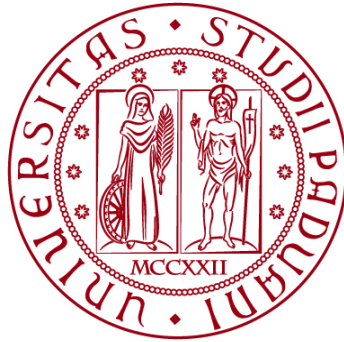


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Rapporto sessi dei nidiacei in relazione alla
poliandria ed eterozigotità delle femmine di
Passera lagia *Petronia petronia***

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

Laureanda: Gioia Bruni

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Sex ratio in <i>Petronia petronia</i>	5
1.2 Sessaggio molecolare	6
2. SCOPO DELLO STUDIO	6
3. MATERIALI E METODI.....	7
3.1 Biologia della specie <i>Petronia petronia</i> (Passera lagia).....	7
3.2 Raccolta dati	8
3.3 Preparazione del campione	8
3.3.1 Diluizione del DNA	8
3.3.2 Preparazione della reazione di amplificazione (PCR)	8
3.4 Elettroforesi su gel	9
3.4.1 Preparazione del gel di agarosio.....	9
3.4.2 Visualizzazione del DNA	9
3.5 Determinazione del sesso	9
3.6 Analisi statistica dei dati	10
4. RISULTATI.....	11
4.1 Analisi dei campioni su gel di agarosio.....	11
4.1.1 Determinazione del sesso nei pulli.....	11
4.2 Relazione del sex ratio con le variabili considerate.....	11
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	17
6. BIBLIOGRAFIA	19

1. INTRODUZIONE

Il rapporto sessi (sex ratio) è il valore che definisce la proporzione tra il numero di maschi e di femmine in una popolazione. Il sex ratio è un importante carattere di life-history che influenza la vitalità della popolazione attraverso i suoi effetti sulle dinamiche della popolazione e sulla dimensione effettiva della popolazione (Legendre 2004). Per questo, conoscere cosa può determinare la variazione del sex ratio ha importanti ripercussioni nella gestione delle popolazioni sia *in situ* che *ex situ* per la conservazione della specie. Ne è esempio il caso del Kakapo (*Strigops habroptila*), una specie a rischio di estinzione in cui si è notato come una modifica al regime alimentare potrebbe portare ad una variazione del rapporto sessi nella specie stessa (Mick et al. 2002). Un uguale investimento nei due sessi sarebbe una strategia evolutiva stabile promossa dalla selezione frequenza-dipendente (Fisher 1930). Tuttavia, in determinate condizioni, sociali e/o ecologiche, la fitness relativa di figlie e figli potrebbe differire e diventerebbe adattativo per la madre investire preferenzialmente le proprie risorse verso un sesso oppure l'altro e quindi variare il sex ratio della prole per massimizzare la propria fitness (Trivers e Willard 1973, Charnov 1982). Nonostante sia ritenuto che la determinazione del sesso cromosomica, come negli uccelli e mammiferi, possa impedire un aggiustamento del sex ratio della prole a causa della segregazione indipendente dei cromosomi ci sono numerosi esempi di variazioni nel rapporto sessi della prole in relazione a diversi fattori, sociali ed ecologici. Per esempio, diversi dati relativi a uccelli e mammiferi dimostrano come uno dei fattori più importanti quando si considera il rapporto sessi è la condizione della madre. È stato infatti osservato come una madre in salute tende a produrre più figli di sesso maschile perché più avvantaggiati dal punto di vista riproduttivo rispetto alle femmine (Trivers e Willard 1973). Nel gabbiano zafferano, *Larus fuscus*, la manipolazione sperimentale, attraverso sia un miglioramento che peggioramento, delle condizioni materne ha dimostrato un effetto significativo, positivo o negativo, sulla sopravvivenza dei pulli maschi all'involo ma non su quello delle femmine; inoltre, le femmine nelle condizioni peggiori producevano preferenzialmente femmine (Nager et al. 1999). Altri studi hanno messo in evidenza che le femmine negli uccelli sono in grado di cambiare il sex ratio della prole in risposta a cambiamenti ambientali (Matthysen 1998) o sullo stato degli aiutanti (Komdeur et al. 1997).

L'investimento preferenziale verso un sesso o l'altro potrebbe derivare dal vantaggio di produrre preferenzialmente il sesso che trarrà il maggior beneficio dallo stato sociale ereditato dai genitori (Charnov 1982, Sheldon et al. 1999). Così ad esempio, Burley (1981) ha mostrato che nel diamante mandarino (*Taeniopygia guttata*) le femmine variavano il sex ratio dei pulli in accordo alla "qualità del maschio". Similmente, le femmine della balia dal collare, *Ficedula albicollis*, variano il sex ratio dei pulli in accordo alle dimensioni della macchia bianca sulla fronte del padre, un carattere sessuale secondario ereditabile (Ellegren et al. 1996).

Anche in diverse specie di mammiferi è stato dimostrato come il sex ratio varia in relazione a diversi fattori. Si è visto infatti che migliori sono le condizioni delle

femmine (in termini di peso) di wallaby dalle briglie (*Onychogalea fraenata*), maggiore è la produzione di figli maschi, quindi maggiore è la variazione nel rapporto sessi (Fisher 1999). Uno studio del 2006 ha invece dimostrato come il sex ratio dei piccoli di *Rangifer tarandus* è influenzato dai tempi di concepimento della madre (Holand et al. 2006). Analogamente, nel tricosuro volpino (*Trichosurus vulpecula*) è stato verificato come le madri tendono a modificare il sex ratio e produrre più maschi quando si trovano in un'area densamente popolata: in questo caso la disponibilità delle tane che le figlie femmine dovrebbero occupare è bassa e per una madre non è conveniente produrre un numero equo di figli di sesso maschile e femminile (Johnson et al. 2001). Questi e altri studi che hanno considerato l'influenza di diversi fattori sul sex ratio della popolazione hanno dimostrato come la variazione del rapporto sessi sia fondamentale perché in grado di determinare una risposta adattativa ai cambiamenti nelle popolazioni.

1.1 Sex ratio in *Petronia petronia*

Studi passati condotti sulla passera lagia *Petronia petronia* confermano come il sex ratio possa essere influenzato da alcune caratteristiche dell'individuo, come la taglia della macchia gialla presente sul petto della specie (Cantarero et al. 2018). Nello specifico, nello studio pubblicato su *Avian Biology* nel 2018, viene definita la relazione tra il rapporto sessi di maschi e femmine di passera lagia e la dimensione della macchia gialla che gli individui considerati presentano sul petto. Prendendo in considerazione adulti e pulli di entrambi i sessi è stata effettuata un'indagine e si è scoperto che negli adulti, in media, il numero di maschi e femmine era proporzionalmente uguale (il sex ratio non differiva significativamente dal 50:50). Relazionando invece il sex ratio dei pulli alla larghezza della macchia gialla presente sul petto dei genitori, è stata evidenziata una certa tendenza nei risultati: le nidiate che presentavano più maschi corrispondevano a quelle in cui il padre aveva la macchia più grande rispetto a quella della madre. Al contrario invece, quando la madre aveva una macchia gialla più grande del padre, nelle nidiate risultavano esserci più femmine (il sex ratio in questo caso era più basso).

Nello studio del 2018 si è quindi dimostrato come in *P. petronia* gli ornamenti abbiano un determinato effetto sul rapporto sessi e come le caratteristiche genetiche dell'individuo in relazione a quelle del partner siano importanti e possano influenzare il sex ratio stesso.

Nel nostro studio viene valutato se il sex ratio di pulli al nido di passera lagia possa essere influenzato da altre caratteristiche dei genitori quali, per esempio, la poliandria, l'eterozigotità e il body condition della madre. Attraverso queste analisi viene quindi definito se il sex ratio di pulli risulta proporzionale (in termini di numero di maschi e femmine) o se oscilla maggiormente verso un lato (più maschi o più femmine) in base a determinati dati genetici presi in considerazione. I risultati permettono quindi di identificare altri elementi che potrebbero avere un effetto significativo sul rapporto sessi tra uccelli.

1.2 Sessaggio molecolare

Il sesso negli uccelli è determinato dai cromosomi W e Z. Le femmine sono eterogametiche e hanno corredo cromosomico WZ mentre i maschi sono omogametici e hanno corredo cromosomico ZZ. *P. petronia* è una specie che non presenta dimorfismo sessuale e per determinare il sesso di un individuo si esegue il sessaggio molecolare, una tecnica non invasiva che permette di ottenere risultati accurati in tempi rapidi.

Questa tecnica prevede l'estrazione del DNA dal sangue oppure, meno invasivamente, dal calamo delle piume e la successiva amplificazione di un frammento del gene chromodomain helicase DNA binding (CHD) localizzato sul cromosoma W e il suo omologo sul cromosoma Z, attraverso dei primer specifici. Esempi di set di primer utilizzati per il sessaggio sono P2/P8, 2550F/2718R e CHD1F/CHD1R (Çakmak et al. 2017). Questo ultimo set identifica una regione intronica di lunghezza diversa nei cromosomi sessuali W e Z (Griffiths et al. 1996).

L'amplificazione del frammento di DNA permette di ottenere sufficiente materiale che viene poi separato e visualizzato su gel di agarosio. Il prodotto della PCR caricato nel gel viene sottoposto, per un tempo definito, a corsa elettroforetica. A seconda delle caratteristiche del DNA i campioni corrono più o meno velocemente nel gel andando verso il polo positivo, da cui sono attratti. Nel caso degli uccelli, i frammenti dei due cromosomi corrono diversamente a seconda del peso molecolare degli stessi e questa differenza si vede nel gel di agarosio. Grazie a ciò è possibile determinare il sesso di un individuo.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Come descritto precedentemente, a seconda di determinate condizioni fisiche e sociali, le madri possono investire maggiori risorse per produrre più pulli di un sesso rispetto all'altro (Nager et al. 1999). E' infatti nell'interesse della femmina modificare il rapporto sessi per avere una prole con un'alta probabilità di sopravvivenza e riproduzione (Trivers e Willard 1973).

Diversi sono gli studi che pongono l'attenzione sul sex ratio di pulli al nido, analizzandone la relazione con le caratteristiche della madre quali l'età, la taglia o lo status sociale (Hartley et al. 1999; Wheelwright e Seabury 2003). Per quanto riguarda la specie presa in considerazione in questo studio, *Petronia petronia*, è già stato analizzato in passato come il sex ratio della prole possa essere influenzato dalle caratteristiche dei genitori, in particolar modo dalla macchia gialla che presentano sul petto e alle condizioni della femmina (Cantarero et al. 2018). Nello studio che verrà presentato, invece, si andrà a determinare come altri fattori relativi allo status della madre possano influenzare il sex ratio dei pulli.

L'obiettivo della tesi è infatti quello di verificare se le femmine variano il sex ratio al nido in base al loro stato fisiologico, alle caratteristiche genetiche del partner o al loro grado di poliandria. I risultati ottenuti potranno quindi essere inglobati nelle conoscenze pregresse della specie *P. petronia* e in generale negli studi che trattano la variazione del rapporto sessi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Biologia della specie *Petronia petronia* (Passera lagia)

Petronia petronia è una specie appartenente alla famiglia Passeridae caratterizzata da una riconoscibile macchia gialla a livello del petto. Il piumaggio presenta una colorazione bruna, variabile, con una predominanza di striature scure a livello delle ali e del capo e di striature più chiare nel petto (Figura 1). Non presenta dimorfismo sessuale. Ha un peso di circa 30 grammi, una lunghezza di circa 15 cm e un'apertura alare di circa 29 cm (Brichetti e Dicapi 1991). È onnivoro e si nutre soprattutto di insetti e semi di cereali. La specie è distribuita in Asia, Nord Africa, Cina e in Europa in paesi quali Spagna, sud della Francia e Italia; predilige le zone montane caratterizzate da bassa vegetazione. Le popolazioni di *P. petronia* presentano sia femmine monogame che poliandriche. La riproduzione avviene verso la fine di aprile su cavità rocciose o sui tronchi. La schiusa delle uova dura circa 11-13 giorni e ogni nido è costituito da 3 a 8 uova; i piccoli necessitano di cure parentali per le prime settimane (Brichetti e Dicapi 1991).



Figura 1. Esemplare di *Petronia petronia* (Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Petronia_petronia_-_Ariege%2C_Midi-Pyrenee%2C_France-8.jpg, modificato)

3.2 Raccolta dati

È stato determinato il sesso per via molecolare di 199 pulli di passera lagia raccolti negli anni 2016, 2017, 2018 e di alcuni individui adulti di sesso noto raccolti nell'anno 2016 come controllo positivo.

Tutti i campioni sono stati raccolti nella Spagna centrale, (40°54'N, 4°01'W) in ambienti caratterizzati da foreste decidue di *Quercus pirenaica*.

Per ognuno di questi campioni è stato fornito il DNA già estratto da sangue dal quale è stata amplificata la regione del gene CHD che permette di distinguere il sesso degli individui.

Inoltre, sono stati forniti dal tutor i seguenti dati: presenza di extra-pair paternity al nido determinato con loci microsatellite, la condivisione degli alleli microsatellite (allele sharing) della madre con il maschio sociale, il grado di eterozigotità, la meand², il peso, la lunghezza del tarso e la condizione (body condition) delle madri.

3.3 Preparazione del campione

3.3.1 Diluizione del DNA

La concentrazione del DNA dei campioni, espressa in ng/μL, variava da campione a campione da un valore minimo dell'ordine di 10 ng/μL ad un valore massimo di circa 2800 ng/μL. Per garantire un prodotto di amplificazione abbastanza omogeneo e visibile in un gel di agarosio, sono state eseguite opportune diluizioni (da 1:1 a 1:10 a seconda della concentrazione del campione di DNA).

3.3.2 Preparazione della reazione di amplificazione (PCR)

Per il mixer di reazione del sessaggio molecolare mediante PCR è stata utilizzata la 2x EasyTaqPCR SuperMix (TransGen Biotech Co., Ltd.TM), una miscela costituita da EasyTaq DNA Polymerase, dNTPs e tampone di reazione.

Il set di primer utilizzato è CHD1F 5'TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT 3'/CHD1R 5' CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT 3' (Lee et al. 2010; Çakmak et al. 2017). Due geni omologhi CHD di lunghezza diversa sono presenti nei cromosomi sessuali W e Z. Il gene è altamente conservato negli uccelli e grazie al suo polimorfismo di lunghezza a livello della regione intronica può essere utilizzato come marcatore del sesso (Griffiths et al. 1996). Questo polimorfismo è evidenziato tramite amplificazione (PCR) e corsa elettroforetica su gel di agarosio (Çakmak et al. 2017).

Il mixer di reazione della PCR conteneva un volume di 20 μL con: 12,25 μL di H₂O, 0,8 μL di CHD1F (10 μM), 0,8 μL di CHD1R (10 μM), 10 μL di 2x EasyTaqPCR SuperMix e 2 μL di DNA (>10 ng/μL).

Per l'amplificazione è stato eseguito un programma di touchdown che prevedeva una temperatura di annealing che si abbassava di 1°C ad ogni ciclo, partendo da

57 °C fino ad arrivare a 50 °C, seguiti da 30 cicli con annealing a 50°C. Gli step della PCR consistevano in un ciclo di denaturazione a 94°C per 4 min, seguiti da 38 cicli con uno step a 94°C per 30 s, uno step di annealing per 30s, ed uno step di estensione a 72°C per 45 s, ed un ciclo finale a 74°C per 5 min (Çakmak et al. 2017).

3.4 Elettroforesi su gel

3.4.1 Preparazione del gel di agarosio

I campioni di DNA amplificato vengono separati attraverso la tecnica dell'elettroforesi su gel di agarosio. È stato preparato gel di agarosio al 2%: 4,8 g di agarosio, 240 ml di TAE e 6 µL di colorante per il DNA EuroSafe 20'000X (Euroclone).

All'interno di ogni pozzetto del gel sono stati caricati 5 µL così ripartiti: 3 µL di DNA e 2 µL di DNA loading buffer. Per ogni gel si predisponeva anche un controllo negativo (mixer di reazione amplificato con 2 µL di H₂O al posto del DNA) e un marcatore di peso molecolare che in questo caso era 100 bp DNA Ladder (Promega). Come controllo positivo sono stati amplificati e caricati due adulti di passera lagia di sesso noto.

La corse del gel è stata effettuata a 90 volt per 1 ora.

3.4.2 Visualizzazione del DNA

Il gel viene successivamente visualizzato in un transilluminatore UV (Gel DocTM XR+ with Image LabTM Software BioRad) e fotografato.

3.5 Determinazione del sesso

L'immagine del gel ottenuta mostra la migrazione del DNA carico negativamente dal polo negativo (catodo) al polo positivo (anodo).

Utilizzando, come in questo caso, il set di primer CHD1R/CHD1F si dovrebbero ottenere nel gel di agarosio due bande rappresentanti i due omologhi del gene CDH del cromosoma W a 350 bp e del cromosoma Z a 450 bp per le femmine mentre per i maschi una sola banda a 450 bp del cromosoma Z (Çakmak et al. 2017) (Figura 2).

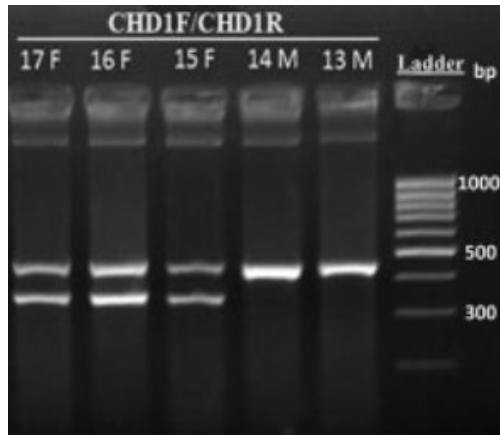


Figura 2. (da Çakmak, 2017, modificato). Rappresentazione dei campioni di DNA di uccello nel gel di agarosio. È possibile osservare, a partire da sinistra, tre campioni di sesso femminile e due campioni di sesso maschile.

Ad ogni campione viene quindi associato il sesso a seconda delle bande ottenute nel gel di agarosio. Si determina il numero di maschi e femmine in ogni nido di passera lagia e il sex ratio che in questo caso rappresenta il rapporto del numero di maschi sul numero totale di pulli al nido.

3.6 Analisi statistica dei dati

Per primo si è andati a verificare se il sex ratio al nido è influenzato dalla poliandria delle femmine confrontando tramite il test non parametrico di Mann Whitney U-Test il sex ratio al nido di femmine poliandriche e monogame, utilizzando il software GenAlex ver 6.51 in Excel (Peakall e Smouse, 2012). Quindi si è verificato se il sex ratio dei pulli al nido di *P. petronia* è influenzato dalle caratteristiche genetiche della madre, in particolare sono state considerate l'eterozigosità osservata (H_0) a 10 loci microsatelliti, misura che indica la proporzione di loci eterozigoti, e la $meand^2$ che è una misura di eterozigosità per loci microsatellite che tiene conto anche delle differenze in dimensione tra gli alleli (Coulson et al. 1998).

Infine, come variabile genetica è stata presa in considerazione il grado di similarità tra la madre e il padre sociale (maschio al nido) misurata come allele sharing cioè la proporzione di alleli condivisi tra i due partners ai 10 loci microsatellite

Poi è stata considerata una misura rappresentante lo stato fisiologico della femmina e cioè la body condition che tiene in considerazione la lunghezza del tarso e il peso della femmina nella seguente relazione:

$$Body\ condition = \frac{massa}{lunghezza\ del\ tarso^3}$$

Tutte le variabili sono state analizzate attraverso una regressione lineare nel programma PSPG GNU (General Public License), dove il rapporto sessi

rappresentava la variabile dipendente, e visualizzate tramite grafico a dispersione.

4. RISULTATI

4.1 Analisi dei campioni su gel di agarosio

A differenza dell'atteso, i risultati delle analisi effettuate su gel di agarosio mostravano prevalentemente la banda inferiore (350 bp) per i campioni di sesso femminile (Figura 3), mentre la banda a 450 bp era molto debole. Questo era già stato notato con alcuni test di DNA di campioni adulti di sesso noto. Il motivo per cui la seconda banda nei campioni femminili non si vedeva potrebbe essere dovuto al fatto che durante la PCR i due frammenti del cromosoma W e Z entrano in competizione e quello con dimensioni minori viene preferenzialmente amplificato. Questo problema non si riscontra invece nei maschi, nei quali viene amplificato solo l'omologo presente nel cromosoma (Z) e quindi nel gel di agarosio si osservava la sola banda a 450 bp.

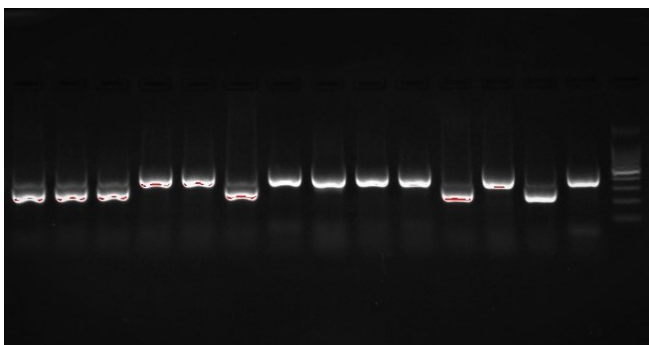


Figura 3. Sessaggio di alcuni campioni di pulli. Le bande più basse rappresentano gli individui di sesso femminile mentre quelle più alte quelle di sesso maschile. Si possono osservare, a partire da sinistra: 3 femmine, 2 maschi, 1 femmina, 4 maschi, 1 femmina, 1 maschio, 1 femmina e 1 maschio. La banda finale a destra rappresenta il marcatore (ladder).

4.1.1 Determinazione del sesso nei pulli

Dei 199 pulli di passera lagia, 96 erano di sesso maschile, 101 di sesso femminile e per 2 pulli non è stato possibile determinare il sesso in quanto l'amplificazione del gene CHD non è riuscita.

4.2 Relazione del sex ratio con le variabili considerate

Per ogni nido è stato calcolato il rapporto sessi come il numero di maschi sul numero totale di pulli presenti al nido stesso. Il sex ratio medio di tutti i 51 nidi

presi in considerazione non devia dalla parità ed era di $0,49 \pm 0,28$, con valori al nido compresi tra 0 e 1 (tabella 1).

Tabella 1. Dati relativi ai campioni di femmine *Petronia petronia*: extra-pair paternity (assenza EPP= 1, presenza EPP = 2), sex ratio al nido, allele sharing tra madre e padre sociale, e eterozigosità osservata (H_0), meand², lunghezza del tarso, peso, body condition della madre.

Campione	EPP	Sex Ratio	Allele sharing	H0	Meand ²	Lunghezza del tarso	Peso	Body condition
2016_201	1	0,40	0,70	0,50	11,2	18,0	31,2	0,005377
2016_220	1	0,25	0,60	0,50	26,8	17,5	30,1	0,005636
2016_253	1	0,67	0,60	0,70	144,9	18,9	29,8	0,004393
2016_46	1	1,00	0,75	0,90	162,5	18,5	30,9	0,004860
2016_48	1	1,00	0,65	0,80	78,5	18,6	32,2	0,005004
2016_52	1	0,00	0,70	0,70	211,8	18,7	31,5	0,004833
2016_78	1	0,33	0,60	0,70	80,8	18,8	29,4	0,004453
2016_B27	1	0,40	0,63	0,78	56,0	18,2	31,2	0,005187
2016_B5	1	0,33	0,60	0,80	90,0	18,8	32,1	0,004863
2016_B52	1	0,75	0,65	0,60	182,6	18,8	31,4	0,004706
2016_G13	2	1,00	0,60	0,80	323,4	19,0	32,8	0,004820
2016_G2	1	0,40	0,67	0,90	309,7	17,7	31,0	0,005564
2016_G28	1	0,50	0,50	0,90	326,3	17,5	31,6	0,005881
2016_G4	1	0,50	0,72	0,78	153,3	19,3	31,2	0,004346
2016_G5	2	0,20	0,83	0,70	91,9	17,8	29,8	0,005327
2016_G6	1	0,60	0,60	0,80	260,6	19,2	31,8	0,004472
2017_220	1	0,50	0,70	0,80	158,7	18,9	31,2	0,004607
2017_224	1	1,00	0,55	0,50	26,3	19,6	33,3	0,004423
2017_238	1	0,25	0,70	0,50	11,2	18,4	30,5	0,004896
2017_253	2	0,80	0,40	0,80	68,4	18,2	29,2	0,004860
2017_257	1	0,75	0,60	0,90	112,1	18,4	30,7	0,004952
2017_46	1	1,00	0,50	0,67	14,4	17,6	33,0	0,006022
2017_48	2	1,00	0,65	0,90	185,9	17,5	29,9	0,005608

2017_78	1	0,00	0,44	0,70	80,8	18,8	29,9	0,004536
2017_B46	1	0,67	0,55	0,80	187,3	18,7	29,8	0,004564
2017_B5	1	0,33	0,64	0,67	100,0	19,9	31,4	0,004015
2017_G12	2	0,33	0,60	0,90	309,7	18,7	32,1	0,004901
2017_G13	2	0,00	0,70	1,00	368,7	18,4	32,1	0,005178
2017_G2	1	0,33	0,75	0,80	6,9	19,3	30,4	0,004235
2017_G24	1	0,25	0,70	0,80	333,5	19,1	30,2	0,004327
2017_G6	1	0,33	0,55	0,60	182,6	19,0	31,1	0,004549
2018_201	1	0,50	0,80	0,50	11,2	18,2	32,1	0,005333
2018_216	1	0,75	0,65	0,90	191,3	18,6	34,8	0,005399
2018_220	1	0,67	0,70	0,90	186,2	19,1	30,2	0,004341
2018_46	1	0,75	0,50	0,70	68,0	18,3	29,7	0,004822
2018_48	1	0,60	0,65	0,90	185,9	18,1	32,6	0,005534
2018_78	1	0,67	0,44	0,60	61,2	19,4	30,2	0,004130
2018_87	1	0,33	0,50	0,90	107,8	18,7	32,1	0,004948
2018_B2	1	0,50	0,70	0,70	217,0	19,5	29,9	0,004026
2018_B4	2	0,00	0,95	0,70	323,7	18,5	28,9	0,004594
2018_B43	1	0,33	0,40	0,80	79,8	18,9	31,7	0,004695
2018_B5	1	0,50	0,60	0,90	340,1	18,8	33,2	0,005004
2018_B51	2	0,25	0,61	0,78	28,9	18,1	29,8	0,005034
2018_G12	1	0,50	0,65	0,80	72,9	18,7	30,9	0,004733
2018_G13	1	0,50	0,70	0,60	193,6	18,9	32,9	0,004850
2018_G16	1	0,60	0,75	0,90	198,5	19,6	35,3	0,004688
2018_G2	1	0,00	0,75	0,80	6,9	18,6	30,6	0,004794
2018_G24	2	0,60	0,61	1,00	132,9	19,0	30,9	0,004498
2018_G6	1	0,20	0,60	0,60	176,6	19,1	34,6	0,004973

Le femmine poliandriche non hanno mostrato un diverso sex ratio al nido rispetto alle femmine monogame. Media del sex ratio ai nidi di femmine monogame = $0,499 \pm 0,257$, e delle femmine poliandriche = $0,465 \pm 0,398$ (Mann-Whitney U -test = 209,5, $n_1 = 49$ $n_2 = 9$, $P > 0,05$).

Il grado di eterozigotità della madre inteso sia come eterozigotità osservata che come $meand^2$ non influenza il sex ratio al nido (Tabelle 2 e 3, Figure 4 e 5).

Nel caso dell'eterozigotità (H_0) il modello di regressione adattato era: $y = 0,02346x + 0,3145$ (Figura 4), e la regressione non era significativa, $R^2 = 0,012$, $F_{(1,47)} = 0,19$, $p = 0,666$ (Tabella 2).

Tabella 2. Test di regressione considerando come variabile dipendente il sex ratio dei pulli e come variabile indipendente l'eterozigotità della madre.

ANOVA (SexRatio)					
	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Regression	0,02	1	0,02	0,19	0,666
Residual	3,9	47	0,08		
Total	3,92	48			

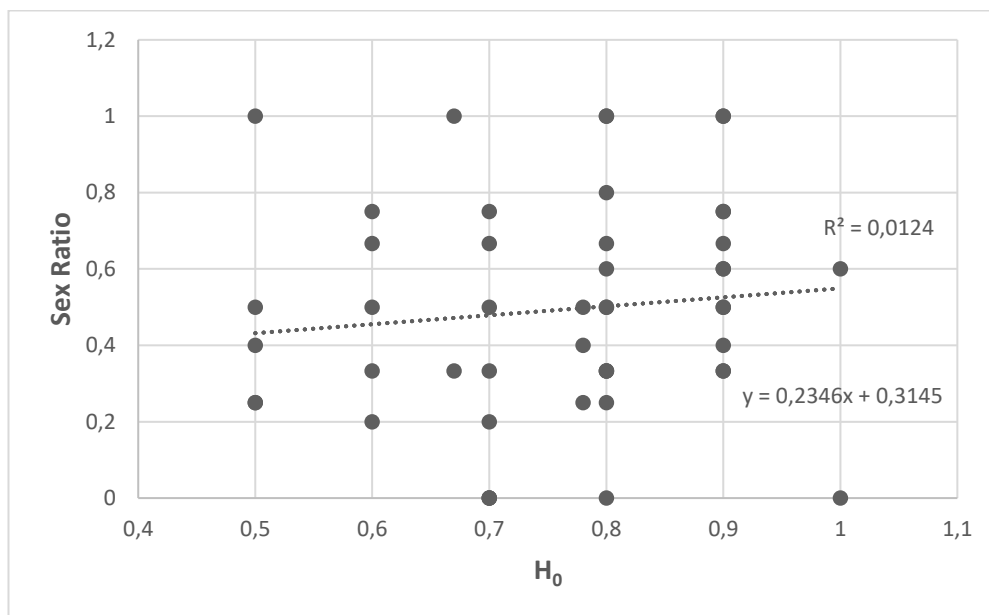


Figura 4. Grafico a dispersione che evidenzia la relazione tra il sex ratio dei pulli di *Petronia petronia* e l'eterozigotità della madre.

La variabile $meand^2$ nei dati presi in considerazione assume valori tra 6,9 e 340,1 (tabella 1). Il modello di regressione adattato era: $y = -0,0002x + 0,5181$ (Figura 5), e la regressione non era significativa, $R^2 = 0,004$, $F_{(1,47)} = 0,19$, $p = 0,666$ (Tabella 3).

Tabella 3. Test di regressione lineare in cui viene considerato il sex ratio dei pulli di passera lagia come variabile dipendente e il meand² della madre come variabile indipendente

ANOVA (SexRatio)					
	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Regression	0,02	1	0,02	0,19	0,666
Residual	3,9	47	0,08		
Total	3,92	48			

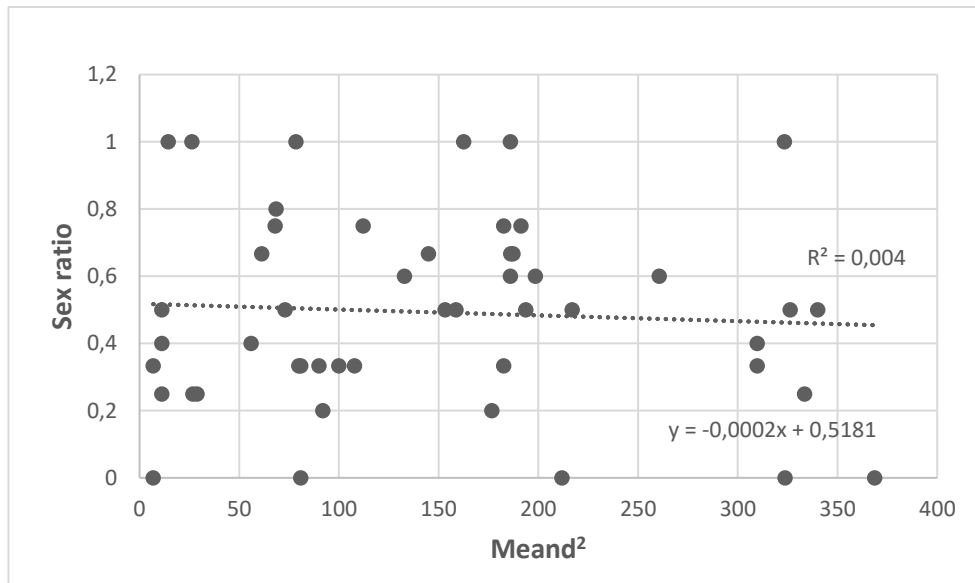


Figura 5. Grafico a dispersione in cui è rappresentata la relazione tra il rapporto sessi dei pulli di passera lagia e il meand² della madre.

La similarità genetica della femmina con il maschio sociale tendenzialmente sembra influenzare il sex ratio al nido, con le femmine con più elevato allele sharing con il maschio sociale produrre preferenzialmente pulli di sesso femminile. Il modello di regressione era: $y = -0,0002x + 0,5181$ (Figura 6). e la regressione era quasi significativa, $R^2 = 0,067$, $F_{(1,47)} = 3,37$, $p = 0,07$ (Tabella 4).

Tabella 4. Test di regressione in cui sono state considerate le seguenti variabili: sex ratio (variabile dipendente) e allele sharing (variabile indipendente).

ANOVA (SexRatio)					
	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Regression	0,26	1	0,26	3,37	0,073
Residual	3,66	47	0,08		
Total	3,92	48			

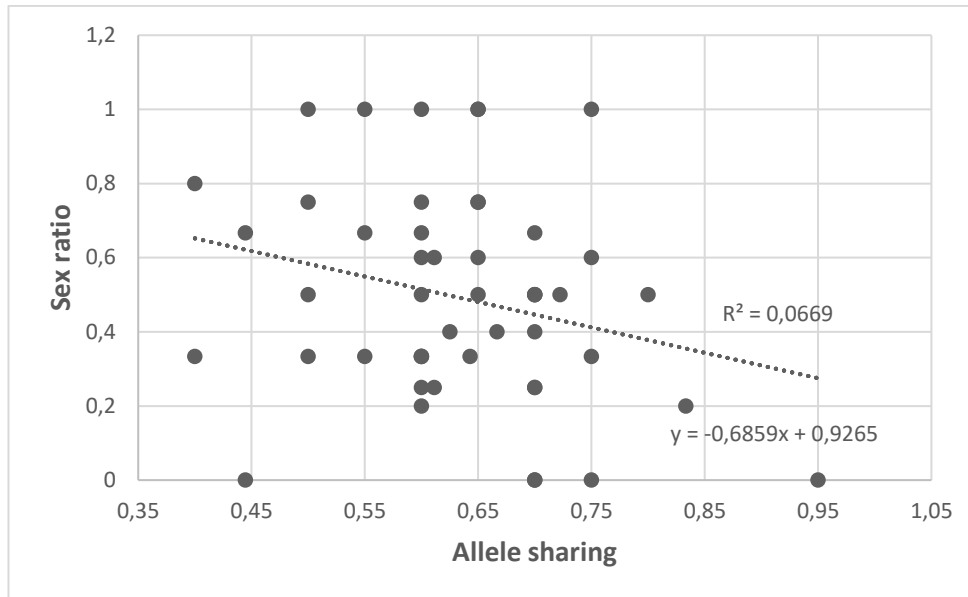


Figura 6. Grafico a dispersione che mostra la relazione tra allele sharing della madre con il maschio sociale e sex ratio dei pulli del nido.

Infine, è stata considerata una misura dello stato fisiologico della madre espressa dalla body condition, tuttavia anche questa non spiega differenze nel sex ratio al nido.

La massa dei campioni analizzati oscillava tra 29,2 g e 34,8 g ($31,3 \pm 1,4$) mentre la lunghezza del tarso tra 17,47 cm e 29,45 cm ($18,6 \pm 0,7$). Il massimo e il minimo valore della body condition sono rispettivamente $0,004026 \text{ g/cm}^3$ e $0,004973 \text{ g/cm}^3$ ($0,0049 \pm 0,0005$) (Tabella 1).

Nel caso della body condition il modello di regressione era $y = 64,42x + 18,06$ (Figura 7) e la regressione non era significativa, $R^2 = 0,0103$, $F_{(1,47)} = 0,49$, $p = 0,448$ (Tabella 5).

Tabella 5. Test di regressione lineare eseguito considerando come variabile dipendente il sex ratio dei pulli di passera lagia e come variabile indipendente la body condition della madre.

ANOVA (SexRatio)					
	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Regression	0,04	1	0,04	0,49	0,488
Residual	3,88	47	0,08		
Total	3,92	48			

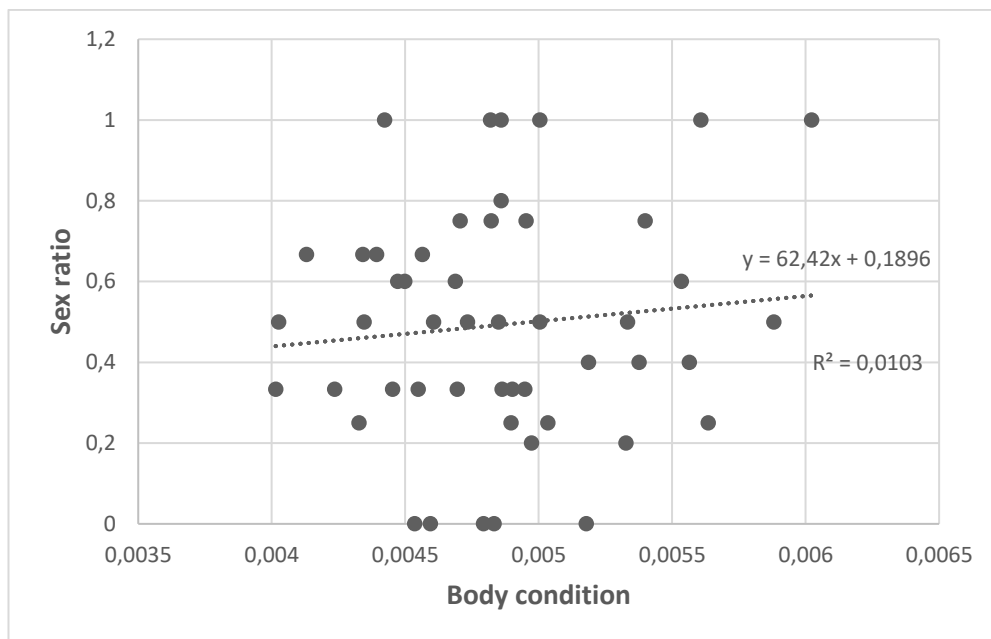


Figura 7. Grafico a dispersione in cui si considera come variabile indipendente il body condition e come variabile dipendente il sex ratio. La linea di tendenza rileva una relazione lineare tra i dati analizzati.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano come il sex ratio di pulli al nido di femmine di passera lagia non venga influenzato dallo status monogamo o poliandrico della madre. Bisogna però considerare che questo studio si basa su una popolazione di origine spagnola in cui la percentuale di femmine poliandriche è molto bassa rispetto, ad esempio, alle popolazioni italiana e francese (Corregidor-Castro et al. 2022) e questo potrebbe ridurre il potere statistico della nostra analisi. Tuttavia, la mancanza di una relazione tra sex ratio e poliandria delle femmine è stata ulteriormente riscontrata in altre specie, quali *Miliaria calandra* (Hartley et al. 1999) e *Passerculus sandwichensis* (Wheelwright e Seabury 2003), a prova del fatto che i risultati possono essere considerati validi anche per *Petronia petronia*.

Nello studio presentato viene inoltre verificato come determinate caratteristiche della madre (eterozigosità, meand² e body condition) non siano relazionate al sex ratio di pulli al nido di *P. petronia*. Per quanto riguarda il rapporto tra eterozigosità e sex ratio, un altro studio nella specie *Aegialus concinnus* (Li et al. 2016) ha ottenuto gli stessi risultati osservati in *P. petronia*. Ulteriori studi, invece, hanno investigato la correlazione tra rapporto sessi e body condition ottenendo risultati contrastanti a seconda della specie oggetto di studio. Mentre in *Chiroxipia lanceolata* (Laucht et al. 2008) e *M. calandra* (Hartley et al. 1999) non è stata riscontrata una relazione tra la condizione della femmina e il sex ratio dei pulli similmente a quanto descritto in questa tesi per *P. petronia*, nella specie *Larus cachinnas* (Alonso-Alvarez e Velando 2003) è stato notato come ad un

aumento della body condition della femmina corrispondeva un aumento del numero di maschi nel nido. È quindi necessario investigare ulteriormente sul rapporto tra body condition e sex ratio nelle diverse specie.

Tuttavia, è stato riscontrato che il sesso della prole potrebbe essere modificato adattativamente dalle femmine in funzione della somiglianza genetica con il partner. Infatti, una relazione quasi significativa tra l'allele sharing a loci microsatellite tra la madre e il maschio sociale (maschio al nido) e il sex ratio della prole è risultata dalle analisi e maggiore era la condivisione di alleli, maggiore era la tendenza a produrre preferenzialmente femmine. Madri e padri più simili geneticamente condividerebbero un grado di parentela più stretto e per questo motivo la prole potrebbe avere una maggiore probabilità di esprimere alleli recessivi che ne riducono la fitness. Il costo sarebbe più elevato per la prole maschile in quanto i maschi sono più pesanti in media delle femmine (Cantarero et al. 2018) e il successo riproduttivo dei maschi ha una varianza più grande di quello delle femmine (Trivers e Willard 1973). La relazione tra inbreeding e sex ratio è già stata investigata in passato in diverse specie con risultati contrastanti. Per esempio, a supporto dei risultati ottenuti in questo studio, in *Tragelaphus eurycerus isaaci*, è stato notato come ad un aumento dell'inbreeding corrispondeva una diminuzione della produzione di individui di sesso maschile (Malo et al. 2019). Tuttavia, in un altro studio in *Cheoropsis liberiensis*, non è stata riscontrata alcuna relazione tra consanguineità e rapporto sessi della prole (Graczyk et al. 2015).

In conclusione, questi risultati in cui non si trova una relazione tra caratteristiche genetiche o fisiologiche delle femmine con il sex ratio della prole indicherebbero un supporto per un rapporto sessi del 50:50 a livello della popolazione (Fisher 1930) come inoltre già riscontrato dallo studio di Cantarero et al. (2018), mentre non supportano la nozione di una modificazione adattativa del sex ratio in funzione delle condizioni individuali delle femmine (Trivers e Willard 1973). Tuttavia, la relazione tra sex ratio e similarità genetica tra i partners suggeriscono un aggiustamento parentale (materno o paterno) al sex ratio della prole basato sulla predetta qualità della prole (Malo et al. 2019). Per determinare la dissimilarità genetica (basso inbreeding) della prole futura e adattare il sex ratio i partners dovrebbero usare degli indizi fenotipici i quali dovrebbero correlare con la dissimilarità genetica. *P. petronia* utilizza le dimensioni relative del badge tra i partners per aggiustare il sex ratio della prole (Cantarero et al 2018) ma come le dimensioni del badge possano informare sul grado di dissimilarità genetica tra di essi è alquanto difficile da immaginare.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alonso-Alvarez, C. e Velando, A. (2003). Female body condition and brood sex ratio in yellow-legged gulls *Larus cachinnans*. *Ibis* 145:220-226.
- Brichetti P. e Dicapi C. (1991). *Il grande libro degli uccelli d'Italia e d'Europa*. Ed. De Vecchi, Milano
- Burley, N. (1981). Sex ratio manipulation and selection for attractiveness. *Science*. 211: 721–722
- Çakmak, E., Akın Pekşen, Ç. e Bilgin, C. C. (2017). Comparison of three different primer sets for sexing birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29:59–63.
- Cantarero, A., Pilastro, A. e Griggio, M. (2018). Nestling sex ratio is associated with both male and female attractiveness in rock sparrows. *J. Avian Biol.* 49:1-9.
- Charnov, E.L. (1982). The theory of sex allocation. - *Monogr. Popul. Biol.* 18: 1-355
- Corregidor-Castro, A., Griggio, M., Grapputo, A., Mingozi, T., Pilastro, A., Plaza, M. e Cantarero, A. (2022). Heterozygosity, genetic similarity and extra-pair paternity variation in two populations of rock sparrow *Petronia petronia*: a within and between populations comparison. *J. Avian Biol.* 2022(6): 1-11.
- Coulson, T. N., Pemberton, J. M., Albon, S. D., Beaumont, M., Marshall, T. C., Slate J., Guinness, F. E. e Clutton-Brock, T. H. (1998). Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265:489–495.
- Ellegren, H., Gustafsson, L. e Sheldon, B. C. (1996). Sex ratio adjustment in relation to paternal attractiveness in a wild bird population. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 11723–11728.
- Fisher, D. O. (1999). Offspring sex ratio variation in the bridled nailtail wallaby, *Onychogalea fraenata*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 45:411–419.
- Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press, Oxford.
- Graczyk, M., Cwiertnia, P., Borowska, A., Barczak, E. e Szwaczkowski, T. (2015). Inbreeding and offspring sex ratio in the pygmy hippopotamus (*Cheoropsis liberiensis*) population kept in zoological gardens. *Folia Biol.* 63:35–42.
- Griffiths, R., Daan, S. e Cor., D. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263, 1251-1256

Hartley, I. R., Griffith, S. C., Wilson, K., Shepherd, M. e Burke, T. (1999). Nestling sex ratios in the polygynously breeding corn bunting *Miliaria calandra*. J. Avian Biol. 30:7-14.

Holand, Ø., Mysterud, A., Røed, K. H., Coulson, T., Gjøstein, H., Weladji, R. B. e Nieminen, M. (2006). Adaptive adjustment of offspring sex ratio and maternal reproductive effort in an iteroparous mammal. Proc. R. Soc. B. 273:293–299.

Johnson, C. N., Clinchy, M., Taylor, A. C., Krebs, C. J., Jarman, P. J., Payne, A. e Ritchie, E. G. (2001). Adjustment of offspring sex ratios in relation to the availability of resources for philopatric offspring in the common brushtail possum. Proc. R. Soc. Lond. B 268:2001–2005.

Komdeur, J., Daan, S., Tinbergen, J. e Mateman, C. (1997). Extreme adaptive modification in sex ratio of the Seychelles warbler's eggs. Nature 385: 522-525

Laucht, S., DuVal, E. H. e Kempnaers, B. (2008). Maternal correlates of brood sex ratio variation in the lekking lance-tailed manakin *Chiroxiphia lanceolata*. J. Avian Biol. 39:198–205.

Lee, J. C.-I., Tsai, L.-C., Hwa, P.-Y., Chan, C.-L., Huang, A., Chin, S.-C., Wang, L.-C., Lin, J.-T., Linacre, A. e Hsieh, H.-M. (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. Mol. Cel. Probes 24:27–31.

Legendre, S. (2004). *Evolutionary Conservation Biology*. Ed. RDUCD Ferrière, Cambridge.

Li, J., Wang, Y., Lv, L., Wang, P. e Zhang, Z. (2016). No facultative manipulation of offspring sex ratio in relation to parental genetic characteristics in a bird with sex-specific heterozygosity-fitness correlation. Behav. Ecol. Sociobiol. 70:963–973.

Malo, A. F., Gilbert, T. C. e Riordan, P. (2019). Drivers of sex ratio bias in the eastern bongo: lower inbreeding increases the probability of being born male. Proc. R. Soc. B. 286:1-8

Matthysen, E. (1998). *The nuthatches*. Ed. Poyser, London.

Mick N.C. e Bruce, C.R. (2002). Effect of supplementary feeding on the offspring sex ratio of kakapo: a dilemma for the conservation of a polygynous parrot. Biol. Cons. 107:13-18.

Nager, R. G., Monaghan, P., Griffiths, R., Houston D.C. e Dawson, R. (1999). Experimental demonstration that offspring sex ratio varies with maternal condition. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:570–573.

Peakall, R. e Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539

Sheldon, B. C., Andersson, S., Griffith, S. C., Ornborg, J. e Sendecka, J. (1999). Ultraviolet colour variation influences blue tit sex ratios. *Nature* 402: 874–877

Trivers, R. L. e Willard., D.E. (1973). Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science*. 179:90–92.

Wheelwright, N. T. e Seabury, R. E. (2003). Fifty:fifty offspring sex ratios in savannah sparrows (*Passerculus sandwichensis*). *The Auk*. 120(1):171-179