

Daugavpils Universitāte
Sistemātiskās bioloģijas institūts
Dzīvnieku ekoloģijas un evolūcijas laboratorija



Inese Kivleniece

**MILTU MELNUĻU TĒVIŅU TERMINĀLĀS
INVESTĪCIJAS: METABOLISMS,
PERSONALITĀTES UN IMUNITĀTE**

Promocijas darba
KOPSAVILKUMS
bioloģijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
(ekoloģijas apakšnozarē)

Daugavpils 2014

Promocijas darbs izstrādāts: Daugavpils Universitātes Sistemātiskās bioloģijas institūta Dzīvnieku ekoloģijas un evolūcijas laboratorijā laika periodā no 2009. līdz 2013. gadam.



Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā
«Atbalsts Daugavpils Universitātes doktora studiju īstenošanai»
Vienošanās Nr. 2009/0140/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/015

Darba raksturs: promocijas darbs (publikāciju kopa) bioloģijas nozares ekoloģijas apakšnozarē.

Promocijas darba zinātniskais vadītājs:

Dr. biol. **Indriķis Krams** (Daugavpils Universitāte, Latvija)

Promocijas darba zinātniskais konsultants:

PhD, asoc. prof. **Markus J. Rantala** (Turku Universitāte, Somija)

Recenzenti:

- PhD, prof. **Toomas Tammaru** (Tartu Universitāte, Igaunija)
- Dr. biol., asoc. prof. **Natalja Škute** (Daugavpils Universitāte, Latvija)
- Dr. biol., asoc. prof. **Voldemārs Spuņģis** (Latvijas Universitāte)

Promocijas padomes priekšsēdētājs: Dr. biol., prof. **Arvīds Barševskis**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks: Daugavpils Universitātes bioloģijas nozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2014. gada 21. februārī, plkst. 13:30, Daugavpils Universitātē (Vienības ielā 13), 311. auditorijā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Daugavpils Universitātes bibliotēkā, Vienības ielā 13, Daugavpilī un http://du.lv/lv/zinatne/promocija/aizstavetie_promocijas_darbi/2014_gads.

Atsauksmes sūtīt: Promocijas padomes sekretārei, Vienības iela 13-209, Daugavpils, LV-5401; mob. +37126002593; e-pasts: jana.paidere@du.lv.

Padomes sekretāre: Dr. biol. **Jana Paidere**, Daugavpils Universitātes pētniece.

© Inese Kivleniece, 2014

ISBN: 978-9984-14-656-0

SATURS

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	4
IEVADS	5
Pētījuma aktualitāte	5
Zinātniskā novitāte	6
Promocijas darba mērķis un uzdevumi	6
Pētījuma rezultātu aprobācija	7
MATERIĀLS UN METODEDES	8
Pētījuma suga	8
<i>T. molitor</i> svēršana un to dzimuma noteikšana	9
Inkapsulācijas mērīšana	9
Mātišu izvēles testi	10
Kustību aktivitātes novērtēšana	11
Izdzīvotības noteikšana	11
CO ₂ respirometrija	11
Plēsonības imitācijas eksperimenti	12
Plēsēji un izdzīvotības eksperimenti	12
Datu analīze	13
Zinātniskā ētika	14
REZULTĀTI	14
Kompromisi starp imunitāti, dzimumpievilcību un izdzīvotību (I, II, III)	14
Imūnsistēmas aktivācijas ietekme uz miera stāvokļa metabolismu terminālo investīciju gadījumā (III)	16
Plēsonības ietekme uz pretplēsēju uzvedību, MSM un izdzīvotību (IV, V, VI)	16
DISKUSIJA	18
Resursu pārdale starp konkurējošām dzīvības funkcijām	18
MSM, pretplēsēju uzvedības un izdzīvotības saistība	19
SECINAJUMI	21
LITERATŪRAS SARAKSTS	46

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

Promocijas darbs ir balstīts uz publikācijām, kas disertācijas tekstā ir norādītas ar romiešu cipariem. Oriģinālie raksti ir publicēti ar izdevēju atļaujām. Autora pieminēšanas kārtība publikācijā norāda viņa ieguldījumu pētījuma veikšanā.

- I** **Kivleniece, I.**, Krams, I., Daukšte, J., Krama, T. & Rantala, M.J. 2010. Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction. *Animal Behaviour*, 80: 1015-1021; doi: 10.1016/j.anbehav.2010.09.004
- II** Krams, I., Daukšte, J., **Kivleniece, I.**, Krama, T., Rantala, M.J., Ramey, G. & Šauša, L. 2011. Female choice reveals terminal investment in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, after a repeated activation of the immune system. *Journal of Insect Science*, 11: 56; available online: insectscience.org/11.56; ISSN: 1536-2442
- III** Krams, I.A., Krama, T., Moore, F.R., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Freeberg, T.M., Mänd, R., Rantala, M.J., Daukšte, J. & Mänd, M. 2014. Male mealworm beetles increase resting metabolic rate under terminal investment. *Journal of Evolutionary Biology* (in press); doi: 10.1111/jeb.12318
- IV** Krams, I., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Krama, T., Mänd, R., Rantala, M.J., Znotiņa, S., Freeberg, T.M. & Mänd, M. 2013. Predation promotes survival of beetles with lower resting metabolic rates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148: 94-103; doi: 10.1111/eea.12079
- V** Krams, I., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Krama, T., Freeberg, T.M., Mänd, R., Vrublevska, J., Rantala, M.J. & Mänd, M. 2013. Predation selects for low resting metabolic rate and consistent individual differences in anti-predator behavior in a beetle. *Acta Ethologica*, 16: 163-172; doi: 10.1007/s10211-013-0147-3
- VI** Krams, I., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Krama, T., Freeberg, T.M., Mänd, R., Sivacova, L., Rantala, M.J. & Mänd, M. 2013. High repeatability of anti-predator responses and resting metabolic rate in a beetle. *Journal of Insect Behavior*, 27: 57-66; doi: 10.1007/s10905-013-9408-2

Autora ieguldījums pētījumos:

	I	II	III	IV	V	VI
Pētījuma ideja	*	*	*			*
Pētījuma dizains	*	*	*	*	*	*
Datu ievākšana	*	*	*	*	*	*
Datu analīze			*	*	*	
Manuskripta sagatavošana	*	*	*	*	*	*

IEVADS

Pētījuma aktualitāte

Kad parazīti uzbrūk saimniekam un ietekmē tā imūnsistēmu, tie samazina saimnieka izdzīvotību un reprodiktīvos panākumus, kas negatīvi ietekmē tā individuālo ģenētisko pielāgotību. Investīcijas imunitātē var palīdzēt organismam atgūties no parazītu uzbrukuma, bet tādā veidā samazinās investīcijas citās svarīgās sugas bioloģiskajās īpatnībās, piem., dzimumsignālos. Galvenais sugu bioloģijas kompromiss ir starp vairošanās procesu un somatisko sevis uzturēšanu, piem., atveseļošanās mehānismiem un imūnkompetenci. Potenciālie mehānismi, kas regulē šādus fizioloģiskos kompromisus, nav pietiekami izpētīti.

Dzīvības stratēģiju teorija nosaka, ka sekundārajām dzimumpazīmēm godīgi jāatspoguļo tēviņu imūnkompetenci. Terminālo investīciju gadījumā tēviņi vairāk resursu iegulda pašreizējā vairošanās procesā, izdalot feromonus un tādējādi negodīgi signalizējot mātītēm par savu veselības stāvokli. Tomēr pašreizējie atklājumi terminālo investīciju jomā ir ļoti pretrunīgi, radot pretrunīgus rezultātus pat vienā un tajā pašā pētījuma sistēmā.

Līdz šim veiktie pētījumi ir balstīti uz miera stāvokļa metabolismu (MSM), kas atspoguļo minimālo enerģijas daudzumu, kas nepieciešams organismam, lai uzturētu dzīvības funkcijas. Joprojām nav skaidri zināms, vai dabiskā atlase spēj ietekmēt MSM, un cik pastāvīga varētu būt šī ietekme. Tā kā parazīti ierosina saimniekorganismos enerģētiski intensīvus un metaboliski dārgus procesus, teorija paredz, ka infekcijas enerģētiskajām izmaksām būtu jāpalielina MSM. Daudzos pētījumos ir atklāts šāds MSM pieaugums reakcijā pret patogēniem (piem., Giorgi et al. 2001; Nilsson 2003), bet daudzos citos netika konstatēta būtiska parazītisma ietekme uz MSM (piem., Chappell et al. 1996; Rivero et al. 2007) vai pat tika novērota MSM samazināšanās (piem., Oppliger et al. 1996; Scantlebury et al. 2007). Enerģijas pārdale starp saimniekiem un parazītiem, tāpat kā inficēto tēviņu terminālās investīcijas, nav līdz galam izprastas.

Daudzām sugām individuālās atšķirības uzvedībā un fizioloģijā, kas ir pastāvīgas dažādos kontekstos un stabilas laika gaitā, tiek sauktas par temperamentu vai personālītāti. Pastāvīgas individuālās atšķirības enerģijas metabolismā (kā to atspoguļo MSM) var pozitīvi korelē ar individuālajām atšķirībām metaboliski dārgajās preplēsēju atbildes reakcijās. Tomēr trūkst eksperimentālo pētījumu, kas atklāj saistības starp MSM, personālītātēm, enerģijas patēriņu un izdzīvotību. Līdz šim ir veikti tikai daži pētījumi, kuros tika meklēta saistība starp personālītāšu pazīmēm un preplēsēju uzvedību. Būtiskas individuālās atšķirības MSM un preplēsēju uzvedībā ir izplatīta parādība dzīvnieku pasaulē, un tām varētu būt svarīga loma mūsu izpratnē par variācijām uzvedībā un dzīvnieku personālītātēs.

Neskatoties uz to, ka miltu melnuļi ir populārs pētījumu objekts evolucionārajā bioloģijā, miltu melnuļu MSM un preplēsēju uzvedības atkārtamība līdz šim netika pētītas. Svarīgi uzsvērt, ka atkārtamību var uzskatīt iedzimtības aptuveno rādītāju. Kad atkārtamība ir zema, maz ticams, ka mērāmā pazīme reaģēs uz jebkāda veida atlasu un, ka tā korelē ar citām pazīmēm.

Zinātniskā novitāte

Promocijas darba rezultāti parāda, ka miltu melnuļu tēviņu dzimumpievilcība samazinājās tiklīdz tika aktivēta viņu imūnsistēma, norādot uz kompromisu starp imunitāti un dzimumsignalizēšanu, kas ir pierādīts virknē iepriekš veikto pētījumu. Vienreiz imunoloģiski aktivēto tēviņu paaugstinātās inkapsulācijas reakcijas pierādīja to, ka šie tēviņi investēja atveseļošanās procesā. Šie novērojumi saskan ar iepriekš veiktajiem pētījumiem par imunoloģisko praimingu. Tomēr mātīšu izvēles testi parādīja, ka tēviņi ar atkārtoti aktivētu imūnsistēmu bija būtiski pievilcīgāki, nekā tēviņi ar vienreiz aktivētu imūnsistēmu, taču šiem tēviņiem samazinājās aktivitāte un inkapsulācijas intensitāte. Atkārtotas imūnsistēmas aktivācijas rezultātā tēviņi, kurus izvēlējās mātītes, negodīgi signalizēja par savu patieso veselības stāvokli. Šī pētījuma rezultāti atbilst iepriekšējiem atklājumiem, ka miltu melnuļu tēviņi spēj ātri mainīt savas pievilcības pazīmes.

Viens no svarīgākajiem šī pētījuma atklājumiem ir tas, ka miltu melnuļu mātīšu un tēviņu pastāvīgas individuālās atšķirības pretplēsēju uzvedībā būtiski korelēja ar MSM un izdzīvotību. MSM bija pozitīvi saistīts ar reakcijas aizkavēšanās laiku un negatīvi saistīts ar imobilitātes ilgumu, atspoguļojot uzvedības sindromu miltu melnuļu *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) pretplēsēju uzvedībā. Rezultāti liecina par to, ka indivīdi ar augstu MSM bija pārdroši un vairāk pakļauti plēsonības riskam. Tas atbilst dažiem nesen veiktajiem pētījumiem, kuros pierādīta MSM pozitīvā saistība ar mirstību. Ir svarīgi atzīmēt, ka augsta MSM enerģētiskās izmaksas nebija atkarīgas no dzimuma. Slēpšanās klījās un imobilitāte vairāku minūšu garumā tika atzīta par miltu melnuļu vissvarīgāko pretplēsēju stratēģiju šajā pētījumā. Rezultāti pierāda to, ka dabiskā atlase atbalsta samazinātu MSM *T. molitor* vabolēm. Atkārtojamība šiem četriem mērījumiem (MSM, slēpšanās uzvedība, reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes ilgums) bija statistiski būtiska. Šāda augsta atkārtojamība norāda uz mainību starp indivīdiem un pastāvīgumu viena indivīda ietvaros. Pētījuma rezultāti saskan ar nesen izvirzīto hipotēzi, ka personalitāšu pazīmes var sasaistīties ar sugas bioloģiskajām īpatnībām un izveidot integratīvus dzīves gaitas (*pace-of-life*) sindromus, kad uzvedība un sugu bioloģija kovariē nepārtrauktā "ātrs-lēns" dzīves stilā.

Promocijas darba mērķis un uzdevumi

Galvenais pētījuma mērķis bija izpētīt ekoloģiskos kompromisus starp imunitāti, dzimumpievilcību, izdzīvotību un miera stāvokļa metabolismu *T. molitor* tēviņiem un konstatēt MSM izmaiņas indivīdiem ar dažādām personalitātēm atšķirīgos plēsonības eksperimentos.

Pirmais pētījuma uzdevums bija noskaidrot, vai miltu melnuļu imūnsistēmas aktivācija, izmantojot neilona implantus kā "sintētiskos" parazītus, ierosina terminālās investīcijas vairošanās procesā, un, vai tas ietekmē inkapsulācijas reakciju, tēviņu aktivitāti un atlikušo dzīves ilgumu (**I, II, III**). Tēviņu spēja piesaistīt mātītes tika pārbaudīta, izmantojot mātīšu izvēles testus gan ar dzīvjiem tēviņiem, gan ar viņu feromoniem, lai pārliccinātos, ka tēviņu dzimumsignalizēšana ir saistīta ar feromoniem.

Otrais pētījuma uzdevums bija pārbaudīt saistību starp palielinātu MSM, paaugstinātu dzimumpievilcību un mirstību, izmantojot neilona implantu metodi un mērot MSM izmaiņas *T. molitor* (III).

Trešais pētījuma uzdevums bija izpētīt, vai miltu melnuļu mātītes un tēviņi atšķiras pēc MSM, pretplēsēju reakciju aizkavēšanās, imobilitātes ilguma un slēpšanās uzvedības eksperimentos, kuros tiek imitēta plēsonība (IV, V).

Ceturtais pētījuma uzdevums bija noskaidrot, vai pretplēsēju uzvedība un MSM ir saistīta ar izdzīvotību plēsonības eksperimentos, izmantojot nakts laika plēsēju, brūno žurku *Rattus norvegicus* (Berkenhout) (Rodentia: Muridae), vai plēsēju, kas barību vāc dienā - lielo zīlīti *Parus major* L. (Passeriformes: Paridae) (IV, V).

Piektais pētījuma uzdevums bija pārbaudīt, vai MSM un individuālās pretplēsēju uzvedības atšķirības ir atkārtojamas (IV, V, VI).

Pētījuma rezultātu aprobācija

Par promocijas darba rezultātiem ziņots 14 starptautiskajās zinātniskajās konferencēs, 2 ārvalstuursos un 2 vietējas nozīmes zinātniskajās konferencēs:

- The Nordic Evolutionary Psychology Meeting 2013 (Tartu, Igaunija, 12.-13.09.2013.): Consistent individual differences in energy metabolism underlie consistent individual differences in behaviour
- 4th International Conference on Laboratory Diagnostics in Veterinary Medicine, Food and Environmental Safety (Rīga, Latvija, 5.-6.09.2013.): Production of sex pheromones increases metabolism under terminal investment conditions
- The Society for Experimental Biology Annual Main Meeting 2013 (Valensija, Spānija, 2.-6.07.2013.): Male mealworm beetles increase resting metabolic rate under terminal investment
- Daugavpils Universitātes 55. starptautiskā zinātniskā konference (Daugavpils, Latvija, 10.-12.04.2013.): High Repeatability of Anti-Predator Responses and Resting Metabolic Rate in a Beetle
- XXIV International Congress of Entomology (Daegu, Koreja, 19.-25.08.2012.): Predation selects for lower resting metabolic rates in *Tenebrio molitor*
- 14th International Behavioral Ecology Congress (Lunda, Zviedrija, 12.-17.08.2012.): Predation selects for lower resting metabolic rates in mealworm beetle *Tenebrio molitor*
- BOVA Intensive Master Course "Causes and consequences of pollinator decline" (5.-11.08.2012., Jarvelja, Igaunija): Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction
- Daugavpils Universitātes 54. starptautiskā zinātniskā konference (Daugavpils, Latvija, 18.-20.04.2012.): Consistent individual differences in anti-predator behaviour of male and female mealworm beetles *Tenebrio molitor*
- 13th Congress of the European Society for Evolutionary Biology (Tūbingena, Vācija, 20.-25.08.2011.): Consistent individual differences in anti-predator behaviour in mealworm beetles *Tenebrio molitor*

- 6th International Conference “Research and conservation of biological diversity in Baltic region” (Daugavpils, Latvija, 28.-29.04.2011.): Phenotypic effects of temperature on the immune defense, sexual attractiveness and survival in mealworm beetles *Tenebrio molitor*
- THERMADAPT Science Meeting “Evolutionary and plastic responses of animal growth to different temperatures: adaptations and constraints” (Tartu, Igaunija, 28.-30.04.2011.): Temperature mediated trade-off between encapsulation response and attractiveness in male mealworm beetles *Tenebrio molitor*
- Daugavpils Universitātes 53. starptautiskā zinātniskā konference (Daugavpils, Latvija, 13.-15.04.2011.): 1) Šūnu līmeņa imūnsistēmas atbildes maksimālā vērtība miltu melnūlim *Tenebrio molitor* 2) Miltu melnuļu *Tenebrio molitor* personalitātes: individuālās atšķirības pretplēsēju uzvedībā 3) Miltu melnuļu *Tenebrio molitor* mobilitātes un elpošanas izmaiņas plēsonības apstākļos un to termālā regulācija
- Latvijas Universitātes 69. zinātniskā konference (Rīga, Latvija, 3.02.2011.): 1) Starppaudžu imunoloģiskās sagatavošanās pētījumi kukaiņiem 2) Miltu melnuļu aktivitāte paaugstināta plēsonības riska apstākļos
- Doctoral Autumn School “Phenotypic plasticity” (Otepe, Igaunija, 29.-31.10.2010.): The role of terminal investment in reproduction of males of *Tenebrio molitor*
- V European Conference on Behavioural Biology (Ferāra, Itālija, 16.-18.07.2010.): Terminal investment in sexual signaling in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*
- Latvijas Universitātes 68. zinātniskā konference (Rīga, Latvija, 2.02.2010.): Miltu melnuļu feromonu loma dzimumpievilcības signalizēšanā terminālās stratēģijas gadījumā
- 5th International conference „Research and conservation of biological diversity in Baltic region” (Daugavpils, Latvija, 22.-24.04.2009.): Increased sexual attractiveness as terminal investment does not happen at the expense of immunity in insects
- Daugavpils Universitātes 51. starptautiskā zinātniskā konference (Daugavpils, Latvija, 15.-18.04.2009.): Miltu melnuļu *Tenebrio molitor* tēviņu pievilcības un imunitātes palielināšanās pēc imūnsistēmas aktivācijas

MATERIĀLS UN METODES

Pētījuma suga

Miltu melnuļi ir viena no melnuļu dzimtas sugām. Šīs vaboles ir holometaboliski kukaiņi, kam raksturīga pilnīga metamorfoze. *T. molitor* ir izplatīti visā pasaulē, bet visbiežāk sastopami graudaugu produktos mājās un noliktavās. Šīs vaboles pārtiek arī no beigtiem kukaiņiem un ēdiena atliekām. Šie kukaiņi nav īpaši bīstami kaitēkļi, jo to populāciju lielumu var kontrolēt ar vienkāršām sanitārijas metodēm. Miltu melnuļus izmanto arī kā dzīvnieku barību. Relatīvi lielais izmērs un vienkāršas audzēšanas prasības padara tos par populāru pētījumu objektu bioķīmijā, ekoloģiskajā imunoloģijā, evolūcijā un fizioloģijā. Vaboles, kas tika izmantotas šajā pētījumā (**I, II, III, IV, V, VI**), ir ievāktas no dabiskām populācijām dažās DA-Latvijas klētīs laika posmā no 2008. līdz 2012. gadam. Laboratorijas

kultūra tik turēta $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrā kliju un kviešu miltu maisījumā ar svaigiem burkāniem un āboliem. Parazītu klātbūtne kultūrā netika pārbaudīta.

***T. molitor* svēršana un to dzimuma noteikšana**

T. molitor kūniņas un imago tika svērti, izmantojot Kern analītiskos svarus (Kern & Sohn ABS 120-4, Balingen, Germany) vai RADWAG elektriskos svarus (RADWAG 26-600 Radom, Poland) (**I, II, III, IV, V, VI**). Tikai vaboles ar vidējo svaru ($\pm 4\%$ vidējais svars) tika izmantotas visos eksperimentos.

T. molitor kūniņas tika izņemtas no kultūras iekūpošanās dienā. Kūniņām dzimums tika noteikts vizuāli pēc ārējiem dzimumorgāniem uz vēdera astotā segmenta pēc Bhattacharya et al. (1970) metodes (**I, II, III, IV, V, VI**).

Inkapsulācijas mērīšana

Imūnsistēmas aktivēšana

Miltu melnuļu tēviņi tika imobilizēti aukstumā, un pēc tam tiem tika ievietots sterils neilona implants (2 mm garš, 0.18 mm diametrā, noberzts ar smilšpapīru, ar mezglu pa vidu) dorsāli caur kukaiņa pleirālo membrānu starp trešo un ceturto vēdera posmu (Koskimäki et al. 2004; Mikkola & Rantala 2010; Rantala et al. 2002; Rantala & Kortet 2003; van Ooik et al. 2007) (**I, II, III**). Kontroles grupas indivīdiem tika veikts dūriens pleirālajā membrānā starp trešo un ceturto vēdera segmentu (**I, II**) vai arī tiem netika veikts ne dūriens, ne ievietoti implanti (**III**). Dažiem tēviņiem no kontroles grupas tika veikta imūnsistēmas aktivācija, lai noteiktu inkapsulācijas atbildes reakcijas bāzes līmeni un turpmāk tie eksperimentos netika izmantoti (**I**). Eksperimentālajiem tēviņiem tika ļauts atgūties no implantācijas akūtā efekta 70-72 stundas (**I, II**). Otrais implants tika ievietots netālu (apmēram 1 mm tālāk) no tās vietas, kur bija ievietots pirmais implants (**I, II**). Citā pētījumā (**III**) eksperimentālajiem tēviņiem tika ievietoti divi implanti vienlaicīgi abās ķermeņa pusēs. Nejauši atlasītiem tēviņiem, kam implantācija bija veikta divas reizes un kam mātītes deva priekšroku otrajā izvēles testā, tika ievietots trešais implants. Tas tika darīts, lai noskaidrotu, vai mātīšu izvēlētie tēviņi atveseļojās pēc otrās imūnsistēmas aktivācijas, termināli investējot vairošanās procesā (**II**).

Implantācijas ilgums bija dažāds (**I, II, III**), lai atklātu atšķirības starp indivīdiem. Eksperimentālie indivīdi tika turēti numurētos cilindriskos, caurspīdīgos plastmasas trauciņos pastāvīgā temperatūrā ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Pēc implantēšanas implanta mezgls tika uzmanīgi satverts un implants izņemts no vaboles. Implantu izņemšana imitēja kukaiņu imūnsistēmas aktivitāti, kad tiek likvidēts parazīts vai tā oliņa (Yourth et al. 2001, 2002). Izņemtie implanti tika izžāvēti un uzglabāti turpmākai analīzei.

Imunitātes mērījumi

Lai izmērītu inkapsulācijas reakcijas intensitāti pret neilona implantu (**I, II, III**), tika analizēta gaismas atstarošanās (melnbaltā skala) no katra implanta. Ir izpētīts, ka kukaiņu imūnsistēma reaģē uz implantu kā uz parazītu vai svešķermeni un cenšas to iekapsulēt - izolēt no sava ķermeņa. Rezultātā ap implantu izveidojas šūnu materiāla, melanīna un citu ķīmisko nogulšņu slānis, kura krāsa atbilst imūnsistēmas atbildes reakcijas intensitātei (Yourth et al. 2001, 2002).

Lai noteiktu implanta melanizācijas pakāpi, katrs no tiem tika fotografēts no diviem (III) vai trim (I, II) leņķiem konstanta apgaismojuma apstākļos, izmantojot Zeiss Lumar V12 stereomikroskopu ar Axio Cam MRc5 digitālo kameru (Carl Zeiss, Jena, Germany). Iegūtās fotogrāfijas tika analizētas, izmantojot attēlu analīzes programmu (Image J, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Tā implanta daļa, kas bija atradusies kukaiņa ķermenī, tika iezīmēta un programma aprēķināja melanizācijas pakāpi. Atstarošanās intensitātes vērtība implantam pirms ievietošanas kukaiņa ķermenī tika pielīdzināta nulles līmeņa melanizācijai (Daukšte 2012).

Mātīšu izvēles testi

Tēviņu dzimumpievilcība tika noteikta, izmantojot mātīšu izvēles testus, kuros mātītēm tika piedāvāts izvēlēties vienu no diviem tēviņiem (I, II), vai piedāvājot mātītēm filtrpapīra diskus ar tēviņu feromoniem (III). Eksperimenti tika veikti sarkanās lampas gaismā, jo *Tenebrionidae* dzimtas pārstāvji neredz garos (sarkanos) gaismas viļņus (Briscoe & Chittka 2001).

Testi ar dzīvjiem tēviņiem

Izvēles arēna sastāvēja no lielas kastes (30x20 cm, GxP) mātītei un divām mazākām kastītēm (10x5x5 cm, GxPxA) tēviņiem, kas bija piestiprinātas pie lielās kastes pretējām sienām (I, II). Lielākā kaste bija no organiskā stikla, atvērta, taisnstūrveida kaste ar mazām, vertikālām spraugām uz divām pretējām sienām, kas bija vērstas uz tēviņu kastīšu pusi. Spraugu izmēri bija pietiekami lieli, lai vaboles caur tām ar taustekļiem varētu sataustīt viena otru. Tas ļāva tēviņu feromoniem iekļūt mātīšu kastē un nodrošināja dzirdes un taustes kontaktu starp tēviņiem un mātītēm, katram paliekot savā kastē. Katrs izvēles tests sākās, vienlaicīgi ievietojot divus tēviņus pretējās tēviņu kastītēs. Pēc mātītes atbrīvošanas tika pierakstīts laiks, kas pagāja, līdz mātīte izvēlējās tēviņu (I, II), kā arī tēviņu aktivitāte (II). Izvēles kritērijs bija tāds, ka mātītei bija jāsaskaras ar tēviņu un jāpaliek kontaktā ar viņu vismaz 2 min. Kliju slānis mātītes kastē tika mainīts pēc katra testa, lai novērstu kliju piesātināšanos ar iepriekš izmantoto indivīdu smaržu (Daukšte 2012).

Feromonu ievākšana

Tika iegūti divi feromonu paraugi no katra tēviņa pirms un pēc imūnsistēmas aktivācijas (III). Katrs indivīds tika ielikts mazā, aizvērtā Petri platītē (Ø 37 mm) ar filtrpapīra disku uz 9 stundām (Rantala et al. 2002; Vainikka et al. 2007). Otra feromonu ievākšana tika veikta, lai redzētu, vai implantācija ietekmēja feromonu pievilcību. Lai izvairītos no jebkādas laika un vecuma ietekmes uz kukaiņu imūnsistēmu un dzimumpievilcību, implantēšana un feromonu ievākšana tika veikta vienas diennakts laikā.

Testi ar feromonu diskkiem

Testi tika veikti, izmantojot ievāktos feromonu diskus: viens tests pirms eksperimentālo tēviņu imūnsistēmas aktivācijas un otrs - drīz vien pēc implantu izņemšanas (III). Feromonu disku pāri tika piedāvāti 14 – 15 dienas vecām mātītēm, kas pirms tam nekad nebija pārojušās. Feromonu diski izvēles testiem tika sagatavoti vienlaicīgi. Izvēles arēna sastāvēja no stikla Petri plates (Ø 9 cm), kas bija apgāzta uz tīra filtrpapīra un uz kura atradās arī feromonu diski. Mātīte tika novietota zem mazas Petri platītes izvēles arēnas

centrā, lai aklimatizētos 5 min. Testa sākumā Petri platīte tika noņemta un pāri visai arēnai uzlikta stikla plate. Katrs tests ilga 10 min, kuru laikā tika pierakstīta mātītes pārvietošanās. Izvēle tika noteikta pēc kopējā laika, ko mātīte pavadīja uz katra feromonu diska (Daukste 2012).

Kustību aktivitātes novērtēšana

Mātīšu izvēles testu laikā tēviņu aktivitāte tika iedalīta 5 kategorijās: (i) aktivitātes nebija = 0 punkti: tēviņš bija nekustīgs; (ii) haotiska aktivitāte = 1 punkts: lai gan tēviņš bija aktīvs, aktivitātes bija novērojamas galvenokārt pie tēviņa kastītes pretējās puses prom no mātītes kastes; (iii) vāja aktivitāte = 2 punkti: tēviņš pavadīja aptuveni 50% laika blakus spraugām, mēģinot iebāzt galvu mātītes kastē vai arī tēviņš visu laiku pavadīja pie spraugām un tikai dažas reizes mēģinot iebāzt galvu mātītes kastē; (iv) vidēja aktivitāte = 3 punkti: tēviņš pavadīja līdz 75% laika blakus spraugām, mēģinot iebāzt galvu mātītes kastē; (v) augsta aktivitāte = 4 punkti: tēviņš pavadīja 100 % laika pie spraugām, mēģinot iebāzt galvu mātītes kastē (**II**).

Izdzīvotības noteikšana

Tēviņi no visām grupām tika iekļauti izdzīvotības grupā, lai noteiktu viņu izdzīvotību (**I, II, III**), kā arī iespējamās mainības iemeslus eksperimentālajās grupās (**II**). Katra vabole tika turēta individuālos, cilindriskos, numurētos 30 ml caurspīdīgas plastmasas trauciņos (**I**) vai 200 ml plastmasas kastītēs (**II, III**) konstantā istabas temperatūrā ($25 \pm 0.5^\circ\text{C}$) kliju un kviešu miltu maisījumā ar svaigiem burkāniem. Vaboles šajos trauciņos pavadīja 30 dienas (**I, II**) vai 64 dienas (**III**) pēc eksperimenta beigām. Mirstība tika pārbaudīta reizi nedēļā (**I, II, III**).

CO₂ respirometrija

Respirometrijas iekārta

Respirometrijas iekārtai bija pievienota infrasarkanā optiskā sistēma ar infrasarkano gaismu izstarojošām diodēm (TSA6203) un infrasarkano starojumu reģistrējošām diodēm (BP104), kas atradās abās kukaiņu kameras pusēs. Šī metode deva iespēju vienlaicīgi reģistrēt katras vaboles CO₂ izelpu un kustības (**IV**). Gāzes koncentrācijas respirometrs (**III, IV, V, VI**) tika kalibrēts, izmantojot kalibrācijas gāzes (Trärgase, VEB, Saxon Junkalor GmbH, Dessau) (Lighton 2008; Muljar et al. 2012). Kukaiņu kamera (ependorfs ar tilpumu 3 ml) tika caurpūsta ar sausu (5–7% RH) gaisu, kurā nebija CO₂, kas tika paveikts, gaisu laižot caur desikantu Drierite (W. A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, Ohio) un nātrija-kalcija maisījumu ar plūsmas ātrumu 60 ml min⁻¹. Analizatora bāzes līnijas dreifs tika koriģēts katra eksperimenta sākumā un beigās no mērījumiem ar tukšu kukaiņu kameru (Gray & Bradley 2006).

MSM mērīšana

Vaboles tik turētas kukaiņu kamerā vismaz 20 min. Visas vaboles, būdamas nekustīgas, sasniedza zemāko CO₂ izelpu 10 – 15 min (**III, IV**) vai 30 min (**V**) laikā. Vidējais miera stāvokļa metabolisms katrai vabolei tika aprēķināts no iegūtajiem vidējiem aritmētiskajiem turpmākajās 30 min (**III, VI**), 20 min (**V**) vai garākā laika posmā (**IV, VI**) (Metspalu et al.

2002). Tā kā vaboles bija nekustīgas vai aktīvas tikai īsus laika periodus, novērotās CO₂ izplūdes bāzes līnijas aptuveni atbilda katra kukaiņa MSM. Kad mērījumi beidzās, vaboles tika novietotas atpakaļ savās plastmasas kastītēs.

MSM mērījumi tika atkārtoti pēc 8 dienām (IV), 6 dienām (V) vai 10 un 15 dienām (VI). Nespolo & Franco (2007) konstatēja, ka atkārtotām starp mērījumiem ar laiku lineāri samazinās, norādot uz pierašanu pie eksperimentālajām manipulācijām. Tomēr laika intervāls 6-8 dienas ir pietiekams, lai izvairītos no pierašanas miltu melnuļu gadījumā, kam raksturīgs īss dzīves ilgums - laboratorijas kultūrās parasti tie ir 4 mēneši (Daukste et al. 2012).

Plēsonības imitācijas eksperimenti

Tika pielietotas divas eksperimentālas metodes (IV, V, VI), lai izmērītu pretplēsēju uzvedību (reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes ilgumu) reakcijā pret imitētu plēsonību. Daudzas vaboles reakcijā uz virkni mehānisku un optisku stimulu kļūst toniski imobilas, un šis stāvoklis var ilgt no dažām sekundēm līdz pat vairākām stundām. Patiesajai toniskajai imobilitātei raksturīgs pilnīgs vēdera un krūšu segmentu regulāro kustību trūkums (Metspalu et al. 2002).

Pretplēsēju uzvedība plastmasas kastītēs

Eksperimenti tika veikti vēlu vakarā (20:00-23:00). Vaboles atradās 200 ml plastmasas kastītēs ar klijam, miltiem un burkāniem. Pa katras vaboles kastīti no 10 cm attāluma tika uzsists ar nūjiņu, imitējot aptuveni 40 g smaga grauzēja uzbrukumu (IV, VI). Uzvedības atbildes reakcijas tika novērotas sarkanajā gaismā, kas imitē nakts apstākļus un neietekmē vaboļu aktivitāti. Tika novērots katras vaboles individuālais reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes laiks uz kliju virsmas vai arī tai parokoties zem kliju slāņa. Ja vabole turpināja pārvietoties zem klijam, to neuzskatīja par imobilu. Šis eksperiments tika atkārtots 6 dienas (IV) vai 10 dienas (VI) vēlāk.

Aizsardzības uzvedība kukaiņu kamerā

Vaboles tika turētas rokās 2 min un pēc tam tām tika dota iespēja paslēpties kukaiņu kamerā (ependorfā ar tilpumu 1.5 ml). Šajā kamerā vaboles vai nu kļuva mazāk aktīvas vai pilnīgi nekustīgas. Kukaiņu kamera bija aprīkota ar infrasarkano optisko-aktogrāfisko sistēmu. Kad vaboles atkal uzsāka kustināt kājas, galvu un antenas, tās tika pakļautas pēkšņam, īsam mehāniskam stimulam, uzsitot no 10 cm attāluma ar nūjiņu pa ependorfu un imitējot aptuveni 20 g smaga priekšmeta nokrišanu uz tā, kas var būt pielīdzināms lielās zīlītes uzbrukumam (V, VI). Tika novērots pretplēsēju reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes ilgums. Eksperiments tika atkārtots 5 dienas (V) vai 10 dienas (VI) vēlāk.

Plēsēji un izdzīvotības eksperimenti

Galvenie savvaļas miltu melnuļu plēsēji klētīs ir putni un grauzēji. Šajā pētījumā kā miltu melnuļu plēsēji tika izmantotas brūnās žurkas (IV) un lielās zīlītes (V).

Izdzīvotība žurku plēsonības apstākļos

Trīs stundas pirms eksperimenta žurkas tika ieliktas individuālos būros ar *ad libitum* pieejamu ūdeni un barību. Plēsonības arēnas pamatne (30×50×40 cm, G×P×A) tika noklāta ar 2 cm biezu kliju slāni, lai nodrošinātu vabolēm barību un iespēju pārvietoties bez

slīdēšanas, kā arī, lai tās varētu ierakties, kas ir viens no izglābšanās mehānismiem. Stundu pirms katra plēsonības testa žurka tika palaista plēsonības arēnā, lai varētu ar to iepazīties. Pēc 30 min žurka tika izņemta no arēnas un novietota atpakaļ savā būrī. Desmit vaboles (mātītes vai tēviņi) tika ievietotas plēsonības arēnā. Neviena vabole nepalika guļam uz muguras. Visas vaboles tika iezīmētas ar baltu korektora krāsu. Saskaņā ar iepriekš veiktajiem novērojumiem, iezīmēšana *per se* neietekmē miltu melnuļu izdzīvotību.

Katrā eksperimentā tika izmantoti 5 indivīdi, kas bija aktīvi plēsēja imitācijas testos, un 5 indivīdi, kas slēpās plēsēja imitācijas testos. Vaboles plēsonības arēnā netraucēti pavadīja 30 min. Pēc šī 30 min perioda plēsonības arēnā tika ielikta žurka, kam 2 stundas pirms eksperimenta netika dota barība. Katrs plēsonības eksperiments ilga 15 min. Tika novērots, vai vaboles ierakās klijās, tiklīdz arēnā tika ielaista žurka. Kad eksperiments beidzās, žurka tika izņemta no arēnas, un tika identificēti un saskaitīti izdzīvojušie indivīdi. Katra vabole žurku plēsonības eksperimentos piedalījās tikai vienu reizi. Bet katra žurka tika izmantota divreiz: tēviņu izdzīvotības un mātīšu izdzīvotības eksperimentā ar 60 min pārtraukumu. Katra vabole tika pakļauta diviem plēsēja imitācijas testiem plastmasas kastītēs un vienam plēsonības testam (IV).

Izdzīvotība putnu plēsonības apstākļos

Lielās zīlītes tika noķertas vienu dienu pirms plēsonības eksperimenta. Putni tika turēti individuālos būrīšos ar *ad libitum* pieejamu ūdeni un barību. Stundu pirms katra plēsonības testa desmit nejauši atlasītas vaboles (mātītes vai tēviņi) tika ielaistas citā būrītī - plēsonības arēnā (30×40×40 cm, G×P×A), lai iepazītos ar apkārtējo vidi. Neviena vabole netika atstāta guļam uz muguras. Visas vaboles tika individuāli iezīmētas ar korektoru. Katras arēnas pamatne tika noklāta ar 2 cm biezu kliju slāni, lai nodrošinātu vaboles ar barību un iespēju ierakties, kā arī lai novērstu slīdēšanu pārvietošanās laikā.

Katrā testā vaboles tika pakļautas lielajām zīlītēm, kas 2 h stundas pirms eksperimenta nebija barotas. Putni sāka uzbrukt vabolēm jau pirmajās testa minūtēs. Katrs eksperiments ilga 15 min. Putnu un vaboļu uzvedība tika novērota no slēpņa. Kad eksperiments beidzās, putns tika izņemts no arēnas un izdzīvojušās vaboles tika saskaitītas un identificētas. Katra lielā zīlīte tika izmantota divas reizes: tēviņu izdzīvotības un mātīšu izdzīvotības eksperimentā ar 1 h pārtraukumu. Katra vabole tika pakļauta diviem plēsēja imitācijas testiem endorfos un vienam plēsonības testam (V).

Datu analīze

Dati tika analizēti, izmantojot SPSS 12.0 Windows (I, II), SPSS 17.0 Windows (V) vai Statistica 8.0 Windows programmu (IV, VI). Datu normālais sadalījums tika pārbaudīts, izmantojot Kolmogorov-Smirnov testu (I, II). Visi testi bija divpusīgi attiecībā pret normālā sadalījuma līkni (I, IV, V, VI). Bonferroni metode tika izmantota, lai samazinātu kritisko P vērtību maza apjoma paraugkopās (I). Ja uzvedības dati nebija normāli sadalīti, attiecīgās paraugkopas tika pakļautas kvadrātsaknes transformācijas procedūrai (IV, V, VI). Reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes ilguma atkārtojamības tika aprēķinātas divos testos pēc Lessells & Boag's (1987) metodes (IV, V, VI). Uzvedības sindroms tika noteikts pēc korelācijas starp reakcijas aizkavēšanos un imobilitātes ilguma (IV, V). Dati par mātīšu

izvēles laiku un inkapsulācijas intensitātes vērtībām bija normāli sadalīti un tālāk tika analizēti, izmantojot parametriskos testus. Lai pārbaudītu mātīšu izvēles laiku divos testos, tika izmantota parastā variācijas analīze (ANOVA). Atšķirības tēviņu inkapsulācijas intensitātē triju imūnsistēmas aktivāciju rezultātā tika analizētas, izmantojot atkārtoto variācijas analīzi. Tēviņu aktivitātes paraugkopa neatbilda normālajam sadalījumam, tāpēc tika analizēta, izmantojot neparametriskos testus (II). Tika izmantota ANOVA ar grupu kā starp-grupu faktoru (3 līmeņi: kontrole, vājas intensitātes reakcija, stipras intensitātes reakcija) un fāzi kā iekš-grupu faktoru (2 līmeņi: pirms un pēc manipulācijas), lai analizētu mātīšu izvēles testu rezultātus un atšķirības miera stāvokļa metabolismā. Multiplā lineārā regresijas analīze tika izmantota, lai noskaidrotu tēviņu feromonu pievilcības cēloņus. ANOVA atspoguļoja būtisku fāzes ($F_{1,177} = 47.5, P < 0.001$) un grupas ($F_{1,177} = 66.3, P < 0.001$) ietekmi, kā arī būtisku mijiedarbību starp fāzi un grupu ($F_{2,177} = 85.62, P < 0.001$) (III).

Zinātniskā ētika

Lielās zīlītes tika atbrīvotas 2-3 h laikā pēc uzvedības testu (vaboļu izdzīvotības testu) beigām tajā pašā vietā, kur tika noķertas (V). Garākais laika periods, ko lielā zīlīte pavadīja nebrīvē, bija 18 h. Tika veikts eksperiments, izmantojot dzīvas vaboles, lai iegūtu patiešām ticamus atkarīgos mērījumus, kas sasaistītu MSM ar izdzīvotību. Šajā pētījumā plēsonību nebija iespējams aizstāt ar modeļu matemātisko izpēti (Cuthill 2007; Fedigan 2010).

REZULTĀTI

Kompromisi starp imunitāti, dzimumpievilcību un izdzīvotību (I, II, III)

Dzimumpievilcība

Pirmā imūnsistēmas aktivācija ar neilona implantu samazināja tēviņu pievilcību (I, II): mātīšu izvēles testos ar dzīviem tēviņiem mātītes deva priekšroku kontroles tēviņiem 48 no 50 gadījumiem (G tests: $G = 30.68, P < 0.001$) (I). Tomēr pēc otras imūnsistēmas aktivācijas tika novērots būtisks tēviņu dzimumpievilcības pieaugums (I, II). 39 no 50 gadījumiem mātītes izvēlējās atkārtoti aktivētos tēviņus (G tests: $G = 15.39, P < 0.001$), norādot uz terminālajam investīcijām vairošanās procesā. Turklāt tēviņi ar divreiz aktivētu imūnsistēmu bija pievilcīgāki, nekā tēviņi ar vienreiz aktivētu imūnsistēmu visos 50 gadījumos (G tests: $G = 63.72, P < 0.001$) (I).

Netika konstatētas atšķirības laikā, ko mātītes pavadīja uz kontroles un eksperimentālo tēviņu (ar intensīvu imūnreakciju) feromonu diskiem pirms un pēc manipulācijas (post-hoc testi ar Bonferoni korekciju, $P > 0.05$). Mātītes būtiski vairāk laika pavadīja uz eksperimentālo tēviņu (ar vājas intensitātes imūnreakciju) diskiem pēc manipulācijas, nekā pirms tās ($P < 0.001$). Turklāt mātītes pavadīja būtiski vairāk laika tieši uz šiem diskiem, nekā uz visiem citiem (visi $P < 0.003$) (III).

Kustību aktivitāte

Pirmajā mātīšu izvēles testā aktivitātes punkti eksperimentālajiem tēviņiem bija zemāki, nekā kontroles tēviņiem (Mann-Whitney U-tests: $z = -8.36, n_1 = n_2 = 114, P < 0.001$), norādot uz to, ka imūnsistēmas aktivācija samazina tēviņu aktivitāti. Arī otrajā mātīšu

izvēles testā tēviņiem ar aktivētu imūnsistēmu bija būtiski zemāki aktivitātes punkti, nekā kontroles tēviņiem (Mann-Whitney U-tests: $z = -5.59$, $n_1 = n_2 = 114$, $P < 0.001$). Aktivitātes punkti tēviņiem, kurus mātītes izvēlējās otrajā izvēles testā, bija zemāki, nekā tēviņiem, kurus mātītes neizvēlējās (Mann-Whitney U-tests: $z = -6.27$, $n_1 = 71$, $n_2 = 43$, $P < 0.001$), norādot uz to, ka kustību aktivitāte var būt kompromisā ar palielinātu feromonu pievilcību **(II)**.

Inkapsulācijas reakcijas

Neilona implantu ievietošana *T. molitor* tēviņiem radīja atšķirīgas atbildes reakcijas, atspoguļojot to spējas investēt imūnsistēmā. Eksperimentālo tēviņu inkapsulācijas reakcijas bija būtiski intensīvākas pēc atkārtotas imūnsistēmas aktivācijas, nekā pēc pirmās aktivācijas (Scheffé tests $P < 0.05$) **(II)**, norādot uz to, ka tēviņi pēc pirmās imūnsistēmas aktivācijas investēja, galvenokārt, imunitātē. Inkapsulācijas intensitāte pēc trešās implantācijas bija būtiski zemāka, nekā pēc pirmās implantācijas (Scheffé tests $P < 0.05$), kas liecina par to, ka tēviņi nemēģināja atveseļoties pēc atkārtotas imūnsistēmas aktivācijas **(II)**.

Līdzīgi rezultāti tika iegūti atkārtotā pētījumā: inkapsulācijas intensitāte pēc mātīšu izvēles testiem bija būtiski lielāka tēviņiem ar vienreiz aktivētu imūnsistēmu (to parādīja otrs implants), nekā kontroles grupas tēviņiem (pirmais implants; Scheffé tests: $P < 0.001$) un atkārtoti aktivētajiem tēviņiem (trešais implants; Scheffé tests: $P < 0.001$). Kontroles tēviņu inkapsulācijas intensitāte bija būtiski lielāka, nekā tēviņiem ar atkārtoti aktivētu imūnsistēmu (Scheffé tests: $P < 0.001$) **(I)**.

Eksperimentālo tēviņu inkapsulācijas vērtības nebija normāli sadalītas (Kolmogorova-Smirnova tests, $P = 0.048$). Kad šie tēviņi tika iedalīti divās inkapsulācijas intensitātes grupās: virs un zem inkapsulācijas intensitātes mediānas (inkapsulācijas intensitāte = 60), starp grupām tika novērotas būtiskas atšķirības ($t = -14.37$, $p < 0.001$; stipras intensitātes imūnreakcija: $n = 48$; 67.38 ± 4.28 , vidējais \pm SD; vājas intensitātes imūnreakcija: $n = 42$; 46.52 ± 8.51 , vidējais \pm SD). Inkapsulācijas vērtības šīm grupām bija normāli sadalītas (Kolmogorova-Smirnova testi, vājas intensitātes imūnreakcija: $P = 0.2$; intensīva imūnreakcija: $P = 0.7$) **(III)**. Pēc pirmās implantācijas inkapsulācijas intensitāte eksperimentālajiem tēviņiem, kurus izvēlējās mātītes, bija vājāka, salīdzinājumā ar eksperimentālajiem tēviņiem, kurus mātītes neizvēlējās (t -tests: $t = -1.26$, $n_1 = 23$, $n_2 = 91$, $P = 0.05$), norādot uz to, ka daži tēviņi terminālo investīciju stratēģiju izvēlējās jau pēc pirmās imūnsistēmas aktivācijas **(II)**. Inkapsulācijas intensitāte pēc otras implantācijas tēviņiem, kurus izvēlējās mātītes, bija būtiski vājāka, nekā neizvēlētajiem tēviņiem (t -tests: $t = 0.16$, $n_1 = 71$, $n_2 = 43$, $P = 0.004$) **(I, II)**.

Izdzīvotība

Izdzīvotība atšķīrās starp dažādām tēviņu grupām. Tēviņu, kuriem imūnsistēmas bija atkārtoti aktivētas, izdzīvotība bija būtiski zemāka, nekā izdzīvotība kontroles tēviņu grupā (G tests: $G = 26.31$, $P < 0.01$) vai tēviņiem, kuriem imūnsistēmas bija aktivētas vienreiz (G tests: $G = 33.51$, $P < 0.01$). Kontroles grupas tēviņu izdzīvotība neatšķīrās no vienreiz imunoloģiski aktivētu tēviņu izdzīvotības (G tests: $G = 0.18$, $P = 0.44$) **(I)**.

Kontroles un eksperimentālo tēviņu izdzīvotība būtiski atšķīrās (Fišera tiešais tests: P

< 0.001): kontroles grupas tēviņi nodzīvoja ilgāk, nekā eksperimentālie tēviņi. Tika novērotas būtiskas atšķirības izdzīvotībā starp abām eksperimentālo tēviņu grupām (Fišera tiešais tests: $P < 0.001$): ilgāk nodzīvoja tēviņi, kas uz imūnsistēmas aktivēšanu reaģēja intensīvāk, nekā tēviņi, kam tika novērota vājas intensitātes reakcija (**II, III**).

Imūnsistēmas aktivācijas ietekme uz miera stāvokļa metabolismu terminālo investīciju gadījumā (III)

Variācijas analīze atspoguļoja būtisku fāzes ($F_{1,177} = 86.67$, $P < 0.001$) un grupas ($F_{2,177} = 101.950$, $P < 0.001$), kā arī būtiskas mijiedarbības starp fāzi un grupu ($F_{1,177} = 101.95$, $P < 0.001$) ietekmi uz MSM. Kontroles un eksperimentālajiem tēviņiem ar intensīvu imūnreakciju netika konstatētas atšķirības miera stāvokļa metabolismā pirms un pēc imūnsistēmas aktivācijas (post-hoc testi ar Bonferoni korekciju, $P > 0.05$). MSM bija būtiski augstāks eksperimentālās grupas tēviņiem ar vājas intensitātes imūnreakciju pēc imūnsistēmas aktivācijas, nekā pirms tās ($P < 0.001$). Turklāt MSM bija augstāks tieši šiem tēviņiem, nekā visiem citiem (visi $P < 0.003$).

Plēsonības ietekme uz pretplēsēju uzvedību, MSM un izdzīvotību (IV, V, VI)

Miltu melnuļu miera stāvokļa metabolisms bija individuāli atkārtojams ($R = 0.926$, $F_{479,480} = 52.44$, $P < 0.0001$; $R = 0.574$, $F_{299,300} = 16.217$, $P < 0.001$; $R = 0.92$, $F_{59,60} = 77.59$, $P < 0.0001$) (**IV, V, VI**). Būtiski atkārtojama bija arī reakcijas aizkavēšanās, kad tika sists pa plastmasas kastīti ($R = 0.613$, $F_{479,480} = 4.166$, $P = 0.001$; $R = 0.58$, $F_{59,60} = 3.82$, $P < 0.0001$) (**IV, VI**) vai kukaiņu kameru ($R = 0.854$, $F_{299,300} = 26.304$, $P < 0.001$; $R = 0.75$, $F_{59,60} = 6.90$, $P < 0.0001$) (**V, VI**), un imobilitātes ilgums, sitot pa plastmasas kastīti ($R = 0.848$, $F_{479,480} = 12.162$, $P < 0.0001$; $R = 0.71$, $F_{59,60} = 5.94$, $P < 0.0001$) (**IV, VI**) un kukaiņu kameru ($R = 0.593$, $F_{299,300} = 13.095$, $P < 0.001$; $R = 0.75$, $F_{59,60} = 7.06$, $P < 0.0001$) (**V, VI**).

Reakcijas aizkavēšanās laiks reakcijā uz sitienu variēja starp 2 un 240 s (42.43 ± 40.42 , vidējais aritmētiskais \pm SD; plastmasas kastītē) (**IV**), 2 un 118 s (26.89 ± 20.34 , vidējais \pm SD; kukaiņu kamerā) (**V**), 3 un 196 s (29.81 ± 7.98 , vidējais \pm SD; plastmasas kastītē) (**VI**) vai 2 un 121 s (31.24 ± 9.16 , vidējais \pm SD; kukaiņu kamerā) (**VI**). Imobilitātes ilgums pēc sitiena variēja starp 3 un 293 s (93.87 ± 50.75 , vidējais \pm SD; plastmasas kastītē) (**IV**), 4 un 920 s (287.03 ± 195.98 , vidējais \pm SD; kukaiņu kamerā) (**V**), 4 un 256 s (99.47 ± 24.58 , vidējais \pm SD; plastmasas kastītē) (**VI**) vai 5 un 273 s (103.43 ± 34.51 , vidējais \pm SD; kukaiņu kamerā) (**VI**). Starp reakcijas aizkavēšanos un imobilitātes ilgumu plēsēju imitācijas eksperimentos tika novērota negatīva saistība, norādot uz to, ka ātra kustību pārtraukšana ir saistīta ar garākiem imobilitātes periodiem, un tas liecina par uzvedības sindromu (**IV, V, VI**).

Reakcijā uz sitienu starp miera stāvokļa metabolismu un reakcijas aizkavēšanās laiku tika novērota pozitīva saistība (**IV, V, VI**). Turpretim, starp imobilitātes ilgumu un MSM tika novērota negatīva saistība (**IV, V, VI**).

Reakcijas aizkavēšanās laiks pēc sitiena pa plastmasas kastīti neatšķīrās starp izdzīvojušajiem un neizdzīvojušajiem indivīdiem (30.61 ± 11.46 vs. 34.36 ± 35.58 s; $F_{1,478} = 0.284$, $P = 0.59$), lai gan pēc sitiena pa kukaiņu kameru tas bija būtiski īsāks izdzīvojušajiem

individīdiem (20.96 ± 38.78 s, vidējais \pm SD), nekā neizdzīvojušajiem individīdiem (69.60 ± 139.13 , vidējais \pm SD; t-tests, $t = -2.685$, $P = 0.008$) (**IV**, **V**). Individīdiem, kas ierakās kliju slānī, reakcijas aizkavēšanās laiks (45.42 ± 35.75 s) bija līdzīgs tam, ko novēroja individīdiem, kas neierakās klijās (39.43 ± 13.03 s; $F_{1,478} = 3.003$, $P = 0.085$) (**IV**).

Ierakšanās klijās tika attiecināta uz kopējo imobilitātes ilgumu, slēpjoties klijās plastmasas kastītē. Izdzīvojušie individīdi vairāk tiecās ierakties klijās, nekā neizdzīvojušie individīdi ($\chi^2 = 309.07$, $df = 1$, $P < 0.0001$). Izdzīvojušo individīdu, kas ierakās klijās, kopējais imobilitātes ilgums bija garāks, nekā neizdzīvojušajiem individīdiem, kas ierakās klijās (151.69 ± 32.99 vs. 102.78 ± 29.30 s; ANOVA: $F_{1,121} = 24.610$, $P < 0.001$) (**IV**). Līdzīgi arī pēc sītienu pa kukaiņu kameru izdzīvojušo individīdu kopējais imobilitātes ilgums (277.48 ± 163.90 , vidējais \pm SD) bija būtiski garāks, nekā neizdzīvojušajiem individīdiem (186.04 ± 174.15 , vidējais \pm SD; t-tests, $t = 3.783$, $P = 0.001$) (**V**).

Miera stāvokļa metabolisms būtiski atšķīrās starp izdzīvojušajiem un neizdzīvojušajiem individīdiem (115.78 ± 40.47 vs. 71.95 ± 23.45 s; $F_{1,478} = 95.882$, $P < 0.0001$) (**IV**). Noķertajiem individīdiem bija būtiski augstāks MSM, nekā individīdiem, kas izdzīvoja plēsonības eksperimentos (žurku plēsonība: 0.54 ± 0.23 vs. 1.33 ± 0.41 VCO₂ ml h⁻¹, $F_{1,478} = 100.437$, $P < 0.0001$; putnu plēsonība: 0.23 ± 0.11 vs. 0.74 ± 0.42 VCO₂ ml h⁻¹, t-tests, $t = 22.32$, $P = 0.01$) (**IV**, **V**).

GLM analīze parādīja, ka reakcijas aizkavēšanās atbildē uz mehānisku stimulu un kopējais imobilitātes ilgums bija atkarīgi no MSM (kovariāte GLM analīzē) (**IV**, **V**). Imobilitātes ilgums bija atkarīgs no dzimuma (**IV**). Saistība starp dzimumu un MSM neietekmēja uzvedību plēsonības apstākļos (**IV**, **V**). Tas nozīmē, ka individīdiem ar zemu MSM ir garāks imobilitātes laiks.

Katrā plēsonības eksperimentā žurkas notvēra 7.77 ± 0.91 (vidējais \pm SD) vaboles un tikai 107 no 480 vabolēm izdzīvoja. Izdzīvojušo mātīšu ($n = 78$) un tēviņu ($n = 29$) skaits būtiski atšķīrās ($\chi^2 = 28.88$, $df = 1$, $P < 0.001$). Būtiski atšķīrās arī to mātīšu un tēviņu skaits, kas slēpās klijās, kad tika uzsisis pa plastmasas kastīti ($\chi^2 = 21.738$, $df = 1$, $P = 0.0001$). MSM vidējās vērtības neatšķīrās starp dzimumiem (tēviņi: 0.88 ± 0.39 , mātītes: 0.79 ± 0.50 VCO₂ ml h⁻¹; ANOVA: $F_{1,105} = 0.08$, $P = 0.64$). To apstiprināja GLM analīze, parādot, ka izdzīvotība bija atkarīga no MSM, nevis no vaboles dzimuma. GLM analīzes rezultāti pierāda to, ka ierakšanās uzvedība plastmasas kastītē bija atkarīga no MSM, nevis no dzimuma vai mijiedarbības starp dzimumu un MSM. Papildus GLM analīze parādīja, ka izdzīvotība bija atkarīga no imobilitātes ilguma ($F_{1,121} = 2.53$, $P < 0.001$), slēpšanās klijās ($F_{1,121} = 259.34$, $P < 0.001$) un mijiedarbības starp kopējo imobilitātes ilgumu un tieksmi ierakties klijās ($F_{1,121} = 5.86$, $P < 0.001$) plēsonības riska apstākļos. Rezultāti liecina par to, ka ilga slēpšanās klijās palielina izdzīvotību (**IV**).

Lielās zīlītes noķēra 7.63 ± 0.77 (vidējais \pm SD) vaboles katra plēsonības eksperimenta laikā un tikai 71 no 300 vabolēm izdzīvoja. Izdzīvojušo mātīšu ($n = 40$) un tēviņu ($n = 31$) skaits būtiski neatšķīrās ($\chi^2 = 1.181$, $df = 1$, $P = 0.28$). Visas izdzīvojušās vaboles ($n = 71$) kļuva nekustīgas, tiklīdz plēsējs tika ielikts plēsonības arēnā, bet lielākā daļa neizdzīvojušo vaboļu (149 no 229 individīdiem) bija aktīvas ($\chi^2 = 89.1971$, $df = 1$, $P = 0.0001$). GLM analīze apstiprināja, ka augsts MSM (Wald $\chi^2 = 5.00$, $df = 1$, $P = 0.03$) un ilga reakcijas

aizkavēšanās (Wald $\chi^2 = 4.43$, $df = 1$, $P = 0.038$) samazināja miltu melnuļu izdzīvotību, jo tiem daudz biežāk uzbruka plēsēji. Saistība starp MSM un reakcijas aizkavēšanos nebija būtiska (Wald $\chi^2 = 2.68$, $df = 1$, $P = 0.092$) (**V**).

DISKUSIJA

Resursu pārdale starp konkurējošām dzīvības funkcijām

Promocijas darba rezultāti parāda, ka miltu melnuļu tēviņu dzimumpievilcība samazinājās tiklīdz tika aktivēta viņu imūnsistēma (**I**, **II**), norādot uz kompromisu starp imunitāti un dzimumsignalizēšanu (Zahavi 1975; Sheldon & Verhulst 1996; Møller et al. 1999), kas ir pierādīts virknē iepriekš veikto pētījumu (piem., Peters et al. 2004, Simmons et al. 2005; Sadd & Siva-Jothy 2006; Zala et al. 2008). Ierobežotais resursu daudzums neļauj organismiem optimāli investēt vienlaicīgi gan imūnsistēmas atveseļošanā, gan dzimumpievilcībā (Ahtiainen et al. 2005; Sadd et al. 2006), it īpaši fizioloģiskā stresa apstākļos (Siva-Jothy & Thompson 2002; Rantala et al. 2003a; Schmid-Hempel 2003; De Block & Stoks 2008; Sadd & Schmid-Hempel 2009). Vienreiz imunoloģiski aktivēto tēviņu paaugstinātās inkapsulācijas reakcijas pierādīja to, ka šie tēviņi investēja atveseļošanās procesā (**I**, **II**). Šie novērojumi saskan ar iepriekš veiktajiem pētījumiem par imunoloģisko praimingu (piem., Moret & Siva-Jothy 2003; Moret 2006).

Tomēr mātīšu izvēles testi parādīja, ka tēviņi ar atkārtoti aktivētu imūnsistēmu bija būtiski pievilcīgāki, nekā tēviņi ar vienreiz aktivētu imūnsistēmu, taču šiem tēviņiem samazinājās inkapsulācijas intensitāte (**I**, **II**). Atkārtota implanta ievietošana samazināja arī tēviņu aktivitāti (**II**), kas liecina par kompromisu starp feromonu veidošanu un enerģijas patēriņu citām vajadzībām, piem., aktivitātei un atveseļošanās procesam.

Tēviņu pievilcības pieaugums var būt izskaidrojams ar palielinātām resursu investīcijām dzimumsignalizēšanā, galvenokārt, feromonu sintēzē (Tanaka et al. 1986). Terminālo investīciju hipotēze paredz, ka saimniekam, kas cieš no infekcijas, kas negatīvi ietekmē tā izdzīvotību, jāinvestē resursi pašreizējā vairošanās procesā, lai iespējams samazinātu parazitisma enerģētiskās izmaksas un palielinātu savu individuālo ģenētisko pielāgotību (Clutton-Brock 1984; Armitage et al. 2003; Moret 2006; Sadd & Siva-Jothy 2006). Daži tēviņi izmantoja terminālo investīciju stratēģiju jau pēc pirmās imūnsistēmas aktivācijas un šiem tēviņiem bija paaugstināts MSM (**III**). Augsts MSM ilgtermiņā var izraisīt oksidatīvo stresu, jo organismā uzkrājas brīvie radikāļi (Hekimi et al. 2011). Imūnsistēmas atbildes reakcija uz neilona implantu ir enerģētiski dārga un veicina būtiski zemāku izdzīvotību imunoloģiski aktivēto tēviņu grupā (piem., Rantala et al. 2003b; Sadd et al. 2006; Creighton et al. 2009; Holman 2012). Fakts, ka tēviņiem, kurus neizvēlējās mātītes, bija labāka izdzīvotība, nekā izvēlētajiem tēviņiem, demonstrē cēloņsakarību starp terminālajām investīcijām un vaboļu samazināto dzīves ilgumu (**I**, **II**, **III**). Turklāt resursu novirzīšana no imūnsistēmas vajadzībām var pavājināt antioksidatīvo aizsardzību, padarot organismus jutīgākus pret brīvajiem radikāļiem (Lalouette et al. 2011).

T. molitor mātītes gūst ģenētiskos labumus, pārojoties ar neinficētiem tēviņiem, daļēji tāpēc, ka vairošanās ir enerģētiski dārgs process (Worden et al. 2000). Atkārtotas

imūnsistēmas aktivācijas rezultātā tēviņi, kurus izvēlējās mātītes, negodīgi signalizēja par savu patieso veselības stāvokli. Tas saskan ar Dawkins & Krebs (1978) ideju, ka dabiskā atlase ir labvēlīga indivīdiem, kas veiksmīgi manipulē ar citu indivīdu uzvedību. Šī pētījuma rezultāti atbilst iepriekšējiem atklājumiem, ka miltu melnuļu tēviņi spēj ātri mainīt savas pievilcības pazīmes (Sadd et al. 2006). Kad tiek pētīta saistība starp dzimumpievilcību un indivīda rezistenci pret parazītiem (Hamilton & Zuk 1982), jāņem vērā, ka imunitātes-vairošanās mijiedarbības iznākums var būt būtiski atkarīgs no organismu nākotnes reproduktīvās vērtības.

Tēviņu dzimumsignalizēšanai terminālo investīciju apstākļos jābūt saistītai ar spējām radīt pievilcīgus dzimumferomonus. Tā kā dzimumferomoni ir sarežģītas ķīmiskas vielas, tad to sintēze ir enerģētiski dārga un var izraisīt oksidatīvo stresu (Byers 2005; Harari et al. 2011). Miltu melnuļu mātītes dod priekšroku to tēviņu feromoniem, kam ir vislabākā imūnkompetence, t.i., ātras inkapsulācijas reakcijas pret jaunu antigēnu un augsts fenoloksidāzes līmenis hemolimfā (Rantala et al. 2002). Miltu melnuļu tēviņu dzimumferomoni stimulē mātīšu mobilitāti un veicina pārošanās uzvedību (August 1971; Hurd & Parry 1991). Citos pētījumos ir pierādījies, ka *T. molitor* mātītes bieži vien pārojas atkārtoti un ka gan pirms-, gan pēc-pārošanās uzvedība ir svarīga šīs sugas dzimumatlasses sastāvdaļa (Worden & Parker 2005). Tas liecina par to, ka mātītes nepaļaujas tikai uz feromonu signāliem dzimumpartnera izvēles laikā. Nesen tika pierādīts, ka tēviņu kutikulas ogļūdeņraži un dziedzeru feromoni terminālo investīciju apstākļos mainās un padara tēviņus pievilcīgākus mātīšu priekšā (Nielsen & Holman 2012). Šajā pētījumā tika iegūti feromoni un veikti mātīšu izvēles testi, izmantojot vispārārstītas metodes, kas ietver feromonu iegūšanu uz filtrpapīra (III) un uzvedības eksperimentus (I, II) (piem., Worden et al. 2000; Rantala et al. 2002, 2003a,b; Sadd et al. 2006; Vainikka et al. 2007). Nākotnes pētījumos būtu jākoncentrējas uz dažādiem *T. molitor* dzimumferomonu veidiem, to lomu un sintēzes enerģētiskajām izmaksām.

Pētījumu rezultāti par terminālajām investīcijām ir ļoti pretrunīgi (Javoiš & Tammaru 2004; Sadd et al. 2006; Vainikka et al. 2007; Bascunan-Garcia et al. 2010; Mason et al. 2011). Neskatoties uz pozitīviem pierādījumiem, ir virkne gadījumu, kur pretēji gaidītajam terminālās investīcijas netika konstatētas (Javoiš 2013). Iespējams, ka antioksidantu sistēmas (Halliwell 2012) ir tik efektīvas un ātras, novēršot bioloģisko struktūru oksidatīvos bojājumus un pasargājot tās no brīvajiem radikāļiem, ka oksidatīvais stress var palikt nepamanīts, ja paraugi tiek ņemti nepiemērotos laika intervālos (Meitern et al. 2013). Turpmākajos pētījumos būtu nepieciešams izmantot ekoloģiskās imunoloģijas pieeju, lai terminālās investīcijas pētītu ar daudz precīzākām metodēm.

MSM, pretplēsēju uzvedības un izdzīvotības saistība

Viens no svarīgākajiem šī pētījuma atklājumiem ir tas, ka miltu melnuļu mātīšu un tēviņu pastāvīgas individuālās atšķirības pretplēsēju uzvedībā būtiski korelēja ar MSM un izdzīvotību. MSM bija pozitīvi saistīts ar reakcijas aizkavēšanās laiku un negatīvi saistīts ar imobilitātes ilgumu, atspoguļojot uzvedības sindromu *T. molitor* pretplēsēju uzvedībā (IV, V, VI). Reakcijas aizkavēšanās bija negatīvi saistīta ar imobilitātes ilgumu. Šie rezultāti

liecina par to, ka indivīdi ar augstu MSM bija pārdroši un vairāk pakļauti plēsonības riskam (Artacho & Nespolo 2009). Tas atbilst dažiem nesen veiktajiem pētījumiem, kuros pierādīta MSM pozitīvā saistība ar mirstību (Alvarez & Nicieza 2005; Artacho & Nespolo 2009; Boratynski & Koteja 2009; Larivee et al. 2010; Lantová et al. 2011). Ir svarīgi atzīmēt, ka augsta MSM enerģētiskās izmaksas nebija atkarīgas no dzimuma (IV). Slēpšanās klijās un imobilitāte vairāku minūšu garumā tika atzīta par miltu melnuļu vissvarīgāko pretplēsēju stratēģiju šajā pētījumā. Ierakšanās klijās un samazināts MSM bija pozitīvi saistīti ar garākiem imobilitātes periodiem un palielinātu izdzīvotību. Šie rezultāti ir pierādījums tam, ka dabiskā atlase atbalsta samazinātu MSM *T. molitor* vabolēm. Atkārtojamība šiem četriem mērījumiem (MSM, slēpšanās uzvedība, reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes ilgums) bija statistiski būtiska un variēja no 0.61 līdz 0.93 (IV), no 0.57 līdz 0.85 (V) vai no 0.58 līdz 0.92 (VI). Šāda augsta atkārtojamība norāda uz mainību starp indivīdiem un pastāvīgumu viena indivīda ietvaros. Lai gan tiek uzskatīts, ka uzvedības reakcijas ir daudz "plastiskākas", nekā fizioloģiskās reakcijas (West-Eberhard 2003), ir iespējams, ka MSM ietekmē citi svarīgi faktori, kurus būtu nepieciešams izpētīt nākotnē.

Šī pētījuma rezultāti atbalsta hipotēzi, ka pastāvīgas individuālās atšķirības enerģijas metabolismā varētu būt pamatā arī pastāvīgām individuālām atšķirībām uzvedībā, augšanā un auglībā (Careau et al. 2008; Stamps 2007; Wolf et al. 2007). Šajā gadījumā ātri augošiem indivīdiem ar paaugstinātu auglību un MSM būtu jābūt aktīviem, agresīviem un pārdrošiem barības iegūšanas kontekstā (Burton et al. 2011). Tikai dažos pētījumos ir pierādīta saistība starp dzīvības stratēģijām un uzvedību vienas sugas ietvaros (piem., Dingemanse & de Goede 2004; Boon et al. 2007; Reale et al. 2010a,b). Uzvedības reakcijas, kurām īsā laika periodā nepieciešams maksimāls aerobais metabolisms, piem., izglābšanās no plēsēja vai ar vairošanos saistītas aktivitātes, var korelēt ar MSM (Sadowska et al. 2005; Wone et al. 2009). Dažos pētījumos ir konstatēts, ka indivīdi ar augstu MSM, kas konkurē par barību vai barošanās teritorijām, ir dominantie savās sociālajās grupās (Yamamoto et al. 1998). Laboratoriju gadījumā, kad barība ir pieejama *ad libitum*, ir pieņemts uzskatīt, ka barības uzņemšanas intensitāte nav atkarīga no uzvedības un sociālās dominances, tāpēc pētnieki var nepamanīt korelācijas starp uzvedību un MSM vai auglību.

Līdz šim vēl aizvien trūkst empīrisku pētījumu par pozitīvu saistību starp MSM un ilgstošu enerģijas patēriņu dažādu sugu indivīdiem, kā arī šādu procesu atkārtojamību (Chappell et al. 2004; Fu et al. 2008; Rezende et al. 2009; Vezina et al. 2006). Šī pētījuma rezultāti rada saikni starp šiem procesiem un individuālo ģenētisko pielāgotību. Aktīvie indivīdi ar garāku reakcijas aizkavēšanās laiku un īsāku imobilitātes ilgumu, kā arī tie, kas nepaslēpās klijās, bija vairāk pakļauti plēsonībai, nekā mazāk aktīvie indivīdi (IV, V). Tomēr šī pētījuma rezultāti nedod iespēju precīzi pateikt, vai tas ir palielināts reakcijas aizkavēšanās laiks vai īsais imobilitātes ilgums, kas palielina plēsonības risku. Šis jautājums atspoguļo problēmu, ko vajadzētu atrisināt turpmākajos pētījumos. Tā kā dažas vaboles plēsonības apstākļos nekavējoties pārtrauc savas aktivitātes, bet citas velta dažas sekundes, lai ieraktos klijās, tad tas liecina par izdzīvojušo vaboļu dažādām izdzīvotības stratēģijām. Ir nepieciešams noskaidrot, vai izdzīvojušo indivīdu pretplēsēju reakcijas nozīmē dažādas izdzīvotības stratēģijas un vai šīs stratēģijas ir saistītas ar metabolismu.

Vairošanās kontekstā augstam MSM ir individuālās ģenētiskās pielāgotības priekšrocības. Pārdošajiem *T. molitor* tēviņiem ir lielākas iespējas pāroties un būtiski uzlabot savu individuālo ģenētisko pielāgotību, nekā piesardzīgajiem indivīdiem, jo tēviņiem aktīvi jāseko mātītēm, lai iegūtu pārošanās iespējas (Worden & Parker 2001; Smith & Blumstein 2008). Rezultāti apstiprina ar MSM saistītu kompromisu starp dažādiem individuālās ģenētiskās pielāgotības variantiem, kas rodas no augsta MSM un plēsonības riska. Vēl joprojām nav īsti skaidrs, vai metabolisma enerģētiskās izmaksas un personalitāšu pazīmes atspoguļojas absolūtajā ģenētiskajā pielāgotībā. Mākslīgās atlasēs eksperimentos plēsēja klātbūtnē indivīdi ar garāku imobilitātes ilgumu ir mazāk pakļauti atlasei, nekā indivīdi ar īsākiem imobilitātes periodiem (Miyatake et al. 2004, 2009). Saistība starp garu imobilitātes ilgumu un izdzīvotību atspoguļo ģenētiski determinētu saistību starp *T. molitor* MSM un pretplēseju uzvedību.

Pētījuma rezultāti saskan ar nesen izvirzīto hipotēzi, ka personalitāšu pazīmes var sasaistīties ar sugas bioloģiskajām īpatnībām un izveidot integratīvus dzīves gaitas (*pace-of-life*) sindromus, kad uzvedība un sugu stratēģijas kovariē nepārtrauktā "ātrs-lēns" dzīves stilā (Careau et al. 2009; Reale et al. 2010a,b). Uz "lēnās" dzīves stila ass, kas rodas, galvenokārt, no augšanas-mirstības kompromisa (Stamps 2007), indivīdi būs ar lēnu metabolismu, mazu agresivitāti un ne tik pārdoši kā indivīdi uz "ātrās" dzīves stila ass (Reale et al. 2010a,b). Pārdošai uzvedībai kopā ar augstu metabolismu un agrīnu dzimumnobriešanu jāuzlabo indivīda ģenētiskā pielāgotība, jo pārdošo indivīdu paaugstinātā mirstība neļauj tiem sasniegt vēlīnās dzimumnobriešanas vecumu. Tomēr augsts MSM var nozīmēt arī palielinātu enerģētisko budžetu, kura iztērēšanai nepieciešams vairāk laika, jo ir jāatrod barību un jāizvairās no plēsējiem. Šo sakarību ir jāizpēta, jo dzīvības stratēģiju un uzvedības mainīgo dažādas kombinācijas var izskaidrot dažādu uzvedības tipu saglabāšanos populācijā (Wolf et al. 2007; Dingemanse & Wolf 2010; Wolf & Weissing 2010).

Dažādie uzvedības tipi tomēr var radīt līdzīgas individuālās ģenētiskās pielāgotības vērtības, jo tos atšķirīgi var ietekmēt vides apstākļi (Biro et al. 2006; Dingemanse & Wolf 2010; Reale et al. 2010a,b; Wolf & Weissing 2010). Nākotnē būtu jāveic pētījumi, kombinējot dažādas sugas bioloģiskās īpatnības ar faktoriem, kas ietekmē novecošanos (Daukste et al. 2012), kā arī fizioloģiskās un uzvedības pazīmes, lai noskaidrotu faktoros, kas populācijās rada un uztur atšķirīgus MSM un uzvedības tipus. Visbeidzot, pavisam nesen ir izvirzīta doma, ka patogēni un parazīti rada tādu pašu slogu individuālajai ģenētiskajai pielāgotībai kā visi plēsēji kopā, kas ietekmē atšķirīgu personalitāšu adaptīvās vērtības vairošanās procesā (Kortet et al. 2010). Tāpēc turpmākajiem teorētiskajiem un eksperimentālajiem pētījumiem personalitāšu jomā ir vairāk jāpievēršas imūnsistēmas darbībai atkarībā no ekoloģiskā konteksta un koevolucionārajai dinamikai starp saimniekorganismiem un parazītiem.

SECINĀJUMI

Šajā pētījumā miltu melnuļiem tika novēroti vairāki kompromisi starp dzīvībai svarīgām funkcijām, piem., vairošanās procesu, imunitāti, miera stāvokļa metabolismu un izdzīvotību.

Pirmo reizi aktivējot miltu melnuļu tēviņu imūnsistēmu, paaugstināta mirstība netika novērota, taču šo indivīdu kustību aktivitāte un dzimumpievilcība būtiski samazinājās. Tomēr pēc atkārtotas tēviņu imūnsistēmas aktivācijas mātītes deva priekšroku tēviņiem, kuru imūnsistēma bija aktivēta divas reizes pēc kārtas, lai gan tiem bija zemāka aktivitāte un paaugstināta mirstība. Šīs pazīmes liecina par terminālajām investīcijām dzimumsignalizēšanā, kuru pamatā ir kompromiss starp feromonu sintēzi un enerģētiskajiem izdevumiem, kas nepieciešami tādām aktivitātēm kā imūnsistēmas atveseļošana. Samazināta neilona implantu inkapsulācijas intensitāte un paaugstināta mirstība liecina par to, ka šie tēviņi enerģiju neinvestēja savas imūnsistēmas atveseļošanā. Pētījuma rezultāti pierāda, ka terminālo investīciju apstākļos tēviņi var negodīgi signalizēt mātītēm par savu patieso veselības stāvokli. Kad tēviņu imūnsistēma tika aktivēta trešo reizi, neilona implantu melanizācijas intensitāte pievilcīgākajiem tēviņiem bija zemāka, nekā mazāk pievilcīgajiem tēviņiem.

Imūnsistēmas aktivācija palielināja miera stāvokļa metabolismu tēviņiem ar paaugstinātu dzimumpievilcību un mirstību. Šie rezultāti apstiprina saistību starp MSM un mirstību un pierāda to, ka *T. molitor* dzimumpievilcības pieaugums var būt enerģētiski dārgs process.

Pētījuma rezultāti sniedz tiešu pierādījumu tam, ka dabiskā atlase darbojas pret kustību aktivitātēm, neietekmējot indivīdus ar samazinātu MSM. Piesardzīgākie indivīdi ar samazinātu MSM paslēpās klijās daudz veiksmīgāk, nekā pārdrošie indivīdi ar paaugstinātu MSM, kas sevi pakļāva lielākam plēsonības riskam. Tas ir svarīgs pierādījums saistībai starp pretplēsēju uzvedību un metabolismu. Slēpšanās klijās bija saistīta ar ilgāku imobilitāti. MSM fenotipiski kovariēja ar personalitāšu pazīmēm: tika novērota negatīva saistība starp reakcijas aizkavēšanās laiku un imobilitātes ilgumu, pozitīva saistība - starp reakcijas aizkavēšanos un MSM, un negatīva saistība starp MSM un imobilitātes ilgumu. Korelācija starp uzvedības reakcijām liecina par uzvedības sindromu *T. molitor* pretplēsēju uzvedībā.

Svarīgs atklājums šajā pētījumā ir tas, ka *T. molitor* pretplēsēju uzvedības reakcijas bija atkārtojamas ne tikai laikā, bet arī starp kontekstiem (atšķirīgiem vides apstākļiem), jo reakcijas aizkavēšanās un imobilitātes ilgums būtiski neatšķīrās starp eksperimentiem, kas tika veikti plastmasas kastītēs un kukaiņu kamerā.

University of Daugavpils
Institute of Systematic Biology
Laboratory of Animal Ecology and Evolution



Inese Kivleniece

**TERMINAL INVESTMENT IN MALE MEALWORM BEETLES:
METABOLIC RATE, PERSONALITY AND IMMUNITY**

SUMMARY

of the Doctoral Thesis in Biology
for the Scientific Degree
(branch: Ecology)

Daugavpils 2014

The Doctoral Thesis was performed: at University of Daugavpils, Institute of Systematic Biology, Laboratory of Animal Ecology and Evolution in 2009-2013.



This work has been supported by the European Social Fund within the Project
«Support for the implementation of doctoral studies at Daugavpils University»
Agreement Nr. 2009/0140/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/015

Type of work: Doctoral Thesis (a set of publications) in biology, branch of ecology.

Supervisor:

Dr. biol. **Indriķis Krams** (University of Daugavpils, Latvia)

Co-supervisor:

PhD, Adj. Prof. Markus J. Rantala (University of Turku, Finland)

Opponents:

- PhD, Prof. Toomas Tammaru (University of Tartu, Estonia)
- Dr. biol., Assoc. Prof. Nataļja Škute (University of Daugavpils, Latvia)
- Dr. biol., Assoc. Prof. Voldemārs Spuņģis (University of Latvia)

The Head of the Promotion Council: Dr. biol., Prof. Arvīds Barševskis

The defence of the Doctoral Thesis will take place in University of Daugavpils (Vienibas street 13) at the open meeting of the Promotion Council for Science of Biology on February 21, 2014, at 1:30 p.m., Room 311.

The Doctoral Thesis and it's summary are available at the library of University of Daugavpils, Vienibas street 13, Daugavpils and at:
http://du.lv/lv/zinatne/promocija/aizstavetie_promocijas_darbi/2014_gads.

Comments are welcome. Send them to the secretary of the Promotion Council, Vienibas street 13-209, Daugavpils, LV-5401; mob. +37126002593; e-mail: jana.paidere@du.lv.

Secretary of the Promotion Council: Dr. biol. Jana Paidere, researcher of University of Daugavpils.

© Inese Kivleniece, 2014

ISBN: 978-9984-14-656-0

CONTENTS

LIST OF ORIGINAL PAPERS	26
INTRODUCTION	27
Topicality of the study	27
Novelty of the thesis	28
The aim and tasks of the research	28
Approbation of the research results	29
MATERIAL AND METHODS	30
Study species	30
Weighing and sexing of <i>T. molitor</i>	31
Measurement of encapsulation response	31
Female preference tests	32
Scoring of locomotor activity	33
Survival estimation	33
Flow-through CO ₂ respirometry	33
Imitation of predator approach	34
Predators and survival experiments	35
Data analysis	36
Ethical note	36
RESULTS	37
Trade-offs among immunity, sexual signalling and survival (I, II, III)	37
The effect of immune insult on resting metabolic rate under terminal investment strategy (III)	38
Predation impact on anti-predatory responses, resting metabolic rate and survival (IV, V, VI)	39
DISCUSSION	41
Resource allocation among competing life functions	41
Consistency and correlations of RMR, anti-predator behaviour and survival over time	42
CONCLUSIONS	45
REFERENCES	46

LIST OF ORIGINAL PAPERS

This thesis is based on the following papers, which are referred to in the text by their Roman numerals. Original papers are reproduced with permissions from the publishers. The order of the authors' names reflects their involvement in the paper.

- I** **Kivleniece, I.**, Krams, I., Daukšte, J., Krama, T. & Rantala, M.J. 2010. Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction. *Animal Behaviour*, 80: 1015-1021; doi: 10.1016/j.anbehav.2010.09.004
- II** Krams, I., Daukšte, J., **Kivleniece, I.**, Krama, T., Rantala, M.J., Ramey, G. & Šauša, L. 2011. Female choice reveals terminal investment in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, after a repeated activation of the immune system. *Journal of Insect Science*, 11: 56; available online: insectscience.org/11.56; ISSN: 1536-2442
- III** Krams, I.A., Krama, T., Moore, F.R., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Freeberg, T.M., Mänd, R., Rantala, M.J., Daukšte, J. & Mänd, M. 2014. Male mealworm beetles increase resting metabolic rate under terminal investment. *Journal of Evolutionary Biology* (in press); doi: 10.1111/jeb.12318
- IV** Krams, I., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Krama, T., Mänd, R., Rantala, M.J., Znotiņa, S., Freeberg, T.M. & Mänd, M. 2013. Predation promotes survival of beetles with lower resting metabolic rates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148: 94-103; doi: 10.1111/eea.12079
- V** Krams, I., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Krama, T., Freeberg, T.M., Mänd, R., Vrublevska, J., Rantala, M.J. & Mänd, M. 2013. Predation selects for low resting metabolic rate and consistent individual differences in anti-predator behavior in a beetle. *Acta Ethologica*, 16: 163-172; doi: 10.1007/s10211-013-0147-3
- VI** Krams, I., **Kivleniece, I.**, Kuusik, A., Krama, T., Freeberg, T.M., Mänd, R., Sivacova, L., Rantala, M.J. & Mänd, M. 2013. High repeatability of anti-predator responses and resting metabolic rate in a beetle. *Journal of Insect Behavior*, 27: 57-66; doi: 10.1007/s10905-013-9408-2

The author's contribution to the papers:

	I	II	III	IV	V	VI
Original idea	*	*	*			*
Study design	*	*	*	*	*	*
Data collection	*	*	*	*	*	*
Data analysis			*	*	*	
Manuscript preparation	*	*	*	*	*	*

INTRODUCTION

Topicality of the study

When parasites challenge an organism's immune system they reduce its fitness by decreasing survival or reproductive success. The investment in immune defence can recover host from the parasite attack but it is traded-off against investment in other important traits, such as sexual signalling. A major life history trade-off is one between reproduction and somatic maintenance, such as repair mechanisms and immunocompetence, but mechanisms regulating such physiological trade-offs are unclear.

Theory suggests that secondary sexual traits should honestly reflect males' immunocompetence. Under terminal investment males tend to invest more in the current reproductive output increasing production of pheromones and thus dishonestly signalling their condition to females. The current findings of the phenomenon of terminal investment are clearly contradictory, producing confounding results even within the same study system.

The existing studies have focused primarily on resting metabolic rate (RMR), reflecting the minimum energy required to keep an individual alive. It is still largely not certain whether natural selection might influence RMR, and how consistent over time such influences might be. Because parasites induce host processes that are energetically demanding, theory predicts that energetic costs of infection should cause RMR to increase. Although a number of studies have reported such an increase of RMR to pathogens (e.g. Giorgi et al. 2001; Nilsson 2003), many other studies report either non-significant effects of parasitism (e.g. Chappell et al. 1996; Rivero et al. 2007), or actual decreases in host RMR caused by parasites (e.g. Oppliger et al. 1996; Scantlebury et al. 2007). This indicates that energetic relations between hosts and parasites, as well as terminal investment of infected hosts, are far from being well understood.

In many species, individual differences in behaviour and physiology that are consistent across contexts and are stable over time are termed temperament or personality. Consistent individual differences in energy metabolism, as reflected by RMR, may be correlated positively with individual differences in metabolically costly anti-predator responses. However, experimental studies to find out links among RMRs, personality, energy output, and survival are largely missing. There are few studies investigating the relationship between personality traits and anti-predator behaviour. Significant between-individual variation in RMR and anti-predator responses of animals is a widespread phenomenon that may have important implications for our understanding of variation in behaviour and animal personality.

Although yellow mealworms are a popular study object in evolutionary biology, repeatabilities in mealworm anti-predator responses and RMR have not been studied so far. It is important to note that repeatability can be considered as the approximate estimate of the upper limit of heritability. When repeatability is low, the measured trait is unlikely to respond to any kind of selection, and it is also unlikely to correlate with the measurements of other traits.

Novelty of the thesis

The results of this thesis show that the sexual attractiveness of male mealworm beetles decreased as soon as their immune system was activated, suggesting a trade-off between immunity and sexual signalling, which is supported by a number of previous studies on animals. The greater encapsulation response of the single-treatment males against the nylon implant proved their investment in recovery of immune system. These observations support previous findings of immunological priming. However, the female preference tests showed that males subjected to a repeated immune challenge were significantly more attractive to females than single-treatment males, while the encapsulation rate and activity scores significantly decreased in repeated-treatment males. The effects of repeated insertions of nylon implants indicate that males preferred by females signalled their condition in a dishonest way. The results of this study support previous findings that male mealworm beetles can rapidly modulate their attractiveness traits.

A major novel finding of this thesis is that consistent individual differences in anti-predator behaviour of male and female mealworm beetles were significantly correlated with their RMR and with survival. RMR was positively correlated with the latency of immobility response and was negatively correlated with the total duration of immobility, revealing a behavioural syndrome in the anti-predator behaviour of yellow mealworm beetles *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). These results suggest that individuals with higher levels of RMR were bold, explaining their higher exposure to the risk of predation. This supports some recent findings showing that RMR may be positively related to mortality. It is important to note that cost of higher RMR was not sex-specific. Hiding in the layer of bran and staying immobile for several minutes was found to be the most important anti-predator strategy of *T. molitor* in this study. These results provide evidence of natural selection for reduced RMR in *T. molitor* beetles. Repeatabilities for those four main measures (RMR, hiding behaviour, latency to become immobile, and total time spent immobile) were all statistically significant. Such high repeatabilities further point to the variability among individuals, but consistency within individuals, for these different measures. The results of this thesis are consistent with a recently proposed hypothesis suggesting that personality traits may couple with life history traits and form integrative pace-of-life syndromes, where behaviour and life history co-vary in a fast–slow lifestyle continuum.

The aim and tasks of the research

The main goal of this thesis was to test the trade-offs among immunity, sexual attractiveness, survival and resting metabolic rate in male *T. molitor* and to establish changes in RMR for individuals with different personalities using several predation trials.

The first task of the study was to find out whether a parasite-like immunological challenge to adult *T. molitor* males' immune system via nylon implants increases terminal reproductive effort and whether it has any effect to their encapsulation response, locomotor activity and remaining life span (**I, II, III**). The ability of the males to attract females was

tested in female preference tests, using either live males or pheromone samples to ensure that male signalling is pheromone-related.

The second task of this thesis was to test link between high RMR, increased sexual attractiveness and mortality via insertion of nylon monofilament and measurement of RMR changes in *T. molitor* (III).

The third task of this thesis was to test whether female and male mealworm beetles differ over time in their RMR, individual response latency time, duration of immobility, and hiding behaviour to treatments mimicking an approaching predation threat (IV, V).

The fourth task of this thesis was to find out whether anti-predator behaviour and RMR are correlated with survival rates of individuals under predator tests exposed either to a nocturnal predator, the brown rat *Rattus norvegicus* (Berkenhout) (Rodentia: Muridae), or to a diurnal predator, the great tit *Parus major* L. (Passeriformes: Paridae) (IV, V).

The fifth task of the thesis was to test whether RMR and anti-predator responses were consistently repeatable across individuals (IV, V, VI).

Approbation of the research results

The results of the research work have been notified at 14 international conferences, 2 international courses and 2 local scientific conferences:

- The Nordic Evolutionary Psychology Meeting 2013 (Tartu, Estonia, 12.-13.09.2013.): Consistent individual differences in energy metabolism underlie consistent individual differences in behaviour
- 4th International Conference on Laboratory Diagnostics in Veterinary Medicine, Food and Environmental Safety (Riga, Latvia, 5.-6.09.2013): Production of sex pheromones increases metabolism under terminal investment conditions
- The Society for Experimental Biology Annual Main Meeting 2013 (Valencia, Spain, 2.-6.07.2013.): Male mealworm beetles increase resting metabolic rate under terminal investment
- 55th International Conference of Daugavpils University (Daugavpils, Latvia, 10.-12.04.2013.): High Repeatability of Anti-Predator Responses and Resting Metabolic Rate in a Beetle
- XXIV International Congress of Entomology (Daegu, Korea, 19.-25.08.2012.): Predation selects for lower resting metabolic rates in *Tenebrio molitor*
- 14th International Behavioral Ecology Congress (Lund, Sweden, 12.-17.08.2012.): Predation selects for lower resting metabolic rates in mealworm beetle *Tenebrio molitor*
- BOVA Intensive Master Course "Causes and consequences of pollinator decline" (5.-11.08.2012., Research station of EMU in Järvselja, Estonia): Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction
- 54th International Conference of Daugavpils University (Daugavpils, Latvia, 18.-20.04.2012.): Consistent individual differences in anti-predator behaviour of male and female mealworm beetles *Tenebrio molitor*

- 13th Congress of the European Society for Evolutionary Biology (Tübingen, Germany, 20.-25.08.2011.): Consistent individual differences in anti-predator behaviour in mealworm beetles *Tenebrio molitor*
- 6th International Conference “Research and conservation of biological diversity in Baltic region” (Daugavpils, Latvia, 28.-29.04.2011.): Phenotypic effects of temperature on the immune defense, sexual attractiveness and survival in mealworm beetles *Tenebrio molitor*
- THERMADAPT Science Meeting “Evolutionary and plastic responses of animal growth to different temperatures: adaptations and constraints” (Tartu, Estonia, 28.-30.04.2011.): Temperature mediated trade-off between encapsulation response and attractiveness in male mealworm beetles *Tenebrio molitor*
- 53rd International Conference of Daugavpils University (Daugavpils, Latvia, 13.-15.04.2011.): 1) Šūnu līmeņa imūnsistēmas atbildes maksimālā vērtība miltu melnūlim *Tenebrio molitor* 2) Miltu melnuļu *Tenebrio molitor* personalitātes: individuālās atšķirības preplēsēju uzvedībā 3) Miltu melnuļu *Tenebrio molitor* mobilitātes un elpošanas izmaiņas plēsonības apstākļos un to termālā regulācija
- 69th Scientific Conference of University of Latvia (Riga, Latvia, 3.02.2011.): 1) Starppaudžu imunoloģiskās sagatavošanās pētījumi kukaiņiem 2) Miltu melnuļu aktivitāte paaugstināta plēsonības riska apstākļos
- Doctoral Autumn School “Phenotypic plasticity” (Otepää, Estonia, 29.-31.10.2010.): The role of terminal investment in reproduction of males of *Tenebrio molitor*
- V European Conference on Behavioural Biology (Ferrara, Italy, 16.-18.07.2010.): Terminal investment in sexual signaling in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*
- 68th Scientific Conference of University of Latvia (Riga, Latvia, 2.02.2010.): Miltu melnuļu feromonu loma dzimumpievilcības signalizēšanā terminālās stratēģijas gadījumā
- 5th International conference „Research and conservation of biological diversity in Baltic region” (Daugavpils, Latvia, 22.-24.04.2009.): Increased sexual attractiveness as terminal investment does not happen at the expense of immunity in insects
- 51st International Conference of Daugavpils University (Daugavpils, Latvia, 15.-18.04.2009.): Miltu melnuļu *Tenebrio molitor* tēviņu pievilcības un imunitātes palielināšanās pēc imūnsistēmas aktivācijas

MATERIAL AND METHODS

Study species

The mealworm beetle is one of the species in the family of darkling beetle. These beetles are holometabolic insects and go through a complete metamorphosis during their life cycle. *T. molitor* is a common scavenger and often infests grain products in homes and storages all over the world. These beetles also eat dead insects and meat scraps. Yellow mealworm beetles are not dangerous pests because their populations can be controlled with common sanitation methods. This species is used as an animal food and also for biological research.

Relatively large size, ease of rearing and handling make the beetles useful in studies in the fields of biochemistry, ecological immunology, evolution and physiology. The beetles used in the experiments of this thesis (**I, II, III, IV, V, VI**) were collected from natural populations in several barns in southeastern Latvia in 2008-2012. The stock culture was maintained at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ on bran mixed with wheat flour, fresh carrots and apples. Parasite exposure of beetles was unknown.

Weighing and sexing of *T. molitor*

Body mass of all pupae and adult female and male *T. molitor* was obtained using Kern analytical balance (Kern & Sohn ABS 120-4, Balingen, Germany) or RADWAG electronic balance (RADWAG 26-600 Radom, Poland) (**I, II, III, IV, V, VI**). Only beetles of average body mass were used in all studies ($\pm 4\%$ average mass).

The pupae of *T. molitor* were removed from the culture on the day of pupation. Pupae were sexed visually by examining genitalia on the eighth abdominal segment according to Bhattacharya et al. (1970) (**I, II, III, IV, V, VI**).

Measurement of encapsulation response

Activation of immune system

Males of mealworm beetles were chilled on ice and then inserted a piece of sterile nylon monofilament (2 mm length, 0.18 mm diameter, rubbed with sandpaper, knotted at one end) through the insect's pleural membrane between the third and fourth abdominal sternite (Koskimäki et al. 2004; Mikkola & Rantala 2010; Rantala et al. 2002; Rantala & Kortet 2003; van Ooik et al. 2007) (**I, II, III**). Individuals of the control group had a hole punctured in the pleural membrane between the third and fourth abdominal sternites, but were not implanted with the nylon monofilament (**I, II**) or they were handled similarly as treatment males but their cuticle was not punctured and these animals were not implanted (**III**). Separate males from the control group were used to determine the baseline levels of their encapsulation response only and these individuals were not used further (**I**). Treatment males were allowed to recover from any acute effects from the nylon insert treatment for 70-72 hours (**I, II**). In the repeated-treatment males, the second implant was inserted near (ca. 1 mm apart) the place where the first monofilament was inserted (**I, II**). While in the other study (**III**) treatment males simultaneously received two sterile nylon monofilament implants from both sides of the body. Randomly chosen males that had already two implants and were preferred by females during the second female choice trial, received an implant for the third time. This was done to see whether the males preferred by females had recovered their immune system while investing in terminal reproductive effort after the second immune challenge (**II**).

The duration of implantation was different (**I, II, III**) in order to find out differences among individuals. Experimental individuals were kept in numbered cylindrical translucent plastic canisters at a constant temperature ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). After implantation, the knot of the monofilament was carefully grasped and implant was removed from a beetle. The removal of implants imitated the activity of the insect's immune system in destroying or eliminating

a parasite or its egg (Yourth et al. 2001, 2002). The removed implants were stored and dried for later analysis.

Immune assays

To measure the strength of encapsulation response against nylon monofilaments (**I**, **II**, **III**), the lightness of each nylon insert (grayscale value) was analysed. It is widely appreciated that insect immune systems respond to the insert as though it were a parasitic or foreign body invasion by attempting to encapsulate the foreign body. The resulting coating formed from cellular materials and chemical deposits on the insert darkens and correlates with the level of immune system response (Yourth et al. 2001, 2002).

To quantify lightness, each removed monofilament was photographed from two (**III**) or three (**I**, **II**) angles under constant light conditions using a Zeiss Lumar V12 Stereo microscope and Axio Cam MRc5 digital camera (Carl Zeiss, Jena, Germany). The digital images were analyzed using image analysis software (Image J, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The area of that portion of the insert that had been within the insect's body was marked, and the program calculated the grayscale value. Since increasing melanization indicated a stronger immune response in this study, reflectance of an implant was calibrated before the insertion to zero level (Daukšte 2012).

Female preference tests

Sexual attractiveness of males was evaluated by using female preference tests either by observing the direct choice between males (**I**, **II**) or by presenting females pheromone discs of males (**III**). The trials were done under red light because members of the *Tenebrionidae* family cannot see long (red) wavelengths (Briscoe & Chittka 2001).

Tests of dyadic preference

The dyadic preference arena consisted of a large container (30×20 cm, L×W) for the female and two smaller containers (10×5×5 cm, L×W×H) for the males that were attached outside opposite walls of the large container (**I**, **II**). The larger container was an open, topped, rectangular Plexiglas box with a small section of vertical slots in the walls adjacent to the male containers attached to two opposite walls. The slots were just large enough for beetle to insert its head into the adjacent container. This arrangement allowed male pheromones to enter the female container and also allowed the males and female to make audible and tactile contact while remaining within their respective containers. Each dyadic preference test was started by simultaneously placing the two males into the opposite male containers. After releasing female, the time it took for a female to choose a male was recorded (**I**, **II**) as well as the specific activity behaviours of the male beetles (**II**). The criteria for a clear choice were when the female met and touched one of the males and remained in close and continuous contact for at least 2 min. The layer of bran on the floor was changed after every trial to exclude contamination of the bran with smell of the previous individuals (Daukšte 2012).

Odour collection

Two samples of sex pheromones were collected from each male beetle before and after implantation (**III**). Odour samples were obtained by placing each individual in a small

closed Petri dish containing a filter paper disc for 9 h (Rantala et al. 2002; Vainikka et al. 2007). Second collection of odours was done to see whether implantation affected the attractiveness of pheromones. To avoid any time and age-related effects on insect immunity and attractiveness, we performed implantations and odour collections during 24 hours.

Tests of pheromone discs

Tests were performed by using the collected odour discs: one test before the immune system of the experimental males was activated and a second one was done as soon as the implants were removed (**III**). The odour disc pairs were presented to 14 – 15 days old virgin females. The discs for the preference tests were prepared simultaneously for each pair. The arena for preference trials consisted of a 9-cm-diameter glass dish inverted over a new filter paper on which the disc pair was placed. Female was placed under a small (Ø 37 mm) Petri dish in the centre of the circular arena to acclimatize for 5 min. At the start of the trial, the dish that restricted the beetle was removed, and a glass dish was placed over the entire arena. Each trial lasted for 10 min, during which time the beetle's movements were recorded. Preference was measured as the total time that the beetle spent on each filter paper disc (Daukšte 2012).

Scoring of locomotor activity

During the dyadic preference tests, male activity was scored according to five categories: (i) no activity = 0 points: male remained motionless; (ii) untargeted activity = 1 point: although male was active, the activity was mostly near its wall opposite from the female; (iii) weak activity = 2 points: male either spent up to 50% of time near slots and trying to put its head into the female container or the male spent 100% of time near the slots while making a few attempts to put its head into the female container; (iv) average response = 3 points: male spent up to 75% of time near slots trying to put its head into the female container; (v) strong activity = 4 points: male spent 100% of time near slots putting its head into the female container (**II**).

Survival estimation

Males from all experimental groups were allocated to the survival group to determine their survival rates (**I, II, III**) and also possible sources of variation within the treatment group (**II**). Each beetle was kept individually in the 30 ml numbered, cylindrical, translucent plastic canisters (**I**) or in the 200 ml plastic containers (**II, III**) at a constant room temperature ($25 \pm 0.5^\circ\text{C}$) on bran mixed with wheat flour and provided with fresh carrots. Beetles stayed in these containers for 30 days (**I, II**) or for 64 days (**III**) after the end of experiments. The mortality of the groups was measured once a week (**I, II, III**).

Flow-through CO₂ respirometry

Respirometric device

The respirometric device was combined with an infrared optical system using IR-emitting diodes (TSA6203) and IR-sensor diodes (BP104) that were placed on the sides of the insect chamber. IR diodes made it possible to record CO₂ production and movements of each beetle simultaneously (**IV**). The flow-through respirometer (**III, IV, V, VI**) was calibrated at different flow rates by means of calibration gases (Trägergase, VEB, Saxon Junkalor

GmbH, Dessau) (Lighton 2008) with gas injection (Muljar et al. 2012). The insect chamber (Eppendorf test tube, volume 3 ml) was perfused with dry (5–7% RH) CO₂-free air, produced by passing air over Drierite (W. A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, Ohio) and soda-lime granules at a flow rate of 60 ml min⁻¹. Baseline drift of the analyzer was corrected during analysis from the measurements at the beginning and end of each trial with the respirometer chamber empty (Gray & Bradley 2006).

Measurement of RMR

The beetles were kept in the insect chambers for at least 20 min. All of the beetles reached the lowest rates of CO₂ production in a 10 – 15 min period, when they were motionless (**III**, **IV**) or within 30 min (**V**). The mean resting metabolic rate of each individual was calculated by averaging data obtained over next 30 min (**III**, **VI**), 20 min (**V**) or over long periods (**IV**, **VI**) for each beetle (Metspalu et al. 2002). Since the beetles were either immobile or active just for short periods, the baselines of recorded CO₂ emissions roughly corresponded to the resting metabolic rate of each insect. As soon as the measurements were over, the beetles were returned back to their plastic containers.

The RMR trials were repeated 8 days (**IV**), 6 days (**V**) or 10 and 15 days (**VI**) later. Nespolo & Franco (2007) showed that repeatabilities are linearly reduced with time between measurements, suggesting habituation to experimental manipulations. However, the time interval of 6-8 days seems to be sufficient to avoid habituation in the case of such short-lived organisms as mealworm beetles. The life span of *T. molitor* usually reaches 4 months in the laboratory (Daukšte et al. 2012).

Imitation of predator approach

Two experimental methods (**IV**, **V**, **VI**) were used to measure anti-predatory behaviours (latency time to become immobile and time spent immobile) in response to imitated predator approach. Many beetles respond to a variety of mechanical or optical stimuli by abruptly reaching a state of tonic immobility lasting from a few seconds to several hours. The true tonic immobility in beetles usually is characterized by the lack of regular pumping movements involving both abdominal and thoracic segments (Metspalu et al. 2002).

Anti-predator response in plastic containers

For each beetle, in the beginning of the night (8:00-11:00 PM) its 200 ml plastic container was hit on the side with a stick, applying of mass of about 40 g (imitating the attack of rodent) from the distance of 10 cm (**IV**, **VI**). The response of the beetles was observed under red light, which mimic the nocturnal conditions and did not reduce their activity. Individual response latency time to the mechanical stimulus and the total time the beetles spent motionless, either on the bran surface or hidden in the layer of bran, were recorded. If the beetle continued to move under the layer of bran, it was not considered to be immobile. This trial was repeated 6 days (**IV**) or 10 days (**VI**) later.

Defensive behaviour in Eppendorf test tube

Beetles were handled for 2 min and then they had the opportunity to escape in the insect chamber (Eppendorf test tube, volume 1.5 ml). In this tube, the beetles either became less active or completely immobile. The insect chamber was combined with the infrared optical–

actographic system. When beetles resumed locomotion by moving the legs, head, and antennae, they were exposed to a sudden and brief mechanical stimulus by flicking the tube from above with a stick to apply a mass of about 20 g dropped from a height of 10 cm (V, VI). This mimicked a light jump of a landing great tit onto the insect chamber. The time to become immobile and the time beetles spent immobile were recorded. The trials were repeated 5 days (V) or 10 days (VI) later.

Predators and survival experiments

Major predators of wild mealworm beetles living in barns include birds and rodents. Wild brown rats (IV) and great tits (V) were used as predators of mealworm beetles.

Survival under rat predation

Three hours prior the trials, rats were placed in individual cages with water and food *ad libitum*. The floor of predation arena (30×50×40 cm, L×W×H) was covered with 2 cm layer of bran to provide beetles their usual food supply, to allow the beetles to locomote without slipping, and to burrow as a form of escape mechanism. An hour before each predation trial, a rat was released into the predation arena to familiarize itself with the environment. After 30 min, the rat was removed and returned to its cage. Ten beetles (males or females) were placed in predation arena. It was necessary to ensure that no beetles were left lying on their backs. All of the beetles were individually marked with correction pen. According to a preliminary study, markings *per se* did not influence the survival of mealworm beetles.

In each trial 5 individuals that had remained active during all previous predation mimicking experiments and 5 individuals that were consistently hiding during predation imitating experiments were used. The beetles were left undisturbed for 30 min. After this 30 min period, a rat deprived of food for 2 hours before the onset of the trial was returned back to the predation arena. Each predation experiment lasted for 15 min. It was recorded whether the beetles dug in the layer of bran as soon as the rat was released in the cage. As soon as the trial was over, the rat was removed and the survivors were counted and identified. Each beetle was tested only once with a rat predator. But each rat was used twice: during a male beetle survival experiment and during a female beetle survival experiment, which were separated by a 60 min break for each individual rat. Each individual test beetle was exposed to two simulated predator-approach tests in an open arena and a single survival test (IV).

Survival under bird predation

The great tits were captured a day before the beetle survival trials. Birds were kept in individual cages with water and food *ad libitum*. An hour before each predation trial, ten randomly chosen beetles (males or females) were released into other bird cages, which served as predation exposure arenas (30×40×40 cm, L×W×H) to familiarize themselves with the environment. This gave them ample time to search out and find cover. It was necessary to ensure that no beetles were left lying on their backs. All of the beetles were individually marked with a correction pen. The floor of each arena was covered with a 2 cm layer of bran, which provided beetles their usual food supply. The bran layer was thick enough for beetles to prevent slipping and to burrow out of sight.

In each trial beetles were exposed to a great tit deprived of food for 2 h before the onset of the trial. The bird started to attack the beetles within the first minutes of the survival trial. Each predation trial lasted for 15 min. The behaviour of birds and beetles were observed from a hide. As soon as the trial was over, the bird was removed and the survivors were counted. Each great tit was used twice: during the male survival experiment and during the female survival experiment, which were separated by a 1 h break for each individual bird. Each individual test beetle was exposed to two predator approach tests in a hide (the insect chamber) and one survival test (V).

Data analysis

Data were analysed using SPSS 12.0 statistical package for Windows (I, II), SPSS 17.0 for Windows (V) or Statistica 8.0 for Windows (IV, VI). Normality of the data was tested using a Kolmogorov-Smirnov test (I, II). All of the tests were two-tailed (I, IV, V, VI). The Bonferroni method was used for reducing the critical value for P (I). Values of behavioural data were not distributed normally and so were square root transformed (IV, V, VI). The repeatabilities of response latency time to the mechanical stimulus, and the total time beetles spent immobile, were calculated across two trials using Lessells & Boag's (1987) method (IV, V, VI). The existence of a behavioural syndrome was assessed from the correlations between response latency to mechanical stimulus and the duration of immobility (IV, V). Data on the time it took for a female to make a choice in preference tests as well as the rates of encapsulation response of the treatment males were normally distributed, and parametric tests were used to analyze these variables. To examine time of female preference across the two trials, one-way ANOVA was used. Differences in encapsulation responses of the males across the three implants were analyzed using a repeated-measures ANOVA. Activity scores of males were not normally distributed, and were analyzed by using non-parametric tests (II). ANOVA was used with group as a between subjects factor (3 levels: control, low intensity response, high intensity response) and phase as a within subjects factor (2 levels: before and after manipulation) to analyse the results of female preference tests and differences in RMR. Multiple linear regression analysis was used to find out determinants of odour attractiveness in males. ANOVA revealed significant effects of phase ($F_{1,177} = 47.5$, $P < 0.001$) and group ($F_{1,177} = 66.3$, $P < 0.001$), and a significant interaction between phase and group ($F_{2,177} = 85.62$, $P < 0.001$) (III).

Ethical note

The great tits were released within 2–3 h after the behavioural experiments (mealworm survival tests at their place of capture (V)). The longest time a great tit was held in captivity for this study was 18 h. We performed the experiment using live beetles to obtain really valid dependent measures linking RMR to survival, and it was not possible to “model” predation events in this study (Cuthill 2007; Fedigan 2010).

RESULTS

Trade-offs among immunity, sexual signalling and survival (I, II, III)

Sexual attractiveness

The first immune challenge by a nylon monofilament reduced the attractiveness of males (I, II): in the dyadic preference tests with live males females preferred control males in 48 out of 50 cases (G test: $G = 30.68$, $P < 0.001$, Yate's correction) (I). However, the second activation of the immune system was associated with a significant increase in the sexual attractiveness of males (I, II). In 39 out of 50 cases females preferred repeated-treatment males over the control males (G test: $G = 15.39$, $P < 0.001$, Yate's correction) suggesting terminal investment in reproduction. Furthermore, the repeated-treatment males were more attractive than single-treatment males in all 50 cases (G test: $G = 63.72$, $P < 0.001$, Yate's correction) (I).

There was no difference in time spent by females on the odour discs during the before and after phases of males in the control condition and experimental males who produced a high intensity response to the experimental manipulation (post-hoc tests with Bonferroni correction, $P > 0.05$) (III). Females spent significantly longer on the odour discs of experimental males who produced a low intensity response to manipulation after the manipulation than before ($P < 0.001$). Furthermore, females spent significantly longer on these discs than any others (all $P < 0.003$).

Locomotor activity

In the first female choice test, activity score of treatment males was lower than that of control males (two-tailed Mann-Whitney U-test: $z = -8.36$, $n_1 = n_2 = 114$, $P < 0.001$), suggesting that activation of immune response reduces male activity (II). Also in the second female choice test, males with activated immune system had significantly lower activity scores than control males (two-tailed Mann-Whitney U-test: $z = -5.59$, $n_1 = n_2 = 114$, $P < 0.001$). Activity score of males preferred by females during the second female choice test was lower than activity of non-preferred males (two-tailed Mann-Whitney U-test: $z = -6.27$, $n_1 = 71$, $n_2 = 43$, $P < 0.001$), suggesting that locomotor activity may be traded-off against increased pheromonal attractiveness.

Encapsulation response

Implantation of the nylon monofilament elicited a significant responses in *T.molitor* males reflecting their ability to invest in the immune system. This response of the treatment males was significantly greater for the second immune challenge than for the first immune challenge (Scheffé's test $P < 0.05$) (II), indicating that males, in general, invested in their immune system after the first challenge. The encapsulation response after the third implantation was significantly lower than the response for the first immune challenge (Scheffé's test $P < 0.05$), showing that the males did not make attempts to boost their immune system after the second activation of immune system (II).

Similar results were obtained also in a repeated study: the encapsulation response after the female choice tests was significantly greater for single-treatment males (second nylon monofilament) than that of the control group (first nylon monofilament; Scheffe's test: $P <$

0.001) and the repeated-treatment group (third nylon monofilament; Scheffe's test: $P < 0.001$). The encapsulation response of the control males was significantly greater than that of the repeated-treatment males (Scheffe's test: $P < 0.001$) (I).

The rates of encapsulation response of experimental males were not distributed normally (Kolmogorov-Smirnov test, $P = 0.048$). When experimental males were split into two groups of encapsulation response: above and below the median encapsulation response (lightness = 60), there was a significant difference between groups ($t = -14.37$, $p < 0.001$; high intensity response: $n = 48$; 67.38 ± 4.28 , mean \pm SD; low intensity response: $n = 42$; 46.52 ± 8.51 , mean \pm SD). The rates of encapsulation were distributed normally for the both groups (Kolmogorov-Smirnov tests, low intensity response: $P = 0.2$; high intensity response: $P = 0.7$) (III). After the first implantation, the encapsulation response of treatment males preferred by females in the female choice was marginally lower compared to the encapsulation rate of treatment males non-preferred by females (two-tailed t-test: $t = -1.26$, $n_1 = 23$, $n_2 = 91$, $P = 0.05$), suggesting that some males may already have followed a terminal reproductive investment strategy after receiving their first implant (II). Moreover, the encapsulation rate of males preferred by females after the second implantation was significantly lower than that of the non-preferred males (two-tailed t-test: $t = 0.16$, $n_1 = 71$, $n_2 = 43$, $P = 0.004$) (I, II).

Survival

The survival rates differed between the groups of males. The survival rate of males from the repeated-treatment group was significantly lower than that of males in the control group (G test: $G = 26.31$, $P < 0.01$, Yate's correction) and the single-treatment group (G test: $G = 33.51$, $P < 0.01$, Yate's correction). The survival of males from the control group did not differ from that of males in the single-treatment group (G test: $G = 0.18$, $P = 0.44$, Yate's correction) (I).

Survival rates differed significantly between the control males and experimental males (Fisher's exact test: $P < 0.001$, Yate's correction), such that more males in the control condition survived and fewer males in the experimental condition survived than expected by chance. Furthermore, there was a significant difference in the survival rates of males in the experimental condition with high versus low immune response intensity (Fisher's exact test: $P < 0.001$), such that more males who responded to immune challenge with high intensity, and fewer males who responded with low intensity, survived than was expected by chance (II, III).

The effect of immune insult on resting metabolic rate under terminal investment strategy (III)

Analysis of variance revealed significant effects of phase ($F_{1,177} = 86.67$, $P < 0.001$) and group ($F_{2,177} = 101.950$, $P < 0.001$) and a significant interaction between phase and group ($F_{1,177} = 101.95$, $P < 0.001$) on RMR. There was no difference in RMR during the before and after phases of males in the control condition and experimental males who produced a high intensity response to the experimental manipulation (post-hoc tests with Bonferroni correction, $P > 0.05$). RMR, however, was significantly elevated amongst those

experimental males who produced a low intensity response to manipulation after the manipulation than before ($P < 0.001$). Furthermore, RMR was highest in this group than any others (all $P < 0.003$).

Predation impact on anti-predatory responses, resting metabolic rate and survival (IV, V, VI)

Resting metabolic rate of mealworm beetles was found to be repeatable ($R = 0.926$, $F_{479,480} = 52.44$, $P < 0.0001$; $R = 0.574$, $F_{299,300} = 16.217$, $P < 0.001$; $R = 0.92$, $F_{59,60} = 77.59$, $P < 0.0001$) among individual beetles (IV, V, VI). Individuals were significantly repeatable both in the response latency after flicking the plastic container ($R = 0.613$, $F_{479,480} = 4.166$, $P = 0.001$; $R = 0.58$, $F_{59,60} = 3.82$, $P < 0.0001$) (IV, VI) or the insect chamber ($R = 0.854$, $F_{299,300} = 26.304$, $P < 0.001$; $R = 0.75$, $F_{59,60} = 6.90$, $P < 0.0001$) (V, VI) and in the total time spent immobile in the plastic container ($R = 0.848$, $F_{479,480} = 12.162$, $P < 0.0001$; $R = 0.71$, $F_{59,60} = 5.94$, $P < 0.0001$) (IV, VI) or in the insect chamber ($R = 0.593$, $F_{299,300} = 13.095$, $P < 0.001$; $R = 0.75$, $F_{59,60} = 7.06$, $P < 0.0001$) (V, VI).

The latency to become immobile in response to flicking varied between 2 and 240 s (42.43 ± 40.42 , mean \pm SD; plastic container) (IV), 2 and 118 s (26.89 ± 20.34 , mean \pm SD; insect chamber) (V), 3 and 196 s (29.81 ± 7.98 , mean \pm SD; plastic container) (VI) or 2 and 121 s (31.24 ± 9.16 , mean \pm SD; insect chamber) (VI). The total time spent motionless after flicking varied between 3 and 293 s (93.87 ± 50.75 , mean \pm SD; plastic container) (IV), 4 and 920 s (287.03 ± 195.98 , mean \pm SD; insect chamber) (V), 4 and 256 s (99.47 ± 24.58 , mean \pm SD; plastic container) (VI) or 5 and 273 s (103.43 ± 34.51 , mean \pm SD; insect chamber) (VI). The response latency to simulated predator approach and the total time spent immobile were negatively correlated indicating that rapid interruption in activity was associated with longer periods of immobility, which suggests a behavioural syndrome (IV, V, VI).

Resting metabolic rate correlated positively with response latency to flicking (IV, V, VI). In contrast, the total time of immobility and the RMR were negatively correlated (IV, V, VI).

The response latency after flicking the plastic container did not differ between survivors and non-survivors (30.61 ± 11.46 vs. 34.36 ± 35.58 s; $F_{1,478} = 0.284$, $P = 0.59$), while after flicking the insect chamber it was significantly shorter for survivors (20.96 ± 38.78 s, mean \pm SD) than for non-survivors (69.60 ± 139.13 , mean \pm SD; t -test, $t = -2.685$, $P = 0.008$) (IV, V). The latency to become immobile of individuals that dug in the layer bran (45.42 ± 35.75 s) was similar to that of individuals that did not dig in the layer of bran (39.43 ± 13.03 s; $F_{1,478} = 3.003$, $P = 0.085$) (IV).

Digging in the layer of bran was associated with the total time spent immobile while hiding in bran in the plastic container. Survivors were highly likely to hide in the bran layer than non-survivors ($\chi^2 = 309.07$, $df = 1$, $P < 0.0001$). Total time spent immobile of survivors that dug in the bran layer was higher than total time of immobility of non-survivors that dug in the layer of bran (151.69 ± 32.99 vs. 102.78 ± 29.30 s; one-way ANOVA: $F_{1,121} = 24.610$, $P < 0.001$) (IV). Similarly, the total time spent motionless after flicking the insect chamber

of survivors (277.48 ± 163.90 , mean \pm SD) was significantly longer than that of non-survivors (186.04 ± 174.15 , mean \pm SD; t-test, $t = 3.783$, $P = 0.001$) (**V**).

Resting metabolic rate differed significantly between survivors and non-survivors (115.78 ± 40.47 vs. 71.95 ± 23.45 s; $F_{1,478} = 95.882$, $P < 0.0001$) (**IV**). Captured individuals had significantly higher RMR than individuals that survived the predation trials (rodent predation: 0.54 ± 0.23 vs. 1.33 ± 0.41 VCO₂ ml h⁻¹, $F_{1,478} = 100.437$, $P < 0.0001$; bird predation: 0.23 ± 0.11 vs. 0.74 ± 0.42 VCO₂ ml h⁻¹, t-test, $t = 22.32$, $P = 0.01$) (**IV, V**).

GLM analysis showed that both the response latency to the mechanical stimulus and the total time spent immobile were dependent on the RMR (a covariate in GLM) (**IV, V**). The duration of immobility was dependent also on the sex (**IV**). The interaction between sex and the RMR did not affect the behavioural responses under predation risk (**IV, V**). This indicates that individuals with lower RMRs had longer periods of immobility.

Rats depredated 7.77 ± 0.91 (mean \pm SD) beetles during each experimental trial and only 107 of 480 beetles survived. The number of female ($n = 78$) and male ($n = 29$) survivors was significantly different ($\chi^2 = 28.88$, $df = 1$, $P < 0.001$). The number of females and males hiding in the layer of bran when the plastic container was flicked was significantly different ($\chi^2 = 21.738$, $df = 1$, $P = 0.0001$). The average values of RMR did not differ between sexes (males: 0.88 ± 0.39 , females: 0.79 ± 0.50 VCO₂ ml h⁻¹; one-way ANOVA: $F_{1,105} = 0.08$, $P = 0.64$). This was confirmed by GLM analysis showing that survival was dependent on the RMR and not on sex of the beetles. The results of GLM analysis suggested that digging behaviour was dependent on RMR, and was not dependent on sex or on the interaction of sex and RMR in the plastic container. An additional GLM showed that survival was dependent on the duration of immobility ($F_{1,121} = 2.53$, $P < 0.001$), duration of hiding in the bran layer ($F_{1,121} = 259.34$, $P < 0.001$), and the interaction between the total time spent immobile and the propensity to dig in the layer of bran ($F_{1,121} = 5.86$, $P < 0.001$) under the risk of predation. These results suggest that longer periods of hiding in the bran increased rates of survival (**IV**).

On average, great tits preyed upon 7.63 ± 0.77 beetles during each experimental trial, and only 71 out of 300 beetles survived. The number of female ($n = 40$) and male survivors ($n = 31$) appeared to be the same ($\chi^2 = 1.181$, $df = 1$, $P = 0.28$). All of the survivors ($n = 71$) became immobile once the predator was put in the arena, while most of the non-survivors (149 out of 229 individuals) remained active ($\chi^2 = 89.1971$, $df = 1$, $P = 0.0001$). GLM analysis confirmed that higher RMR (Wald $\chi^2 = 5.00$, $df = 1$, $P = 0.03$) and longer response latency (Wald $\chi^2 = 4.43$, $df = 1$, $P = 0.038$) impaired the survival of mealworm beetles. The RMR by the response latency interaction was non-significant (Wald $\chi^2 = 2.68$, $df = 1$, $P = 0.092$), showing that only beetles with greatest rates of the RMR and longer response latency to flicking were significantly more often attacked by predators (**V**).

DISCUSSION

Resource allocation among competing life functions

The results of this thesis show that the sexual attractiveness of male mealworm beetles decreased as soon as their immune system was activated (**I, II**), suggesting a trade-off between immunity and sexual signalling (Zahavi 1975; Sheldon & Verhulst 1996; Møller et al. 1999), which is supported by a number of previous studies on animals (e.g. Peters et al. 2004, Simmons et al. 2005; Sadd & Siva-Jothy 2006; Zala et al. 2008). Limited amount of resources prevents optimal investment both in the immune system recovery and the sexual attractiveness (Ahtiainen et al. 2005; Sadd et al. 2006) especially under conditions of physiological stress (Siva-Jothy & Thompson 2002; Rantala et al. 2003a; Schmid-Hempel 2003; De Block & Stoks 2008; Sadd & Schmid-Hempel 2009). The greater encapsulation response of the single-treatment males against the nylon implant proved their investment in recovery of immune system (**I, II**). These observations support previous findings of immunological priming (e.g. Moret & Siva-Jothy 2003; Moret 2006) and deserves the future research in *T. molitor*.

However, the female preference tests showed that males subjected to a repeated immune challenge were significantly more attractive to females than single-treatment males, while the encapsulation rate significantly decreased in repeated-treatment males (**I, II**). This change coincided with a decreased activity score (**II**) and suggested a trade-off between pheromone production and energy expenditures for other needs, such as locomotor activity and recovery of immunity.

The increase in male attractiveness can be explained by increased resource allocation to sexual signalling, supposedly to pheromone production (Tanaka et al. 1986). The hypothesis of terminal investment predicts that a host suffering from an infection that negatively affects its survival probability should allocate its resources towards immediate reproduction, which may reduce the costs of parasitism and increase their individual fitness (Clutton-Brock 1984; Armitage et al. 2003; Moret 2006; Sadd & Siva-Jothy 2006). Some males followed a terminal reproductive investment strategy already after first implantation and they had heightened levels of RMR (**III**). Higher levels of RMR may lead to oxidative damage because of higher risk of accumulation of free radicals over time (Hekimi et al. 2011). The immune response to a nylon implant in mealworm beetles is costly and causes a significantly lower survivorship in immunologically challenged males (e.g. Rantala et al. 2003b; Sadd et al. 2006; Creighton et al. 2009; Holman 2012). The fact that males not chosen by females had better survival than males preferred by females demonstrates causality between the terminal investment and death of the beetles (**I, II, III**). Furthermore, allocation of resources from the immune system may impair the antioxidant defences, making organisms more sensitive to free radicals (Lalouette et al. 2011).

In *T. molitor*, females may gain genetic benefits from mating with uninfected males, particularly if mating is costly (Worden et al. 2000). The effects of repeated insertions of nylon implants indicate that males preferred by females signalled their condition in a dishonest way. It is consistent with Dawkins & Krebs's (1978) idea that natural selection

favours individuals that successfully manipulate the behaviour of other individuals, independent of the advantage to the manipulated individuals. The results of this study support previous findings that male mealworm beetles can rapidly modulate their attractiveness traits (Sadd et al. 2006). When considering a relationship between sexual signalling or attractiveness and an individual's ability to resist parasites to evaluate parasite-mediated sexual selection (Hamilton & Zuk 1982), one should take into account that the outcome of immunity-reproduction interplay may be strongly dependent on the future reproductive value.

Male signalling under conditions of terminal investment should be linked to pheromone production. Since sex pheromones are complex chemicals, their production is costly and may cause oxidative stress (Byers 2005; Harari et al. 2011). Female mealworm beetles prefer pheromones from males with better immunocompetence, indicated by a faster encapsulation rate against a novel antigen, and higher levels of phenoloxidase in hemolymph (Rantala et al. 2002). Sex pheromones from male mealworm beetles stimulate female mobility, promote aggregation of females to the vicinity of the male, and enhance copulatory behaviour (August 1971; Hurd & Parry 1991). Other studies have shown that female *T. molitor* often mate repeatedly, and that both pre- and post-copulatory behaviours are important components of sexual selection in this species (Worden & Parker 2005). This evidence suggests that females do not only rely on pheromones during mate choice. Recently it was shown that both male cuticular hydrocarbons and glandular pheromones are affected in a fashion that makes them more attractive to females under terminal investment strategy (Nielsen & Holman 2012). In this thesis pheromones were collected and female preferences assessed using established methods, which combine odour collection on filter paper (III) with behavioural assays (I, II) (e.g. Worden et al. 2000; Rantala et al. 2002, 2003a,b; Sadd et al. 2006; Vainikka et al. 2007). Future research should reveal the importance and costs of production of each type of male sex odours in *T. molitor*.

The findings on terminal investment have been clearly contradictory (Javoiš 2013) even within the same study system so far (Javoiš & Tammaru 2004; Sadd et al. 2006; Vainikka et al. 2007; Bascunan-Garcia et al. 2010; Mason et al. 2011). Besides positive evidence, there are numerous negative cases where, despite expectation, terminal investment was not detected (Javoiš 2013). It is likely that antioxidant systems (Halliwell 2012) may be so efficient and quick in limiting oxidative damage to biological structures by protecting them from free radicals that oxidative stress may pass unnoticed if samples are taken at inappropriate time intervals (Meitern et al. 2013). Future studies should implement eco-immunological approaches to test terminal investment more directly.

Consistency and correlations of RMR, anti-predator behaviour and survival over time

A major novel finding of this thesis is that consistent individual differences in anti-predator behaviour of male and female mealworm beetles were significantly correlated with their RMR and with survival. RMR was positively correlated with the latency of immobility response and was negatively correlated with the total duration of immobility, revealing a behavioural syndrome in the anti-predator behaviour of *T. molitor* (IV, V, VI). The latency

to respond with immobility was negatively correlated with the total duration of immobility. These results suggest that individuals with higher levels of RMR were bold, explaining their higher exposure to the risk of predation (Artacho & Nespolo 2009). This supports some recent findings showing that RMR may be positively related to mortality (Alvarez & Nieceza 2005; Artacho & Nespolo 2009; Boratynski & Koteja 2009; Larivee et al. 2010; Lantová et al. 2011). It is important to note that cost of higher RMR was not sex-specific (IV). Hiding in the layer of bran and staying immobile for several minutes was found to be the most important anti-predator strategy of *T. molitor* in this study. Digging in bran and reduced rates of RMR were also positively associated with longer periods of immobility and increased survival when attacked by the brown rat or the great tit. These results provide evidence of natural selection for reduced RMR in *T. molitor* beetles. Repeatabilities for those four main measures (RMR, hiding behaviour, latency to become immobile, and total time spent immobile) were all statistically significant and ranged from 0.61 to 0.93 (IV), 0.57 to 0.85 (V) or 0.58 to 0.92 (VI). Such high repeatabilities further point to the variability among individuals, but consistency within individuals, for these different measures. Although behavioural responses are typically thought to be more “plastic” than physiological reactions (West-Eberhard 2003), perhaps RMR is affected by some other important factors, which need to be studied in the future.

The results of this thesis support the hypothesis suggesting that consistent individual differences in energy metabolism might underlie consistent individual differences in behaviour, growth and fecundity (Careau et al. 2008; Stamps 2007; Wolf et al. 2007), in which case fast-growing and highly fecund individuals with higher RMR should be more active, aggressive, and bold in contexts related to food acquisition (Burton et al. 2011). Only a few experimental studies have shown a link between life history and behaviour within a species (e.g. Dingemanse & de Goede 2004; Boon et al. 2007; Reale et al. 2010a,b). It has been recently suggested that behavioural responses that require maximal aerobic output over brief periods of time, such as predator escape or activities related to mating, may be correlated with RMR (Sadowska et al. 2005; Wone et al. 2009). Some studies have revealed that in animals competing for food or feeding territories, individuals with higher RMR tend to be dominant (Yamamoto et al. 1998). In case of the *ad libitum* food accessibility in laboratory settings, it is assumed that intake rate need not depend upon behaviour and social dominance, in which case one might not detect correlations between behaviour and RMR or productivity.

Empirical studies of the positive correlations between RMR and sustained energy output across individuals in different species, and the repeatability of such relationships, are rare (Chappell et al. 2004; Fu et al. 2008; Rezende et al. 2009; Vezina et al. 2006). Results of this thesis linked these relationships to fitness outcomes. Active individuals with longer latency of immobility response, with shorter total duration of time spent immobile and those who failed to hide in the bran, were consumed by predator often than less active individuals (IV, V). It is complicatedly to tell exactly whether it was the long latency of anti-predator response or the short time spent motionless that increased the probability of being killed by the predator. This unanswered question reflects a problem to be solved in the future. Since

some beetles immediately stopped their activities under the risk of predation while others spent a few seconds to dig in the layer of bran, this may suggest different survival strategies of survivor beetles. It is necessary to determine whether anti-predator responses of the survivors represent different survival strategies and whether these strategies are related to metabolism.

High RMR has been shown to have fitness advantages in mating contexts. In the *T. molitor* system, bold males may have more copulations and more chances to increase fitness prospects than shy males because males should chase females to solicit copulations (Worden & Parker 2001; Smith & Blumstein 2008). Results show a RMR-based trade-off between fitness benefits arising from high RMR and predation risk. It is still not clear whether metabolic costs and personality traits are reflected also in the absolute fitness of individuals in terms of increased net reproductive rate. In artificial selection experiments when a predator is introduced, individuals selected for longer death feigning durations are at a selective advantage relative to those at shorter durations (Miyatake et al. 2004, 2009). A link between longer durations of death feigning and survival may provide some support for gene-based links between RMR and anti-predator behaviour in *T. molitor*.

The results of this thesis are consistent with a recently proposed hypothesis suggesting that personality traits may couple with life history traits and form integrative pace-of-life syndromes, where behaviour and life history co-vary in a fast–slow lifestyle continuum (Careau et al. 2009; Reale et al. 2010a,b). At the slow end of the lifestyle continuum, arising mainly from the general growth–mortality trade-off (Stamps 2007), individuals would have slow metabolism, low aggressiveness, and low boldness compared to individuals on the fast end of the continuum (Reale et al. 2010a,b). Bold behaviour should yield better fitness when combined with high metabolism and early rather than late maturation since higher mortality of bold individuals would make them unsuccessful in ever reaching the age required for late maturation. A high RMR may represent a higher energetic budget that necessitates more time to be spent foraging, elevating predation risk. These predictions need to be tested in future studies since different combinations of life history and behavioural variables may yield equal expected lifetime fitness and thus explain the maintenance of different behavioural types in population (Wolf et al. 2007; Dingemanse & Wolf 2010; Wolf & Weissing 2010).

Different behavioural types may yield equal expected life-time fitness, or perhaps absolute fitness may differ across different environments (Biro et al. 2006; Dingemanse & Wolf 2010; Reale et al. 2010a,b; Wolf & Weissing 2010). Future studies need to test predictions based on various combinations of life history, senescence-related effects (Daukste et al. 2012), and physiological and behavioural variables to explain the maintenance of different RMR and behavioural types in populations. Finally, it has been suggested that parasites, including pathogens, impose fitness costs comparable to those from predators, and influence the adaptiveness of personality traits associated with reproduction (Kortet et al. 2010). Therefore, future experimental and theoretical work in the field of personality research should focus on the condition dependence of immune function and co-evolutionary dynamics between hosts and parasites.

CONCLUSIONS

The main conclusion of this thesis is that there are several trade-offs between essential life functions, such as reproduction, immunity, resting metabolic rate and survival in *T. molitor*.

It was found that after a single parasite-like activation of immune system by a nylon monofilament, male mealworm beetles did not suffer from increased mortality but their locomotor activity and ability to attract a mate was reduced. However, after a repeated immune challenge, the females more often chose the treatment males, although these males had significantly reduced locomotor activity and later suffered a high mortality rate, suggesting terminal investment in sexual signalling which is supposedly based on a trade-off between pheromone production and energy expenditures needed for such activities as recovery of immune system. The reduced encapsulation response against the nylon implant and reduced survival of these males suggest they did not invest in recovery of their immune system. Results of this thesis suggest that under terminal investment males preferred by females may signal their condition dishonestly. When treatment males received their third implants, melanization of nylon implants was found to be lower in more attractive than in less attractive males.

Activation of the immune system increased resting metabolic rate in males with heightened attractiveness of their odours and that later suffered higher mortality rates. The results suggest a link between high RMR and mortality, and also show that an increase in odour attractiveness may be costly in *T. molitor*.

Results of this thesis provide direct evidence of natural selection against mobility, i.e., for reduced RMR in *T. molitor* beetles. Shy individuals with lower RMR concealed themselves against predators in substrate more successfully than bold individuals with higher RMR, that were more exposed to the risk of predation. This is an important evidence on the association between anti-predator behaviour and metabolism. Hiding in the layer of bran was associated with longer periods of immobility. RMR co-varied phenotypically with personality traits: there was a negative correlation between response latency time and time spent immobile, a positive correlation between response latency and RMR, and a negative correlation between RMR and total time spent immobile. The correlation between behavioural responses suggests a behavioural syndrome in the anti-predator behaviour of *T. molitor*.

The important finding of this study is that anti-predator responses of semi-natural *T. molitor* were not only highly repeatable across time but also across contexts (environments), because the response latency and the total time spent immobile did not significantly differ between the trials done in plastic containers and insect chamber.

LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES

- Ahtiainen, J.J., Alatalo, R.V., Kortet, R. & Rantala, M.J. 2005. A trade-off between immune function and sexual signaling in a wild population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *J. Evol. Biol.* 18: 985–991.
- Alvarez, D. & Nicieza, A.G. 2005. Is metabolic rate a reliable predictor of growth and survival of brown trout (*Salmo trutta*) in the wild? *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 62: 643-649.
- Armitage, S.A.O., Thompson, J.J.W., Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. 2003. Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J. Evol. Biol.* 16: 1038-1044.
- Artacho, P. & Nespolo, R.F. 2009. Natural selection reduces energy metabolism in the garden snail, *Helix aspersa* (*Cornu aspersum*). *Evolution* 63: 1044-1050.
- August, C.J. 1971. The role of male and female pheromones in the mating behaviour of *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.* 17: 739-751.
- Bascunan-Garcia, A.P., Lara, C. & Cordoba-Aguilar, A. 2010. Immune investment impairs growth, female reproduction and survival in the house cricket, *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* 56: 204-211.
- Bhattacharya, A.K., Ameel, J.J. & Waldbaer, G.P. 1970. A method for sexing living pupal and adult yellow mealworms. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63: 1783.
- Biro, P.A., Abrahams, M.V., Post, J.R. & Parkinson, E.A. 2006. Behavioural trade-offs between growth and mortality explain evolution of submaximal growth rates. *J. Anim. Ecol.* 75: 1165-1171.
- Boon, A.K., Reale, D. & Boutin, S. 2007. The interaction between personality, offspring fitness and food abundance in North American red squirrels. *Ecol. Lett.* 10: 1094-1104.
- Boratynski, Z. & Koteja, P. 2009. The association between body mass, metabolic rates and survival of bank voles. *Funct. Ecol.* 23: 330-339.
- Briscoe, A.D. & Chittka, L. 2001. The evolution of color vision in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 46: 471-510.
- Burton, T., Killen, S.S., Armstrong, J.D. & Metcalfe, N.B. 2011. What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? *Proc. R. Soc. B* 278: 3465-3473.
- Byers, J.A. 2005. A cost of alarm pheromone production in cotton aphids, *Aphis gossypii*. *Naturwissenschaften* 92: 69-72.
- Careau, V., Bininda-Emonds, O.R.P., Thomas, D.W., Reale, D. & Humphries, M.M. 2009. Exploration strategies map along fast-slow metabolic and life-history continua in muroid rodents. *Funct. Ecol.* 23: 150-156.
- Careau, V., Thomas, D., Humphries, M.M. & Reale, D. 2008. Energy metabolism and animal personality. *Oikos* 117: 641-653.

- Chappell, M.A., Garland, T., Rezende, E.L. & Gomes, F.R. 2004. Voluntary running in deer mice: speed, distance, energy costs and temperature effects. *J. Exp. Biol.* 207: 3839-3854.
- Chappell, M.A., Zuk, M. & Johnsen, T.S. 1996. Repeatability of aerobic performance in Red Junglefowl: effects of ontogeny and nematode infection. *Funct. Ecol.* 10: 578-585.
- Clutton-Brock, T.H. 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *Am. Nat.* 123: 212-229.
- Creighton, J.C., Heflin, N.D. & Belk, M.C. 2009. Cost of reproduction, resource quality, and terminal investment in a burying beetle. *Am. Nat.* 174: 673-684.
- Cuthill, I.C. 2007. Ethical regulation and animal science: why animal behaviour is not so special. *Anim. Behav.* 74: 15-22.
- Daukšte, J. 2012. Specificity of encapsulation response in insects: research perspectives in ecological immunology. Ph.D. Thesis. University of Daugavpils: Latvia.
- Daukšte, J., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M.J. & Krams, I. 2012. Senescence in immune priming and attractiveness in a beetle. *J. Evol. Biol.* 25: 1298-1304.
- Dawkins, R. & Krebs, J.R. 1978. Animal signals: information or manipulation. In: *Behavioural Ecology* (J.R. Krebs & N.B. Davies, eds), pp. 282–309. Blackwell, Oxford.
- De Block, M. & Stoks, R. 2008. Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proc. R. Soc. B* 275: 781-785.
- Dingemanse, N.J. & Wolf, M. 2010. Recent models for adaptive personality differences: a review. *Philos. Trans. R. Soc. B* 365: 3947-3958.
- Dingemanse, N.J. & de Goede, P. 2004. The relation between dominance and exploratory behavior is context-dependent in wild great tits. *Behav. Ecol.* 15: 1023-1030.
- Fedigan, L.M. 2010. Ethical issues faced by field primatologists: asking the relevant questions. *Am. J. Primatol.* 72: 754-771.
- Fu, S.J., Cao, Z.D., Peng, J.L. & Wang, Y.X. 2008. Is peak postprandial oxygen consumption positively related to growth rate and resting oxygen consumption in a sedentary catfish *Silurus meridionalis*? *J. Fish. Biol.* 73: 692-701.
- Giorgi, M.S., Arlettaz, R., Christe, P. & Vogel, P. 2001. The energetic grooming costs imposed by a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) upon its bat host (*Myotis myotis*). *Proc. R. Soc. B* 268: 2071–2075.
- Gray, E.M. & Bradley, T.J. 2006. Evidence from mosquitoes suggests that cyclic gas exchange and discontinuous gas exchange are two manifestations of a single respiratory pattern. *J. Exp. Biol.* 209: 1603-1611.
- Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.* 70: 257-65.
- Hamilton, W.D. & Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218: 384-387.
- Harari, A.R., Zahavi, T. & Thiéry, D. 2011. Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evolution* 65: 1572-1582.

- Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. 2011. Taking a ``good'' look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21: 569-576.
- Holman, L. 2012. Costs and constraints conspire to produce honest signaling: insights from an ant queen pheromone. *Evolution* 66: 2094-2105.
- Hurd, H. & Parry, G. 1991. Metacestode-induced depression of the production, and responses to, sex pheromone in the intermediate host *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Pathol.* 58: 82-87.
- Javoiš, J. & Tammaru, T. 2004. Reproductive decisions are sensitive to cues of life expectancy: the case of a moth. *Anim. Behav.* 68: 249-255.
- Javoiš, J. 2013. A two-resource model of terminal investment. *Theor. Biosci.* 132: 123-132.
- Kortet, R., Härkönen, L., Hokkanen, P., Härkönen, S., Kaitala, A., Kaunisto, S., Laaksonen, S., Kekäläinen, J. & Ylönen, H. 2010. Experiments on the ectoparasitic deer ked that often attacks humans; preferences for body parts, colour and temperature. *Bull. Entomol. Res.* 100: 279-285.
- Koskimäki, J., Rantala, M. J., Taskinen, J., Tynkkynen, K. & Suhonen, J. 2004. Immunocompetence and resource holding potential in the damselfly, *Calopteryx virgo* L. *Behav. Ecol.* 15: 169-173.
- Lalouette, L., Williams, C.M., Hervant, F., Sinclair, B.J. & Renault, D. 2011. Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comp. Biochem. Phys. A* 158: 229-234.
- Lantová, P., Zub, K., Koskela, E., Šichová, K. & Borowski, Z. 2011. Is there a linkage between metabolism and personality in small mammals? The root vole (*Microtus oeconomus*) example. *Physiol. Behav.* 104: 378-383.
- Larivee, M.L., Boutin, S., Speakman, J.R., McAdam, A.G. & Humphries, M.M. 2010. Associations between over-winter survival and resting metabolic rate in juvenile North American red squirrels. *Funct. Ecol.* 24: 597-607.
- Lessells, C.M. & Boag, P.T. 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104: 116-121.
- Lighton, J.R.B. 2008. Measuring metabolic rate: a manual for scientists. Oxford University Press, New York.
- Mason, T.H.E., Chirichella, R., Richards, S.A., Stephens, P.A., Willis, S.G. & Apollonio, M. 2011. Contrasting life histories in neighbouring populations of a large mammal. *PLoS One* 6: e28002.
- Meitern, R., Sild, E., Kilk, K., Porosk, R. & Hõrak, P. 2013. On the methodological limitations of detecting oxidative stress: effects of paraquat on measures of oxidative status in greenfinches. *J. Exp. Biol.* 216: 2713-2721.
- Metspalu, L., Kuusik, A., Hiisaar, K. & Tartes, U. 2002. Tonic immobility in adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) evoked by mechanical and optical stimuli. *Eur. J. Entomol.* 99: 215-219.
- Mikkola, K. & Rantala, M.J. 2010. Immune defence, a possible non-visual selective factor behind the industrial melanism of moths (Lepidoptera). *Biol. J. Linn. Soc.* 99: 831-838.

- Miyatake, T., Katayama, K., Takeda, Y., Nakashima, A., Sugita, A. & Mizumoto, M. 2004. Is death-feigning adaptive? Heritable variation in fitness difference of death-feigning behaviour. *Proc. R. Soc. B* 271: 2293-2296.
- Miyatake, T., Nakayama, S., Nishi, Y. & Nakajima, S. 2009. Tonically immobilized selfish prey can survive by sacrificing others. *Proc. R. Soc. B* 276: 2763-2767.
- Møller, A.P., Christe, P. & Lux, E. 1999. Parasitism, host immune function, and sexual selection. *Quart. Rev. Biol.* 74: 3-20.
- Moret, Y. & Siva-Jothy, M.T. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. B* 270: 2475-2480.
- Moret, Y. 2006. 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. B* 273: 1399-1405.
- Muljar, R., Karise, R., Viik, E., Kuusik, A., Williams, I., Metspalu, L., Hiiesaar, K., Must, A., Luik, A. & Mänd, M. 2012. Effects of Fastac 50 EC on bumble bee *Bombus terrestris* L. respiration: DGE disappearance does not lead to increasing water loss. *J. Insect Physiol.* 58: 1469-1476.
- Nespolo, R.F. & Franco, M. 2007. Whole-animal metabolic rate is a repeatable trait: a meta-analysis. *J. Exp. Biol.* 210: 2000-2005.
- Nielsen, M.L. & Holman, L. 2012. Terminal investment in multiple sexual signals: immune-challenged males produce more attractive pheromones. *Funct. Ecol.* 26: 20-28.
- Nilsson, J.A. 2003. Ectoparasitism in marsh tits: costs and functional explanations. *Behav. Ecol.* 14: 175-181.
- Oppliger, A., Christe, P. & Richner, H. 1996. Clutch size and malaria resistance. *Nature* 381: 565.
- Peters, A., Delhey, K., Denk, A.G. & Kempenaers, B. 2004. Trade-offs between immune investment and sexual signaling in male mallards. *Am. Nat.* 164: 51-59.
- Rantala, M.J., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A. & Suhonen, J. 2002. Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proc. R. Soc. B* 269: 1681-1685.
- Rantala, M.J., Kortet, R., Kotiaho, J.S., Vainikka, A. & Suhonen, J. 2003a. Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Funct. Ecol.* 17: 534-540.
- Rantala, M.J. & Kortet, R. 2003. Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biol. J. Linn. Soc.* 79: 503-510.
- Rantala, M.J., Vainikka, A. & Kortet, R. 2003b. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production tradeoffs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proc. R. Soc. B* 270: 2257-2261.
- Reale, D., Dingemanse, N.J., Kazem, A.J.N. & Wright, J. 2010a. Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. *Philos. Transact. R. Soc. Lond. B* 365: 3937-3946.

- Reale, D., Garant, D., Humphries, M.M., Bergeron, P., Careau, V. & Montiglio, P.O. 2010b. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philos. Transact. R. Soc. Lond. B* 365: 4051-4063.
- Rezende, E.L., Gomes, F.R., Chappell, M.A. & Garland, T. 2009. Running behavior and its energy cost in mice selectively bred for high voluntary locomotor activity. *Physiol. Biochem. Zool.* 82: 662-679.
- Rivero, A., Agnew, P., Bedhomme, S., Sidobre, C. & Michalakis, Y. 2007. Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraiaculicis*. *Parasitology* 134: 1355-1362.
- Sadd, B., Holman, L., Armitage, H., Lock, F., Marland, R. & Siva-Jothy, M.T. 2006. Modulation of sexual signalling by immune challenged male mealworm beetles (*Tenebrio molitor*, L): evidence for terminal investment and dishonesty. *J. Evol. Biol.* 19: 321-325.
- Sadd, B. & Siva-Jothy, M.T. 2006. Self-harm caused by an insect's innate immunity. *Proc. R. Soc. B* 273: 2571-2574.
- Sadd, B.M. & Schmid-Hempel, P. 2009. Principles of ecological immunology. *Evol. Appl.* 2: 113-121.
- Sadowska, E.T., Labocha, M.K., Baliga, K., Stanisz, A., Wroblewska, A.K., Jagusiak, W. & Koteja, P. 2005. Genetic correlations between basal and maximum metabolic rates in a wild rodent: consequences for evolution of endothermy. *Evolution* 59: 672-681.
- Scantlebury, M., Waterman, J.M., Hillegass, M., Speakman, J.R. & Bennett, N.C. 2007. Energetic costs of parasitism in the Cape ground squirrel *Xerus inauris*. *Proc. R. Soc. B* 274: 2169-2177.
- Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. R. Soc. B* 270: 357-366.
- Sheldon, B.C. & Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11: 317-321.
- Simmons, L.W., Zuk, M. & Rotenberry, J.T. 2005. Immune function reflected in calling song characteristics in a natural population of the cricket *Teleogryllus commodus*. *Anim. Behav.* 69: 1235-1241.
- Siva-Jothy, M. & Thompson, J. 2002. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiol. Entomol.* 27: 206-212.
- Smith, B.R. & Blumstein, D.T. 2008. Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behav. Ecol.* 19: 448-455.
- Stamps, J.A. 2007. Growth-mortality tradeoffs and 'personality traits' in animals. *Ecol. Lett.* 10: 355-363.
- Tanaka, Y., Honda, H., Ohsawa, K. & Yamamoto, I. 1986. A sex attractant of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L., and its role in the mating behaviour. *J. Pesticide Sci.* 11: 49-55.
- Vainikka, A., Rantala, M.J., Seppälä, O. & Suhonen, J. 2007. Do male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, sustain the honesty of pheromone signals under immune challenge? *Acta Ethol.* 10: 63-72.

- van Ooik, T., Rantala, M.J. & Saloniemi, I. 2007. Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*. *Environ. Pollut.* 145: 348-354.
- Vezina, F., Speakman, J.R. & Williams, T.D. 2006. Individually variable energy management strategies in relation to energetic costs of egg production. *Ecology* 87: 2447-2458.
- West-Eberhard, M.J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York.
- Wolf, M., van Doorn, G.S., Leimar, O. & Weissing, F.J. 2007. Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature* 447: 581-584.
- Wolf, M. & Weissing, F.J. 2010. An explanatory framework for adaptive personality differences. *Philos. Trans. R. Soc. B* 365: 3959-3968.
- Wone, B., Sears, M.W., Labocha, M.K., Donovan, E.R. & Hayes, J.P. 2009. Genetic variances and covariances of aerobic metabolic rates in laboratory mice. *Proc. R. Soc. B* 276: 3695-3704.
- Worden, B.D. & Parker, P.G. 2001. Polyandry in grain beetles, *Tenebrio molitor*, leads to greater reproductive success: material or genetic benefits? *Behav. Ecol.* 12: 761-767.
- Worden, B.D., Parker, P.G. & Pappas, P.W. 2000. Parasites reduce attractiveness and reproductive success in male grain beetles. *Anim. Behav.* 59: 543-550.
- Worden, B.D. & Parker, P.G. 2005. Females prefer noninfected males as mates in the grain beetle *Tenebrio molitor*: evidence in pre- and postcopulatory behaviours. *Anim. Behav.* 70: 1047-1053.
- Yamamoto, T., Ueda, H. & Higashi, S. 1998. Correlation among dominance status, metabolic rate and otolith size in masu salmon. *J. Fish Biol.* 52: 281-290.
- Yourth, C.P., Forbes, M.R. & Smith, B.P. 2001. On understanding variation in immune expression of the damselflies *Lestes* spp. *Can. J. Zool.* 79: 815-821.
- Yourth, C.P., Forbes, M.R. & Smith, B.P. 2002. Immune expression in a damselfly is related to time of season, not to fluctuating asymmetry or host size. *Ecol. Entomol.* 27: 123-128.
- Zahavi, A. 1975. Mate selection - a selection for a handicap. *J. Theor. Biol.* 53: 205-214.
- Zala, S.M., Potts, W.K. & Penn, D.J. 2008. Exposing males to female scent increases the cost of controlling *Salmonella* infection in wild house mice. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62: 895-900.

Inese Kivleniece. *Miltu melnuļu tēviņu terminālās investīcijas: metabolisms, personalitātes un imunitāte. Promocijas darba kopsavilkums = Terminal investment in male mealworm beetles: metabolic rate, personality and immunity. Summary of the Thesis for Obtaining the Doctoral Degree.* Daugavpils, 2014. 51 lpp.

ISBN: 978-9984-14-656-0

Daugavpils Universitātes
Akadēmiskais apgāds "Saule"
Saules iela 1/3, Daugavpils, LV-5401
saule@du.lv