

riflessa allo specchio dell'individuo. La risposta al modello e al trattamento di controllo (l'inserimento di un foglio bianco) non è risultata significativamente diversa e questi stimoli non hanno causato alcun atteggiamento aggressivo. Al contrario, il 63% degli individui testati ha manifestato un comportamento chiaramente aggressivo nei confronti dell'immagine riflessa nello specchio, con ripetuti tentativi di morsi. I risultati dimostrano il ruolo degli stimoli visivi nella comunicazione territoriale, ma solo come effetto combinato di forma e movimento, a differenza di quanto osservato in altre famiglie, in cui la sola forma è sufficiente a stimolare risposte aggressive. Gli specchi, quindi, possono essere strumenti molto utili per indagare l'aggressività in relazione ad aspetti fisiologici e morfologici nei lacertidi.

**Abstract.** Isolating the effects of single releasers in animal communication is difficult because a releaser is often made by a combination of different key stimuli. Territorial communication in reptiles depends on visual, chemical and acoustic stimuli, but their role depends on phylogeny. Lacertids are modern lizards that rely mainly on chemical cues for their communication, even if they also use aggressive displays based on visual recognition. We experimentally tested the visual stimuli that release an aggressive response in males of the common wall lizard (*Podarcis muralis*), testing the effects of silicone models and mirrored images in captivity. The response to models and control (a blank sheet) was not significantly different and these stimuli did not release any aggressive behaviour, whereas the reflected image in a mirror caused an overt aggression in 63% of tested individuals. The results clearly demonstrate the fundamental role of visual stimuli in territorial communication, but only as a combined effect of shape and motion, differently from other lizard families for which shape is sufficient to stimulate aggressive responses. Mirrors can be useful tools to investigate aggression related to physiological and morphological aspects in lacertid lizards.

## **Do proteins from lizard femoral glands convey identity information?**

Marco MANGIACOTTI<sup>1,2</sup>, Sofia GAGGIANI<sup>1</sup>, Alan J. COLADONATO<sup>1,\*</sup>, Stefano SCALI<sup>2</sup>, Marco A.L. ZUFFI<sup>3</sup>, Roberto SACCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Earth and Environmental Sciences, University of Pavia, Via Taramelli 24, 27100 Pavia, Italy

\* Corresponding author. Email: [alan.coladonato90@gmail.com](mailto:alan.coladonato90@gmail.com)

<sup>2</sup> Museo di Storia Naturale di Milano, corso Venezia 55, 20121 Milan, Italy

<sup>3</sup> Museum Natural History, University of Pisa, Via Roma 79 56011 Calci (Pisa), Italy

**Abstract.** Most lacertid lizards bear specialized epidermal glands in the cloacal region, which produce waxy secretions used in intraspecific chemical communication. These secretions are made of a variable mixture of lipids and proteins. While the former has been already proved to convey information about quality and condition of the emitter, the role of the latter has been poorly investigated. Among the hypothesized functions, proteins can carry information about individual identity, which is assumed a prerequisite for such a social communication system to work. We tested this hypothesis on *Podarcis muralis* using behavioural trials in a neutral arena.

We extracted the protein fraction of the femoral gland secretions by solubilizing them in 1500 µL phosphate buffered saline (PBS). We prepared the substrate for the test by dropping 50 µL of the solution on each central point of a regularly gridded blotting paper sheet. After putting the sheet on

the arena floor, a lizard was placed in the middle, where no drops were on, under a removable refuge. After 5 minutes of acclimatization, we removed the refuge and recorded lizard movements for 15 minutes starting from the first tongue flicking. We considered only adult males and each lizard was tested three times with three different substrates obtained using PBS solution: i) alone, i.e., without proteins inside (CTRL); ii) with proteins from the tested lizard (SELF); iii) with proteins from a never-met donor (N-SELF). The presentation order was randomized and subsequent trials were done at 24 hours distance. Lizard trajectories were automatically extracted using idTracker. Trajectory points were classified according to the sign of the residuals of the RST analysis (Residence in Time and Space analysis): negative residuals indicate a time-intensive behaviour while positive residuals indicate both time and space intensive behaviour. The proportion of positive residuals (PPR) was used as the response variable and interpreted as a restlessness proxy. We tested the substrate effect on the response by fitting a linear model with random intercept on the individual, substrate as a three level factor, and lizard body temperature and trial order as control variables, using a Bayesian estimate of model parameters.

PPR showed no dependence from trial order ( $\beta_{\text{trial}} = -0.015 \pm 0.023$ ;  $P_{\beta < 0} = 0.75$ ), while temperature had a slight positive effect ( $\beta_{\text{temp}} = 0.017 \pm 0.012$ ;  $P_{\beta > 0} = 0.93$ ). PPR was increased by N-SELF treatment ( $\beta_{\text{N-SELF}} = 0.124 \pm 0.043$ ;  $P_{\beta > 0} = 1.00$ ), while SELF showed a less probable positive effect ( $\beta_{\text{SELF}} = 0.041 \pm 0.044$ ;  $P_{\beta > 0} = 0.83$ ). The probability that N-SELF PPR ( $0.614 \pm 0.035$ ) is higher than those of CTRL ( $0.490 \pm 0.035$ ) and SELF ( $0.531 \pm 0.035$ ) exceeds 0.95.

Male common wall lizards responded differently to the protein content coming from a conspecific individual compared to a non-protein stimulus and to their own chemicals. Hence, they are able to detect proteins and they could use them to transfer identity related information.

**Riassunto.** La maggior parte delle lucertole possiede delle ghiandole epidermiche nella regione cloacale, che producono secrezioni cerose utilizzate per la comunicazione intraspecifica. Queste secrezioni sono costituite da una miscela di lipidi e proteine, in quantità variabile. Mentre è stato dimostrato che i lipidi vengono utilizzati per trasferire informazioni relative alla qualità e alla condizione del segnalatore, il ruolo delle proteine resta poco conosciuto. Tra le funzioni ipotizzate, esse porterebbero informazioni relative all'identità individuale, prerequisito del sistema di comunicazione sociale nei sauri. Abbiamo testato questa ipotesi nella lucertola muraiola (*Podarcis muralis*), utilizzando esperimenti comportamentali in arena neutra.

Abbiamo estratto la frazione proteica delle secrezioni femorali solubilizzandole in 1500  $\mu\text{L}$  di buffer fosfato salino (PBS). Abbiamo preparato il substrato dell'arena (un foglio pretagliato di carta assorbente) per ogni test rilasciando 50  $\mu\text{L}$  di soluzione su ciascun punto di una griglia regolare. Dopo aver trasferito il foglio nell'arena, una lucertola è stata posizionata nel centro dell'arena, in una zona dove la soluzione non era presente, sotto un rifugio rimovibile ed opaco. Dopo cinque minuti di acclimatazione, abbiamo rimosso il rifugio e registrato i movimenti della lucertola per 15 minuti. Abbiamo considerato solo maschi adulti e ogni lucertola è stata testata tre volte con tre differenti substrati ottenuti da tre diverse soluzioni: i) solo PBS, cioè senza proteine all'interno; ii) PBS con proteine provenienti dalla lucertola testata (SELF); iii) PBS con proteine ottenute da un donatore sconosciuto (N-SELF). L'ordine di presentazione degli stimoli è stato randomizzato e gli esperimenti sono stati ripetuti a distanza di 24 ore uno dall'altro. Le traiettorie delle lucertole sono state estratte automaticamente usando idTracker. I punti della traiettoria sono stati classificati in base al segno dei residui dell'analisi RST (Residence in Time and Space analysis): residui negativi indicano un comportamento intensivo per quanto riguarda il tempo, mentre residui positivi

evidenziano un comportamento intensivo sia nello spazio sia nel tempo. La proporzione di residui positivi (PPR) è stata usata come variabile di risposta e interpretata come “irrequietezza”. Abbiamo testato l’effetto del substrato sulla PPR attraverso modelli misti lineari, con l’individuo come effetto random sull’intercetta, il substrato come fattore a tre livelli, la temperatura corporea e l’ordine dei trial come variabili di controllo. Per la stima dei parametri del modello abbiamo usato un approccio bayesiano.

PPR non ha mostrato una dipendenza dall’ordine dei trial ( $\beta_{\text{trial}} = -0.015 \pm 0.023$ ;  $P_{\beta < 0} = 0.75$ ), mentre la temperatura ha avuto un lieve effetto positivo ( $\beta_{\text{temp}} = 0.017 \pm 0.012$ ;  $P_{\beta > 0} = 0.93$ ). Il PPR è accresciuto dal trattamento N-SELF ( $\beta_{\text{N-SELF}} = 0.124 \pm 0.043$ ;  $P_{\beta > 0} = 1.00$ ), mentre SELF mostra un effetto positivo meno probabile ( $\beta_{\text{SELF}} = 0.041 \pm 0.044$ ;  $P_{\beta > 0} = 0.83$ ). La probabilità che la risposta al N-SELF ( $0.614 \pm 0.035$ ) sia più lata di CTRL ( $0.490 \pm 0.035$ ) e SELF ( $0.531 \pm 0.035$ ) supera lo 0.95.

I maschi di lucertola muraiola hanno risposto diversamente al contenuto proteico proveniente da individui conspecifici rispetto a stimoli non proteici o propri. Quindi, sono in grado di discriminare le proteine e potrebbero usarle per trasferire informazioni relative all’identità.