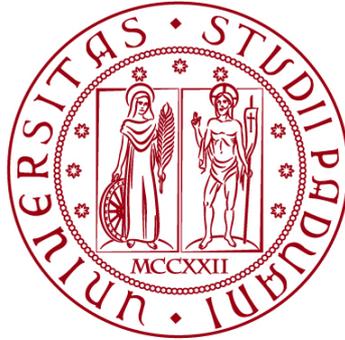


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Dinamica dei telomeri nei due sessi di pulli di
passera lagia (*Petronia petronia*)**

**Tutor: Prof. Alessandro Grapputo
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott. Alejandro Corregidor Castro
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Daniela Andrada Ardelean

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

SOMMARIO

ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Passera lagia, <i>Petronia petronia</i>	3
1.2 Sessaggio molecolare	4
1.3 Telomeri	5
1.4 Relazione tra lunghezza dei telomeri e condizioni ambientali	5
1.5 Effetto dello stress sulla variazione della lunghezza dei telomeri	7
2. SCOPO DELLO STUDIO	7
3. MATERIALI E METODI	9
3.1 Sessaggio molecolare dei campioni	9
3.2 Analisi statistica dei dati	12
4. RISULTATI	13
5. CONCLUSIONI	17
BIBLIOGRAFIA	18

ABSTRACT

Il presente studio esplora la dinamica dei telomeri nei pulli di *Petronia petronia* (passera lagia), indagando le differenze legate al sesso e all'ambiente. Utilizzando il sessaggio molecolare e la misurazione della lunghezza relativa dei telomeri (RTL), abbiamo analizzato campioni di sangue raccolti in due tempi diversi durante la crescita di pulli di passera lagia. I risultati suggeriscono un accorciamento dei telomeri nei pulli nel breve periodo di tempo studiato, con un'apparente, ma non significativa, maggiore riduzione nei maschi rispetto alle femmine. Inoltre, è stata osservata una differenza significativa nella lunghezza dei telomeri alla nascita tra i campioni raccolti negli anni 2021 e 2022, suggerendo l'influenza di fattori ambientali come temperatura e disponibilità di risorse sulla dinamica della lunghezza di queste regioni cromosomiche. Questo studio contribuisce alla comprensione del ruolo dei telomeri nel ciclo vitale degli uccelli e mette in luce l'importanza delle condizioni ambientali sullo stress fisiologico nei primi stadi di sviluppo.

1. INTRODUZIONE

1.1 Passera lagia, *Petronia petronia*

La passera lagia (Figura 1), *Petronia petronia* (Linnaeus 1766), è un uccello della famiglia Passeridae ed è l'unica specie inclusa nel genere *Petronia*. I suoi habitat di riproduzione e nidificazione sono ben distribuiti sulle colline della penisola iberica, dell'Europa meridionale, delle zone occidentali dell'Africa settentrionale e in gran parte della Cina (Petronias articles—Encyclopedia of Life).



Figura 1. Esemplare di *Petronia petronia*

(Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Petronia_petronia_-_Ariege,_Midi-Pyrenees,_France-8.jpg)

Le sue dimensioni sono simili a quelle del passero domestico europeo, *Passer domesticus*. È lunga circa 14 cm ma ha un becco più grande e conico (Cramp 1994).

Il piumaggio varia sui toni del marrone con striature scure sulle ali e sul dorso, mentre risulta di un colore più chiaro sul ventre (Vicente Garcia-Navas et al. 2013).

È caratterizzata da una tipica macchia di colore giallo sul petto, che la distingue dal passero comune europeo, ma anche dalle altre specie della famiglia Passeridae, e che risulta di rilevante importanza durante la stagione riproduttiva, segnalando la qualità dell'individuo. Molti studi hanno dimostrato che sia maschi che femmine preferiscono un partner con una macchia gialla più grande, e che maschi di dimensioni maggiori sono genitori migliori e offrono migliore difesa del nido, migliori cure parentali e miglior approvvigionamento nutritivo ai pulli. È stato inoltre

dimostrato che la difesa del maschio della covata aumenta in relazione all'ornamentazione femminile (Vicente García-Navas et al. 2013).

La passera lagna nidifica nelle fessure delle rocce in habitat naturale, o nelle fessure dei muri degli edifici qualora la trovassimo in habitat urbano. Depongono da 4 a 5 uova e possono essere monogami o poliandrici, a seconda di fattori ecologici e sociali (Cramp 1994).

È onnivora, prettamente granivora durante tutto l'anno, e insettivora durante la stagione riproduttiva. In primavera, infatti, la sua dieta è principalmente composta da piccoli invertebrati, in particolare bruchi e cavallette, che vengono dati come pasto anche ai pulli (Cramp 1994).

1.2 Sessaggio molecolare

L'identificazione del sesso nelle specie aviarie è importante per studi ecologici e comportamentali e per la gestione e la conservazione delle specie (Çakmak et al. 2017).

La passera lagna è una specie monomorfa, per cui sia in età adulta che in età precoce, maschi e femmine sono difficilmente distinguibili sulla base dei tratti morfologici. Per questo motivo, per identificarne il sesso, si ricorre a metodi molecolari, che tramite PCR ed elettroforesi (Hans Ellegren 1996), permettono di sessare gli individui in modo semplice ed economico rispetto ad altri metodi usati in passato come ad esempio la dissezione degli embrioni (Howe 1977).

Per la PCR viene estratto il DNA degli individui dal sangue oppure dalle piume, rendendo questa tecnica poco invasiva e dannosa e anche molto più semplice.

Sappiamo che nelle specie aviarie i due sessi si distinguono sulla base di due cromosomi sessuali. A differenza della specie umana in cui i maschi rappresentano il sesso eterogametico presentando i cromosomi XY mentre le femmine quello omogametico, presentando i cromosomi XX, negli uccelli sono i maschi a rappresentare il sesso omogametico con i cromosomi ZZ, mentre le femmine sono eterogametiche con i cromosomi ZW (Hans Ellegren 1996).

Il sessaggio molecolare negli uccelli è possibile perché il gene chromo-helicase DNA binding (CHD), benché altamente conservato, presenta lievi differenze nelle dimensioni e nella sequenza nucleotidica degli introni dei due omologhi CHDZ e CHDW nei corrispondenti cromosomi (Hans Ellegren 1996). Avremo quindi sul cromosoma W il gene CHDW, che sarà tipico delle femmine e assente nel sesso maschile, mentre nel cromosoma Z sarà presente il gene CHDZ, tipico di entrambi i sessi. L'amplificazione di una particolare regione intronica e la sua corsa elettroforica in un gel di agarosio permette di distinguere un'unica banda nei maschi (ZZ), e due bande nelle femmine (ZW) (Çakmak et al. 2017).

La conoscenza del sesso dei pulli è necessaria allo scopo del nostro studio, ossia capire se c'è differenza nella lunghezza dei telomeri tra i due sessi di passera lagia.

1.3 Telomeri

I telomeri sono sequenze non codificanti presenti alle estremità dei cromosomi degli eucarioti. Sono sequenze ripetute in tandem e hanno un ruolo fondamentale nella divisione cellulare (Blackburn 1991). Queste sequenze, infatti, proteggono i cromosomi dal deterioramento e impediscono la fusione dei cromosomi gli uni con gli altri (Blackburn 1991). Ad ogni ciclo di divisione cellulare, però, queste sequenze perdono parte dei loro nucleotidi, accorciandosi sempre un po' di più. Telomeri più corti renderanno quindi i cromosomi più esposti al rischio di fusione e ai danni da ROS, tra l'altro anch'essi causa di un ulteriore accorciamento dei telomeri stessi (Remot et al. 2022).

Prendendo in considerazione il fatto che i telomeri si accorciano ad ogni divisione mitotica, l'accorciamento dei telomeri viene spesso studiato come un segno dell'invecchiamento e dell'avanzamento dell'età (Vedder et al. 2022). Tuttavia una recente meta-analisi non ha trovato evidenza di un pattern universale di accorciamento dei telomeri con l'avanzare dell'età tra i vertebrati (Remot et al. 2022).

È stato visto che, ad opporsi al fenomeno di accorciamento dei telomeri, esiste un enzima chiamato telomerasi, che aggiunge nucleotidi alle sequenze telomeriche, contrastando in parte il loro accorciamento (Sherratt et al. 2004). Questo enzima è una trascrittasi inversa ed è maggiormente espresso in tessuti proliferativi (Li 2012)

e in specie di piccole dimensioni (Gomes et al. 2011). In assenza di questo enzima, i telomeri vanno incontro a un inevitabile deterioramento che viene accelerato da vari stress ambientali e che può portare anche alla senescenza cellulare (Remot et al. 2022).

1.4 Relazione tra lunghezza dei telomeri e condizioni ambientali

Vari studi hanno dimostrato che lo stile di vita e lo stress ambientale influiscono sull'accorciamento dei telomeri. Ad esempio nella cinciallegra (*Parus major*), individui che vivono in ambiente urbano mostrano telomeri più corti rispetto a individui che vivono nei boschi, indicando che un ambiente urbano può essere una fonte maggiore di stress per la specie (Salmon et al. 2016). Allo stesso modo, studiando delle popolazioni di capriolo (*Capreolus capreolus*) si è osservato che una popolazione di individui anziani che aveva vissuto in un ambiente con forte limitazione delle risorse, aveva telomeri più corti rispetto a una popolazione che invece aveva vissuto in condizioni ambientali migliori (Wilbourn et al. 2017).

Un altro studio condotto sull'organismo *Proteus anguinus* ha dimostrato, invece, che in questa specie la lunghezza dei telomeri aumenta con l'aumentare dell'età, suggerendo che negli organismi ectotermi e in particolare negli organismi piccoli e longevi come il proteo, si ha un'inversione della tendenza da parte dei telomeri ad accorciarsi con l'età (Voituron et al. 2023). In questo studio, infatti, è stato dimostrato che in una popolazione di 41 individui provenienti da una cava francese a Moulis, c'è stato un allungamento dei telomeri in particolare fino a un'età media di 25 anni, dopo di che è stato raggiunto un plateau in cui i valori mediamente rimanevano uguali e le lunghezze dei telomeri non variavano più. La variazione di lunghezza nei telomeri era indipendente dalla temperatura, infatti nella cava la temperatura è rimasta stabile per tutta la durata dello studio, ed era anche indipendente dal sesso e dalle dimensioni corporali, anche se i maschi tendevano ad avere RTL (Relative Telomere Length – lunghezza relativa dei telomeri) più corte (Voituron et al. 2023).

I risultati ottenuti da questo studio possono essere spiegati con due ipotesi. La prima è l'ipotesi “della selezione” per cui gli individui più longevi partono già con dei

telomeri più lunghi e la variazione nella lunghezza dei telomeri decresce con l'età per la scomparsa selettiva degli individui con telomeri più corti (Voituron et al. 2023).

La seconda è l'ipotesi "dell'allungamento" per cui gli individui più longevi sono quelli capaci di allungare i propri telomeri con l'avanzare dell'età e hanno dei meccanismi più efficienti di mantenimento o allungamento dei telomeri (Voituron et al. 2023).

La longevità di questa specie è in parte associata al basso rischio di predazione nell'ambiente in cui vivono e al loro stile di vita (Voituron et al. 2023). *Proteus* è in grado di ridurre il consumo metabolico in caso di scarsità di cibo riducendo così anche un eventuale accumulo di stress ossidativo che porterebbe le cellule alla senescenza (Hervant et al. 2001).

Allo stesso modo, anche una RTL invariabile o crescente potrebbe spiegare la longevità di questa specie in quanto i telomeri proteggono le cellule dalla senescenza e dal danno ossidativo e un'attività telomerasica somatica stabile aiuta a sostenere i costi metabolici (Voituron et al. 2023).

1.5 Effetto dello stress sulla variazione della lunghezza dei telomeri

L'indagine di come le strategie riproduttive influiscono sulla dinamica dei telomeri durante il corso della vita, in particolare negli uccelli, ha dimostrato che le cure parentali e le condizioni pre e postnatali, principalmente della vita precoce dei pulcini, influiscono sulla lunghezza dei telomeri alla nascita e sul loro tasso di accorciamento nel corso della vita (Vedder et al. 2022). In particolare, condizioni pre e postnatali favorevoli portano alla nascita di pulcini con telomeri più lunghi e meno suscettibili allo stress. La successiva esposizione a fattori di stress, come ad esempio la presenza di microorganismi che causavano malattie negli individui studiati durante l'indagine, non agiva in egual modo sui due sessi (Romero-Haro et al. 2022). Allo stesso modo anche la disponibilità di nutrienti agiva in modo diverso su maschi e femmine, suggerendo che i due sessi differissero nella loro suscettibilità ai fattori di stress e che anche la variazione dei telomeri poteva esservi associata in modo diverso in maschi e femmine (Romero-Haro et al. 2022).

Lo studio conclude che un miglior approvvigionamento materno porta ad avere una prole maschile con telomeri più lunghi alla nascita ma che questa strategia ad alto costo riproduttivo ha un'accelerazione sul logoramento dei telomeri più tardi nella vita degli stessi pulcini (Romero-Haro et al. 2022).

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio era quello di investigare se la lunghezza dei telomeri varia tra maschi e femmine di pulcini di passera lagia, se i telomeri si accorciano durante l'accrescimento dei pulli e se il tasso di accorciamento differisce tra i due sessi.

A questo scopo si è resa necessaria la misurazione della lunghezza relativa dei telomeri (RTL – relative telomere length) dal sangue di pulli di passera lagia, campionato due volte alla distanza di una settimana l'uno dall'altro, e l'identificazione del sesso dei pulli stessi attraverso tecniche di sessaggio molecolare (Griffiths et al. 1996).

I benefici di elevate cure parentali durante le prime fasi dello sviluppo e giovanili sono geneticamente legate ai costi di fornire le cure parentali quando adulti. Dopo la schiusa i pulli vanno incontro ad un rapido accrescimento.

Quello che si vuole indagare attraverso questo studio è se maschi e femmine di passera lagia presentano una diversa variazione dei telomeri, dovuta a possibili fattori di stress e alla diversa capacità dei due sessi di gestirli.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Sessaggio molecolare dei campioni

Due prelievi di sangue a distanza di una settimana sono stati eseguiti dai pulli di passera lagia dalla vena brachiale presente sotto l'ala. Il primo prelievo a 7 giorni dalla schiusa ed il secondo a 13 giorni dalla schiusa. Dal sangue di entrambi i prelievi è stato estratto il DNA per il sessaggio molecolare e la misurazione dei telomeri.

I campioni di sangue sono stati conservati a -20°C fino all'estrazione. Il DNA genomico totale è stato estratto usando il kit commerciale DNeasy Blood & Tissue kit (Qigen) seguendo il protocollo indicato per campioni tissutali con l'eccezione di un ulteriore lavaggio con il Buffer AW2 e due eluizioni in $50\ \mu\text{l}$ di AE buffer (Qigen). Il DNA estratto è stato quantificato con il Qbit e la sua qualità verificata al nanodrop. Il DNA ottenuto è stato diluito ad una concentrazione di lavoro di $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$. Dai vari campioni di DNA è stata eseguita un'amplificazione mediante PCR del gene CHD la cui miscela di reazione di $20\ \mu\text{l}$ conteneva $2\ \mu\text{l}$ EasyTaq buffer (10X, TransGenBiotech), $0,4\ \mu\text{l}$ di primer CHDF ($10\ \text{mM}$, $5'$ -TATCGCAGTTTCCTTTTCAGGT- $3'$), $0,4\ \mu\text{l}$ di primer CHDR ($10\ \text{mM}$, $5'$ -CCTTTTATTGATCCACAAGCCT- $3'$), $1,6\ \mu\text{l}$ di dNTPs ($2,5\ \text{mM}$), $0,2\ \mu\text{l}$ di EasyTaq polimerasi ($2\ \text{U}/\mu\text{l}$), $2\ \mu\text{l}$ di DNA ($10\ \text{ng}/\mu\text{l}$) e portata a volume con H_2O .

Una volta preparata la piastra con i campioni di DNA degli individui da esaminare, si è eseguita la PCR con un programma di touchdown in cui la temperatura di annealing si abbassava di 1°C ad ogni ciclo, da 57°C fino ad arrivare a 50°C . Dopo un ciclo di denaturazione a 94°C per 4 minuti, sono seguiti 38 cicli con uno step a 94°C per 30 secondi, uno step di annealing per 30 secondi, ed uno step di estensione per 45 secondi a 72°C . Infine un ciclo finale di estensione per 5 minuti a 74°C .

I prodotti di amplificazione sono stati fatti correre in un gel di agarosio al 1,2% in TAE 1X a circa 100 Volt per circa 1 ora fino ad ottenere delle bande ben visibili. Oltre ai campioni è stato fatto correre un controllo negativo, contenente $2\ \mu\text{l}$ di acqua aggiunti alla miscela di amplificazione invece del DNA, e un marcatore di peso molecolare Ladder da 100 pb di DNA.

Il gel è stato osservato e fotografato su un trans-illuminatore ad UV, permettendo di distinguere gli esemplari maschi (caratterizzati da una singola banda) dalle femmine (caratterizzate dalla presenza di due bande distinte).

I risultati ottenuti sono stati inseriti in una tabella Excel (Tabella 1) all'interno di cui sono state raccolte anche altre informazioni sui pulli studiati quali età e lunghezza dei telomeri alla prima e alla seconda visita, forniti dai miei tutor di tesi.

Tabella 1. Pulcini da cui sono stati fatti i prelievi di sangue durante il campionamento nelle stagioni 2021 e 2022 e per i quali è stato determinato il sesso e calcolata la lunghezza dei telomeri. Eta1 è l'età (in giorni) dei pulli al primo prelievo, Eta2 è l'età (in giorni) dei pulli al secondo prelievo, DifEta è la differenza tra le due. Δ RTL è la differenza tra RTL2 (lunghezza relativa dei telomeri all'Eta2 non mostrata) e RTL1 (lunghezza relativa dei telomeri all'Eta1). I dati di RTL alle due età mi sono stati forniti dal mio tutor. Nella tabella sono indicati anche l'anno di campionamento (Anno) e il sesso dei pulli (M-maschio, F-femmina, NA-non determinato) determinato molecularmente, l'identificativo di ogni pulcino (ID) e l'identificativo dei nidi (Nido).

ID	Nido	Δ RTL	Sesso	Eta1	Eta2	DifEta	Anno	RTL1
17_P4_2021	17	-0,95084	F	7	13	6	2021	0,95684
201_P1_2021	201	-0,51202	M	7	13	6	2021	0,550233
201_P2_2021	201	0,208287	F	7	13	6	2021	0,017872
201_P3_2021	201	0,818909	M	7	13	6	2021	0,604948
220_P2_2021	220	-0,04137	M	7	13	6	2021	0,302222
253_P1_2021	253	0,118965	M	7	13	6	2021	0,263849
255_P1_2022	255	-0,62758	M	7	13	6	2022	0,657035
255_P2_2022	255	-0,10907	F	7	13	6	2022	1,018498
255_P3_2022	255	-0,06617	M	7	13	6	2022	0,199425
48_P1_2022	48	-0,6004	M	7	13	6	2022	0,699205
48_P4_2022	48	0,218278	F	7	13	6	2022	0,101529
78_P1_2022	78	-1,10441	M	7	13	6	2022	1,190157
78_P2_2022	78	-1,84558	M	7	13	6	2022	1,945654
80_P3_2022	80	-0,85331	M	7	13	6	2022	0,957145
87_P1_2021	87	-0,47545	F	7	13	6	2021	0,482832
87_P2_2021	87	0,563679	F	7	13	6	2021	0,088437
B14_P5_2021	B14	-0,0299	M	7	13	6	2021	0,056066

B30_P2_2022	B30	-1,08666	M	7	13	6	2022	1,314231
B30_P4_2022	B30	3,239868	F	7	13	6	2022	0,319679
B30_P5_2022	B30	-0,16385	F	7	13	6	2022	0,689664
B4_P1_2022	B4	-0,3574	M	7	13	6	2022	0,415234
B42_P5_2021	B42	0,14559	M	7	13	6	2021	0,041373
B46_P3_2021	B46	0,342015	F	7	13	6	2021	0,111786
B50_P1_2021	B50	0,212913	F	7	13	6	2021	0,428544
G1_P1_2022	G1	-0,11356	M	7	13	6	2022	0,18099
G1_P2_2022	G1	-0,2184	F	7	13	6	2022	0,421261
G1_P3_2022	G1	-0,57957	F	7	13	6	2022	1,105975
G1_P4_2022	G1	0,223149	F	7	13	6	2022	0,188893
G1_P5_2021	G1	-0,02199	F	7	12	5	2021	0,039854
G1_P5_2022	G1	-0,24833	M	7	13	6	2022	0,275101
G15_P1_2022	G15	0,897664	F	7	13	6	2022	0,059734
G15_P4_2022	G15	-0,21846	M	7	13	6	2022	0,308617
G16_P3_2021	G16	-0,46033	M	7	13	6	2021	0,508329
G21_P1_2021	G21	-0,10264	M	7	13	6	2021	0,16873
G21_P2_2021	G21	-0,02718	F	7	13	6	2021	0,035413
G21_P4_2021	G21	0,033619	F	7	13	6	2021	0,016791
G21_P6_2021	G21	0,007717	M	7	13	6	2021	0,030236
G26_P2_2022	G26	-0,35871	M	7	13	6	2022	0,455391
G26_P3_2022	G26	0,054053	F	7	13	6	2022	0,031201
G26_P5_2022	G26	-1,10568	F	7	13	6	2022	1,157269
G33_P1_2022	G33	-0,01722	F	6	12	6	2022	0,154167
G33_P2_2022	G33	-0,42519	F	6	12	6	2022	0,467641
G33_P6_2022	G33	-0,57543	F	7	13	6	2022	0,668184
G33_P7_2022	G33	-0,10915	F	7	13	6	2022	0,144644
G35_P3_2022	G35	-1,22264	F	7	13	6	2022	1,393769
G35_P4_2022	G35	-0,1242	F	7	13	6	2022	0,290795
G43_P2_2022	G43	0,129296	M	7	13	6	2022	0,154614
G43_P4_2022	G43	-0,20632	F	7	13	6	2022	0,354769
G43_P5_2022	G43	0,066454	F	7	13	6	2022	0,034529

G7_P1_2022	G7	-0,45774	F	7	13	6	2022	0,520665
G7_P2_2022	G7	-0,42776	M	7	13	6	2022	0,596831
G8_P2_2021	G8	-0,22804	M	7	13	6	2021	0,235542
G8_P3_2021	G8	-0,23805	NA	7	13	6	2021	0,244635
G8_P5_2021	G8	-0,16804	M	7	13	6	2021	0,172335
G8_P6_2021	G8	-0,16554	F	7	13	6	2021	0,223869
G8_P7_2021	G8	-0,02804	M	7	13	6	2021	0,084632

3.2 Analisi statistica dei dati

Per analizzare i dati sono stati costruiti due modelli lineari misti usando il pacchetto “lme4” in R (Bates et al. 2015).

Nel primo modello, come fattori fissi sono stati usati la differenza nella lunghezza dei telomeri (Δ RTL), il sesso, l’anno in cui sono stati rilevati i dati e la differenza di età tra la prima e la seconda visita al nido. Come fattore casuale, invece, è stato usato il nido di provenienza dei pulli.

Nel secondo modello, come fattori fissi sono stati usati la lunghezza dei telomeri (RTL1), il sesso, l’anno in cui sono stati rilevati i dati e l’età alla prima visita al nido. Come fattore casuale, invece, è stato usato il nido di provenienza dei pulli.

Δ RTL è stata calcolata mediante la differenza tra la lunghezza relativa dei telomeri (RTL) rilevata nella seconda visita e quella rilevata durante la prima visita. La seconda visita è stata eseguita in media 6 giorni dopo la prima visita.

Grazie alla costruzione dei modelli lineari e dei grafici che ne sono derivati, siamo stati in grado di analizzare la differenza nella lunghezza dei telomeri sulla base del sesso e degli altri fattori presi in considerazione, per valutare se, come previsto nelle ipotesi, la differenza nella lunghezza dei telomeri dipendesse dal sesso, o da eventuali altri fattori come per esempio l’età.

4. RISULTATI

È stato determinato il sesso di 56 pulcini di cui 29 sono risultati di sesso femminile, 26 di sesso maschile e 1 è rimasto indeterminato.

Gli individui con genotipo femminile (ZW), infatti, mostravano sul gel di agarosio 2 bande distinte, mentre gli individui di sesso maschile (ZZ) presentavano una singola banda (Figura 2). L'individuo di sesso indeterminato non ha dato prodotti di amplificazione.

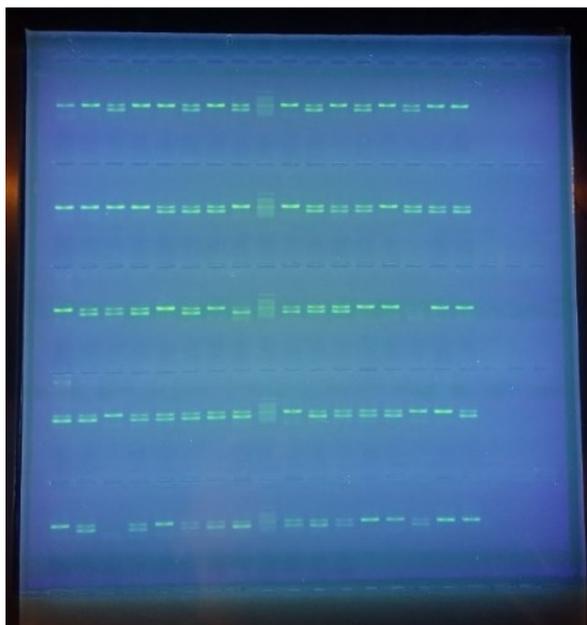


Figura 2. Gel di agarosio con le bande relative al sessaggio molecolare dei puli.

L'effetto dell'età e del sesso sulla lunghezza dei telomeri è stato analizzato mediante due modelli lineari.

Nel primo abbiamo studiato come variava la lunghezza dei telomeri nel tempo (ΔRTL), tra il secondo e il primo prelievo, e se questa variazione fosse anche legata al sesso (Figura 3).

La media del ΔRTL risultava negativa in entrambi gli anni, indicando una diminuzione nella lunghezza dei telomeri con l'età. Tuttavia la differenza non era significativa ($p = 0,8042$) come pure non c'erano differenze tra anni ($p = 0,1615$).

Infine, benché non avessimo trovato differenze significative nell'accorciamento dei telomeri tra i due sessi, c'era una tendenza ad un accorciamento maggiore nei

maschi ($p = 0,0833$) che potrà essere confermato solo con un maggior numero di campioni.

Per quanto riguarda il sesso, nel modello lineare utilizzato possiamo notare che non c'è nemmeno una differenza legata ad esso, ma il valore si avvicina al valore di significatività 0,05. Un motivo per cui tale valore si avvicina ma non raggiunge il livello di significatività potrebbe essere la bassa numerosità del campione preso in considerazione. L'avvicinamento al valore di significatività, tuttavia, potrebbe indicare che i maschi perdono più lunghezza dei telomeri rispetto alle femmine, e questo si osserva guardando il valore di stima negativo (Estimate = -0,3238) (Tabella 2).

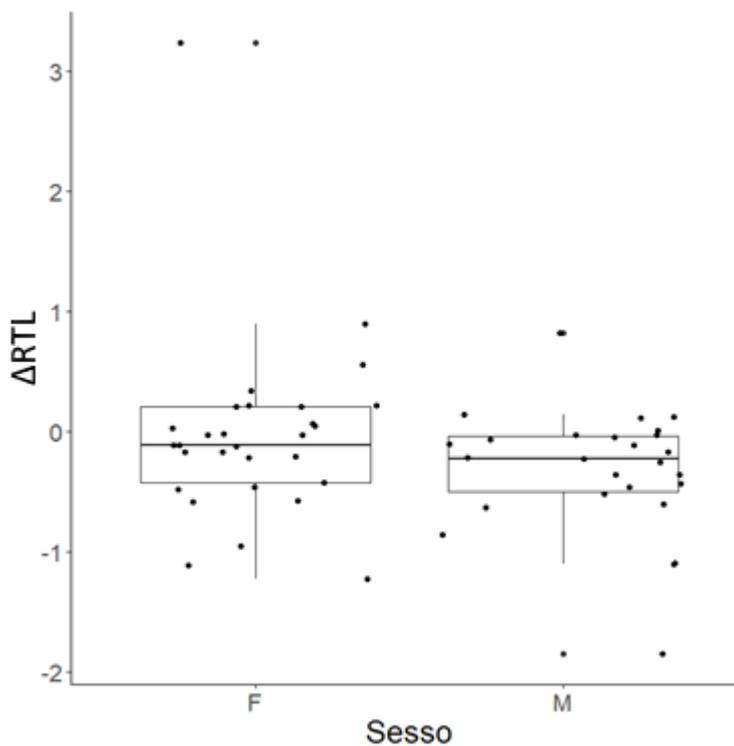


Figura 3. Media della ΔRTL ($\pm SE$) per maschi (M) e femmine (F) di passera lagia.

Tabella 2. Risultati dal modello lineare misto (LMM) nel quale la differenza della lunghezza dei telomeri (Δ RTL) è la variabile dipendente e la differenza di età, il sesso e l'anno di campionamento sono le variabili indipendenti.

Variabile	Valori \pm SE	t value	Pr
ΔRTL	-0,8815 \pm 4,0952	-0,215	0,8304
SessoM	-0,3238 \pm 0,1833	-1,767	0,0833
Anno2022	-0,2669 \pm 0,1879	-1,421	0,1615
DifEta	0,1719 \pm 0,6897	0,249	0,8042

Nel secondo modello lineare, invece siamo andati a vedere se già all'età del primo prelievo ci fosse una differenza nella lunghezza dei telomeri tra i due sessi.

Tabella 3. Risultati dal modello lineare misto (LMM) nel quale la lunghezza relativa dei telomeri all'età del primo prelievo (RTL1) è la variabile dipendente e il sesso e l'anno di campionamento sono le variabili indipendenti.

Variabile	Valori \pm SE	t value	Pr
RTL1	-1,15727 \pm 2,09477	-0,552	0,5831
SessoM	0,08547 \pm 0,10556	0,810	0,4223
Anno2022	0,33369 \pm 0,12228	2,729	0,0117
Eta1	0,19624 \pm 0,29986	0,654	0,5158

Non abbiamo trovato differenze nella lunghezza dei telomeri (RTL) tra i due sessi ($p=0.4243$), tuttavia nel 2022 i pulcini mostravano una lunghezza dei telomeri significativamente maggiore rispetto al 2021 ($p=0.0117$) (Tabella 3, Figura 4).

L'anno di campionamento sembra aver influito sulla lunghezza del telomero alla nascita. I pulli nati nel 2022 infatti avevano una RTL significativamente maggiore ai pulli nati l'anno prima. Invece non sono state riscontrate differenze tra i due sessi. I fattori che potrebbero aver influito su questa differenza annuale sono molteplici, tra cui fattori genetici e di stress ambientale.

Fattori ambientali che potrebbero aver influito maggiormente sulla lunghezza dei telomeri sono le condizioni meteorologiche avverse, ad esempio temperatura e tasso delle precipitazioni, ma anche fattori biotici come un diverso rischio di predazione, qualità del nido e competizione al nido. È stato visto, infatti, che durante il periodo di nidificazione, se la quantità di acqua disponibile era più scarsa, a causa di periodi secchi e con poche precipitazioni dovute alle alte temperature, ciò comportava una fonte di stress per gli individui di scriccioli dalla corona viola (*Malurus coronatus*), i cui nidiacei mostravano telomeri più corti rispetto ai periodi in cui le temperature erano più miti e l'acqua più abbondante (Eastwood et al. 2022).

L'influenza della temperatura sulla lunghezza dei telomeri è stata osservata anche in altre specie di animali selvatici come ad esempio nel junco occhiscuro (*Junco hyemalis*) che presenta un accorciamento dei telomeri a temperature molto basse probabilmente a causa dello stress da freddo (Graham et al. 2019).

In conclusione, da questo studio non sono state trovate particolari corrispondenze tra la diversa variazione nella lunghezza dei telomeri associate alla differenza di età o al sesso, ma probabilmente a differenze nelle condizioni ambientali sperimentate dai nidiacei nei due anni (2021 e 2022) di campionamento.

Questo suggerisce che la diversa variazione nella lunghezza dei telomeri dipende maggiormente da fattori esterni come potrebbero essere la temperatura e altri valori ad essa associati, come ad esempio la disponibilità di acqua e cibo.

Questi dati potrebbero suggerire che i cambiamenti climatici ed in particolare le ondate di calore non hanno solo degli effetti immediati ma anche sulla fitness e sopravvivenza futura dei pulli, quindi effetti più tardivi che si potrebbero manifestare nella vita adulta. L'esposizione a maggiore stress andrebbe ad influire sulla lunghezza dei telomeri e di conseguenza sulla fitness e la longevità dei pulli stessi (Eastwood et al. 2022).

BIBLIOGRAFIA

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569–573. <https://doi.org/10.1038/350569a0>
- Çakmak, E., Akın Pekşen, Ç., & Bilgin, C. C. (2017). Comparison of three different primer sets for sexing birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 29(1), 59–63. <https://doi.org/10.1177/1040638716675197>
- Cramp, S., Perrins, C. M., & Brooks, D. J. (1994). *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa: The birds of the Western Palearctic*. Oxford university press.
- Eastwood, J. R., Connallon, T., Delhey, K., Hall, M. L., Teunissen, N., Kingma, S. A., La Porte, A. M., Verhulst, S., & Peters, A. (2022). Hot and dry conditions predict shorter nestling telomeres in an endangered songbird: Implications for population persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(25), e2122944119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122944119>
- Ellegren, H. (1996). First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings. Biological Sciences*, 263(1377), 1635–1641. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0239>
- García-Navas, V., Rincón, A., Ferrer, E., & Fathi, H. (2013). Mating strategies, parental investment and mutual ornamentation in Iberian Rock Sparrows *Petronia petronia*. *Behaviour*, 150. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003112>
- Gomes, N. M. V., Ryder, O. A., Houck, M. L., Charter, S. J., Walker, W., Forsyth, N. R., Austad, S. N., Venditti, C., Pagel, M., Shay, J. W., & Wright, W. E.

- (2011). Comparative biology of mammalian telomeres: Hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*, 10(5), 761–768. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00718.x>
- Graham, J. L., Bauer, C. M., Heidinger, B. J., Ketterson, E. D., & Greives, T. J. (2019). Early-breeding females experience greater telomere loss. *Molecular Ecology*, 28(1), 114–126. <https://doi.org/10.1111/mec.14952>
- Griffiths, R., Daan, S., & Dijkstra, C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings. Biological Sciences*, 263(1374), 1251–1256. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0184>
- Hervant, F., Mathieu, J., & Durand, J. (2001). Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *The Journal of Experimental Biology*, 204(Pt 2), 269–281. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.2.269>
- Howe, H. F. (1977). Sex-Ratio Adjustment in the Common Grackle. *Science*, 198(4318), 744–746. <https://doi.org/10.1126/science.198.4318.744>
- Li, C. (2012). Deer antler regeneration: A stem cell-based epimorphic process. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 96(1), 51–62. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21000>
- Petronias articles—Encyclopedia of Life. (n.d.). Retrieved June 26, 2024, from <https://eol.org/pages/45513734/articles>
- Remot, F., Ronget, V., Froy, H., Rey, B., Gaillard, J.-M., Nussey, D. H., & Le-maitre, J.-F. (2022). Decline in telomere length with increasing age across nonhuman vertebrates: A meta-analysis. *Molecular Ecology*, 31(23), 5917–5932. <https://doi.org/10.1111/mec.16145>
- Romero-Haro, A. Á., Morger, J., Haussmann, M. F., & Tschirren, B. (2022). Reproductive Strategies Affect Telomere Dynamics across the Life Course. *The American Naturalist*, 200(3), 373–382. <https://doi.org/10.1086/720440>

- Salmón, P., Nilsson, J. F., Nord, A., Bensch, S., & Isaksson, C. (2016). Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major*. *Biology Letters*, 12(6), 20160155. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0155>
- Sherratt, D.J., West, S. C., Chan, S. R. W. L., & Blackburn, E. H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1441), 109–121.
- Vedder, O., Moiron, M., Bichet, C., Bauch, C., Verhulst, S., Becker, P. H., & Bouwhuis, S. (2022). Telomere length is heritable and genetically correlated with lifespan in a wild bird. *Molecular Ecology*, 31(23), 6297–6307. <https://doi.org/10.1111/mec.15807>
- Voituron, Y., Guillaume, O., Dumet, A., Zahn, S., & Criscuolo, F. (2023). Temperature-independent telomere lengthening with age in the long-lived human fish (*Proteus anguinus*). *Proceedings. Biological Sciences*, 290(1998), 20230503. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0503>
- Wilbourn, R. V., Froy, H., McManus, M.-C., Cheynel, L., Gaillard, J.-M., Gilot-Fromont, E., Regis, C., Rey, B., Pellerin, M., Lemaître, J.-F., & Nussey, D. H. (2017). Age-dependent associations between telomere length and environmental conditions in roe deer. *Biology Letters*, 13(9), 20170434. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0434>