

36. OTDK Biológia Szekció

A tesztoszteron hatása barkóscinege (*Panurus biarmicus*) fiókák növekedésére és az ivari dimorfizmus kialakulására

Készítette: Bujnóczki Noémi
Biológia BSc, harmadéves hallgató

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biológiai és
Ökológiai Intézet, Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Lendvai Ádám Zoltán
DE Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék, Egyetemi Docens

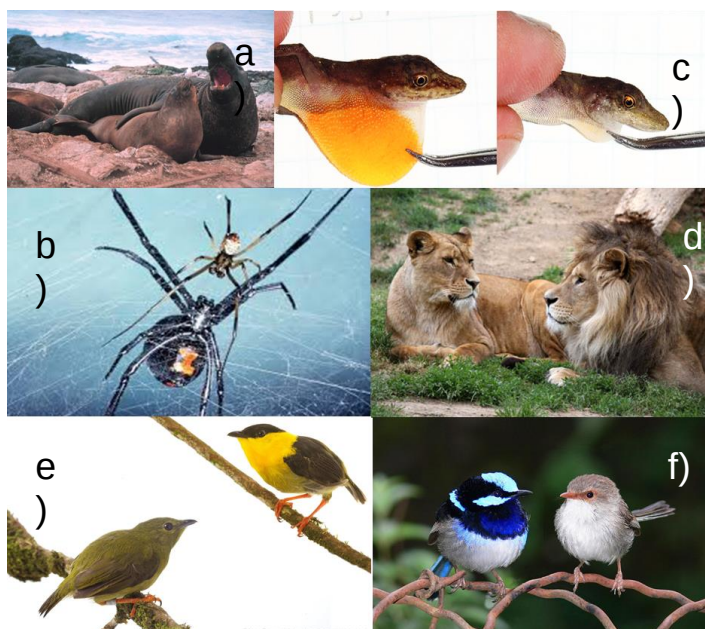
Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék:	2
Bevezetés	3
Célkitűzés	9
Anyagok és módszerek	10
A vizsgált faj.....	10
Tesztoszteron kezelés.....	12
A fiókák nemének meghatározása	13
Hormonkoncentrációk meghatározása	14
Tesztoszteron mérése	14
Inzulinszerű növekedési faktor 1 mérése.....	14
Adatelemzés	15
Eredmények	17
A kezelés hatása.....	17
A kezelés hatása a fiókák IGF-1 szintjére	20
Diszkusszió	23
Összefoglalás	29
Köszönetnyilvánítás	30
Irodalomjegyzék	31

Bevezetés

Az állatvilágban egy fajon belül a hím és nőstény egyedek megjelenésükben gyakran markánsan eltérnek egymástól. Ez a különbség több módon is megjelenhet: eltérő lehet a nemek kültakarójának színezete, a testméretük, sőt egyéb függelékekkel, tehát különböző másodlagos nemi jellegekkel is rendelkezhetnek. A különbség lehet feltűnő, de lehet egészen apró is. A gerinctelenek és gerincesek között is sok olyan fajt találunk, ahol az egyik nem (jellemzően a hím) pompás színezettel rendelkezik akár egész életében, vagy csupán a párzási időszakban, míg a másik nem színezete fakó, és beolvad a környezetbe. A színezeten túl a nemek közötti különbség megmutatkozhat a méretben is. A méretkülönbség lehet alig észrevehető, vagy egészen extrém is, ahol a hím és a nőstény annyira különbözik egymástól, hogy akár két különböző fajnak is tűnhet. A nemek közötti különbség gyakran feltűnő másodlagos nemi bélyegek meglétében jelentkezik: ilyenkor az egyik ivar rendelkezhet valamilyen függelékkel, mint például a szarvasbogarak (*Lucanidae*) megnagyobbodott rágója, vagy a házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*) hímjeinek a sarkantyúja.



1.kép: Az ivari dimorfizmus számos módon megjelenik az állatvilágban. Az északi elefántfókák (*Mirounga angustirostris*) (a) esetében a hímek sokkal nagyobbak, mint a nőstények, ezzel szemben a fekete özvegyek (*Latrodectus* sp.) (b) esetében a nőstények rendelkeznek nagyobb testmérettel, mint a hímek. Az anolisz gyíkok (*Anolis* sp.) (c) esetében a hímek torok redője sokkal látványosabb, mint a nőstényeké, a hím oroszlánok (*Panthera leo*) (d) pedig általában, az egészségi állapotuktól függően, hatalmas sörénnyel rendelkeznek. Az aranyvörös pipra (*Manacus vitellinus*) (e) és lazúr tündérmadár (*Malurus cyaneus*) (f) esetében a hímek tollazata sokkal színpompásabb, mint a nőstényeké.

Az ivari dimorfizmus kialakulására a szexuális és a természetes szelekció is hatással lehet (Blondel és mtsai., 2002). Ha egy élőlény színezetével beleolvad a környezetébe, akkor a ragadozók kevesebb eséllyel veszik észre. Erre jó példa a fácán (*Phasianus colchicus*) tojó tollazatának színe. Mivel a földön fészkel, így sok veszélyforrásnak van kitéve, ezért előnyösebb számára, ha a környezethez hasonló a tollazata. Ezzel szemben a fácán hím számára, a szaporodás szempontjából előnyösebb, ha minél díszesebb tollazattal rendelkezik. Az élénk színek, valamint hosszú és látványos függelékek különböző jelzésként szolgálnak a nőstények és a hímek számára is. Erre egy példa lehet a hím oroszlánok sörénye, melynek állapota és nagysága képet ad az oroszlán fizikai állapotáról. Egy másik példa a figyelemfelkeltő függelékekre egyes madarak farktollai, például a hosszúfarkú özvegypinty (*Euplectes progne*), ahol a tojók a hosszú farktollakat preferálják. Hiába költségesebb és veszélyesebb a hím számára a hosszú fark, párosodás szempontjából a hosszabb farktollak az előnyösebbek (Dunn és mtsai., 2001; Winquist & Lemon, 1994).

Az ivari dimorfizmus kialakulására a párzási rendszerek is hatással vannak. Azoknál a fajoknál, ahol a poligínia valamelyik formája (legyen az nőstényvédő, forrásvédő, tülekedő poligínia) alakult ki, az ivari dimorfizmus minden formáját felfedezhetjük. Több fajnál a nőstények előnyben részesítik a nagyobb hímeket. A nagyobb testméret egy jelzés lehet a nőstény számára a hím állapotáról, valamint a nagy testméret jellemzően növeli a hímek kompetitív sikerét és annak lehetőségét, hogy forrásokat vagy akár a nőstények egy csoportját monopolizálják. A naphalak (*Lepomis gibbosus*) esetében pl. a nőstények a nagyobb hímeket preferálják, a nagyobb hímek pedig territóriumot tartanak, s gondoskodnak utódaikról (Colgan és mtsai., 1981).

Az ivari dimorfizmusra a legkülönbözőbb és legdíszesebb példákat a madarak között találjuk. A madarak esetében az ivari dimorfizmus meglepte több tényezőtől is függ. Ez a különbség a tollazat mintázatában és az egyedek testméretében is megjelenhet (Owens & Hartley, 1998). A feltűnő tollazati mintázatok és az élénk színek előnyökkel és hátrányokkal is járnak. Az előnyök közé sorolható a már fent említett szaporodási előny, ami a díszes és színpompás tollazatból származik. Hátrány viszont, hogy a feltűnőbb tollazatú hímeket a ragadozók is hamarabb észreveszik. Azoknál a fajoknál, ahol a nőstények mortalitása nagyobb, a hímek tollazata nem feltűnő. Ezzel ellentétben azoknál a fajoknál, ahol a hímek élénkebbek és színesebbek a szexuális szelekciónak köszönhetően, a hímek mortalitásának nagyobbnak kell lennie egészen addig, amíg a színesebb tollazatból előny származik (Dale és mtsai., 2015; Promislow és mtsai., 1992).

A testméretbeli különbség kialakulhat a túlélés érdekében. Ez különösen megfigyelhető a vándorló madarak körében. Azoknál a fajoknál; ahol a hímek kora tavasszal, a nőtények pedig később kelnek útra; a nemek testmérete közötti különbség nagyobb, mint azoknál a fajoknál, amelyeknél a nemek később, de egy időben vándorolnak. A nagyobb testméret segít a zord időjárás átvészelésében (Kissner és mtsai., 2003). Más esetben a nemek testmérete közötti különbség változhat egy fajon belül a természeti adottságok, például táplálékmenyiség, vagy paraziták jelenlétének hatására (Blondel és mtsai., 2002). Vannak olyan tojók, amelyek a nagyobb testméretet részesítik előnyben, mert így az ő fiókái is nagyobbak lesznek, mint másoké. Az is egy magyarázat, hogy vannak hímek, amelyek küzdenek a nőtényekért. Ez megnyilvánulhat verekedésben, ahogyan az a házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*) és a kék páva (*Pavo cristatus*) hímeinél megfigyelhető, amelyek mind tollazatukkal, mind erejükkel megpróbálják elnyerni a tojók tetszését, valamint megpróbálják elérni, hogy a másik hím elhagyja a területüket.

A hímek és nőtények testméretbeli különbsége már fiatal korban eldőlt. A növekedésre egyaránt hatással vannak külső és belső tényezők is. Külső tényezőnek számít, hogy milyen gyakorisággal etetik a fiókákat a szülők, valamint milyen mennyiségben érhető el az adott területen az adott táplálék. A növekedést befolyásolhatja az utódgondozási rendszer (mindkét szülő eteti-e a fiókákat vagy csupán az egyikük, azaz biparentális vagy uniparentális gondozás a jellemző), valamint a fészekalj méret. Ezek a külső tényezők egy fészekaljban ugyanúgy hatnak mindegyik fiókára, a belső hatások viszont egyénileg hatnak a fiókák növekedésére. A növekedést befolyásoló egyik legjelentősebb belső hatások a hormonok.

A hormonok endokrin mirigyek termékei, amelyek a keringésbe jutva a szervezet bármely részében kifejthetik hatásukat. A hormonok hatása igen széleskörű, és befolyással vannak a fiziológiai, morfológiai és viselkedési mintázatokra (Ketterson & Nolan, 1992). A növekedés meghatározásában döntő szerepet az ún. hipotalamusz-hipofízis-szomatotróp hormonális tengely (HPS-tengely) játszik. A HPS-tengely központi integrátora a hipotalamusz, melynek *arcuatus* magjában termelődnek olyan hormonok, melyek a növekedési hormon szekrécióját serkentik (GHRH - növekedési hormon felszabadító hormon), vagy éppen gátolják (szomatosztatin, vagy GHIH). Maga a növekedési hormon (GH - szomatotropin) a hipofízis elülső lebenyében termelődik. A növekedési hormon termelődése a májban az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) termelését idézi elő. Az IGF-1 egy polipeptid anyagcsere hormon, amely hatással van a növekedésre (embrionális és születés utáni), a szaporodásra és az élettartamra (Dantzer & Swanson, 2012). Az IGF-1 növekedésre gyakorolt hatását a sejtprolifерáció serkentésén keresztül feje ki, így pl. hat az izom és csontsejtek növekedésére,

differentiálódására és túlélésére (Lodjak és mtsai., 2018). Pleiotropikus hatása miatt az IGF-1 a növekedés szabályozásán túl szerepet játszik számos meghatározó folyamat irányításában is, így befolyásolja pl. az ivarérettség elérését, illetve az utódok számát és/vagy méretét.

Az IGF-1 evolúciósan erősen konzervált hormon (Narasimhan és mtsai., 2009). A gerinctelenekben inzulinszerű növekedési faktorok helyett azzal homológ inzulinszerű peptidek találhatóak, a gerincesek esetében pedig az IGF-1 mellett csupán két másik hasonló faktora/hormonja van (IGF-2 és maga az inzulin) (Dantzer & Swanson, 2012; Jones & Clemmons, 1995; Leervers, 2001). A gerinctelenek esetében ezek az inzulinszerű peptidek együtt felelősek a növekedés és metabolizmus szabályozásáért, ezzel szemben a gerinceseknél ez a két szabályozási rendszer már jobban elhatárolódott egymástól. A gerincesek esetében már mindegyik inzulinszerű hormonnak megvan a saját receptora. Laboratóriumi körülmények között nem találtak nagy eltérést az IGF-1 hatásaiban különböző rendszertani csoportok között. Minden esetben az IGF-1 pozitív kapcsolatban állt a növekedéssel, a szaporodással és negatív hatással volt az élettartamra (Dantzer & Swanson, 2012). Viszont kevés információnk van arról, hogy szabadon élő gerincesek esetén milyen hatása van a keringésben lévő IGF-1-nek a növekedésre, szaporodásra és egyéb életfolyamatokra (Lodjak & Verhulst, 2020). Ebből a szempontból az egyik legkevésbé ismert gerinces csoport a madarak. A madarak metabolizmusa és élettana jelentős eltéréseket mutat az emlősökhöz képest, mégis az IGF-1 szabályozó szerepéről ebben a kládban igen korlátozottak az ismereteink.

A hormonális hatások, mint pl. az IGF-1 a növekedést genetikai hatásokkal interakcióban szabályozzák. A genomi régiók, amelyek a növekedésért és egy fajra jellemző testtömeg kialakulásáért felelősek, csupán kis mértékben különböznek a két nem között, viszont ezen régiók szabályozása ivar-specifikus (Cox és mtsai., 2009). Énekesmadaraknál a végleges felnőttkori testméret és a nemek közötti testméret különbség már fióka korban eldől. Nemi hormonok már embrionális korban is megtalálhatóak a tojássárgájában, valamint már a pár napos fiókákban is termelődnek nemi hormonok, annak ellenére, hogy ivarmirigyeik még fejletlenek (Adkins-Regan és mtsai., 1990; Kozłowski & Ricklefs, 2011; Silverin & Sharp, 1996). A szikanyagba a tojó által kerülnek be a hormonok (androgének és glükokortikoidok) (Groothuis & Schwabl, 2008). Ezáltal a tojó képes befolyásolni a fiókák fenotípusát a környezeti hatásokkal szemben. Az ekkor termelődött nemi hormonok hatással lesznek a serdülőkori növekedésre, hosszantartó hatásuk miatt. Az androgének (leginkább a tesztoszteron és a 5α -dihidrotesztoszteron), melyeket a tojó a szikanyagba juttat, gyorsítják a fiókák fejlődését, és pozitív hatással lesznek a fiókák növekedési rátájára, kompetíciós képességére (Muriel, Salmon, és mtsai., 2015; Schwabl és mtsai., 2007).

Az egyik legjelentősebb androgén szteroid hormon, amely befolyásolja a növekedést a tesztoszteron. A tesztoszteron termelésében szerepet játszik a hipotalamusz - hipofízis - gonád (HPG-) tengely. A ventrális hipotalamuszban felszabaduló gonadotropint felszabadító hormon (GnRH) kezdi meg a tesztoszteron keletkezéséhez szükséges kaszkádot. Miután a GnRH csatlakozik a hipofízis elülső lebenyén lévő megfelelő receptorhoz, megkezdődik az agyalapi mirigyben a luteinizáló hormon (LH - sárgatest képzés) bioszintetizációja. A herében található Leydig-sejtek LH receptorai megkötik a luteinizáló hormont, amely elindít itt egy hírvívő kaszkádot. Ennek hatására koleszterin jelenik meg a herében található mitokondriumok külső felületén. Innen a mitokondrium belső membránjába kerülve pregnenolonná konvertálódik a koleszterin. Ezután progeszteron keletkezik majd egy közti termékén keresztül androsztendion, amelyből tesztoszteron keletkezik (Zirkin & Papadopoulos, 2018). Bár a tesztoszteron főként a herékben termelődik, kisebb mennyiségben a mellékvesekéreg *zona fasciculata* régiója és a petefészkek is termel tesztoszteront, így az nőstényekben is előfordul (Burger, 2002).

A növekedés szabályozásában a tesztoszteronnak kétféle (bipotenciális) szabályozó hatása lehet. Ivari dimorfizmussal jellemezhető gyíkoknál például, a legtöbb faj esetében, a hím egyedek rendelkeznek nagyobb testmérettel. Ezeknél a fajoknál az a jellemző, hogy a tesztoszteron serkentő hatással van a növekedésre. Ugyanakkor, azoknál a fajoknál, ahol testméretbeli ivari dimorfizmus a nőstények felé eltol (tehát a nőstények nagyobbak, mint a hímek), a tesztoszteron gátló hatást fejt ki a növekedésre. A madagaszkári gekkóknál (*Paroedura picta*) és barna anoliszoknál (*Anolis sergei*) például, ahol a hímek nagyobbak, mint a nőstények, a kasztrálás bár nem okoz testméretbeli csökkenést a hím egyedek esetében, de a testméret növekedése lelassul. Az anolisz hímek esetében az is megfigyelhető, hogy a tesztoszteron kezelés növeli a testméretet. A *Paroedura* nőstényeknél a tesztoszteron kezelés viszont hímekhez hasonló testméretet eredményez (Cox és mtsai., 2009; Kubička és mtsai., 2016).

A HPS és HPG tengelyek között szoros kapcsolat figyelhető meg. Az IGF-1 stimulálja a GnRH felszabadulását (ami hatással van a gonadotropinokra: tüszőérlelő hormonra és a luteinizáló hormonra), valamint közvetett hatással van az ivarmirigyek hormontermelésére is (pl. tesztoszteron, ösztrogén). A két hormonrendszer közötti kapcsolat ugyanakkor kétirányú, mivel a nemi hormonok stimulálják a HPS tengelyt, és ezáltal kulcsfontosságú szerepet kapnak a serdülőkori növekedés ideje alatt (Mauras és mtsai., 1996). Azon pikkelyes hüllők esetében, ahol a nőstények rendelkeznek nagyobb testmérettel (például a keleti sövényleguán - *Sceloporus undulatus*), az ivarérett hímek májában termelődő IGF-1 mRNS szintje

szignifikánsan megnő, ha az egyedeket kasztráljuk. Ez a szint visszaáll a herék eltávolítása előtti szintre, ha tesztoszteronnal kezeljük az egyedeket. A nőstény sővényleguán egyedek esetében a tesztoszteron kezelésnek nincs hatása a májban keletkező IGF-1 mRNS szintjére (Duncan és mtsai., 2020). Más állatfajok esetében is gyakori, hogy az ivari hormonok, leginkább a tesztoszteron és a 17β -ösztadiol, negatív hatással van az IGF-1 termelésre, vagy pedig a GnRH expressziójára (Zhang és mtsai., 2022).

A tesztoszteron többféleképpen fejtheti ki a hatását a növekedésre énekesmadarak esetében is. A szülőktől való kéregetés befolyásolja a fiókák fejlődését, valamint növekedését (Price, 1998). A kormos légykapó (*Ficedula hypoleuca*) fiókák tesztoszteron kezelést követően hosszabb ideig kéregetnek, valamint magasabbra is nyújtják a nyakukat (Goodship & Buchanan, 2007). Számos fajnál leírták, hogy a szülők előnyben részesítik, azaz többet etetik, azokat a fiókákat, amelyek nagyobb intenzitással kéregetnek (Goodship & Buchanan, 2007).

A tesztoszteronnak tehát közvetetten pozitív hatása van a növekedésre a kéregetési viselkedésen keresztül. A tesztoszteron és más androgének viszont hatnak az IGF-1 expressziójára, s a hormonon keresztül a csontok és a vázizomzat növekedésére. Az aranyvörös pipra (*Manacus vitellinus*), zebrapinty (*Taeniopygia guttata*) és bogyóevő tirannusz (*Mionectes oleagineus*) hímek esetében például a tesztoszteron növeli az IGF-1 mRNS expresszióját, viszont ez a növekedés eltérő nagyságú a három faj egyedeinél (Fuxjager és mtsai., 2012). A tesztoszteron nagyobb mértékben emeli a piprák és tirannuszok IGF-1 mRNS expresszióját, mint a zebrapintyekét, aminek az oka a fajok eltérő szaporodási viselkedésében keresendő. A trópusi piprák és tirannuszok udvarlásuk során akrobatikus ugrásokat, röppenéseket és szárnymozgásokat mutatnak be, amelyek az izmok extrém igénybevitelét teszik szükségessé. Ezeknek az izmoknak a működése részben az androgén receptorok közvetítésével aktiválódik, és a fokozott IGF-1 expresszió pedig növeli az izomrostok méretét és erejét (Fuxjager és mtsai., 2012). Az androgén receptorok megtalálhatóak a legtöbb szervben, ebből származik az androgének pleiotrópikus hatása. Ezen receptorok megtalálhatóak verébalakú madarak fő szárnyizmaiban, melyek a repülést segítik elő. Ezek az izmok teszik ki a madarak tömegének csaknem 40%-át. Ebből következik, hogy ezen madarak tömege érzékeny az androgén hormonok szintjére (Fuxjager és mtsai., 2012). A testtömeg azonban összefügg a szkeletális struktúrák méretével is (magyarán a nagyobb testméret nagyobb tömeggel jár). A csontozati elemek (amit madarak esetében jellemzően a csüd hosszával jellemeznek) növekedése szintén érzékeny az androgének szintjére. Ez az érzékenység a fiókák fejlődésével változik. A még tojásban tesztoszteronnal kezelt fiókák csüdhossza, ivartól függetlenül, a hormon dózis növelésével (egy bizonyos határig) jobban nő (Muriel, Perez-Rodriguez, és mtsai.,

2015).Viszont más hatása van a tesztoszteron dózisonak az éppen kikelt fiókák testsúlyára. A frissen kikelt fiókák esetében azok, amelyek nagyobb tesztoszteron dózist kaptak, alacsonyabb testtömeggel rendelkeztek, mint a többi kezelt csoport. A pár napos fiókák esetében a nagyobb dózis negatív hatása már nem figyelhető meg.

A jelen vizsgálatban az ivari dimorfizmus kialakulását és annak hormonális kontrollját egy gyakori, bár kevésbé ismert énekesmadáron, a barkóscinegén (*Panurus biarmicus*) vizsgáltuk. A barkóscinegére látványos ivari dimorfizmus jellemző. A hímek tollazata a fejükön kékesszürke, szemük alatt fekete barkók figyelhetőek meg, és erős sárga csőrrel rendelkeznek (2. kép). Ezzel szemben a tojó drapp barna, csőrük színe visszafogott, hasonlít a fiatal fiókák csőrének színéhez. Az ivari dimorfizmus már fiatal fióka korban megjelenik. Bár a tollazat színezete csak a felnőttkor elérése után változik meg, a fiatal hím fiókák csőre már pár napos korban élénk sárga színű (Darolová és mtsai., 2009). A hím és nőstény fiókák között nemcsak megjelenésben van eltérés. Kikelést követően a nőstény fiókák, egy fészekaljon belül, nagyobb testtömeggel rendelkeznek, mint a hím fiókák, azonban a hím fiókák gyorsabban nőnek, és hamarabb érik el a felnőttkori testsúlyukat, mint a nőstény fiókák (Darolová és mtsai., 2008). Ugyanakkor a nemi dimorfizmus kialakulásának proximális kontrollja, az IGF-1 és az androgének szerepe több más énekesmadárhoz hasonlóan, a barkóscinegék esetén is feltáratlan.

Célkitűzés

Vizsgálatunk célja, hogy kiderítsük a nemi hormonok jelenléte befolyásolja-e a barkóscinegéknél a HPS-tengely működését, majd ezáltal a fiókák növekedését és az ivari dimorfizmus kialakulását. Hipotézisünk az volt, hogy a fiókakori tesztoszteron serkentő hatást fejt ki az IGF-1 szint termelődésére, és ezáltal hozzájárul a hímek intenzívebb növekedéséhez. Hipotézisünk teszteléséhez barkóscinege fiókák keringésben lévő tesztoszteron szintjét nem invazív módon manipuláltuk, majd nyomon követtük a fiókák növekedését a fejlődés legintenzívebb szakaszában. Molekuláris módszerekkel megállapítottuk a fiókák ivarát, és megvizsgáltuk, hogy a hormonkezelés hatása ivarspecifikus módon történik-e.

Anyagok és módszerek

A vizsgált faj

A barkóscinege (*Panurus biarmicus*) (Linnaeus 1758) egy Euráziában elterjedt, nádasokban költő énekesmadár. Kedveli az olyan területeket, ahol a nádcsomók mellett nyílt vízterület található.

A barkóscinege körülbelül 11-20 g tömegű, a hímek nagyobbak, mint a tojók. A hím és a tojó tollazatában, valamint csőr színében jelentős különbségek láthatóak (2. kép). A hím színesebb, feje kékes-szürke és szemei alatt fekete színű tollak, (a “barkók”) találhatóak. A hímek csőre sárgás színű, még a tojóké halvány barna (esetekben szürkés), akárcsak a nagyon fiatal fiókáké. Ez az ivari dimorfizmus már egészen fiatalon fióka korban észrevehető, s felhasználható egészen pontos nem-meghatározásra (Darolová és mtsai., 2009). A hím fiókák csőre a 7. nap környékén már megegyezik a felnőtt hím madarak csőrének színével.



2. kép: A képen egy hím (felül) és egy tojó (alul) barkóscinege látható. Az illusztrációkat Hilary Burn készítette.

A barkóscinegékre szociális monogámia (azaz egy hím egy tojóval párosodik) jellemző, de a páron kívüli kapcsolatokról származó utódok aránya jelentős lehet egyes populációkban

(Hoi & Hoi-Leitner, 1997). A fészkek építésében mind a két nem részt vesz, majd kora márciustól kora szeptemberig 2-4 fészkealjat is felnevelnek. Egy fészekben 3-11 tojás is előfordulhat, de a fészkealj jellemző mérete 4-8 tojás. Az inkubációt mindkét szülő egymást váltva végzi átlagosan 10-14 napig. A fiókák gyorsan nőnek, 9-13 naposan válnak röpképesé, és 12-13 naposan hagyják el a fészket.

Megfigyelték, hogy ennél a madárnál a párba állás már fiatal korban, nagyon gyakran már a kirepülés után pár héttel megtörténik. Ilyenkor a pár együtt repül és közel maradnak egymáshoz. Előfordul, hogy ezek a párok már a kikelés évében tojást raknak (Spitzer, 1972), de ez a fészkealj csak nagyon kevés esetben lesz sikeres. Ez a próbálkozás viszont pozitív hatással van a párra: az együtt repülés és próba fészkek építésének köszönhetően az együttműködésük fejlődik. Azok a párok, amelyek már a kikelésük után megpróbálnak egy fészkealjat felnevelni és gyakorolnak, a következő évben sikeresebbek a fészkepítésben. Sőt fiókáik is sikeresebbek azon párok fiókáival szemben, amelyek nem gyakoroltak és csak a költés előtt álltak párba (Griggio & Hoi, 2011).



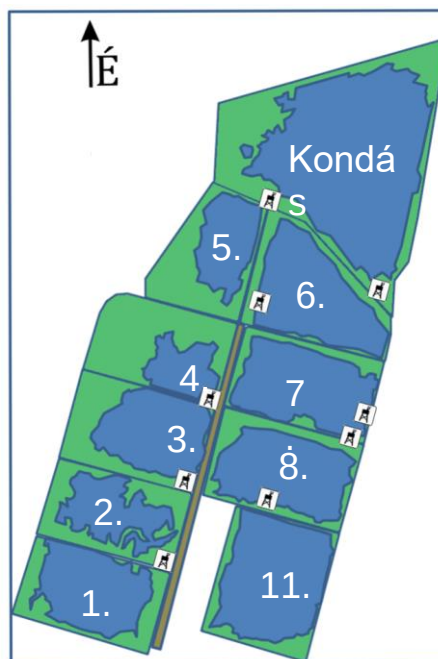
3. kép: A képen barkóscinege fiókák láthatóak. A képet Tóth Zsófia készítette a Hortobágyi Nemzeti Park területén.

Egy korábbi vizsgálat kimutatta, hogy fészkealjon belül, kikeléskor a nőstény fiókák nagyobb testtömeggel rendelkeznek, mint a hím fiókák, viszont a hím fiókák szignifikánsan gyorsabban növekednek, mint a nőstény fiókák (Darolová és mtsai., 2008). Elképzelhető, hogy barkóscinegék esetében ezért kelnek ki a nőstény fiókák először (kevert ivarú fészkekben), és

rendelkezik nagyobb kezdeti testsúllyal, mint a hím fiókák. Ezt a tojó képes lehet befolyásolni azáltal, hogy más mennyiségű hormont (legtöbb esetben tesztoszteront) juttat a tojássárgába. Más vizsgálatok kimutatták, hogy a *Serinus canaria* tojó egy fészekaljon belül, az egymást követő tojásokba egyre több tesztoszteront juttat (Schwabl, 1993, 1996).

A terület bemutatása, általános módszerek

A vizsgálat helyszíne a Hortobágyi Nemzeti Park területén található Hortobágyi Halastó volt (47°38' 13.7N és 21°04'42.8E). Az itt található halastavak megfelelő táplálkozási és költési helyet nyújtanak a barkóscinegék számára. A kísérlet előtt a sűrű nádasokat végigkutattuk, és a fészkeket tartalmazó nádcsomókat színes szalaggal megjelöltük, majd a GPS koordinátáit is felírtuk. A jelölt fészkeink a halastó 1-es, 2-es, 3-as, 6-os és 7-es halastavainál voltak (4. kép). A vizsgálatba összesen 26 fészket vontunk be. A fészkek rendszeres ellenőrzésével megállapítottuk a fiókák kikelésének időpontját, amit a fiókakor 0. napjának tekintettünk.



4. kép: A Hortobágyi Halastó tórendszere. A vizsgálatot a Hortobágyi Nemzeti Park 1., 2., 3., 6., 7. halastavainál végeztük.

Tesztoszteron kezelés

A kísérlet a kelés utáni 4. napon kezdődött és a 7. napig tartott. Kezelés előtt minden fiókát egy egyedileg számozott alumínium gyűrűvel láttunk el, és testtömegüket (± 0.01 g), szárnyhosszukat (± 0.5 mm) és csüd hosszukat (± 0.01 mm) megmértük. Minden fészekaljon belül a fiókákat testtömegük alapján sorba rendeztük, majd a fiókákat páronként blokkokba

soroltuk. Egy blokkon belül a fiókákat véletlenszerűen rendeltük a kezelési csoportokhoz (randomizált blokk elrendezés): az egyik fióka tesztoszteron, a másik pedig kontroll kezelést kapott. Ennek a kísérleti elrendezésnek az volt a célja, hogy egy fészekaljon belül minél hasonlóbb fejlettségű fiókákat tudjunk összehasonlítani a kezelés szempontjából. A tesztoszteronnal kezelt csoport (T) 10 µl mogyoró olajban oldott 4 µg tesztoszteront kapott szájon keresztül egy 10 µl-es fix térfogatú pipetta segítségével (Goodship & Buchanan, 2007). A kontroll csoportnak szájon keresztül csupán 10 µl mogyoró olajat adtunk ugyanezen a módon. A fészekalj méretétől és a fiókák fejlettségétől függően egy fészekben jellemzően 1-2 kezelési blokkot alakítottunk ki. Azok a fiókák, amelyek nem kerültek bele egyik csoportba sem, nem kaptak kezelést. A fiókákat kikelés után a negyedik naptól a hetedik napig minden nap lemértük, majd kezeltük. Ezenkívül, a kikelés utáni 4. napon a kezelés megkezdése előtt, valamint a kikelés utáni 8. napon a kezelést követően vért vettünk a fiókáktól. A vérvételhez heparinizált üvegapillárisokat és steril hipodermikus tűket (26 G) használtunk. A kezelésben összesen 26 fészekből, 47 fiókát kezeltünk tesztoszteronnal, 47 fiókát a kontroll oldattal.

A hormonkezelés hatásosságát 4 fészekből származó 12 db, 5-6 napos fióka esetén határoztuk meg. Ezek a fiókák nem vettek részt a kísérletben, csak a hormonkezelés validációjának céljából vontuk be őket a kezelésbe. A mérés után a kísérletben alkalmazott kezelést kapták, majd a fészket zavarástól menetesen hagytuk 90 percig, amely időt követően a fiókáktól vért vettünk. Ezen vérminták elemzése alapján határoztuk meg, hogy a kezelés hatással volt-e a fiókák vérben keringő tesztoszteron szintjére.

A fiókák nemének meghatározása

A fiókák nemének meghatározásához polimeráz lánc-reakciót (PCR) használtunk, ivar-specifikus markerekkel. Az ivar-specifikus, a W és a Z kromoszómán is megtalálható, CHD1 gén amplifikációját követően a már korábban széles körben alkalmazott P2/P8 primereket alkalmaztuk (Bantock és mtsai., 2008). A felszaporított géntermék alapján meg tudtuk állapítani a fióka nemét: a hímek esetében egyetlen géntermék (CHD1-Z), és így a gélen egyetlen sáv látható, míg a nőstények esetén két termék (CHD1-Z és CHD1-W), és ezáltal két sáv látható. Az elektroforézist agaróz gélen végeztük. A módszer validációjához fiókáktól származó mintákat összevetettük olyan felnőtt egyedek mintáival, amelyeknek az ivarát ismertük.

Hormonkoncentrációk meghatározása

A vérvételt követően a vérmintákat hűtőtáskában tároltuk, amíg vissza nem értünk a laborba. Ezután az Eppendorf csövekben lévő mintákat centrifugáltuk, elválasztva ezzel a plazmától a sejtes elemeket. Miután a sejtes elemek leülepedtek, Hamilton tűvel óvatosan leszívtuk a felső réteget, a plazmát. Ezután felcímkézett Eppendorf csövekbe engedjük őket, majd -20°C -on tároltuk a mintákat a hormonkoncentrációk meghatározásáig.

Tesztoszteron mérése

A tesztoszteron szint meghatározásához egy kereskedelmi forgalomban kapható kompetitív ELISA kit-et: (Enzo Life Sciences, kompetitív ELISA kit, katalógus szám: ADI-900-065), használtuk. Mielőtt elkezdtük volna a minták mérését, a reagenseket hagytuk, hogy szobahőmérsékletűek ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) legyenek. Két kalibrációs sort készítettünk ($2 \times 1-5$), az első csőbe $40\ \mu\text{l}$ ($50000\ \text{pg/ml}$ Tesztoszteron) standard oldat került, majd ezt hígítottuk tovább felező hígítással. Az NSB (Non-Specific Binding) és a B_0 ($0\ \text{pg/ml}$ Standard, azaz teljes kötés, TB) lyukakba mértünk $100\ \mu\text{l}$ esszé puffert (fehérjéket, detergenset és nátrium-azidot tartalmazó trisz-pufferált sóoldat). A standardokból és a mintákból $100\ \mu\text{l}$ -t pipettáztunk a megfelelő lyukba. Az NSB lyukakba az esszé pufferból még $50\ \mu\text{l}$ -t mértünk. Az esszében monoklonális egér antitestet használtunk, ebből $50\ \mu\text{l}$ -t pipettáztunk az Üres, a Teljes Aktivitású (TA) és NSB lyukak kivételével mindegyikbe. Ezután szobahőmérsékleten ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) a mikrolemezt rázógépen 1 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubáció lejárta után, a TA és Üres lyukak kivételével, minden lyukba $50\ \mu\text{l}$ -t mértünk a tesztoszteronnal konjugált alkalikus foszfatáz oldatból (tracer). Ezután újbóli 1 órás inkubáció következett szobahőmérsékleten a rázógépen. Ezután háromszor mostuk a mikrolemezt. Az utolsó mosást követően a TA lyukakhoz is adtunk a tracer oldatból $5\ \mu\text{l}$ -t. Ezután minden lyukhoz $200\ \mu\text{l}$ pNpp szubsztrátot (P-nitrofenil-foszfát) adtunk, majd a mikrolemezt lefedjük és újabb 1 órán át inkubáltuk 37°C -on. Végül $50\ \mu\text{l}$ nátrium-foszfát oldatot (stop oldat) pipettáztunk minden lyukba, majd beraktuk a mikrolemezt az olvasóba, majd $405\ \text{nm}$ hullámhosszon olvastuk egy Tecan - Infinite® F50 Plus mikrolemez olvasó készüléken.

Inzulinszerű növekedési faktor 1 mérése

A plazma mintákból az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) koncentrációt egy saját fejlesztésű kompetitív immunszérum módszerrel (ELISA) határoztuk meg (Mahr et al 2020). A méréshez Nunc™ 96-lyukas Polypropylene Microwell™ mikrotiter lemezeket

(mikrolemez) használtunk. A lyukakba, kivéve az előzőleg kijelölt NSB (Non-Specific Binding) lyukakba a mérést megelőző nap délután 100 µl karbonát pufferben oldott, nyúlban IGF-1 ellen termelt ellenanyagot helyeztünk többcsatornás automata pipetta segítségével, majd inkubáltuk 16 órán keresztül 4°C-on ('coating').

A mérés reggelén kivettük a hűtőből a mikrolemezt, majd eltávolítottuk belőle a coating puffert, ezután egyszer átmostuk (250 µl 0,025%-os PBS-Tween20 mosófolyadék használatával). Ezt követően többcsatornás pipettával a mikrolemez minden lyukába mértünk 100 µl biotinilált IGF-1 oldatot (tracer). Majd a TB (total-binding) és NSB lyukakba 20 µl esszé puffert pipettáztunk, a standard hígításnak (ST) kijelölt lyukakba a megfelelő standard oldatból mértünk 20 µl-t. Két párhuzamos hígítási sort készítettünk, felező hígítással (5000 ng/ml kezdeti koncentrációval). Ezt követte a plazma minták felhelyezése a mikrolemezre (11 µl minta + 9 µl esszé puffer: foszfáttal-pufferolt sóoldatban oldott szarvasmarha-szérum-albumint használtunk, 0,05% BSA). Ezután egy 2 órás inkubáció következett szobahőmérsékleten (~25 °C). Az inkubáció lejárta után a mikrolemezt háromszor mostuk, majd 100 µl torna-peroxidázzal (HRP) konjugált sztreptavidin oldatot mértünk minden lyukba. Ezután 30 perces inkubáció következett. Az inkubációt újabb háromszori mosás követte, mely után a már szobahőmérsékletű tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrátból mértünk 100 µl-t a lyukakba. 30 perc elteltével az enzimatis reakciót 100 µl 1M H₂SO₄ (stop oldat) hozzáadásával állítottuk le, majd az OD értékeket 450 nm hullámhosszon mértük (referencia 620 nm).

Adatelemzés

Az adatok elemzéséhez az R program (4.2.1.-es verzió) lme4 (Bates és mtsai., 2015) csomagra épülő lmerTest (Kuznetsova és mtsai., 2017) csomagját használtuk. A fiókák növekedési rátáját lineáris regresszió segítségével határoztuk meg, ahol a független változó a mérés pontos ideje, míg a függő változó a fiókák testtömege, szárnyhossza vagy csüd hossza volt. A modellből az egyenes meredekségét határoztuk meg növekedési rátaként. Az elemzés során megvizsgáltuk, hogy van-e kapcsolat a fiókák testtömegének, csüd hosszának, és szárny hosszának változása és a kezelés között. Valamint azt is vizsgáltuk, hatással van-e a kezelés az IGF-1 szint változására.

Először ellenőriztük, hogy a tesztoszteronnal kezelt és kontroll csoportok testméret paraméterei (testtömeg és annak növekedése, csüd hossz, szárny hossz) között van-e szignifikáns különbség a nemekre való kontrollal vagy anélkül. Ehhez kevert lineáris modell használtunk. Ezen felül ellenőriztük, hogy a fiókák testtömege milyen kapcsolatban áll a csüd

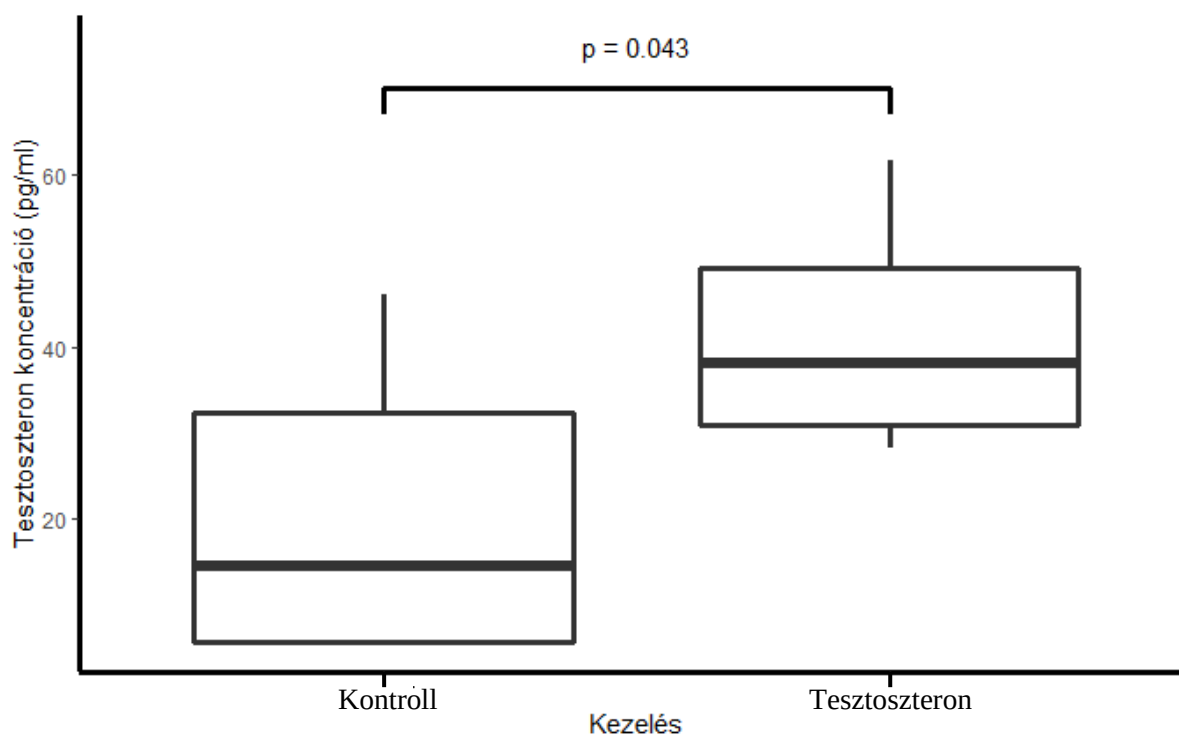
hosszával az ivar függésében.

Ezután vizsgáltuk, hogy az IGF-1 szint kapcsolatban van-e a fiókák testtömegével és csüd hosszával a 4., illetve 8. napon.

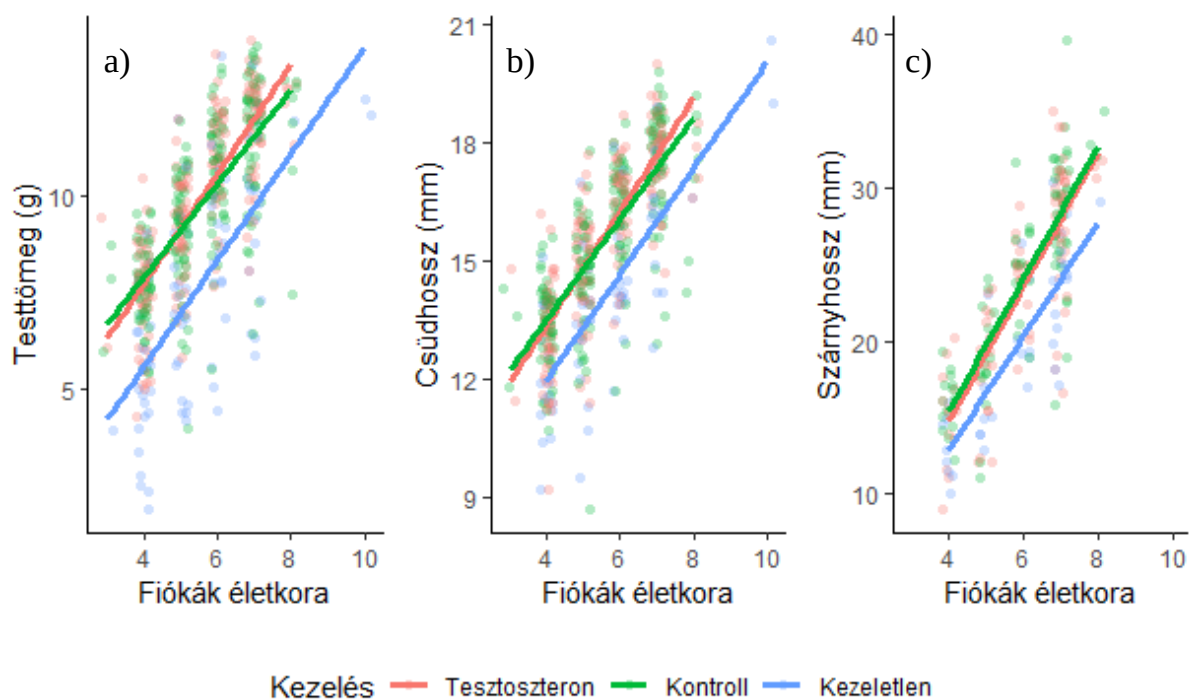
Eredmények

A kezelés hatása

A validációs minták alapján a tesztoszteron kezelés szignifikáns mértékben növelte a fiókák vérkeringésben lévő tesztoszteron szintjét a kontroll egyedekhez képest (1. ábra). A kezelés nem volt hatással a fiókák testtömeg, csüd-, sem pedig a szárnyhossz növekedésére (2. ábra).



1. ábra: A tesztoszteron hormon szintje a Tesztoszteron kezelt csoportban szignifikánsan ($p = 0,043$) nagyobb volt, mint a Kontroll csoportban.



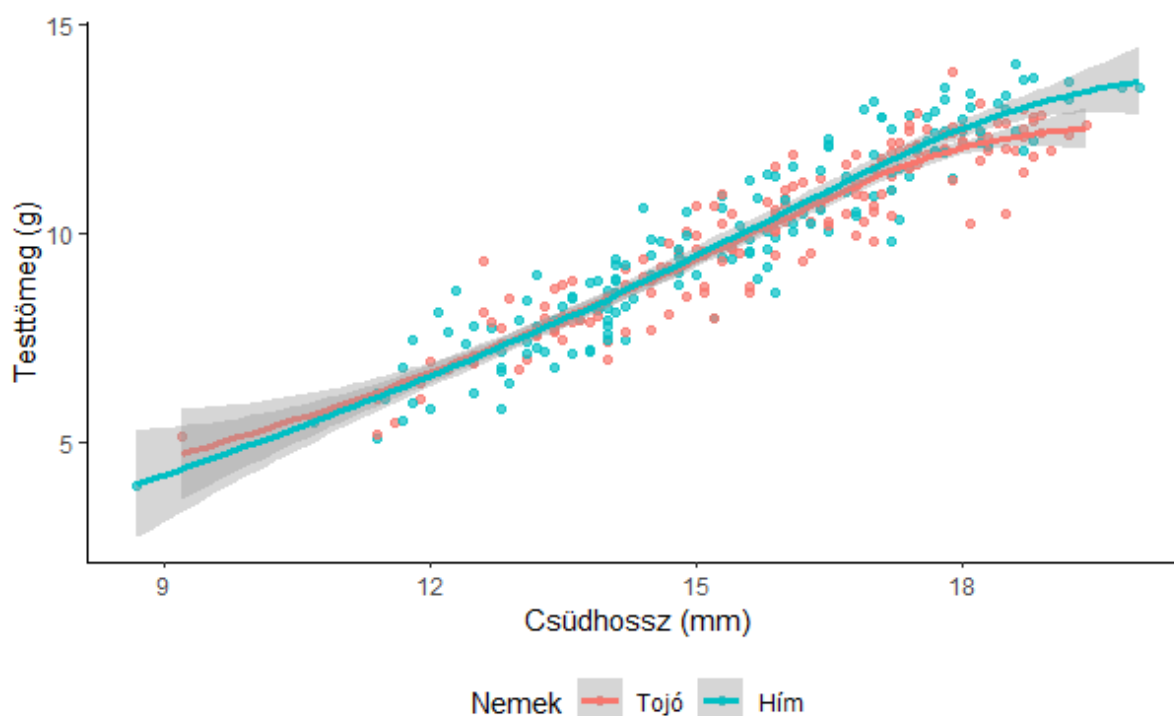
2. ábra: A kezelés nem volt hatással a testtömeg (a), a csüd hossz (b) és a szárnyhossz (c) növekedésére. Az egyes pontok a fiókák méréseit mutatják, míg az egyenes az adatokra illesztett regressziós egyenest mutatja.

A testtömeg változását a hormonkezelés nem befolyásolta, bár a kezeletlen csoportba tartozó fiókák kisebbek voltak, mint a kezelésben résztvevők (1. táblázat). A két nem kezdeti testtömege között nem találtunk különbséget (1. táblázat) és a kezelés sem befolyásolta a két nem növekedését. A hím fiókák testtömege viszont gyorsabban gyarapodik, mint a nőstény fiókáké (1. táblázat, 3. ábra). A fiókák neme és csüd hossza, valamint szárnyhossza között ilyen kapcsolatot nem találtunk.

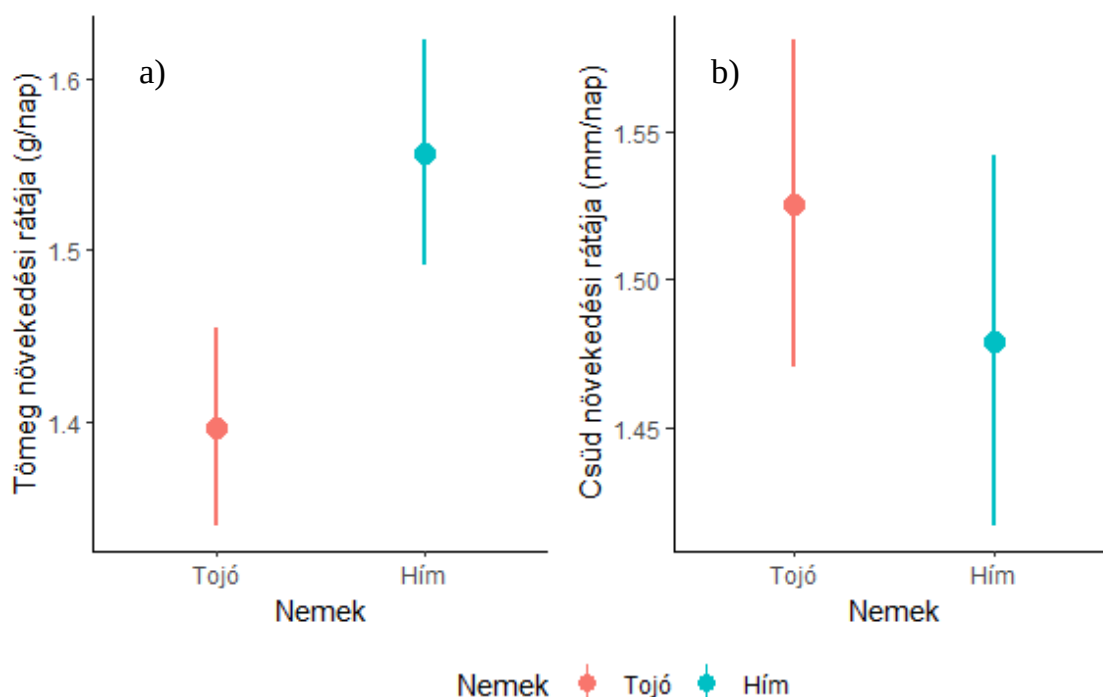
1. táblázat: A tesztoszteron (T) kezelés nincs hatással a testtömeg növekedésére, ám a hím fiókák a kezeléstől függetlenül gyorsabban növelik tömegüket, mint a tojók. A táblázat egy lineáris kevert modell eredményeit mutatja, ahol a függő változó a testtömeg változás, fix hatások a fiókák életkora, a kezelés és az ivar, illetve az ivar és az életkor interakciója. A tengelymetszet (intercept) a hímeket és a kontroll fiókákat jelöli. A modellben a fészekalj azonosítója random intercept-ként szerepelt.

hatás	paraméterbecslés	átlag hibája (SE)	statisztikai próba értéke	p-érték
(Intercept)	1,77	0,37	4,73	<0,001
Fióka életkora (napok)	1,49	0,04	36,66	<0,001
Kezelés (T)	0,04	0,19	0,23	0,818
Kezelés (nincs)	-1,61	0,32	-5,04	<0,001
Ivar (tojó)	0,34	0,35	0,99	0,325
Fióka életkora * ivar (tojó)	-0,12	0,05	-2,29	0,023

Ivartól függetlenül azok a fiókák, amelyek nagyobb csüd hosszal rendelkeznek, nagyobb testtömeget is érnek el. Egy bizonyos csüd méret elérése után (~17 mm) azonban a hím fiókák nagyobb testtömeggel rendelkeznek, mint a nőstény fiókák (3. ábra).



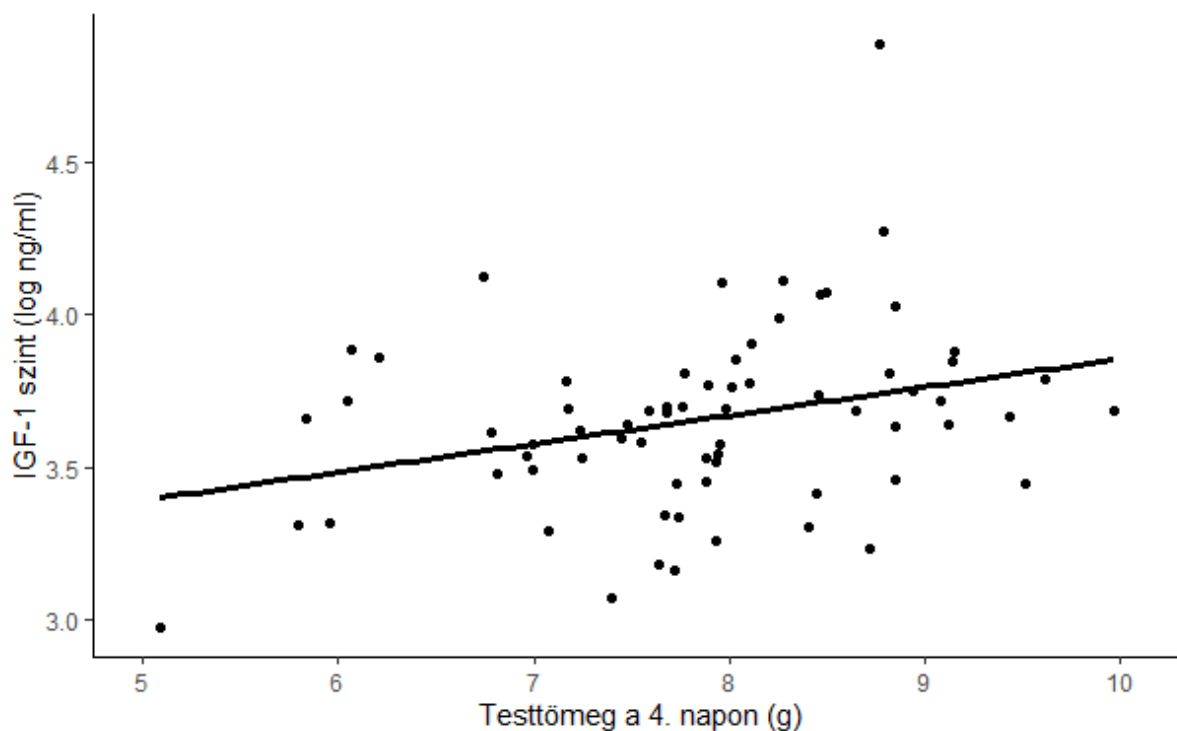
3. ábra. A csüd hossz növekedésével arányosan növekszik a testtömeg a 4-7. napos barkóscinege fiókák esetén. A hímek azonban a növekedésük végén nagyobb testtömeget érnek el, mint a tojók.



4. ábra: A hímek testtömegének növekedési rátája nagyobb, mint a nőstény fiókáké (a). Ez az összefüggés a csüd hossz növekedési rátája (b) és a nemek között nem figyelhető meg.

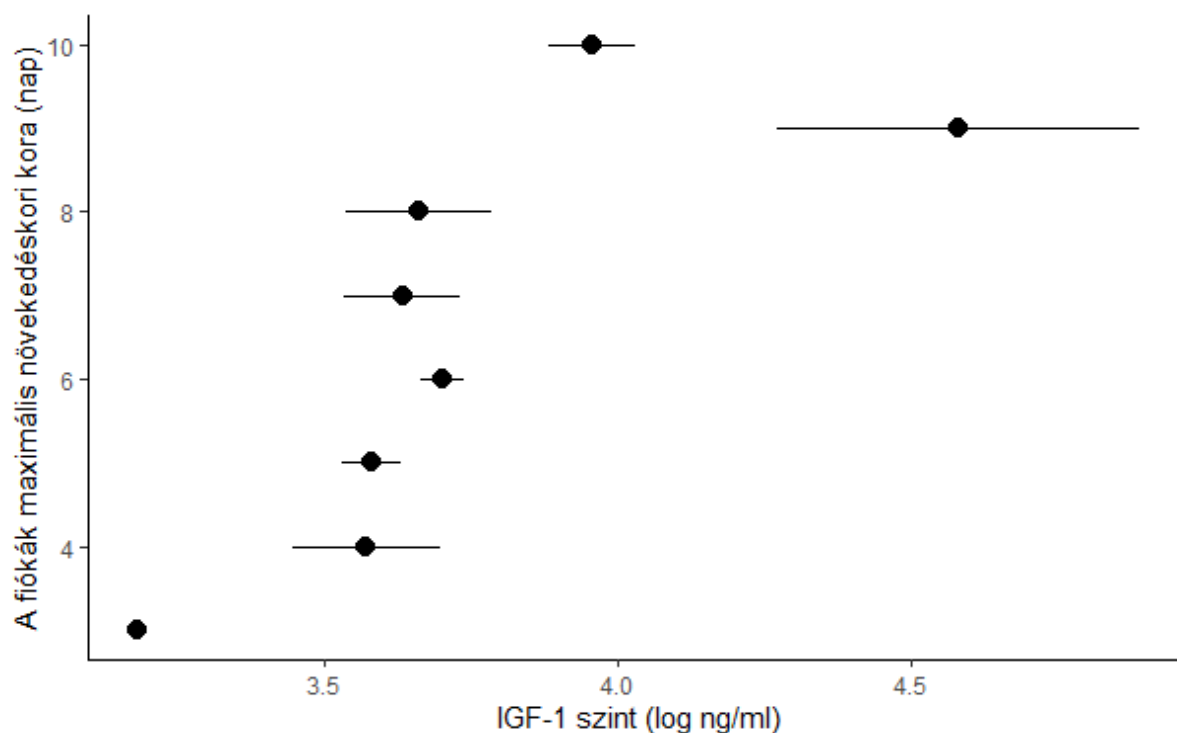
A kezelés hatása a fiókák IGF-1 szintjére

A kezelés elején, a kikelés utáni 4. napon, a kezelési csoportok és a nemek IGF-1 hormon szintjei között nem volt szignifikáns különbség (kezelés: $t = -0,96$; $p = 0,342$; ivar: $t = 0,387$; $p = 0,699$). Azonban a hormonszint pozitív kapcsolatban állt a fiókák testtömegével ($t = 2,45$; $p = 0,017$) (5. ábra). Ugyanez a kapcsolat nem mondható el a 4 napos fiókák csüd hosszáról ($t = 1,57$; $p = 0,121$).



5. ábra: Azok a fiókák, amelyek a 4. napon nagyobb testtömeggel rendelkeztek, kezeléstől függetlenül nagyobb IGF-1 szinttel rendelkeztek, mint azok, amelyek kisebb testtömeggel rendelkeztek.

Azok a fiókák, amelyeknek a 4. napon magasabb volt az IGF-1 hormon szintje, később érték el a maximum növekedésüket ($t = 2,63$; $p = 0,013$) (6. ábra).



6. ábra: Azok a fiókák, amelyek később (a 8. nap környékén) érték el a maximális növekedésüket, magasabb IGF-1 szinttel rendelkeztek, mint azok a fiókák, amelyek hamarabb érték el a maximális növekedésüket.

A második mérést a kezelés végén, a 8. napon végeztük, miután elvégeztük a kezelést. A fiókák IGF-1 szintje nem állt kapcsolatban a fiókák nemével, az elvégzett kezeléssel, vagy a növekedési rátával (2. Táblázat). Azonban az IGF-1 szintje kapcsolatban állt a nőstény fiókák testtömegével, bár az összefüggés marginálisan nem szignifikáns volt ($p = 0,092$).

2. táblázat: A fiókák nemének, a tesztoszteron (T) kezelésnek és a növekedésnek a kapcsolata az IGF-1 hormonnal a kezelés 8. napján. A táblázat egy lineáris kevert modell eredményeit mutatja, ahol a függő változó az IGF-1 szintje, a fix hatások a kezelés, a fiókák ivara, testtömege és növekedési rátája, valamint a testtömeg és a növekedési ráta interakciója az ivarral. A tengelymetszet (intercept) a hímeket és a kontroll fiókákat jelöli. A modellben a fészekalj azonosítója random intercept-ként szerepelt.

hatás	paraméterbecslés	átlag hibája (SE)	statisztikai próba értéke	p-érték
(Intercept)	2,82	0,46	6,15	<0,001
Kezelés (T)	0,03	0,07	0,43	0,668
Ivar (tojó)	1,03	0,73	1,42	0,162
Testtömeg*	0,06	0,04	1,78	0,080
Növekedési ráta*	-0,09	0,07	-1,29	0,203
Fióka testtömege * ivar (tojó)	-0,10	0,06	-1,72	0,092
Fióka növekedési rátája * ivar (tojó)	0,17	0,11	1,51	0,137

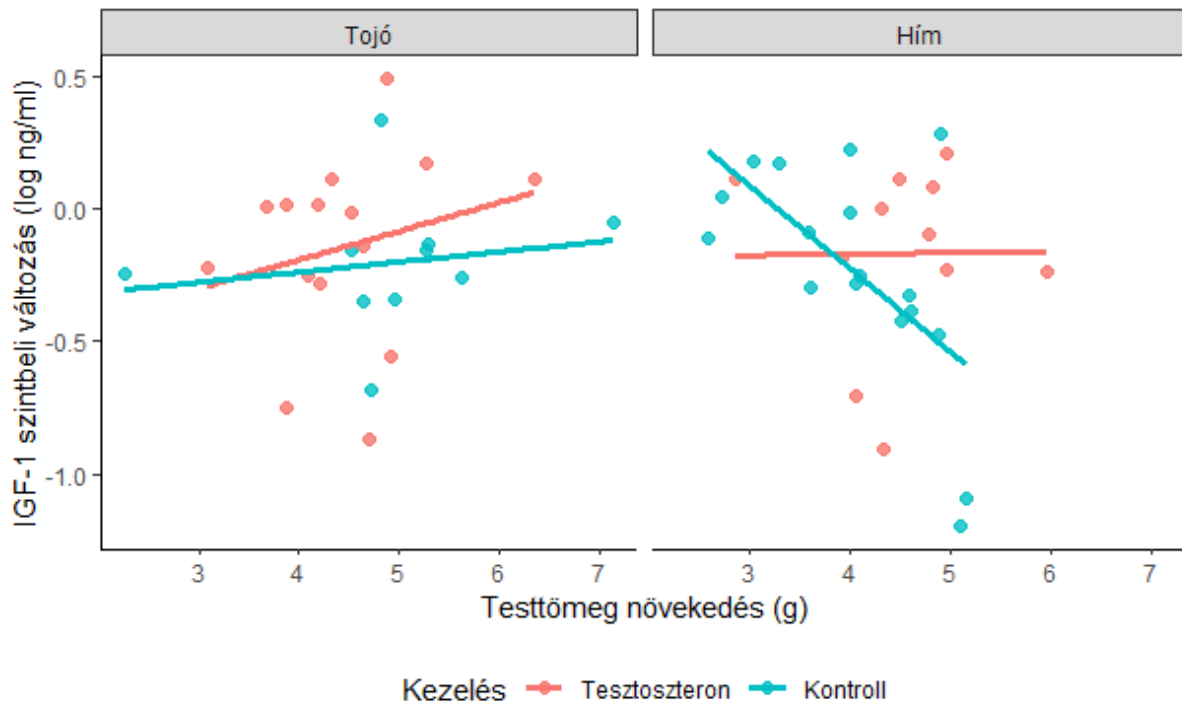
Ezzel szemben az IGF-1 hormonszint változását befolyásolta a kezelés, a fiókák neme és testtömeg gyarapodása (3. táblázat).

3. táblázat: Az IGF-1 hormon szintben történt változás kapcsolata a tesztoszteron (T) kezeléssel, a fiókák nemével és a testtömeg növekedéssel. A táblázat egy lineáris kevert modell eredményeit mutatja, ahol a függő változó az IGF-1 szintje, a fix hatások a kezelés, a fiókák ivara, és testtömegének változása, valamint a testtömeg változásának interakciója a kezeléssel és az ivarral. A tengelymetszet (intercept) a hímeket és a kontroll fiókákat jelöli. A modellben a fészekalj azonosítója random intercept-ként szerepelt.

hatás	paraméterbecslés	átlag hibája (SE)	statisztikai próba értéke	p-érték
(Intercept)	-0,15	0,08	-1,73	0,091
Kezelés (T)	-0,06	0,09	-0,68	0,498
Ivar (Tojó)	-0,05	0,10	-0,56	0,581
Testtömeg változás	0,26	0,10	2,74	0,009
Kezelés (T): testtömeg változás	-0,26	0,10	-2,46	0,018
Ivar (Tojó): testtömeg változás	-0,27	0,11	-2,55	0,014

Szignifikáns különbség volt a fészek között abban, hogy a fiókák IGF-1 hormon szintje hogyan változott a kezelés során ($p = 0,040$). A testtömeg növekedése, a fiókák nemével és a kezeléssel együtt, szignifikánsan hatott az IGF-1 hormon változására (3. táblázat, ivar: $p = 0,014$; kezelés: $p = 0,018$).

A hím fiókák közül, azok IGF-1 szintje növekedett leginkább, amelyeknek a testtömege a leginkább növekedett. A nőstény fiókáknál ilyen növekedés nem figyelhető meg, vagy éppen az ellenkezője történt (7. ábra).



7. ábra: A tesztoszteron kezelés hatással volt a növekedés és az IGF-1 változásának kapcsolatára. A kapcsolat mindkét ivarnál megfigyelhető, de a kezelés hatása a tojóknál erősebb volt.

A tesztoszteron kezelés negatív hatással volt a testtömeg növekedés és az IGF-1 szint változásának kapcsolatára, mind a két nemnél. A hímek esetében ez a kapcsolat pozitív maradt. A nőstény fiókák esetében a különböző egyedek minél jobban növelték a testtömegüket a kezelés során, annál jobban csökkent az IGF-1 hormon szintjük.

Diszkusszió

Hipotézisünket, miszerint a barkóscinege fiókák esetében a tesztoszteron serkentő hatással lesz a növekedésre, eredményeink cáfolják. A tesztoszteron kezelt és kontroll fiókák között nem alakult ki különbség sem testtömegben, sem pedig csüd- vagy szárnyhosszban (2.

ábra). Kimutattuk, hogy a kezeléstől függetlenül a hím fiókák gyorsabban nőnek, mint a tojó fiókák. Ugyanakkor a vizsgálatunk komplex kapcsolatot tárt fel az IGF-1 szint változása, a testtömeg növekedése és az ivar között. Eredményeink arra utalnak, hogy az androgének nem befolyásolják közvetlenül a növekedést, és azok hatása a növekedés és az ivari dimorfizmus kialakítására korlátozott és áttételes lehet.

Bár a kezelés nem volt hatással a testméret növekedésére, az bebizonyosodott, hogy a hím barkóscinege fiókák testtömege ténylegesen gyorsabban gyarapodik, mint a nőtény fiókáké (Darolová és mtsai., 2008). A barkóscinegékre felnőttkorban ivari dimorfizmus jellemző: a hímek kis mértékben bár, de nagyobbak, mint a tojók, és vizsgálatunk megerősítette, hogy az az ivari különbség már a fiókakori fejlődés késői szakaszában is tetten érhető. A felnőtt barkóscinegék esetében a hímek IGF-1 szintje is magasabb, mint a tojóké (Tóth és mtsai., 2022), ám a jelen vizsgálatban nem találtunk különbséget a fiókák IGF-1 szintje között sem 4, sem 8 napos korban. Fióka korban ezzel szemben más vizsgálatban azt találták, hogy a vörösbegyű kékmadar (*Sialia sialis*) fiókák esetében a nőtény fiókák IGF-1 szintje magasabb a kirepülést megelőzően, mint a hím fiókáké (Ridenour és mtsai., 2023).

A barkóscinege fiókákon végzett tesztoszteron kezelés nem volt hatással a testméret és a testtömeg növekedésére. A vizsgálatunkkal szemben más kutatások azt mutatják, hogy a tesztoszteronnak pozitív hatása lehet a fiókák testtömeg és testméretbeli növekedésére (Navara és mtsai., 2006; Schwabl, 1996). Mint ahogy azt a fentiekben láttuk, a tesztoszteron növekedést szabályozó hatása igen változatos lehet az egyes fajoknál, így elképzelhető, hogy még énekesmadarakon belül is a tesztoszteron különböző hatással van a növekedésre és az ivari dimorfizmus kialakulására. A kezelés sikeres volt, ugyanis, az ezzel a módszerrel kezelt 12 db fióka tesztoszteron szintje jelentősen ($p = 0,043$) megnőtt a kontroll fiókákéhoz képest (1. ábra). Mindkét kezelési csoportban egyenlő arányban voltak a nőtény és hím fiókák. A validációs előkísérletet olyan fiókákon végeztük, amelyek nem vettek részt a kísérletben. Ennek oka, hogy a kis (alig 4 grammos) fiókák számára a napi vérvétel veszélyes lett volna, és negatív hatással lehetett volna növekedésükre is. Így a kísérletben használt protokoll eltért a validációs protokolltól, ugyanis a kísérletben nem ellenőriztük a fiókák tesztoszteron szintjét minden kezelés után. Viszont a validációban részt vett fiókák életkora megegyezett a vizsgálatban részt vett egyedekével, ezért megítélésünk szerint ez alkalmas volt annak igazolására, hogy a kezelés önmagában befolyásolta a vérkeringésben lévő tesztoszteron szintet. Másik magyarázat arra, hogy a tesztoszteron kezelés nem befolyásolta a növekedés mértékét az lehet, hogy a tesztoszteron dózis, amelyet alkalmaztunk, kevésnek vagy túl soknak bizonyult. Egy előző vizsgálatban kimutatták, hogy az alkalmazott tesztoszteron dózis csak egy bizonyos mértékig

fejt ki pozitív hatást a növekedésre (Muriel, Perez-Rodriguez, és mtsai., 2015). Azonban abban az esetben is tapasztalható szignifikáns különbség, ha túl kicsi, vagy túl nagy dózisu tesztoszteronnal kezeljük a fiókákat. Az általunk használt dózissal megegyező tesztoszteron kezelést, valamint a validáláshoz használt időt, egy másik vizsgálatban, hasonlóan természetes körülmények között, mások sikeresnek találták kormos légykapó fiókák (*Ficedula hypoleuca*) esetén (Goodship & Buchanan, 2007). Nem kizárható, hogy a kormos légykapókkal ellentétben, a barkóscinegék esetében ekkora tesztoszteron dózis nem okoz látványos változást a növekedésben. Egy további lehetséges magyarázat pedig a két vizsgálat közötti különbségre az lehet, hogy Goodship & Buchanan (2007) a tesztoszteron kezelés protokollját idősebb (13-14 napos) fiókákön validálta, ezzel szemben mi a dózis validációját is 4 napos fiókákön végeztük. Elképzelhető azonban az is, hogy az alkalmazott tesztoszteron kezelést túl későn kezdtük el. A fiókák testmérete már a tojásban eldől, és a tojó képes változtatni a tojásba juttatott androgének mennyiségét, amely befolyással lehet a fiókák kikeléskori testméretére és kikelési sorrendjére (Darolová és mtsai., 2008; Schwabl, 1996). Énekesmadarak esetében korábbi kutatások kimutatták, hogy a még tojásként növelt tesztoszteron szint pozitív közvetlen és közvetett (a kéregetési viselkedésen keresztül (Goodship & Buchanan, 2007; Price, 1998; Schwabl, 1996)) hatással van a fiókák növekedésére. Ez az eredmény ivartól függetlenül megjelenik, közvetlenül kikelés után és a fióka periódusban is; de csupán csak egy bizonyos dózismennyiségig (Muriel, Perez-Rodriguez, és mtsai., 2015). Ezzel szemben mi a tesztoszteron kezelést, valamint a fiókák mérését a kikeléstől számított 4. napon kezdtük el és a 8. napig folytattuk, amikor a barkóscinege fiókák növekedése a lineáris szakaszban van. Bár más kísérletből kiderült, hogy a tesztoszteron akkor is kifejti pozitív hatását a növekedésre, ha csak fióka korban kezdjük el a tesztoszteron kezelését, ezt a hatást eddig csak a kéregetési viselkedésen keresztül vizsgálták (Goodship & Buchanan, 2007). Tehát közvetett módon akkor is kifejti a hatását a tesztoszteron a pár napos fiókák növekedésére, ha a tojásokat nem kezeljük.

A nemi hormonoknak, például a tesztoszteronnak, hosszantartó hatásuk van. Elképzelhető, hogy ebben a rendszerben a tesztoszteron hatása később jelenik meg, és nem a vázrendszer növekedésére, hanem majd a testtömegre, esetleg az első vedlés után megjelenő tollakra fejt ki hatását. A jövőben további kutatásokra van szükség, hogy ellenőrizzük, pontosan milyen hosszú távú hatása van a fióka kori tesztoszteron kezelésnek a vedlési, vándorlási és szaporodási időszakban.

A tesztoszteron hatása tehát lehet serkentő és gátló is. Számos gyík fajnál a tesztoszteronnak egy bipotenciális képességéről számoltak be (Cox és mtsai., 2009; Duncan és mtsai., 2020). *Thamnophis* és *Sceloporus* fajok esetében újszülött hímekre nem volt hatása a

tesztoszteron kezelésnek, ezzel szemben az újszülött nőtényekre és a felnőtt hímekre gátló hatása volt a tesztoszteronnak (Crews és mtsai., 1985; Klukowski és mtsai., 1998; Lerner & Mason, 2001). Ezzel ellentétben a barna anolisz hímek, kasztrálást majd tesztoszteron kezelést követően, szignifikánsan nagyobbra nőttek, mint kasztrált és kezeletlen hím társaik (Cox és mtsai., 2009). A madarakkal kapcsolatos ivari hormonkezelések leginkább ezen hormonok (legtöbb esetben tesztoszteron, ösztradiol, 5α -dihidrotesztoszteron) kérégetésre, madárénekre, valamint az immunrendszerre kifejtett hatását vizsgálja. Tudjuk, hogy ezek a hormonok fontos szerepet játszanak a növekedésben, főleg a serdülőkor és a szaporodási időszak alatt (Mauras és mtsai., 1996). Ám arról, hogy pontosan milyen mechanizmusokon keresztül hatnak a madarak esetében továbbra is korlátozott ismereteink vannak. Elképzelhető, hogy a barkóscinegék esetében a nemi hormonok növekedésre gyakorolt hatása, a növekedési hormonéhoz képest, elhanyagolható.

A barkóscinege fiókák esetében kikeléskor a nőtény fiókák, egy fészken belül, nagyobb testtömeggel rendelkeznek, mint a hím fiókák. Viszont kirepüléskor a hím fiókák általában nagyobb testtömeggel, csüd- és szárnyhosszal rendelkeznek, de a két nem testméretei közötti különbség felnőtt korban sem lesz nagyobb. Akárcsak más kutatásokban, mi is azt találtuk, hogy a hím fiókák gyorsabban növekedtek, mint a nőtények (Darolová és mtsai., 2008), de mind a két nemre igaz, hogy a csüd hossza arányosan növekszik a testtömeggel (3. ábra). Azonban azt figyeltük meg, hogy a fiókakori növekedési periódus vége felé a hím fiókák erőteljesebb növekedésbe kezdenek. Bár csüd hosszuk növekedése nem tér el szignifikánsan a nőtény fiókákétól (4.b ábra), a testtömeg növekedésében (4.a ábra) ezzel szemben szignifikáns különbség található a két nem között. Ez következhet abból, hogy a hím fiókáknak nem a vázrendszere, hanem az izomzata nő jelentősen gyorsabban a növekedési periódus végén, azaz a kirepülési időszak előtt.

A hormonok hatásának ereje, ivartól függetlenül, nagyban függ attól, hogy a célterületen milyen sűrűségben és milyen érzékenységgel vannak jelen az őket érzékelni képes receptorok. A madarak esetében a szárnyizmok jelentős hányadát kiteszik egy madár testtömegének (Fuxjager és mtsai., 2012), és kutatások azt találták, hogy ezekben az izomkötegekben nagy számban találhatóak androgén receptorok (Feng és mtsai., 2010), mely receptorok aktivitása a szaporodási időszakban felerősödik. A vizsgálatunk során sajnos nem került feljegyzésre elég adat a fiókák szárnyadatairól, hogy biztosan meg tudjuk állapítani, milyen kapcsolat van a kezelés és a szárnyak növekedési rátája között. Elképzelhető, hogy a kezelés hatással volt a szárnyhossz, esetleg a szárnyizomzat növekedési rátájára is, ám ahhoz, hogy ezt kiderítsük újabb vizsgálatokat kell végeznünk.

Annak ellenére, hogy a kutatások feltárták azt, hogy az IGF-1 közvetett módon hatással van a nemi hormonok termelésére (Daftary & Gore, 2003, 2005; Lodjak & Verhulst, 2020), valamint fontos szerepet játszik a szaporodási szervek megfelelő növekedésében és működésében (Dantzer & Swanson, 2012; Lodjak & Verhulst, 2020), madarak esetében kevés kutatás foglalkozik azzal, pontosan milyen kapcsolat is van az inzulinszerű növekedési faktor-1 és a nemi hormonok között. Hipotézisünk az volt, hogy a tesztoszteron serkentő hatást fejt ki az IGF-1 szint termelésére, ami majd ezáltal hozzájárul a hímek intenzívebb növekedéséhez. Más, sövénygyíkokon végzett kutatás kimutatta, hogy fiatal gyíkokban és hím felnőttékben a tesztoszteron gátolja a májban termelődő IGF-1 mRNS termelését, mely hatással volt a növekedésre. Az IGF-1 mRNS csökkenésével, egy idő után, a keringésben lévő IGF-1 szintje is csökkennie kell. A fiatalok esetében a növekedési rátájukra is negatív hatással volt a kezelés (Duncan és mtsai., 2020).

A kezelési csoportok IGF-1 szintje között nem volt különbség a kezelés kezdetén. Ugyanakkor, más vizsgálathoz hasonlóan mi is azt találtuk, hogy azoknak a fiókáknak (ivartól függetlenül), amelyek nagyobb testtömeggel rendelkeztek, nagyobb volt az IGF-1 szintjük, mint azoknak a fiókáknak, amelyek kisebb testsúllyal rendelkeztek (Lodjak és mtsai., 2017). A kezdeti IGF-1 szint meghatározó volt a fiókák növekedési rátájának szempontjából is. Azok a fiókák, amelyek magasabb kezdeti IGF-1 szinttel rendelkeztek (kezeléstől függetlenül) később érték el a maximális növekedésüket (6. ábra).

A 8. napon mért IGF-1 szintben sem alakult ki különbség, sem a két nem, sem pedig a két kezelési csoport között. Ezzel szemben szignifikáns kapcsolatot fedeztünk fel az IGF-1 szint változása és a fiókák testtömeg növekedése között (7. ábra). A hím kontroll egyedek esetében a fiókák testtömegének gyarapodása pozitív kapcsolatban áll az IGF-1 szintjük változásával, tehát azok a fiókák, amelyek a legtöbbet híztak, azok IGF-1 szintje is még kis mértékben növekedett. Ezzel szemben, azok a hím fiókák, amelyek tömeggyarapodása kisebb volt, azok IGF-1 szintje a kezelés eleje és vége között jellemzően csökkent. Ez összefüggésben állhat azzal, hogy a kezelés kezdetén már nagyobb testtömeggel rendelkező fiókák relatíve már kevesebbet híznak, és ezért növekedésük már lassuló pályán lehet, amit csökkenő IGF-1 szint kísér, szemben azokéval, amelyek még aktívan növekednek ebben az időszakban. A nőstény kontroll fiókák esetében ez az IGF-1 szintbeli változás a növekedés előrehaladtával állandó, ami a nőstények egyenletesebb növekedésével lehet kapcsolatban. Ezek az eredmények összhangban vannak egy friss vizsgálat eredményeivel, ahol kimutatták, hogy vörösbegyű kékmadár fiókáknál a fiókakor kezdetén mért IGF-1 szint kapcsolatban állt a fiókák tömeggyarapodásával, azonban ez az összefüggés csak a hím fiókákra volt jellemző. Továbbá,

az IGF-1 szint kísérletes növelése is nagyobb tömegnövekedéshez vezetett, ami megerősíti azt az elképzelést, hogy az IGF-1 szint változása kapcsolatban áll a növekedés mértékével (Ridenour és mtsai., 2023).

Ugyanakkor, a tesztoszteron kezelés mindkét csoport esetében gyengítette ezt az összefüggést. Míg hím fiókák esetében a testtömeg gyarapodás és az IGF-1 szint változása közötti kapcsolat továbbra is pozitív (bár gyengébb, mint a kontrolloknál), tojók esetében a kapcsolat negatívvá válik. A tesztoszteronnal kezelt fiókák IGF-1 szintjében a változás a testtömeg növekedésével folyamatosan csökken. Tehát amíg a tesztoszteron kezelés a növekedésre nem hatott önmagában, nőstények esetén úgy tűnik, gátló hatást fejtett ki az IGF-1 szintre, és különösen azoknál a fiókáknál, amelyeknek testtömege egyébként sokat gyarapodott. Bár felnőtt hím madarakban úgy látszik, hogy a tesztoszteronnak van egy pozitív hatása az IGF-1 mRNS expressziójára (Fuxjager és mtsai., 2012), azt nem tudjuk, hogy milyen hatása van az IGF-1 szint változására más rendszerekben, illetve tojókban.

Látjuk, hogy a tesztoszteronnak egy komplex, eddig feltérképezetlen, hatása van az IGF-1 szint változására. Tudjuk, hogy az IGF-1 szint csökkenésével a tömeg növekedése lelassul, az ivarszervek nem fejlődnek és nem működnek megfelelően (Dantzer & Swanson, 2012; Lodjak & Verhulst, 2020). Elképzelhető, hogy a kezelt fiókák azért nem nőttek nagyobbra, mint a kontroll fiókák, mert az IGF-1 szintjük csökkent. Viszont érdekes módon ez nem eredményezte azt, hogy a kontroll fiókák nagyobb testtömegre, csüd- és szárnyhosszra tettek volna szert. Mivel nem találtunk különbséget a növekedésben sem a kezelési csoportok, sem pedig a nemek között, így megeshet, hogy ebben a rendszerben a tesztoszteronnak nem volt sem pozitív, sem negatív hatása a növekedésre. Bár a barkóscinegékénél az ivari dimorfizmus már korán megjelenik (Darolová és mtsai., 2009), az eredmények szerint ennek kialakításában a tesztoszteron nem játszik szerepet ilyen fiatal korban. Elképzelhető viszont, hogy amíg az androgéneknek nincs befolyásoló hatásuk, addig az ösztrogéneknek van. A nőstény gyíkok és kígyók esetében létezik egy hipotézis, miszerint nem az androgének által okozott maszkulinizáció, hanem az ösztrogének és a petefészek okozta feminizáció okozza a növekedésbeli, ezáltal testméretbeli különbséget a nemeknél (Kubička és mtsai., 2016). Elképzelhető, hogy a barkóscinegék növekedésére nem a tesztoszteron (vagy más androgének) van serkentő hatással, hanem ezt a pozitív hatást gátolják más hormonok pl. ösztrogének. A jövőben fontos lenne olyan vizsgálatokat végezni, amelyek az androgének mellett az ösztrogének növekedést befolyásoló hatását vizsgálják madarak esetében. Tudomásunk szerint ilyen vizsgálatot idáig még nem végeztek. Egy ilyen integratív vizsgálat a növekedés

hormonális szabályozásának egy új perspektíváját nyithatja meg és hozzájárulhat a két hormonrendszer (HPG- és HPS-tengely) közötti kapcsolat jobb megértéséhez.

Összefoglalás

Az állatvilágban gyakori, hogy a nemek megjelenésében különbség van, ezt ivari dimorfizmusnak nevezzük. A különbség megnyilvánulhat a nemek kültakarójának mintázatában és színében, a testméretben, valamint egyéb függelékben is. Az ivari dimorfizmus kialakulását meghatározó ultimális hatásokat (pl. természetes és szexuális szelekció) sokat vizsgálták, de annak proximális háttere kevésbé ismert. A jelen vizsgálatban az ivari dimorfizmus kialakulásában szerepet játszó endokrin rendszerek közötti interakciót vizsgáltuk. Az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) hatással van a sejtek differenciálódására, valamint pozitív hatással van a növekedésre. Több rendszertani csoportnál kapcsolatot találtak a nemi hormonok, leginkább az androgének és a növekedést szabályozó mechanizmusok (főként az IGF-1 szintje) között. Mi arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a barkóscinegék esetében a nemi hormonok jelenléte befolyásolja-e az IGF-1 szintet, majd ezáltal a fiókák növekedését és az ivari dimorfizmus kialakulását. Hipotézisünk az volt, hogy a fiókakori tesztoszteron serkentő hatást fejt ki az IGF-1 szint termelődésére, és ezáltal hozzájárul a hímek intenzívebb növekedéséhez.

A vizsgálat során azt találtuk, hogy bár a hím fiókák testtömege gyorsabban gyarapodott, mint a lánytestvéreiké, a tesztoszteron kezelés nem volt hatással sem a hím, sem a nőstény fiókák növekedésére, valamint az IGF-1 szintjük változására. Ugyanakkor felfedeztünk egy komplex kapcsolatot a kezelés és az IGF-1 szint változása között. A kezelt fiókák plazma IGF-1 szintje a kezelés végére nagyobb ütemben csökkent, mint a kontroll kezelést kapott fiókák esetében.

Összességében a vizsgálatunk nem támogatja azt az elképzelést, hogy az androgén hormonok közvetlenül hozzájárulnának a barkóscinegék testméretbeli ivari dimorfizmusának kialakításához, viszont felvetik annak lehetőségét, hogy ivar-specifikus módon befolyásolják az IGF-1 szekrécióját, és ezáltal hosszabb távon fejthetik ki hatásukat.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Lendvai Ádám Zoltánnak, hogy az elemzések és a dolgozat írása közben is folyamatosan segítséget nyújtott és támogatott. A terepi vizsgálatokban és adatgyűjtésben Katharina Mahr, Nürettin Beşer, Rédei Gábor, Nikolas Huber, Lendvai Ádám Zoltán és Tóth Zsófia vettek részt. A tesztoszteron koncentrációk meghatározásában köszönöm Csernus Brigitta közreműködését. Külön meg szeretném köszönni a Hortobágy Nemzeti Park és a Hortobágyi Halgazdaság vezetőségének, amiért engedélyezték, hogy a park területén végezzük el a vizsgálatot. Szeretném megköszönni Kozma Ferenc Sándor és Ladányi Bálint szaktársaimnak, akik a laborban végzett munka folyamán támogattak. A kutatást anyagilag támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal két OTKA pályázata (K113108, K139021), valamint egy osztrák-magyar kétoldalú együttműködési pályázata (TÉT: 2019-2.1.11-TÉT-2019-00043). A minták elemzése és a dolgozat megírása a Debreceni Egyetem Tehetséggondozó Programján belül (DETEP) történt.

Irodalomjegyzék

- Adkins-Regan, E., Abdelnabi, M., Mobarak, M., & Ottinger, M. A. (1990). Sex steroid levels in developing and adult male and female zebra finches (*Poephila guttata*). *General and Comparative Endocrinology*, 78(1), 93–109. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90051-m](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90051-m)
- Bantock, T. M., Prys-Jones, R. P., & Lee, P. L. M. (2008). New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01999.x>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *Journal of Statistical Software*, 67(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Blondel, J., Perret, P., Anstett, M., & Thébaud, C. (2002). Evolution of sexual size dimorphism in birds: Test of hypotheses using Blue Tits in contrasted Mediterranean habitats. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 440–450. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00397.x>
- Burger, H. G. (2002). Androgen production in women. *Fertility and Sterility*, 77, 3–5. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)02985-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)02985-0)
- Colgan, P. W., Nowell, W. A., & Stokes, N. W. (1981). Spatial aspects of nest defence by pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*): Stimulus features and an application of catastrophe theory. *Animal Behaviour*, 29(2), 433–442. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(81\)80103-0](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(81)80103-0)
- Cox, R. M., Stenquist, D. S., & Calsbeek, R. (2009). Testosterone, growth and the evolution of sexual size dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(8), 1586–1598. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01772.x>
- Crews, D., Diamond, M. A., Whittier, J., & Mason, R. (1985). Small male body size in garter snake depends on testes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1985.249.1.R62>

- Daftary, S. S., & Gore, A. C. (2003). Developmental Changes in Hypothalamic Insulin-Like Growth Factor-1: Relationship to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*, 144(5), 2034–2045. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221025>
- Daftary, S. S., & Gore, A. C. (2005). IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 230(5), 292–306. <https://doi.org/10.1177/153537020523000503>
- Dale, J., Dey, C. J., Delhey, K., Kempenaers, B., & Valcu, M. (2015). The effects of life history and sexual selection on male and female plumage colouration. *Nature*, 527(7578), Art. 7578. <https://doi.org/10.1038/nature15509>
- Dantzer, B., & Swanson, E. M. (2012). Mediation of vertebrate life histories via insulin-like growth factor-1. *Biological Reviews*, 87(2), 414–429. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00204.x>
- Darolová, A., Křištofik, J., & Hoi, H. (2008). Female biased hatching order in nestling bearded tits: A compensatory maternal tactic to reduce developmental differences. *Folia Zoologica*, 57, 231–239.
- Darolová, A., Křištofik, J., & Hoi, H. (2009). Extreme brood sex ratios in Bearded Tits *Panurus biarmicus*. *Ibis*. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2008.00879.x>
- Duncan, C. A., Cohick, W. S., & John-Alder, H. B. (2020). Testosterone Reduces Growth and Hepatic *IGF-1* mRNA in a Female-Larger Lizard, *Sceloporus undulatus*: Evidence of an Evolutionary Reversal in Growth Regulation. *Integrative Organismal Biology*, 2(1), obaa036. <https://doi.org/10.1093/iob/obaa036>
- Dunn, P. O., Whittingham, L. A., & Pitcher, T. E. (2001). Mating Systems, Sperm Competition, and the Evolution of Sexual Dimorphism in Birds. *Evolution*, 55(1), 161–175. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01281.x>
- Feng, N. Y., Katz, A., Day, L. B., Barske, J., & Schlinger, B. A. (2010). Limb Muscles Are Androgen Targets in an Acrobatic Tropical Bird. *Endocrinology*, 151(3), 1042–1049. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0901>
- Fuxjager, M. J., Barske, J., Du, S., Day, L. B., & Schlinger, B. A. (2012). Androgens Regulate

- Gene Expression in Avian Skeletal Muscles. *Plos One*, 7(12), e51482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051482>
- Goodship, N. M., & Buchanan, K. L. (2007). Nestling testosterone controls begging behaviour in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Hormones and Behavior*, 52(4), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.06.008>
- Griggio, M., & Hoi, H. (2011). An experiment on the function of the long-term pair bond period in the socially monogamous bearded reedling. *Animal Behaviour*, 82.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.09.016>
- Groothuis, Ton. G. G., & Schwabl, H. (2008). Hormone-mediated maternal effects in birds: *Mechanisms* matter but what do we know of them? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1497), 1647–1661.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.0007>
- Hoi, H., & Hoi-Leitner, M. (1997). An alternative route to coloniality in the bearded tit: Females pursue extra-pair fertilizations. *Behavioral Ecology*, 8(2), 113–119.
<https://doi.org/10.1093/beheco/8.2.113>
- Jones, J. I., & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions*. *Endocrine Reviews*, 16(1), 3–34.
<https://doi.org/10.1210/edrv-16-1-3>
- Ketterson, E. D., & Nolan, V. Jr. (1992). Hormones and Life Histories: An Integrative Approach. *The American Naturalist*. <https://doi.org/10.1086/285396>
- Kissner, K., Weatherhead, P., & Francis, C. (2003). Sexual size dimorphism and timing of migration in birds. *Journal of evolutionary biology*, 16, 154–162.
<https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00479.x>
- Klukowski, M., Nelson, C. E., & Jenkinson, N. M. (1998). Effects of Testosterone on Locomotor Performance and Growth in Field-Active Northern Fence Lizards, *Sceloporus undulatus hyacinthinus*. *Physiological Zoology*, 71(5), 506–514.
<https://doi.org/10.1086/515949>
- Kozlowski, C. P., & Ricklefs, R. E. (2011). The effects of brood size on growth and steroid

- hormone concentrations in nestling eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *General and Comparative Endocrinology*, 173(3), 447–453.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.07.002>
- Kubička, L., Schořálková, T., Červenka, J., & Kratochvíl, L. (2016). Ovarian control of growth and sexual size dimorphism in a male-larger gecko. *Journal of Experimental Biology*, jeb.146597. <https://doi.org/10.1242/jeb.146597>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). **ImerTest** Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82(13).
<https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Leevers, S. J. (2001). Growth control: Invertebrate insulin surprises! *Current Biology*, 11(6), R209–R212. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00107-5)
- Lerner, D. T., & Mason, R. T. (2001). The Influence of Sex Steroids on the Sexual Size Dimorphism in the Red-Spotted Garter Snake, *Thamnophis sirtalis concinnus*. *General and Comparative Endocrinology*, 124(2), 218–225.
<https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7695>
- Lodjak, J., Mägi, M., Sild, E., & Mänd, R. (2017). Causal link between insulin-like growth factor 1 and growth in nestlings of a wild passerine bird. *Functional Ecology*, 31(1), 184–191. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12679>
- Lodjak, J., Mand, R., & Magi, M. (2018). Insulin-like growth factor 1 and life-history evolution of passerine birds. *Functional Ecology*, 32(2), 313–323. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12993>
- Lodjak, J., & Verhulst, S. (2020). Insulin-like growth factor 1 of wild vertebrates in a life-history context. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110978.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110978>
- Mauras, N., Rogol, A. D., Haymond, M. W., & Veldhuis, J. D. (1996). Sex Steroids, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-1: Neuroendocrine and Metabolic Regulation in Puberty. *Hormone Research*, 45(1–2), 74–80. <https://doi.org/10.1159/000184763>
- Muriel, J., Perez-Rodriguez, L., Puerta, M., & Gil, D. (2015). Diverse dose-response effects

- of yolk androgens on embryo development and nestling growth in a wild passerine. *Journal of Experimental Biology*, 218(14), 2241–2249.
<https://doi.org/10.1242/jeb.118257>
- Muriel, J., Salmon, P., Nunez-Buiza, A., de Salas, F., Perez-Rodriguez, L., Puerta, M., & Gil, D. (2015). Context-dependent effects of yolk androgens on nestling growth and immune function in a multibrooded passerine. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(8), 1476–1488. <https://doi.org/10.1111/jeb.12668>
- Narasimhan, S. D., Yen, K., & Tissenbaum, H. A. (2009). Converging Pathways in Lifespan Regulation. *Current biology : CB*, 19(15), R657–R666.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.013>
- Navara, K. J., Hill, G. E., & Mendonça, M. T. (2006). Yolk Testosterone Stimulates Growth and Immunity in House Finch Chicks. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(3), 550–555. <https://doi.org/10.1086/501054>
- Owens, I. P. F., & Hartley, I. R. (1998). Sexual dimorphism in birds: Why are there so many different forms of dimorphism? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1394), 397–407. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0308>
- Price, K. (1998). Benefits of begging for yellow-headed blackbird nestlings. *Animal Behaviour*, 56(3), 571–577. <https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0832>
- Promislow, D. E. L., Montgomerie, R., & Martin, T. E. (1992). Mortality Costs of Sexual Dimorphism in Birds. *Proceedings: Biological Sciences*, 250(1328), 143–150.
- Ridenour, M., Spicer, L. J., & Grindstaff, J. L. (2023). Insulin-like growth factor 1 and the hormonal mediation of sibling rivalry. *General and Comparative Endocrinology*, 330, 114163. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114163>
- Schwabl, H. (1993). Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), 11446–11450. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11446>
- Schwabl, H. (1996). Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 114(3), 271–276.

[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(96\)00009-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(96)00009-6)

Schwabl, H., Palacios, M. G., & Martin, T. E. (2007). Selection for rapid embryo development correlates with embryo exposure to maternal androgens among passerine birds.

American Naturalist, 170(2), 196–206. <https://doi.org/10.1086/519397>

Silverin, B., & Sharp, P. (1996). The development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in juvenile great tits. *General and Comparative Endocrinology*, 103(2), 150–166.

<https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0106>

Spitzer, G. (1972). Jahreszeitliche Aspekte der Biologie der Bartmeise(*Panurus biarmicus*).

Journal für Ornithologie, 113(3), 241–275. <https://doi.org/10.1007/BF01647507>

Tóth, Z., Mahr, K., Ölveczki, G., Őri, L., & Lendvai, A. (2022). Food Restriction Reveals Individual Differences in Insulin-Like Growth Factor-1 Reaction Norms. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 826968. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.826968>

Winquist, T., & Lemon, R. E. (1994). Sexual Selection and Exaggerated Male Tail Length in Birds. *The American Naturalist*, 143(1), 95–116. <https://doi.org/10.1086/285597>

Zhang, M., Yang, Q., Shi, R., Wang, J., Zhang, Z., Yang, Y., Li, W., Chen, S., & Wang, N. (2022). Effects of long-term sex steroid hormones (estradiol and testosterone)–supplemented feeds on the growth performance of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*.

<https://doi.org/10.1007/s10695-022-01125-w>

Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: Formation, function, and regulation†.

Biology of Reproduction, 99(1), 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/iroy059>