3	0,70	b
Cl	F	25	5,87	d
	C	185	43,43	d
	B	16	3,76	d
	CA	4	0,94	d
	Cl	6	1,41	c
Totale		426	100,00	

In grassetto le transizioni modulo fine-inizio sequenza nelle percentuali più rilevanti.

APPENDICE 22 – Analisi “fine-inizio” sequenza in *Hipparchia alcyone*
(continua).

		Modulo iniziale				Totali
		Caso a	Caso b	Caso c	Caso d	
Modulo finale	F	1	6	5	-	19
	C	5	1	25	30	42
	B	6	-	2	16	57
	Ao	1	-	-	15	27
	CA	-	3	3	71	45
	CI	-	-	6	230	189
	Totali	13	10	41	362	426
	%	3,05	2,35	9,62	84,98	100,00

Legenda della tabella

Modulo iniziale della sequenza successiva:

- Caso a, un modulo successivo, ma non rispetta l'ordine di sequenza;
- Caso b, un modulo immediatamente successivo secondo sequenza;
- Caso c, lo stesso modulo;
- Caso d, modulo precedente.

(per la spiegazione vedere par. 3.3.2 in Risultati)

APPENDICE 23 – Capacità discriminatoria delle due specie da parte degli otto sensori del naso elettronico nel set sperimentale COM; *H. fagi* vs *H. alcyone*, ANOVA ad una via delle misure dei maschi.

COM						
Sensori	Sorgente variazione	SS	g.l.	MS	F	p
Sensore 1						
	Gruppi	4516	1	4516	9,99	0,00
	Errore	10849	24	452	[]	[]
	Totale	15366	25	[]	[]	[]
Sensore 2						
	Gruppi	143	1	143	5,21	0,03
	Errore	656	24	27	[]	[]
	Totale	799	25	[]	[]	[]
Sensore 3						
	Gruppi	14614	1	14614	16,47	0,00
	Errore	21296	24	887	[]	[]
	Totale	35910	25	[]	[]	[]
Sensore 4						
	Gruppi	708	1	708	20,61	0,00
	Errore	824	24	34	[]	[]
	Totale	1531	25	[]	[]	[]
Sensore 5						
	Gruppi	785	1	785	7,14	0,01
	Errore	2638	24	110	[]	[]
	Totale	3424	25	[]	[]	[]
Sensore 6						
	Gruppi	41	1	41	0,66	0,42
	Errore	1493	24	62	[]	[]
	Totale	1534	25	[]	[]	[]
Sensore 7						
	Gruppi	315	1	315	9,06	0,01
	Errore	835	24	35	[]	[]
	Totale	1151	25	[]	[]	[]
Sensore 8						
	Gruppi	537	1	537	6,78	0,02
	Errore	1902	24	79	[]	[]
	Totale	2439	25	[]	[]	[]

SS = sum of squared; MS = Means squared; F di Fisher; p = significatività del test di Fischer. (Mathlab 7.0 software usato nell'analisi).

APPENDICE 24 – Capacità discriminatoria delle due specie da parte degli otto sensori del naso elettronico nel set sperimentale NO-COM; *H. fagi* vs *H. alcyone*.

NO-COM						
Sensori	Sorgente variazione	SS	g.l.	MS	F	p
Sensore 1						
	Gruppi	579	1	579	0,39	0,55
	Errore	18028	12	1502	[]	[]
	Totale	18607	13	[]	[]	[]
Sensore 2						
	Gruppi	6	1	6	0,13	0,73
	Errore	589	12	49	[]	[]
	Totale	596	13	[]	[]	[]
Sensore 3						
	Gruppi	44	1	44	0,10	0,76
	Errore	5578	12	465	[]	[]
	Totale	5622	13	[]	[]	[]
Sensore 4						
	Gruppi	27	1	27	0,26	0,62
	Errore	1263	12	105	[]	[]
	Totale	1290	13	[]	[]	[]
Sensore 5						
	Gruppi	2	1	2	0,01	0,94
	Errore	3267	12	272	[]	[]
	Totale	3268	13	[]	[]	[]
Sensore 6						
	Gruppi	2	1	2	0,01	0,94
	Errore	3267	12	272	[]	[]
	Totale	3268	13	[]	[]	[]
Sensore 7						
	Gruppi	39	1	39	0,59	0,46
	Errore	799	12	67	[]	[]
	Totale	839	13	[]	[]	[]
Sensore 8						
	Gruppi	3	1	3	0,02	0,88
	Errore	1738	12	145	[]	[]
	Totale	1742	13	[]	[]	[]

SS = sum of squared; MS = Means squared; F di Fisher; p = livello di significatività del test di Fischer. (Mathlab 7.0 software usato nell'analisi).

BIBLIOGRAFIA

- Ackery, P.R. (1988). Hostplants and classification: a review of nymphalid butterflies. *Biological Journal of Linnean Society* 33: 95-203.
- Altman, J. (1974). Observational study of behaviour: sampling methods. *Behavior* 49: 227-267.
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*, Princeton University Press, 599 pp.
- Andersson, J., Borg-Karlson, A.K., Vongvanich, N., and Wiklund, C. (2007). Male sex pheromone release and female mate choice in a butterfly. *The Journal of Experimental Biology* 210: 964-970.
- Attenborough, D. & Chinery, M. (1990). *Farfalle d'Italia e d'Europa*. Guide della natura De Agostini-Collins, De Agostini (ed.), 320 pp.
- Balletto E. & Cassulo L.A. 1995. Lepidoptera Hesperioidea, Papilionoidea. In: Minelli A., Ruffo S. & La Posta S. (Eds.), *Checklist delle specie della fauna italiana*, 89. Calderini, Bologna.
- Bergman, M., Gotthard, K., Berger, D., Olofsson, M., Kemp, D. J., Wiklund, C. (2007). Mating success of resident versus non-resident males in a territorial butterfly. *Proc. R. Soc. B* 274: 1659–1665.
- Berwaerts, K., Van Dyck, H., Vints, E., and Matthysen, E. (2001). Effect of manipulated wing characteristics and basking posture on thermal properties of the butterfly *Pararge aegeria* (L.). *J. Zool. Lond.* 255: 261-267.
- Berwaerts, K., Van Dyck, H., and Aerts, P. (2002). Does flight morphology relate to flight performance? An experimental test with the butterfly *Pararge aegeria*. *Functional Ecology* 16:484-491.
- Boppré, M. (1984). Chemically interactions between butterflies. In: R.I. Vane-Wright and P.R. Ackery (eds.). *The biology of butterflies*. Academic Press, London, *Symp.R.ent.Soc.Lond.* vol.11, pp. 259-275.
- Brakefield, P.M. (1982a). Ecological studies on the butterfly *Maniola jurtina* in Britain. I. Adult behaviour, microdistribution and dispersal. *Journal of animal ecology*,51:713-726.

- Brakefield, P.M. (1982b). Ecological studies on the butterfly *Maniola jurtina* in Britain. II. Population dynamics: the present position. *Journal of animal ecology* 51:727-738.
- Brower, L.P., Brower J. V. Z., Cranston F.P. (1965). Courtship Behaviour of the queen butterfly, *Danaus gilippus berenice* (Cramer). *Zoologica*, 50:1-39.
- Brussard, P.F., Ehrlich, P.R. (1970). Adult Behavior and population Structure in *Erebia episodea* (Lepidoptera: Satyrinae). *Ecology* 5(51): 880-885.
- Costanzo, K., Monteiro, A. (2007). The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 274:845-851.
- Coutsis, G. J. (1983). Description of the female Genitalia of *Hipparchia fagi* Scopoli, *Hipparchia semele* Linnaeus (Satyridae) and their related taxa. *The Journal of Research on the Lepidoptera*, 22(3): 161-203.
- Curkovic, T., Brunner, J.F., Landolt, P.J. (2006). Courtship behavior in *Choristoneura rosaceana* and *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera. Tortricidae). *Ann. Entomol.Soc.Am.* 99(3): 617-624.
- Daniels, J.C. (2007). Courtship Solicitation by Females of the Barred Sulphur Butterfly (*Eurema daira*) (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Insect Behavior* 20(1): 129-135.
- Davies, N.B. (1978). Territorial defence in the speckled wood butterfly (*Pararge aegeria*): The resident always wins. *Animal Behaviour* 26: 138-147.
- Di Natale, C., Macagnano, A., Davide, F., D'Amico, A., Paolesse, R., Boschi, T., Faccio, M., Ferri, G. (1997). An electronic nose for food analysis. *Sensors and Actuators B* 44: 521-526.
- Di Natale, C., Paolesse, R., Macagnano, A., Mantini, A., Goletti, C., D'Amico, A. (1998). Characterization and design of porphyrins-based broad selectivity chemicals sensors for electronic nose applications. *Sensors and Actuators B* 52: 162-168.
- Di Natale, C., Olafsdottir, G., Einarsson, S., Martinelli, E., Paolesse, R., D'Amico, A. (2001). Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets. *Sensors and Actuators B* 77: 572-578.

- Di Natale, C., Paolesse, R., Bugio, M., Martinelli, E., Pennazza, G., D'Amico, A. (2004). Application of metalloporphyrins-based gas and liquid sensor arrays to the analysis of red wine. *Analytica Chimica Acta* 513: 49-56.
- Dussourd, D. E., Harvis, C., Meinwald, J., Eisner, T. (1991). Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9224-9227.
- Drummond, B.A. (1984). Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera. In: Smith R.L. (ed.), *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press, London, pp. 291-370.
- Ekkehard, F. (1986). Breeding butterflies and moths: rearing descriptions. A practical handbook for british and European species. Apollo books, 176 pp.
- Friberg, M. Vongvanich, N. Borg-Karlson, A.K., Kemp, D.J. Merilaita, S. and Wiklund C. (2008). Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterflies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62: 873-886.
- Garcia-Barros, E. (1989). Estudio comparativo de los caracteres biológicos de dos satirinos, *Hipparchia statilinus* (Hufnagel, 1766) e *H. semele* (L., 1758) (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae). *Miscellanea Zoologica* 13: 85-96.
- Garcia-Barros, E., Martin, J. (1991). Immature stages of *Hipparchia* Fabricius and the systematics of the "Satyrus series" (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). *Systematic Entomology* 16:407-426.
- Garcia-Barros, E., Martin, J. (1995). The eggs of European satyrine butterflies (Nymphalidae): external morphology and its use in systematics. *Zoological Journal of the Linnean Society* 115:73-115.
- Garcia-Barros, E. (2000). Comparative data on the adult biology, ecology and behaviour of species belonging to the genera *Hipparchia*, *Chazara* and *Kanetisa* in central Spain (Nymphalidae: Satyrinae). *Nota Lepidopterologica* 23(2): 119-140.
- Genc, H. (2005). Determination of sex in pupae of *Phyciodes phaon* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Florida Entomologist* 88(4): 536-537.

- Gotthard, K., Nylin, S., Wiklund, C. (1999). Mating system evolution in response to search costs in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. Behav. Ecol. Sociobiol. 45: 424-429.
- Gravetter, F.J., Wallnau, L.B. (1996). Statistics for the behavioural sciences: a first course for students of Psychology and education. West publishing company ed., 631 pp.
- Haccou, P., Meelis, E. (1992). Statistical Analysis of Behavioural 552 Data, An approach based on time-structured models. Oxford University Press, New York.
- Higgins, L.G., Riley, N.D. (1983). Farfalle d'Italia e di Europa. Rizzoli Editore, 393 pp.
- Higgins, L.G. (1975). The classification of European butterflies. Collins, 320 pp.
- Iyengar, V. K., Rossini, C., Eisner, T. (2001). Precopulatory assessment of male quality in an arctid moth (*Utetheisa ornatix*): hydroxydanaidal is the only criterion of choice. Behav. Ecol. Sociobiol. 49, 283-288.
- Jacas, J.A., Garrido, A. (1996). Differences in the morphology of male and female pupae of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). Florida Entomologist 79 (4): 603-606.
- Johansson, B.G., Jones, T.M. (2007). The role of chemical communication in mate choice. Biol. Rev. 82: 265-289.
- Jullien, J. (1909). Un problème résolu : *Satyrus hermione*, *syriaca*, *alcyone*. Bull. Soc. lepidopt. Geneve 1: 361—365.
- Jutzeler, D., Pitzalis, B., and de Bros, E. (1995). Les premiers états d'*Hipparchia neomiris* (Godart, 1824) et *Hipparchia aristaeus aristaeus* (Bonelli, 1826) du Gennargentu, Sardaigne (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). Linneana Belgica Pars XV(2) : 47-54.
- Jutzeler, D., Biermann, H., Hesselbarth, G., Russo, L., Sai, G., et de Bros, E. (1997). Etudes sur la biologie, la morphologie et l'éthologie de *Hipparchia sbordonii* Kudrna, 1984 de l'Isola di Ponza (Latium, Italie) et *Hipparchia neapolitana* (Stauder, 1921) du Monte Faito (Campanie, Italie) et complements sur la biologie de *Hipparchia leighebi* (Kudrna, 1976) (Lepidoptera : Nymphalidae, Satyrinae). Linneana Belgica Pars XVI(3): 105-132.

- Karsholt, O., Razowski, J. (1996). The Lepidoptera of Europe. A distributional Checklist. Apollo books, 380 pp.
- Kemp, D., Wiklund, C. (2001). Fighting without weaponry: a review of male-male contest competition in butterflies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49: 429-442.
- Kobayashi, A., Hiroki, M., Kato, Y. (2001). Sexual isolation between two sympatric types of the butterfly *Eurema hecabe* (L.). *Journal of Insect Behavior* 14(3):353-362.
- Kudrna, O. (1977). A revision of the Genus *Hipparchia* Fabricius. E.W. Classey LTD Faringdon, Oxon England.
- Lauwers, K., Van Dyck, H. (2006). The cost of mating with a non-virgin male in a monandrous butterfly. Experimental evidence from the speckled wood, *Pararge aegeria*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60: 69-76.
- Lederhouse, R.C., Ayres, M.P., Scriber, J.M. (1989). Evaluation of spermatophore counts in studying mating systems of Lepidoptera. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 43(2): 93-101.
- Leraut, P. (1990). Contribution à l'étude des Satyrinae de France (Lep. Nymphalidae). *Entomol. Gallica*, 2(1): 8-19.
- Leskey, T.C., Bergh, J.C. (2003). A simple character for sex differentiation of pupae and pupal exuviae of the dogwood borer (Lepidoptera: Sesiidae). *Florida Entomologist* 86(3): 378-380.
- Liimatainen, L., Hoikkala, A., Aspi, J., Welbergen, Ph. (1992). Courtship in *Drosophila montana*: the effect of male auditory signals on the behaviour of flies. *Anim. Behav.* 43: 35-48.
- Magnus, D.B. (1958). Experimental analysis of some "overoptimal" 577 sign-stimuli in the mating behavior of the fritillary butterfly *Argynnis paphia* L. (Lepidoptera, Nymphalidae). *Proc. Tenth Int. Congr. Ent. Montreal* 2: 405-418.
- Mainardi, D. (1992). *Dizionario di etologia*. Einaudi editore, 868 pp.
- Marin, I. (1994). Sexual isolation in *Drosophila*. II. Intraspecific variation in mate recognition systems. *J. evol. Biol.* 7: 303-314.

- Martin, P., Bateson, P. (1990). La misurazione del comportamento. Liguori (eds.)
- Merckx, T., Van Dyck, H. (2004). Mate location behaviour of the butterfly *Pararge aegeria* in woodland and fragmented landscapes. *Animal behaviour*: 70, 411–416.
- Nieberding, C., de Vos, H., Schneider, M.V., Lassance, J., Estramil, N., Andersson, J., Bång, J., Hedenström, E., Löfstedt, C., and Brakefield, P.M. (2008). The Male sex Pheromone of the Bitterfly *Bicyclus anynana*: Towards an Evolutionary Analysis. *PloS One* 3(7):1-12.
- Ohguchi, O., Hidaka, T. (1988). Mate recognition in two Sympatric Species of butterflies *Pieris rapae* and *P. melete*. *J.Ethol.* 6:49-53.
- Paollesse, R., Alimelli, A., Martinelli, E., Di Natale, C., D'Amico, A., D'Egidio M.G., Aureli, G., Ricelli, A., Fanelli, C. (2006). Detection of fungal contamination of cereal grain samples by electronic nose. *Sensors and Actuators, B* 119: 425-430.
- Percy, J.E. & Weatherston, J. (1971). Studies of physiologically active arthropods secretions. IX. Morphology and histology of the pheromone producing glands of some female Lepidoptera. *Can. Ent.* 103:1733-1739.
- Pinzari, Manuela (2004). Il comportamento riproduttivo di lepidotteri: *Neohipparchia statilinus* e altri Satiridi. Tesi di laurea conseguita all'Università di Roma La Sapienza Prof. Marina Cobolli.
- Pinzari, Manuela (2009). A Comparative Analysis of Mating Recognition Signals in Graylings: *Hipparchia statilinus* vs. *H. semele* (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). *Journal of Insect Behavior* 22 (3): 227-244.
- Pinzari, Mario (2000). Il comportamento territoriale di *Melitaea trivia* ([Denis & Schiffermuller], 1775) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Bollettino dell'Associazione Romana di Entomologia*, 55 (1-4): 67-134.
- Prola C., Provera P., Racheli T e Sbordoni V. 1978. I macrolepidotteri dell'Appennino Centrale Parte I Diurna, Bombyces e Sphinges. *Fragmenta entomologica*, Roma, 14: 1-217.

- Prola, C., Beer, S. (1994). I feromoni in lepidotterologia e per la conoscenza delle Sesiidae italiane (Lepidoptera). Mem. Soc. Ent. Ital. 73: 231-271.
- Robertson, K.A., Monteiro, A. (2005). Female *Bicyclus anynana* butterflies choose males on the basis of their dorsal UV-reflective eyespot pupils. Proc. R. Soc. B 272: 1541-1546.
- Roine, A. (2000). Butterfly of Europe. Lepibase 2.0 software, ISBN 951-98192-1-5, Helsinki.
- Russell, P., Jutzeler, D., and Volpe, G. (2004). The use of the pre-imaginal stages of the Macaronesian *Hipparchia* species in the clarification of the numbers and ranks of the taxa present in Madeira and the Azores archipelago (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). Linneana Belgica Pars XIX (7): 293-304.
- Rutowski, R.L. (1978). The courtship behaviour of the small sulphur butterfly, *Eurema lisa* (Lepidoptera:Pieridae). Animal Behaviour 26:892-903.
- Rutowski, R.L. (1979). Male scent producing structures in *Colias* Butterflies. Function, Localization and Adaptive Features. Journal of chemical Ecology 6(1): 13-26.
- Rutowski, R.L. (1984). Sexual Selection and the Evolution of Butterfly Mating Behavior. Journal of Research on the Lepidoptera, 23(2): 125-142.
- Rutowski, R.L. (1991). The evolution of male mate-locating behaviour in butterflies. American Naturalist 138(5): 1121-1139.
- Rutowski, R.L. (2003). Visual ecology of adult butterflies. In: Boggs C., Watt, B.W. e Ehrlich, P.R. *Butterflies: Ecology and evolution taking flight*. The University of Chicago Press, 1: 9-25.
- Sánchez-Soto, S., Nakano, O. (2004). Estudio Morfológico de *Batrachedra nuciferae* Hodges (Lepidoptera: Coleophoridae). Neotropical Entomology 33(2):173-178.
- Sbordoni V., Forestiero S., 1984. Il mondo delle farfalle. Mondadori, Milano. 312 pp.
- Scott, J.A. (1973). Mating of butterflies. Journal of research on the Lepidoptera 11(2): 99-127.

- Symonds, M.R., Elgar M.A. (2008). The evolution of pheromone diversity. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 220–228.
- Silberglied, R.E., Taylor, O.R. (1978). Ultraviolet reflection and its behavioural role in the courtship of the sulphur butterflies, *Colias eurytheme* and *C. philodice*. *Behav. Ecol.Soc.* 3: 203-243.
- Taylor, O.R. (1973). Reproductive isolation in *Colias eurytheme* and *C. philodice* (Lepidoptera: Pieridae): Use of olfaction in mate selection. *Ann. Ent. Soc. Am.* 66: 621- 626.
- Tinbergen, N. (1941). Ethologische Beobachtungen am Samtfalter, *Satyrus semele* L. *Journal of Fued Ornithologie* 89 (3): 133-144.
- Tinbergen, N. (1972). The courtship of the Grayling *Hipparchia* (= *Satyrus*) *semele* (L.). In London, Allen & Unwin (Ed.), *The animal in its world, field studies* vol. I: 147- 249.
- Tinbergen, N (1998). *Naturalisti curiosi, l'affascinante mondo degli animali.* Traduzione di Fabio Cassola. Rizzoli (ed.). 310 pp.
- Verity, R. (1953). *Le farfalle diurne d'Italia, Papilionida*, vol. V. pp. 354.
- Volpe, G., Jutzeler, D. (2001). Differentiation spécifique d'*Hipparchia fagi* (SCOPOLI, 1763) et d'*Hipparchia alcyone* (D. & S., 1776) de Campanie (Italie) et des regions limitrophes selon les caracteres des ailes, des armatures genitales, de l'oeuf et de la chenille (Lepidoptera : Nymphalidae, Satyrinae). *Linneana Belgica* XVIII (1) :1-26.
- Van Dyck, H., Matthysen, E. (1998). Thermoregulatory differences between phenotypes in the speckled wood butterfly: Hot perchers and cold patrollers? *Oecologia* 114: 326–334.
- Zangheri, P. (1970). *Il naturalista esploratore, raccoglitore e preparatore. Guida pratica elementare per la raccolta, preparazione, conservazione di tutti gli oggetti di storia naturale.* Ulrico Hoepli ed., 493 pp.
- Wedell, N. (2005). Female receptivity in butterflies and moths. *The Journal of Experimental Biology* 208. 3433-3440.
- Wiklund, C. (1977). Courtship Behaviour in Relation to Female 651 Monogamy in *Leptidea sinapis* (Lepidoptera). *Oikos* 29(2): 275-283.

Wiklund, C., Forsberg, J. (1985). Courtship and male discrimination between virgin and mated females in the orange tip butterfly *Anthocharis cardamines*. *Anim. Behav.* 34: 328-332.

Wiklund, C. (2003) Sexual selection and the evolution of butterfly mating systems. In: Boggs C., Watt, B.W. e Ehrlich, P.R. *Butterflies: Ecology and evolution taking flight*. The University of Chicago Press, 4: 67-90.

Wood, D., Ringo, J.M., Johnson, L.L. (1980). Analysis of courtship sequences of the hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Behavior Genetics* 10(5): 459-466.

Yamada, H., Tomaru, M., Matsuda, M. and Oguma, Y. (2008). Behavioural Sequence Leading to sexual isolation between *Drosophila ananassae* and *D. pallidosa*. *J. Insect Behav.* 21: 222-239.