



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA

in

Biologia Evoluzionistica ed Ecologia

In convenzione con l'Università degli studi di Parma

CICLO XXIX

COORDINATORE Prof. Guido Barbujani

Studi ecofisiologici sull'apparato cutaneo degli Anuri nel corso dell'ontogenesi: struttura ed ultrastruttura delle ghiandole sinciziali in *Agalychnis callidryas*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/07

Dottorando

Dott. Rota Elisa

Tutore

Prof. Leis Marilena

Anni 2014/2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1. Generalità sugli Anuri	1
1.2. Ecologia, biogeografia e biologia della conservazione degli Anfibi	3
1.2.1. Impatto umano sulle comunità di Anfibi	8
1.2.2. Declino delle popolazioni di Anfibi	12
1.2.3. Cause del declino degli Anfibi: fattori ambientali	14
1.2.4. Cause del declino degli Anfibi: la chitridiomicosi ed altre patologie	17
1.2.5. Prelievo di Anfibi dall'ambiente a scopo di consumo	20
1.2.6. Specie esotiche ed invasive	22
1.2.7. Salvaguardia e conservazione degli Anfibi	24
1.2.8. Gestione delle popolazioni in cattività e loro trasferimento	26
1.3. Hylidae	29
1.4. Ranidae	32
1.5. Agalychnis callidryas	33
1.6. La pelle degli Anfibi	36
1.6.1. Ghiandole del tegumento	37
1.6.2. Ghiandole sierose negli Anuri	40
1.6.3. Difese chimiche	42
2. SCOPO	45

3. MATERIALI E METODI	pag. 46
3.1. Esempolari studiati	46
3.2. Microscopia ottica ed elettronica	46
3.3. Analisi delle immagini tramite trasformata di Fourier	49
4. RISULTATI	50
4.1. Ghiandole lipidiche in larve postmetamorfiche e adulti	50
4.2. Ghiandole sierose in larve e adulti	51
4.3. Maturazione dei granuli secretori nelle ghiandole sierose	53
4.4. Analisi delle substrutture ripetitive tramite trasformata celere di Fourier	57
5. DISCUSSIONE	59
5.1. Ghiandole a lipidi	59
5.2. Ghiandole sierose	61
5.3. Ghiandole larvali	64
6. CONCLUSIONI	66
7. RINGRAZIAMENTI	69
8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	70

1. INTRODUZIONE

1.1. Generalità sugli Anuri

Gli Anfibi Anuri (Amphibia, Anura), comunemente detti “rane” e “rospi”, sono presenti in tutti i continenti, tranne l’Antartide, e nella maggior parte delle isole. Sono un gruppo molto diversificato, composto da oltre 6200 specie. Vivono nella maggior parte degli habitat acquatici e terrestri, dalle pianure all’alta montagna: si sono adattati a vivere anche in zone aride o temperate-fredde, ma la loro incapacità di adattarsi all’acqua salata li ha quasi completamente esclusi dagli habitat estuarini e marini. La loro maggiore diversità si riscontra nei climi umidi tropicali e quasi la metà di tutte le specie di Anuri del nuovo Mondo vive nelle regioni tropicali (Stuart et al. 2008).

Rane e rospi sono inconfondibili a causa dei loro corpi corti e privi di coda, delle loro teste ampie e piatte, con bocche larghe, e dei loro arti posteriori lunghi e muscolosi (Fig. 1.1). Questa forma corporea è associata e si è evoluta come adattamento allo spostamento “saltatorio”, cioè tramite salti. I lunghi arti posteriori si estendono in modo sincrono e forniscono la forza propulsiva per sollevare e spingere in avanti il corpo corto della rana, una massa compatta facile da spingere in avanti; la corta colonna vertebrale, il robusto cinto pettorale e gli arti anteriori assorbono facilmente l’urto dell’atterraggio. Le rane saltano regolarmente una distanza da 2 a 10 volte la loro lunghezza corporea ed alcune specie sono in grado di effettuare salti prodigiosi, fino a 30 o 40 volte la lunghezza corporea (Stuart et al. 2008). Non tutte le rane si muovono tuttavia saltando: alcune usano una tipica andatura da tetrapode ed anche quelle che normalmente si muovono saltando possono spostarsi lentamente sui quattro arti per una breve distanza.

Le rane hanno fecondazione esterna, con rare eccezioni. I maschi afferrano tipicamente le femmine in un “amplesso” eseguito in modo tale che le loro cloache si sovrappongano, assicurando la fecondazione delle uova man mano che sono deposte (Fig. 1.2). È comune uno sviluppo indiretto di larve libere (“girini”), sebbene sia presente anche uno sviluppo diretto. Lo sviluppo larvale degli Anuri è molto diverso da quello degli Urodeli e dei Cecilidi. Il girino degli Anuri è diverso dalla ranetta e dall’adulto pienamente sviluppato da un punto di vista strutturale, fisiologico, ecologico e comportamentale: la transizione da girino a ranetta richiede una riorganizzazione completa dell’anatomia e della fisiologia, detta metamorfosi larvale (Fig. 1.2). La differenza radicale tra questi due stadi e tipi di vita può in parte spiegare l’assenza di pedomorfosi e pedogenesi.

Le specie viventi di Anuri condividono una serie di caratteristiche che testimoniano la loro origine monofiletica. Tutte hanno una colonna vertebrale accorciata, costituita da un numero di vertebre uguale o inferiore a nove: la maggior parte dei gruppi ne ha otto. Tutte le vertebre presacrali eccetto la prima (l'atlante) hanno processi trasversi e le costole dorsali sono assenti o ridotte, con una sola estremità articolata (unicapitato) limitata alle vertebre dalla seconda alla quarta in alcuni gruppi primitivi. Le vertebre presacrali sono articolate in modo solido e permettono solo piegamenti limitati in direzione laterale e dorsoventrale. Le vertebre postsacrali sono fuse in un urostilo a forma di bastoncino, che si trova all'interno di una cavità dorso pelvica allungata, formata da ili (iliae) caratteristici, allungati e orientati anteriormente (Fig. 1.3). Gli elementi epipodiali di entrambi gli arti anteriori e posteriori sono fusi alle loro estremità, formando rispettivamente robuste radio-ulne e tibio-fibule. L'articolazione della caviglia è allungata ed è costituita da una coppia di ossa fuse (fibulare o astragalo e tibiale o calcagno), che formano una solida struttura (Fig. 1.3). Tutte le rane sono prive di denti sulla mandibola, tranne *Gastrotheca guentheri* (Anura, Hemifractidae), e hanno grandi spazi linfatici sottocutanei. Il girino degli Anuri, a differenza di quelli degli altri gruppi di Anfibi viventi, ha mascelle prive di denti e provviste di placche cheratinose e denti labiali, sostituiti funzionali ma non omologhi.

Gli aspetti filogenetici degli Anuri sono tuttora controversi e nuove informazioni continuano ad accumularsi sulla base di recenti studi molecolari. In origine, il catalogo dei "Batrachia Salientia" di Boulenger (1882) comprendeva circa 1800 specie, classificate in due sottordini, gli Aglossa, con due famiglie, e i Phaneroglossa, con dodici famiglie divise in due serie, Firmisternia e Arcifera. Anche se questa classificazione era puramente fenetica (morfologica), alcuni di questi caratteri sono tuttora utilizzati nelle attuali classificazioni filogenetiche (Stuart et al. 2008). Intorno al 1920 G.K. Noble tentò per la prima volta di costruire una classificazione evolutiva degli Anuri (Noble 1922), prendendo in considerazione numerosi caratteri tra i quali la dentatura, la struttura del cinto pettorale, le vertebre e la muscolatura: ottenne uno schema universalmente accettato fino al 1960. Vi erano tuttavia problemi per alcuni caratteri e per la loro interpretazione (Sokol 1977). Negli ultimi 30 anni sono stati compiuti notevoli progressi in questo campo di ricerca, ma il primo studio molecolare su larga scala finalizzato alla migliore comprensione delle relazioni tra gli Anuri è stato realizzato solo nel 2006 (Frost et al. 2006) e come primo risultato, alcune specie di rane che si ritenevano strettamente imparentate (ad esempio i generi *Eleutherodactylus* e *Leptodactylus*, e altri generi di "ranidi") risultarono evolutivamente molto distanti (Frost et al. 2006). Questo processo di perfezionamento delle conoscenze evolutive degli Anuri è ancora in corso tramite nuovi e più precisi metodi di analisi molecolare.

Per quanto riguarda l'origine degli Anuri, in base ai reperti fossili si ritiene che i tre gruppi di Anfibi viventi, Anuri (Anura), Urodeli (Caudata) e Cecilidi (Apoda) siano apparsi nel tardo Paleozoico (395 milioni di anni fa), prima della frammentazione della Pangea e si siano gradualmente diversificati nel Mesozoico. La maggior parte dei gruppi di Anuri si è tuttavia diversificata nell'Eocene (Fig. 1.4), probabilmente in corrispondenza di un elevato ricambio di specie di amnioti e della diversificazione di numerosi taxa di insetti (Roelans et al. 2011). La presenza di corridoi terrestri oggi scomparsi sembra sia l'unica ipotesi in grado di spiegare la diversificazione di alcune famiglie di Anuri originarie del Gondwana (Natanura e Microhylidae), la cui diversificazione è avvenuta molto più tardi della separazione del Gondwana negli attuali continenti a sud del pianeta (Van Bocxlaer et al. 2006). Per quanto riguarda la famiglia Ranidae, sembra che vi siano state due vie principali di colonizzazione dal Gondwana alla Laurasia: nella prima via gli antenati degli attuali Ranidi sono stati trasportati dallo spostamento dell'India verso nord e dalla collisione nella regione dell'Himalaya, dalla quale si sono diffusi in Asia ("Out of India"), mentre nella seconda via hanno seguito lo spostamento della placca dell'Australia e della Nuova Guinea. Quando l'India è rimasta isolata dalle altre terre emerse tra il Cretaceo e il Terziario, le estese eruzioni vulcaniche del Deccan hanno reso parte del continente inabitabile e i Ranidi sono sopravvissuti nella regione che oggi comprende il sud dell'India e Sri Lanka, originando generi endemici con habitat molto ristretti (Van Bocxlaer et al. 2006).

Nel genere *Eleutherodactylus*, considerato uno dei più ricchi di specie tra i vertebrati e distribuito in America Centrale, America del Sud e isole dei Caraibi, recenti studi filogenetici basati su datazioni molecolari hanno identificato tre diversi raggruppamenti, ciascuno associato ad una delle tre regioni di distribuzione: il raggruppamento dell'America centrale contiene circa 115 specie, quello del Sud-America più di 550 specie e quello dei Caraibi circa 200 specie. La dispersione di questo gruppo non è avvenuta tramite corridoi terrestri, ma in quattro eventi separati di dispersione transoceanica avvenuti nel Cenozoico (Heinicke et al. 2007). Una specie di questo genere, *E. coqui*, è considerata una delle 100 più invasive al mondo (Global Invasive Species Database, 2016).

1.2. Ecologia, biogeografia e biologia della conservazione degli Anfibi

Di oltre 6200 specie viventi di Anuri, circa il 30% è in pericolo di estinzione e di un altro 25% si hanno dati tanto scarsi da non avere informazioni attendibili sulle condizioni delle loro popolazioni (Stuart et al. 2008; Vitt e Caldwell 2014). Si ritiene che circa 165 specie si siano recentemente estinte

ed il numero maggiore di specie minacciate di estinzione si trova attualmente in Colombia, Messico ed Ecuador: in alcune isole caraibiche una percentuale compresa tra 80 e 90% delle specie di Anuri è minacciata di estinzione o già estinta. La perdita di habitat è un fattore significativo nel declino e nell'estinzione di molte specie, ma un'infezione fungina, la chitridiomicosi, sta decimando gravemente numerose popolazioni di Anuri in tutto il mondo.

È difficile separare tra loro argomenti riguardanti l'ecologia, la biogeografia e la biologia della conservazione, perché sono tutti integrati tra loro. Le strategie di conservazione dipendono infatti da informazioni ecologiche fondamentali sugli habitat e sulle specie, mentre la biogeografia si occupa dei cambiamenti avvenuti in lunghi periodi di tempo: nel tempo i modelli ecologici hanno avuto un'influenza fondamentale sui modelli biogeografici attuali. Dopo alcune centinaia di anni di aggressione continua ed accelerata nei confronti degli ambienti naturali, si inizia solo attualmente a comprendere la storia della distribuzione delle specie e dei cambiamenti ecologici nel tempo, oltre alla complessità insita nell'applicazione di queste informazioni alla gestione delle risorse naturali rimaste. I cambiamenti climatici su scala globale, la continua riduzione degli stock pescabili negli oceani, l'inondazione di ambienti naturali terrestri e marini da parte di pesticidi, erbicidi e fertilizzanti, la riduzione nella disponibilità di acqua dolce potabile, l'invasività di alcune specie e numerosi altri problemi globali sono semplicemente i sintomi della principale sfida che gli umani debbano affrontare, cioè l'aumento della popolazione. Secondo il sito web del World Population Clock (World Population Clock 2017), nel mese di gennaio 2017 la popolazione umana ha raggiunto 7 miliardi e 477 milioni di individui. Ogni essere umano ha bisogno di risorse fondamentali (cibo, acqua, un luogo dove vivere) e con la globalizzazione di tecnologie ed economie, ogni umano che ha accesso ad un telefono cellulare, un tablet, un computer o un apparecchio TV tende ad aumentare l'impronta ambientale sul pianeta, ottenendo l'accesso alle risorse che altri hanno già. I progressi nel campo dell'ecologia e della biologia della conservazione sono importanti, ma la gestione della crescita della popolazione umana in modo responsabile e saggio è fondamentale se si vuole che le generazioni future abbiano una qualità di vita simile a quella attuale.

Per quanto riguarda gli Anfibi, la visione che gli sforzi di conservazione che riguardino solo questa classe a rischio siano sufficienti a salvarla in futuro è ristretta e non realistica. Come per gli esseri umani, anche gli animali necessitano di cibo, acqua ed un ambiente ecologicamente sostenibile, ma al contrario degli esseri umani, l'impronta che ciascuno di questi individui appartenenti a questa classe ha avuto sull'ambiente globale non è cambiata dai tempi del Permiano. Se gli umani non riusciranno a conciliare le proprie esigenze con quelle delle generazioni future e dell'ambiente in generale, l'umanità ha davanti un triste futuro: ciascuna generazione che procrastina l'impegno nei confronti di questo problema non fa che raddoppiarne le conseguenze.

Il campo della biogeografia è comunque in veloce evoluzione e l'avvento della filogenesi su basi molecolari permette di eseguire test di verifica delle ipotesi di "vicarianza" ("*vicariance*") e la ricostruzione di ambienti storici e di nicchie ecologiche. L'integrazione della biogeografia con l'ecologia e con gli studi filogenetici rappresenta uno degli strumenti più efficaci per comprendere la storia della diversificazione e della storia degli organismi, in particolare per quanto riguarda gli Anfibi. Ad esempio, l'elevatissima biodiversità degli Anfibi nelle foreste pluviali tropicali è ben nota e spiegabile in base ad alcune ipotesi. La prima formulata in ordine di tempo è quella del "rifugio che scompare" ("*Vanishing Refuge Theory*"), o della "perturbazione climatica", originariamente sviluppata per uccelli e Rettili. L'ipotesi si basa sul fatto che le fluttuazioni climatiche del Pleistocene, avvenute tra 2 milioni e 10000 anni fa, hanno determinato espansioni e contrazioni ripetute delle foreste pluviali, con ripetuti isolamenti della fauna e di conseguenza ripetute speciazioni. I profili di pollini nei depositi del Pleistocene indicano che la foresta pluviale ha effettivamente subito espansioni e contrazioni in questo periodo. Un'altra ipotesi, detta della "barriera fluviale" ("*Riverine Barrier Hypothesis*"), afferma che i grandi fiumi del bacino del Rio delle Amazzoni hanno costituito barriere per le specie che vivevano sul terreno della foresta, limitando il flusso di geni e incrementando la diversità genetica tra una riva e l'altra dei fiumi. Altre ipotesi sono quelle del "gradiente ecologico", che afferma che queste barriere sono costituite da gradienti di temperatura e di umidità, e quelle della "barriera montuosa" (in questo caso le Ande) e quella della "ingressione marina", in cui la barriera sarebbe stata costituita da inondazioni locali di acqua salata (Vitt e Caldwell 2014).

L'ipotesi del "rifugio che scompare" era stata in un primo momento verificata per due specie di lucertole, *Anolis chrysolepis* e *A. brasiliensis*, che si riteneva si fossero diversificate nel Pleistocene durante episodi di espansione e contrazione della foresta pluviale. In seguito, però, indagini molecolari hanno dimostrato che le due specie si sono diversificate molto prima del Pleistocene, smentendo l'ipotesi (Glor et al. 2001). Dati successivi hanno confermato che la diversificazione degli Anfibi nel bacino amazzonico è molto complessa e non facilmente spiegabile con un'unica ipotesi. Un altro studio recente si è basato sulla filogenesi molecolare per verificare due ipotesi contrastanti sulla distribuzione di rane appartenenti al genere *Engystomops*: queste rane vivono in Amazzonia occidentale, regione attraversata da grandi fiumi (secondo l'ipotesi della "barriera fluviale") e con elevati gradienti ecologici da ovest a est (secondo l'ipotesi dei "gradienti ecologici") (Funk et al. 2012). Il modello è in effetti molto complesso: uno dei fiumi principali sembra abbia costituito un'effettiva barriera, ma la veloce espansione delle specie a sud del fiume sembra abbia coinvolto contatti secondari tra gruppi genetici già parzialmente diversificati. Gli studi sui Dendrobatidi sono in accordo con l'ipotesi che vi sia stato un elevato gradiente ecologico almeno in alcune aree, mentre

quelli sugli Iliidi sembrano confermare l'ipotesi della "barriera fluviale". La biogeografia degli Anuri amazzonici appare quindi complessa e non spiegabile in base a un'unica ipotesi.

Per quanto riguarda la scienza della conservazione, è un campo di studi innovativo e fruttuoso con numerose pubblicazioni, ma la maggior parte di questi studi non ha purtroppo determinato azioni sufficienti a salvare specie e habitat: vi sono comunque storie locali di successo che devono essere menzionate con lode, ma il quadro generale è purtroppo ancora quello di un declino continuo nel numero degli individui e delle popolazioni, e di conseguenza nel numero di specie. Gli studiosi si sono quindi chiesti perché la maggior parte delle raccomandazioni e dei risultati ottenuti nel campo della conservazione siano stati disattesi. Molti fattori possono avere contribuito a questa mancanza di successo: in molti paesi le risorse economiche dedicate alla conservazione sono spesso insignificanti rispetto a quelle destinate alla crescita economica e allo sviluppo (Stuart et al. 2008; Vitt e Caldwell 2014). Molti governi ritengono che l'economia basata sulla continua crescita sia l'unica via alla prosperità, quindi gli obiettivi di guadagno economico a breve termine superano quasi sempre le priorità di conservazione delle specie. Altri problemi a lungo termine interferiscono con il lavoro degli scienziati che si occupano di conservazione. Molti di loro sono universitari e l'avanzamento nelle loro carriere dipende dalla produzione di lavori di ricerca originali e spesso teorici: questi studiosi non hanno quindi il tempo o non dispongono di fondi per applicare i loro studi teorici ad una effettiva conservazione delle popolazioni e delle specie. All'opposto, coloro che tentano di operare nel campo della conservazione non hanno spesso accesso ai risultati teorici pubblicati sulle riviste scientifiche. Non è facile trovare soluzioni a questi problemi: le università non sono disposte a modificare le loro priorità di valutazione della ricerca, aggiungendo il coinvolgimento in un lavoro politico o sociale che possa ottenere la conservazione delle specie o degli habitat.

Nel tentativo di influenzare la direzione delle ricerche e favorire la collaborazione tra scienziati che si occupano di conservazione e coloro che la applicano in situazioni reali, numerosi paesi occidentali hanno tentato di identificare priorità di ricerche conservazionistiche che ottengano strategie efficaci di politica e gestione, stilando un elenco di problemi urgenti riguardanti non solo le popolazioni e le specie, ma anche il funzionamento degli ecosistemi, i cambiamenti climatici e molti altri argomenti di importanza fondamentale per la conservazione. Questi tentativi sono però complicati da una continua e crescente "disconnessione" tra le popolazioni umane e la natura, man mano che le prime aumentano di numero e la tecnologia si sviluppa. I bambini non giocano più spontaneamente all'aperto, scoprendo direttamente e personalmente il mondo naturale: al contrario, televisione, computer, telefoni cellulari e tablet competono per il loro tempo libero, sottraendolo alla fondamentale esperienza del mondo naturale (Louv 2008). Un altro motivo per questo "scollamento" tra umani e natura è che oggi circa il 48% di tutta la popolazione mondiale vive in ambienti urbani e

di città, e la diversità delle specie animali e vegetali con cui interagiscono è ridotta ed uniformata. E' urgente trovare una soluzione a questo problema e assolutamente riconnettere il legame tra i bambini e il mondo naturale: i bambini lo amano spontaneamente e del quale, se ne hanno la possibilità, ne partono alla scoperta per conto proprio. Molti studi hanno dimostrato che i bambini che hanno visitato e conosciuto direttamente le aree naturali continuano ad apprezzarle da adulti (Natural Teachers Network 2015). Purtroppo i parchi urbani e le aree di gioco all'aperto non forniscono habitat appropriati e hanno una biodiversità molto limitata. Un modo di invertire questa tendenza è stata l'istituzione negli Stati Uniti della "Chicago Wilderness", una riserva regionale di 225 000 acri compresa tra tre Stati e gestita di un consorzio di 260 organizzazioni federali statali e private. La riserva è costituita da aree naturali che comprendono ambienti di prateria, aree umide, boschi e altri habitat. Il progetto ha avuto un enorme successo perché ha aiutato la gente a comprendere l'importanza della biodiversità, dell'ecologia della conservazione e di come sia necessario educare i bambini e gli adulti al mantenimento degli habitat naturali e delle specie che vi vivono (Natural Teachers Network 2015). Sarebbero necessarie molte iniziative di questo tipo, perché alla velocità con cui le regioni agricole e le aree naturali si trasformano in aree urbane, il tempo per salvaguardare le aree naturali sta drammaticamente finendo.

In quale modo la crisi della biodiversità influenza il campo degli studi sugli Anfibi? La biodiversità non comprende solo la ricchezza di forme di vita sul pianeta, ma anche la diversità genetica e le interazioni tra organismi che formano comunità ed ecosistemi unici: la storia della vita sulla Terra è contenuta in ultima analisi nel DNA, componente integrante della biodiversità. La ricchezza di specie è facilmente riconoscibile in base al numero di specie presenti in una data area, classificate in base al gruppo tassonomico. Il numero di specie in una data area è detto "diversità alpha", ma per una corretta valutazione della biodiversità servono dati riguardanti anche il cambiamento nella diversità delle specie in un gradiente ambientale ("diversità beta") e i cambiamenti nel numero e tipo di specie tra habitat simili per clima e struttura ma in diverse aree geografiche ("diversità gamma") (Vitt e Caldwell 2014). Un altro campo di studi nella biodiversità riguarda i cambiamenti nella flora e nella fauna che sono avvenuti nel tempo: gli esemplari custoditi nei musei possono permettere una valutazione del cambiamento nella biodiversità e nell'abbondanza delle specie, ma spesso non sono sufficienti per una valutazione accurata della biodiversità finalizzata alla conservazione. Gli inventari di biodiversità inoltre identificano continuamente nuove specie: lo studio approfondito di gruppi di Anfibi e Rettili tramite metodi molecolari rivela che l'effettiva biodiversità è mascherata dalla mancata identificazione di specie criptiche e strettamente imparentate (Vitt e Caldwell 2014). La crisi della biodiversità impone di documentare meglio e più rapidamente i biomi del pianeta, intensificando le scoperte di nuove specie. Per quanto riguarda gli Anfibi, ad esempio, il

Brasile ne ha la maggiore ricchezza mondiale con 776 specie, la metà delle quali è stata descritta negli ultimi 40 anni: si deve quindi supporre che molte altre specie non siano ancora state scoperte o descritte (Vitt e Caldwell 2014).

La crisi della biodiversità è caratterizzata dalla perdita o dalla riduzione di biodiversità a tutti e tre i livelli precedentemente descritti e la sua conseguenza estrema è l'estinzione. Questo evento è un processo naturale che avviene continuamente, ma in questi ultimi anni il problema riguarda la velocità con cui il processo sta avvenendo, cioè il numero di specie perse per unità di tempo: questa velocità è molto superiore a quella documentata in passato ed è molto più estesa. In passato l'estinzione è avvenuta ad un ritmo più lento e il numero di specie che si sono estinte è stato pari o leggermente inferiore al numero di specie nuove che sono apparse (Stuart et al. 2008; Vitt e Caldwell 2014). L'aumento graduale del numero di specie ha avuto come risultato l'aumento della biodiversità, ma il fenomeno attuale del rapido declino della biodiversità mondiale ha caratteristiche simili a quelle di un evento di estinzione di massa a livello geologico, nel quale migliaia di specie scompaiono in un breve periodo di tempo.

L'estinzione di massa è un evento catastrofico: la documentazione fossile testimonia perdite superiori al 30% delle specie e l'evento di estinzione avvenuto alla fine del Permiano si ritiene abbia coinvolto l'81% delle specie marine e il 70% di quelle terrestri (Stanley 2016). Un livello di estinzione pari a quello del 50% delle specie (una specie su due) modifica in modo drastico le interazioni tra specie ed ecosistemi: la perdita di biodiversità a causa di un elevato tasso di estinzione può condurre a eventi a cascata, in cui la perdita di una sola specie può causare quella di un numero elevato di altre specie. Non importa quanto gli esseri umani possano essere pieni di risorse: non vi è alcuna garanzia che la loro specie sopravviva ad un evento di estinzione di massa, a causa delle interazioni biologiche complesse che sono alla base delle risorse alimentari globali (Stuart et al. 2008; Vitt e Caldwell 2014).

1.2.1. Impatto umano sulle comunità di Anfibi

Gli esseri umani hanno modificato gli ecosistemi in ogni luogo, e questa affermazione non è esagerata. Le attività umane hanno avuto come risultato globale un aumento medio della temperatura annuale e delle radiazioni ultraviolette sulla superficie della Terra (Vitt e Caldwell 2014). Gli effetti climatici rappresentano solo alcuni aspetti dell'alterazione umana degli ecosistemi, che si estende fino a variazioni locali in un ambiente paludoso o in un tratto di foresta. Tutte queste alterazioni, comprese quelle che avvengono nelle regioni polari, influenzano direttamente le popolazioni di Anfibi e Rettili del pianeta: ad esempio, la velocità sempre maggiore di scioglimento delle calotte

polarì causate dalle attività umane sta provocando un innalzamento del livello del mare e di conseguenza modifica le popolazioni di Anfibi e Rettili nelle regioni costiere e di pianura (Vitt e Caldwell 2014).

Le modificazioni e distruzioni di habitat sono gli effetti più visibili dei cambiamenti ambientali indotti dalle attività umane. Da quando gli uomini hanno iniziato ad appiccare fuochi per catturare prede, trasformando le foreste in praterie, e in seguito, con l'avvento dell'agricoltura, in aree coltivate e giardini, la trasformazione delle regioni naturali è continuata in modo incessante. Alla fine del ventesimo secolo vi erano già sul pianeta 24 mega-città, definite come aree urbane con popolazione superiore a 10 milioni di abitanti. In tutto il mondo le piccole città continuano a crescere, inglobando sempre più le aree naturali, e le regioni agricole sono rapidamente trasformate in aree residenziali. Tutti conoscono gli appelli degli ambientalisti per salvare "le nostre foreste pluviali", ma in realtà tutti gli habitat naturali del mondo sono gravemente minacciati. Un esempio classico è quello che è avvenuto nel Cerrado brasiliano, un bioma unico simile alla savana che comprende il 21% del territorio totale del Brasile (Vitt e Caldwell 2014). Questo bioma è una "hot spot" di biodiversità con più di 420 specie di Anfibi e Rettili, molte delle quali endemiche, e un gran numero di altre specie di vertebrati e di piante esclusive. Intorno al 1950 il Brasile ha costituito una nuova entità politica, il "Distrito Federal", con una nuova capitale, Brasilia, proprio nel cuore del Cerrado, dotandola di un sistema di autostrade per invogliare la popolazione a trasferirvisi: il Cerrado è quindi diventato una regione di frontiera destinata a coltivazioni agricole come soia e mais, e all'allevamento di bestiame: oggi ne è rimasto solo il 20% della regione originale, e di questa solo una piccola parte è protetta.

L'effetto diretto della perdita di habitat sulle comunità di Anfibi è che le specie scompaiono da quell'area, ma le conseguenze si estendono ben oltre i confini dell'habitat perduto. Il taglio delle foreste tropicali e delle regioni temperate influenza sia l'abbondanza sia la presenza di specie di Anfibi nei restanti confini della foresta e fino ad almeno 20-30 metri nel suo interno (Laurance et al. 2007; Vitt e Caldwell 2014). In una foresta decidua del Maine l'effetto "confini della foresta" ha causato una diminuzione dell'abbondanza relativa delle specie originarie di Anfibi anche nelle regioni "di confine", in particolare delle salamandre, più sensibili all'aumento di luce e alla riduzione di umidità. L'abbattimento selettivo di alberi per la raccolta di legname ha sulle comunità di Anfibi un effetto simile a quello dei "confini": la deforestazione e la conseguente distruzione della sottostante vegetazione espongono il suolo alla luce solare diretta (quindi a temperature più alte e con maggiori fluttuazioni) ed al disseccamento: queste variazioni microclimatiche sono fatali per gli Anfibi (Vitt e Caldwell 2014). Se tuttavia le aree deforestate sono lasciate a se stesse, la foresta lentamente si rigenera, a seconda delle condizioni in cui è stata lasciata. Le foreste, sia temperate sia tropicali,

sviluppano spontaneamente zone di radura a causa delle tempeste o della morte naturale degli alberi, ma le radure si riempiono velocemente di giovani alberi provenienti dai semi della foresta circostante: nelle zone deforestare avviene lo stesso processo, che però richiede molto più tempo per la dispersione dei semi a causa della maggiore estensione delle aree rimaste scoperte. Lo stesso principio si applica alla ricolonizzazione di queste aree da parte di comunità di Anfibi. Supponendo che la foresta si rigeneri rapidamente, l'intera comunità di Anfibi potrebbe ricostruirsi in 30 o 40 anni. Dati riguardanti le comunità di Urodela sui Monti Appalachi suggeriscono un periodo di ricolonizzazione variabile tra 20 e 50 anni, ma in alcune foreste le alterazioni drastiche del suolo e della sua morfologia determinate da un eccessivo sfruttamento rendono le zone inabitabili per Anfibi e Rettili. Nelle foreste tropicali il prelievo selettivo di alberi da legname aumenta la temperatura media e modifica in modo irreversibile le interazioni tra specie: ad esempio, in Amazzonia i varchi nella "canopy" attirano lucertole eliotermitiche predatrici di Anfibi, come il genere *Ameiva* (Vitt e Caldwell 2014).

Disastri naturali come inondazioni, frane e incendi avvengono in tutti gli ecosistemi, ma generalmente la fauna locale si riprende rapidamente, a volte addirittura aumentando la biodiversità, come è avvenuto nel grande deserto Victoria in Australia, nel quale vive un numero di specie quattro volte superiore a quello dei deserti americani e del Kalahari: in questa regione australiana sono frequenti gli incendi naturali limitati a piccole aree, che creano microhabitat locali a vari stadi di recupero da precedenti incendi, nei quali la competizione tra specie è molto ridotta (Vitt e Caldwell, 2014). In rari casi una catastrofe naturale può provocare l'estinzione delle popolazioni locali o di intere comunità, e se tra queste vi è l'unica popolazione rimasta di una data specie, la catastrofe ne causa l'estinzione. Questo causa una forte preoccupazione nei confronti degli Anfibi, a causa della riduzione di habitat provocato dall'attività umana. Una data popolazione può infatti produrre un numero di discendenti sufficiente per mantenersi e anche per diffondersi in altri ambienti, oppure non ne può produrre a sufficienza e quindi richiede un apporto migratorio esterno e continuo di nuovi individui. La discontinuità tra habitat e le barriere di dispersione che creano zone inadatte o insormontabili (ad esempio aree agricole, aree residenziali, strade e altre costruzioni umane) sono fatali per la sopravvivenza delle popolazioni del secondo tipo. La frammentazione degli habitat crea tuttavia problemi anche per le popolazioni del primo tipo, a causa dell'incrocio tra consanguinei e dell'instabilità demografica, ed è il motivo principale per l'istituzione di aree protette e rifugi, che purtroppo rappresentano solo piccole parti di aree naturali un tempo estese.

Quanto deve essere estesa un'area protetta, particolarmente per quanto riguarda gli Anfibi? L'estensione dipende dal tipo di specie e dalla sua biologia: sarebbe meglio "il più estesa possibile", ma non è un concetto sufficientemente realistico, considerando la situazione mondiale attuale. L'area protetta dovrebbe mantenere la diversità genetica ed evitare il collasso demografico. La popolazione

minima vitale (“*minimum viable population*”, MVP) è definita come il numero di individui necessari perché la popolazione abbia una possibilità di sopravvivenza del 99% per 1000 anni e possa evitare l'estinzione per catastrofi naturali o fattori genetici, demografici e ambientali (Vitt e Caldwell 2014). Nessuno ha ancora stabilito quale sia questo numero per gli Anfibi, anche se esistono modelli che riguardano popolazioni di testuggini longeve.

Le foreste tropicali sono scrigni della biodiversità del pianeta, quindi le riserve che le comprendono costituiscono habitat fondamentali per la salvaguardia di molte specie. Uno studio recente ha esaminato 60 riserve e aree protette in regioni tropicali per verificare quanta biodiversità si era riusciti a salvaguardare in queste zone (Laurance et al. 2007). Quasi la metà delle riserve avevano una fauna relativamente intatta, ma le altre presentavano un declino allarmante in molti gruppi tassonomici, non solo tra gli Anfibi. Le cause di questo declino erano varie, ma le distruzioni di habitat all'esterno dei confini delle riserve sembravano avere avuto un effetto fondamentale sull'integrità della stessa riserva. Vi sono oggi prove chiare che la distruzione di habitat, la caccia ed altre attività che sfruttano le piante e gli animali nelle zone vicine alla riserva hanno un effetto diretto sulla diversità delle specie che vivono all'interno dell'area protetta: a meno che il degrado ambientale non sia arrestato territorialmente su larga scala, la perdita di biodiversità all'interno delle riserve è destinata a continuare (Vitt e Caldwell 2014).

La frammentazione dell'habitat è un evento tanto comune che spesso non ci si rende conto del suo grave impatto sulle comunità naturali e sulla distribuzione delle specie. Uno studio sulla Great Central Valley in California ha fornito dati chiari riguardo al problema (Fisher e Shaffer 1996). In quella regione il numero di specie autoctone di Anfibi non era elevato: solo 7 specie, quattro di Anuri e tre di Urodeli, con un massimo di 7 specie in tutte le località e qualcuna in meno in alcune aree. L'esame di oltre 1000 luoghi acquatici di riproduzione nelle 28 contee della Central Valley ha rivelato che solo tre contee mantenevano le popolazioni faunistiche originarie. Il mantenimento delle specie era maggiore nelle aree collinari e minore nelle pianure, che si erano progressivamente trasformate in terreni agricoli. Nessuna contea aveva perduto l'intero gruppo di specie originarie, ma la maggior parte aveva perso più della metà delle proprie specie. In alcune aree la biodiversità era aumentata per l'introduzione di specie esotiche, ma queste ultime (in particolare *Lithobates catesbeianus*) si erano rivelate in parte responsabili della scomparsa delle specie originarie (Fisher e Shaffer 1996).

Spesso non si riescono a riconoscere gli effetti delle modificazioni dell'habitat su specie di Anfibi di piccole dimensioni, perché sono difficili da osservare anche quando sono frequenti. Gli effetti sono tuttavia molto evidenti quando la specie è di grandi dimensioni, come avviene nel caso di grandi Rettili (come le iguane del genere *Cyclura* nelle Indie occidentali) che possono essere buoni

da mangiare, avere pelli di valore, essere catturati facilmente, apprezzati come animali esotici da appartamento e avere cicli biologici prolungati (fino a 20 anni) che rendono molto difficile il recupero della loro popolazione. Gli effetti indiretti comprendono la competizione per il cibo con gli animali di fattoria, la distruzione dei nidi da parte di maiali e bestiame, la predazione da parte dei cani e di altri animali domestici. Nel caso di queste iguane, il prelievo in natura delle femmine mature di maggiori dimensioni è stato disastroso: le femmine di maggiori dimensioni, che depongono più uova delle femmine più piccole, sono avvantaggiate in natura nei confronti dei predatori proprio a causa delle loro grandi dimensioni: ma gli umani, pur non essendo predatori naturali di questi Rettili, hanno avuto un ruolo centrale nel loro declino (Vitt e Caldwell 2014).

1.2.2. Declino delle popolazioni di Anfibi

Nel 1989 alcuni scienziati riuniti nel primo Congresso Mondiale di Erpetologia a Canterbury (Regno Unito) espressero la loro preoccupazione riguardo alla scomparsa delle rane: ci si rese presto conto che in tutto il mondo le rane sparivano dai habitat nei quali erano un tempo comuni. Fu istituita una "task force" (Declining Amphibian Populations Task Force, DAPTF) per condurre investigazioni e stabilire una rete di comunicazione mondiale per questo problema, per capire se la scomparsa degli Anfibi fosse un fenomeno locale o globale (Stuart 2008; Vitt e Caldwell 2014). Iniziarono ad accumularsi dati che indicavano come molte popolazioni ed alcune specie di Anfibi fossero scomparse o in grave declino in tutto il mondo. La caratteristica di questo declino era di avvenire in modo improvviso anche in aree apparentemente poco esposte all'influenza umana, nella stessa località sembrava riguardare alcune specie e non altre. Era noto che nelle popolazioni di Anfibi avvenivano di norma fluttuazioni naturali, quindi era necessario stabilire se questa situazione fosse preoccupante. Purtroppo l'allarme iniziale si rivelò assolutamente giustificato e da allora molti studi hanno documentato in modo rigoroso il declino delle popolazioni, cercando di individuarne le cause (Hayes et al. 2010). L'attenzione si è concentrata soprattutto sugli Anuri, a causa della loro maggiore diversità e diffusione globale, e in misura minore sugli Urodeli. Quasi nulla è noto riguardo ai Cecilidi, anche se questo gruppo è probabilmente altrettanto minacciato perché comprende specie principalmente tropicali e sotterranee. Gli habitat dei Cecilidi sono minacciati dall'inquinamento e dalle trasformazioni degli ambienti naturali in zone agricole (con conseguente uso di pesticidi) e in zone urbane (Gower e Wilkinson, 2003). Sebbene la chitridiomicosi abbia causato il declino di Anuri ed Urodeli, nessuno studio ha finora verificato se questo fungo abbia attaccato anche i Cecilidi: il fungo prospera in ambienti umidi, tipici habitat del gruppo, quindi molte specie di Cecilidi che si

trovano in zone infettate potrebbero essere a rischio: purtroppo i dati in questo campo sono quasi inesistenti.

La determinazione del numero di specie di Anfibi minacciate o estinte è difficile a causa della mancanza di dati su molte popolazioni. Il progetto GAA (Global Amphibian Assessment 2005) è un progetto in cui molte organizzazioni conservazioniste e gruppi di ricerca si sono consorziati per identificare il grado di declino degli Anfibi e le aree geografiche coinvolte. Il GAA ritiene che più di un terzo di tutte le specie di Anfibi nel mondo siano minacciate, ed almeno 165 specie si siano probabilmente estinte dal 1980 a oggi.

L'estinzione di popolazioni è un processo naturale che può avvenire naturalmente all'interno di una specie, ma l'evento nel quale tutte le popolazioni di una data specie scompaiono è di norma raro (Vitt e Caldwell 2014). In termini ecologici una popolazione è detta "source" quando la natalità supera la mortalità, e "sink" quando la mortalità supera la natalità (Dias, 1996). Il tasso di estinzione per popolazioni "sink", è misurabile in alcune generazioni o alcuni anni, quello delle metapopolazioni (cioè l'insieme delle popolazioni interconnesse geneticamente tra loro a causa della migrazione di singoli individui) è misurabile in decine o migliaia di generazioni o di anni, e quello delle specie in centinaia di migliaia o milioni di anni. La tendenza all'estinzione di una popolazione o di una specie è associata certamente alle sue dimensioni in termini di numero di individui, ma anche alla modalità di riproduzione e/o di aggregazione tra individui. Tra i Rettili, molte specie di testuggini richiedono 10 o più anni per raggiungere la maturità sessuale e questo aumenta le probabilità che un individuo muoia prima di potersi riprodurre almeno una volta. Molti Anuri ed Urodeli formano aggregazioni temporanee di individui a scopo riproduttivo in pozze d'acqua temporanee nelle stagioni favorevoli: il raduno della maggior parte o di tutti gli adulti in età riproduttiva in uno stesso luogo aumenta la probabilità che un unico evento catastrofico elimini l'intera popolazione (Vitt e Caldwell 2014). Se l'aggregazione a scopo riproduttivo richiede un habitat speciale che si forma solo in determinate condizioni atmosferiche, un cambiamento prolungato del clima può essere sufficiente ad eliminare l'unico sito adatto alla riproduzione per una specie a durata breve di vita, provocandone quindi inevitabilmente l'estinzione. Alcune specie di Anfibi sono contemporaneamente soggette a numerosi fattori di rischio, nella maggior parte dei casi legati alle attività umane: i fattori principali che hanno portato sull'orlo dell'estinzione numerose specie sono il prelievo in natura e la distruzione e frammentazione degli habitat naturali: questi fattori riducono le dimensioni e la variabilità genetica delle popolazioni, aumentando la probabilità che singoli eventi catastrofici ne possano provocare l'estinzione (Vitt e Caldwell 2014).

Le cause del declino e dell'estinzione degli Anfibi sono diverse e molti problemi sono ancora aperti, ma la perdita e le modifiche degli habitat costituiscono i fattori principali coinvolti: dati riguardanti il Regno Unito indicano che il 70% delle paludi e degli stagni siano scomparsi dall'inizio del XX secolo e che il numero di rane e rospi si sia ridotto di più del 90% (Vitt e Caldwell 2014). La perdita e modificazione degli habitat è un fenomeno globale, derivato dall'aumento esponenziale della popolazione umana, ma aggravato anche dalla dispersione degli habitat naturali tra zone agricole, che determina un lento avvelenamento delle specie che vi abitano per esposizione a pesticidi ed erbicidi. Queste sostanze chimiche ed i loro metaboliti hanno effetti che vanno dalla carcinogenesi alla mutagenesi, all'avvelenamento diretto e alla mimesi di ormoni, colpendo tutti gli stadi del ciclo biologico degli Anfibi e riducendone la sopravvivenza. Anche l'acidificazione ambientale è molto diffusa ed esercita i suoi effetti deleteri in particolare sui primi stadi di sviluppo, anche a lunga distanza: può agire inoltre in modo sinergico con altri inquinanti, come i metalli pesanti e gli ecoestrogeni, sconvolgendo i delicati meccanismi fisiologici degli Anfibi e rendendoli più sensibili a malattie virali, batteriche e fungine (Vitt e Caldwell 2014).

1.2.3. Cause del declino degli Anfibi: fattori ambientali

I cambiamenti climatici sono processi che influenzano la distribuzione delle specie e hanno causato grandi estinzioni nel corso della storia della Terra. Con il termine di "cambiamento climatico" si intende qualsiasi cambiamento significativo nell'andamento della temperatura, piovosità, venti, temperature o correnti oceaniche che perdurano per un lungo periodo di tempo. La novità che riguarda i cambiamenti climatici della nostra epoca è la rapidità con la quale stanno avvenendo. Il riscaldamento globale, componente integrante dei cambiamenti climatici, è causato dall'aumento dei gas serra dovuto all'utilizzo di combustibili fossili, dalla deforestazione, dall'agricoltura intensiva e da altre cause di tipo industriale. Sebbene il riscaldamento globale e le sue cause siano ancora un motivo di forte scontro politico negli Stati Uniti e in altre nazioni, i fatti parlano da soli: la temperatura media della superficie del pianeta è aumentata di circa 0.9 °C negli ultimi 100 anni e potrebbe aumentare da 1 a 4 °C nel prossimo secolo (United States Environmental Protection Agency, 2017).

Gli Anfibi sono ectotermi e regolano la propria temperatura corporea entro limiti ristretti, di conseguenza sono e continueranno ad essere influenzati dal riscaldamento globale. Anche se alcune specie potrebbero adattare la propria distribuzione ai cambiamenti di temperatura (ad esempio spostarsi a latitudini o ad altezze maggiori), la frammentazione dei loro habitat e la velocità con la quale stanno avvenendo i cambiamenti climatici rende questo adattamento molto difficile. Come esempio, uno studio su 48 specie di Rettili in 200 località del Messico effettuato nel 2010 e

convalidato da dati di altre regioni, ha rilevato una percentuale di estinzione del 12%, che potrebbe salire fino al 39% nel 2080 (Sinervo et al. 2010). Ci si attenderebbe che le specie tropicali di pianura abbiano una maggiore tolleranza termica e siano meno sensibili ai cambiamenti climatici, ma la foresta tropicale è una sorta di “buffer termico” e molte specie che la abitano vivono in condizioni vicine al loro massimo punto critico termico: un cambiamento anche relativamente limitato della temperatura in queste foreste potrebbe causare una serie di estinzioni “a cascata” tra queste specie, perché la velocità metabolica degli ectotermi aumenta con l’aumentare della temperatura. Nel caso di specie la cui determinazione del sesso dipende dalla temperatura, l’impatto sull’equilibrio numerico dei sessi nella popolazione è rovinoso.

Gli effetti del riscaldamento globale sulle popolazioni di Anfibi sono complessi per l’elevato numero di fattori coinvolti. Oltre ad ovvii effetti diretti (disseccamento di microhabitat riproduttivi, aumento della perdita di acqua attraverso la cute, difficoltà nel trovare riparo), lo stress fisiologico causato dai cambiamenti di temperatura rende gli Anfibi più sensibili ai patogeni (Vitt e Caldwell 2014). Gli inquinanti industriali, tra cui il particolato derivato dai fumi e i rifiuti tossici, si riversano nelle acque e anche gli inquinanti non immediatamente visibili o tossici possono risultare letali a lungo termine. I fosfati presenti nei detersivi o i composti di azoto provenienti da liquami di allevamenti intensivi sono relativamente poco tossici se diluiti, ma i loro effetti si accumulano progressivamente e il risultato è un insieme di gravi conseguenze sull’ecosistema. I microambienti si alterano per primi, con effetti letali sulla microflora e microfauna, e in seguito sulla macroflora e macrofauna. (Vitt e Caldwell 2014). La vita tuttavia può continuare in ambienti inquinati e in alcuni casi la diversità e l’abbondanza delle specie può perfino aumentare, evidenziando uno dei dilemmi della conservazione: quali azioni sono necessarie e quando si deve intervenire? Purtroppo raramente si è in grado di intervenire in modo preventivo, e di solito l’intervento avviene a causa di una crisi imminente o in corso. Alcune di queste crisi sono molto note, come la dispersione di contaminanti ambientali, le piogge acide e gli ecoestrogeni, ed esemplificano ancora meglio la complessità degli effetti dell’inquinamento sulle popolazioni di Anfibi.

I contaminanti ambientali vanno dai rifiuti solidi, frammenti di plastica e catrame riversati nelle acque, alle microparticelle disperse come aerosol o emulsioni, ai metalli pesanti e composti organici derivati da pesticidi, erbicidi e PCB. Le interazioni tra questi inquinanti e le forme di vita spesso non sono ancora chiare, nonostante decenni di intense ricerche: le microparticelle, ad esempio, a seconda delle loro concentrazioni e natura biochimica possono essere letalmente velenose, cancerogene, mutagene e perfino immunosoppressive (Vitt e Caldwell 2014).

L'acidificazione ambientale non è più considerata una emergenza ambientale prioritaria, in parte perché è stata effettivamente ridotta in Europa, Canada e Stati Uniti mediante leggi apposite, ma resta un problema fondamentale in paesi come Cina, India e altre economie emergenti che si affidano ancora al carbone per la produzione di energia a scopo industriale, ma effettuano scarsi controlli sulla qualità dell'aria. Le piogge acide derivano dal rilascio di solfo e ossidi di azoto nell'atmosfera da parte dei combustibili fossili: questi composti reagiscono con il vapore acqueo, producendo acido solforico e acido nitrico che ricadono sul terreno sotto forma di pioggia o neve, anche a grande distanza dalla fonte originaria di inquinamento. La pioggia normale ha pH 5.6-5.8, mentre quella acida ha pH 3.0-4.0 o ancora più basso. Il primo effetto a lunga distanza dell'acidificazione è la morte degli alberi nelle regioni montane, anche se le foreste non sembrano apparentemente inquinate. Le piogge acide sono ancora più distruttive se ricadono sulla roccia o sul suolo povero di minerali, perché in questo caso non possono essere neutralizzate. Gli Anfibi hanno cicli biologici dipendenti dall'acqua, quindi sono generalmente molto sensibili alla tossicità delle piogge acide, anche se con qualche eccezione: alcune specie come *Lithobates virgatipes* e *Hyla andersonii* si riproducono nelle acque acide delle torbiere (pH<4.0). La maggior parte degli Anfibi, soffre danni molto gravi a causa dell'acidità dell'acqua: la mortalità di uova e larve raggiunge il 50% a pH 4.5 e la sopravvivenza degli embrioni è compromessa allo stadio di gastrula a causa dello squilibrio ionico. Anche in acque ad un pH leggermente superiore si osservano anomalie di sviluppo e una elevata letalità alla metamorfosi (Vitt e Caldwell 2014). Gli effetti tossici delle piogge acide sono maggiori nelle specie che si riproducono in specchi d'acqua temporanei, che sono ancora secchi prima della stagione delle piogge: quando arrivano le piogge acide, queste non solo rendono acide le pozze d'acqua ma dilavano l'acidità dalla vegetazione circostante, abbassando il pH degli specchi d'acqua temporanei a valori che superano i limiti di tolleranza anche delle specie più adattabili. Le specie di Anfibi che vivono in acque permanenti hanno maggiori possibilità di sopravvivere a causa della diluizione determinate dal volume maggiore di acqua.

Anche se non sono direttamente letali per alcune specie, le piogge acide provocano tuttavia cambiamenti nella struttura delle comunità. Nella regione di New York, ad esempio, le pozze temporanee d'acqua dolce sono state tutte acidificate dalle piogge provenienti dalle regioni fortemente industrializzate dell'entroterra. In queste pozze vivono due specie di Urodela con diversa tolleranza all'acidità: la specie originariamente più rara, *Ambystoma jeffersonianum*, è tollerante all'acidità e i suoi girini si sviluppano ed eseguono la metamorfosi in acque a pH <4.0, mentre la specie congenere più diffusa, *A. maculatum*, richiede acque a pH 5.0 o superiore. Lo scioglimento delle nevi e le piogge acide di primavera producono pozze con pH 4.5, quindi la popolazione di *A. jeffersonianum* sta progressivamente sopravanzando quella di *A. maculatum*.

Gli ecoestrogeni (composti chimici che imitano gli effetti degli estrogeni) sono ormoni naturali esogeni prodotti da piante e funghi come meccanismi di difesa contro gli erbivori: questi ultimi si sono difesi tramite la coevoluzione, sviluppando tolleranza e capacità di neutralizzare gli ecoestrogeni o di riconoscerli ed evitarne l'ingestione. L'attività umana ha purtroppo introdotto nell'ambiente nuovi ecoestrogeni, spesso in quantità elevate: anche alcuni inquinanti industriali derivati dallo smaltimento di rifiuti fognari, i pesticidi e i loro prodotti di degradazione hanno un debole effetto estrogenico. Gli estrogeni sono componenti fondamentali della fisiologia riproduttiva animale e l'esposizione a questi composti al momento inadatto o in quantità eccessiva danneggia irreparabilmente il comportamento riproduttivo degli Anfibi. Anche gli embrioni e i girini sono molto sensibili agli estrogeni, che possono causare l'interruzione dello sviluppo del loro sistema riproduttivo e di altri organi. Gli effetti degli ecoestrogeni non sono ancora del tutto conosciuti, ma vi sono prove in natura e in laboratorio che questi composti siano in grado di ridurre la capacità riproduttiva e provocare l'insorgenza di tumori e immunosoppressione. Per quanto riguarda i Rettili è ben noto lo storico caso degli alligatori del lago Apopka in Florida, contaminato accidentalmente da DDT e altri pesticidi persistenti nel 1980: dopo una immediata mortalità elevata dei giovani, la popolazione adulta sembrava non avere subito effetti, ma in seguito la vitalità delle uova era diminuita al 20% ed i pochi embrioni schiusi mostravano una femminilizzazione dei maschi con scarsa vitalità degli spermatozoi e gravi anomalie nella morfologia degli ovari e dei follicoli nelle femmine (Semenza et al., 1997). La popolazione non si è più ripresa da questa crisi.

1.2.4. Cause del declino degli Anfibi: la chitridiomicosi ed altre patologie

Le malattie rivestono un ruolo centrale nel declino degli Anfibi, particolarmente in quello che avviene in habitat considerati incontaminati. Uno dei patogeni ubiquitari degli Anfibi è il fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (1999) (Chytridiomycota Rhyzopydiales) (Berger et al. 1998), noto anche come "Bd" (Fig. 1.5). Gli Anfibi sono gli unici ospiti di questo fungo, che attacca le cellule della pelle negli adulti e la cheratina della parti boccali dei girini, causando la "chitridiomicosi". La pelle degli adulti diventa ruvida e non è più in grado di funzionare come organo respiratorio e come equilibratore dell'idratazione, portando alla morte l'animale infettato. Il fungo si diffonde velocemente nell'acqua tramite zoospore flagellate, trasmettendo il contagio da un individuo all'altro. Quando raggiunge una popolazione mai esposta in precedenza, il fungo può causare la morte di una intera comunità di Anfibi, uccidendo in una data area quasi tutte gli individui, anche di specie diverse. L'Amphibian Conservation Summit ha dichiarato nel 2005 la chitridiomicosi degli Anfibi "la peggiore malattia infettiva mai registrata tra i

vertebrati in termini di numero di specie colpite e in termini di capacità di condurle rapidamente all'estinzione".

Il fungo è stato identificato per la prima volta nel 1998 (Berger et al. 1998) e descritto nel 1999 (Longcore et al. 1999), ma in seguito è stato trovato anche in campioni museali di *Xenopus laevis* datati al 1930 (Canestrelli et al. 2013). Non è ancora del tutto chiaro se si sia diffuso recentemente a causa dei cambiamenti climatici globali, oppure se sia diventato più virulento e abbia aumentato la sua velocità di diffusione a causa degli eventi legati al clima. Recentemente è stato documentato come il riscaldamento globale sia correlato alla diffusione del patogeno nelle regioni tropicali di montagna del Costa Rica. L'aria calda aumenta la copertura nuvolosa, che a sua volta causa un clima più temperato (giorni freschi e notti più calde) nelle località ad altezza intermedia, determinando condizioni ideali per la crescita e la diffusione del fungo: questo potrebbe spiegare il repentino e catastrofico declino dei Ranidi negli ambienti montani del Nuovo Continente (Vitt e Caldwell 2014).

In Europa l'infezione è stata segnalata a partire dal 2000 in popolazioni naturali di *Rana arvalis* in Germania e successivamente in popolazioni spagnole di *Alytes obstetricans*. In Italia, la segnalazione di un primo caso di infezione da *B. dendrobatidis* è avvenuta nell'estate del 2002 in esemplari di ululone appenninico dal ventre giallo, *Bombina pachypus* (Anura, Bombinatoridae) provenienti da popolazioni del territorio collinare della provincia di Bologna (Canestrelli et al. 2013). Nel 2004 il fungo aveva già raggiunto tutti i continenti, eccetto l'Asia e l'Antartide, ed aveva contagiato 14 famiglie e 93 specie di Anuri ed Urodeli.

Oltre al declino attribuibile alla chitridiomicosi, in molte popolazioni di Anfibi appaiono frequentemente individui deformati. Un certo numero di individui con malformazioni, di solito inferiore al 5%, è normale in una popolazione a causa di mutazioni, lesioni o traumi: studi recenti, tuttavia, indicano che in alcune popolazioni dal 15 al 90% delle rane presentano gravi malformazioni: in precedenza le malformazioni riguardavano principalmente le dita, ma attualmente comprendono zampe in sovrannumero (Fig. 1.6), occhi o code deformati e altre malformazioni generali del corpo. Queste malformazioni interessano almeno 60 specie in 46 stati in Nord America, Asia ed Europa (Blaustein e Johnson, 2003). Vi sono tre cause possibili di queste deformità, tutte ancora in discussione: radiazioni ultraviolette di tipo UV-B, contaminazione chimica ed infezioni parassitarie. Nel primo caso, l'uso dei clorofluorocarboni ed altri composti da parte dell'uomo ha causato un assottigliamento dello strato protettivo di ozono nella stratosfera, che causa a sua volta un aumento dell'esposizione di piante ed animali alle radiazioni UV-B. Studi sperimentali hanno tuttavia dimostrato che alte dosi di UV-B possono causare malformazioni negli Anfibi, ma il tipo di deformità

non corrisponde a quello osservato nelle popolazioni naturali (Vitt e Caldwell 2014). Negli habitat degli Anfibi sono presenti molti contaminanti chimici (erbicidi, pesticidi e metalli pesanti), alcuni dei quali possono uccidere i girini e causare deformità. Uno dei problemi nel determinare le relazioni causa-effetto è in questo caso la difficoltà di isolare un particolare composto chimico in un ambiente naturale, dato che ve ne sono molti contemporaneamente presenti. Le infezioni parassitarie sono state proposte per la prima volta come causa delle deformità degli Anfibi da Sessions e Ruth (1990), che avevano osservato in laboratorio deformità degli arti associate ad una elevata incidenza di metacercarie, larve di Trematodi parassiti. Gli Autori avevano impiantato sperimentalmente sfere di resina di dimensioni simili a quelle delle metacercarie negli arti in sviluppo di *Xenopus*, riscontrando deformazioni simili a quelle osservate in natura. Studi successivi hanno dimostrato che il trematode parassita *Riberoia* può causare queste deformazioni (Fig. 1.6) (Johnson e Sutherland 2003).

Vi sono molti problemi aperti riguardo alle cause della deformità: ad esempio, perché le infezioni da parassiti hanno aumentato recentemente la loro prevalenza? Una spiegazione può essere l'aumento elevato di habitat artificiali come gli impianti di acquacoltura e i bacini di raccolte delle fattorie, nei quali moltissimi animali vivono ammassati in edifici chiusi. L'alto contenuto di fertilizzanti proveniente dai liquami del bestiame causa a sua volta un aumento della crescita algale e un incremento della popolazione di molluschi che rappresentano gli ospiti intermedi dei parassiti. In questi habitat artificiali gli Anfibi entrano in contatto con uccelli che fanno parte del ciclo del parassita (Fig. 1.6). Altri fattori di stress, come i pesticidi e altre sostanze chimiche, probabilmente interagiscono tra loro, rendendo gli Anfibi più sensibili alle malattie parassitarie.

Nel 2006 Mendelson e collaboratori proposero l'istituzione di un ente internazionale per la salvaguardia degli Anfibi, la Amphibian Survival Alliance (Mendelson et al. 2006), che però iniziò la sua attività solo nel 2011. Lo scopo dell'istituzione era quello di reintrodurre tutte le specie originarie minacciate nei loro ecosistemi naturali in tutto il mondo. Il consorzio è una organizzazione internazionale nata per dare una risposta globale e coordinata alla crisi degli Anfibi, basata su "guidelines" stabilite nel 2005 (Amphibian Conservation Action Plan, ACAP). Le priorità stabilite dall'ACAP sono il rilevamento e il controllo delle malattie infettive degli Anfibi e la salvaguardia degli habitat fondamentali. Un'altra organizzazione fondata recentemente è Amphibian Ark (2016) che comprende l'associazione internazionale degli zoo e degli acquari (World Association of Zoos and Aquariums), la IUCN Conservation Breeding Specialist Group e l'Amphibian Survival Alliance. I membri dell'Amphibian Ark si concentrano sul mantenimento di popolazioni in cattività di specie minacciate e/o sull'orlo dell'estinzione, sperando che sia possibile ripopolare in futuro i loro ambienti naturali (Vitt e Caldwell 2014).

I fattori coinvolti nel declino degli Anfibi sono quindi molto complessi. Considerando che gli Anfibi vivono nell'interfaccia tra acqua e terra e che quindi sono esposti su due fronti agli inquinanti, e considerando che gli Anfibi sono riusciti a sopravvivere nel corso dell'intera storia evolutiva dei vertebrati terrestri, il rapido declino che osserviamo attualmente rappresenta una seria avvisaglia di quanto possano essere devastanti gli effetti dell'attività umana sulle forme di vita del pianeta.

1.2.5. Prelievo di Anfibi dall'ambiente a scopo di consumo

Nel 1998 R. Melisch affermò giustamente “Oltre alla distruzione e modificazione degli habitat, la minaccia principale per le specie di piante ed animali che vivono in natura sono il commercio illegale e l'uso insostenibile a scopo di consumo” (Melisch, 1998). Queste affermazioni non sono certo esagerate di fronte allo sfruttamento operato dagli umani su tutti i biomi mondiali, specialmente per quanto riguarda il continente asiatico. Questo “uso insostenibile a scopo di consumo” comprende tutti i tipi di utilizzo delle specie, legali e illegali, e le catture intenzionali e/o non intenzionali.

Molte specie di Anfibi e Rettili sono minacciate direttamente dal consumo umano in senso più ampio, particolarmente nei paesi in via di sviluppo, ma non solo. Un esempio evidente riguarda l'eccessivo prelievo di specie autoctone di Cheloni del genere *Testudo* in Europa, Africa e Asia in tempi recenti: una volta escluse dal commercio le popolazioni decimate di *Testudo*, il mercato europeo si è rivolto come “sostituzione” alle testuggini nordamericane del genere *Terrapene*, avviando a sua volta la decimazione di queste popolazioni. Il prelievo di piante ed animali dall'ambiente naturale suscita sentimenti etici che hanno indotto a promulgare leggi regolatorie per renderlo sostenibile, ma il problema riguarda soprattutto gli aspetti non commerciali.

Anfibi e Rettili sono ampiamente prelevati in natura, ma l'impatto di questo prelievo si manifesta solo in aree ristrette ed è difficilmente percepibile. Il prelievo è fondamentalmente per consumo (cibo e medicine tradizionali), beni di lusso (pelli, gioielli e curiosità) e per il commercio di animali da compagnia. Ciascun tipo di prelievo e sfruttamento genera un'industria multimilionaria su scala mondiale, che a sua volta conduce all'eccessivo sfruttamento che preoccupa i conservazionisti. Il consumo su base locale come fonte di proteine per la sopravvivenza familiare contribuisce alla decimazione delle popolazioni. Il concetto di prelievo sostenibile può funzionare per specie di interesse commerciale o sportivo, ma può servire anche nel caso di specie eccessivamente sfruttate dal punto di vista alimentare: il prelievo sostenibile funziona se è lasciato in natura un numero sufficiente di individui per riprodursi e mantenere le popolazioni (Caughley e Gunn 1996). In pratica

risulta difficile stabilire limiti di prelievo: perché siano rispettati, questi limiti devono anche tenere conto dell'economia locale (quindi generare profitti) e delle esigenze alimentari umane. Se ad esempio il limite di prelievo è troppo basso, le popolazioni della specie aumenteranno ma le comunità locali ne avranno così poco beneficio da ignorare i limiti di prelievo; se, al contrario, il limite di prelievo è troppo alto, la specie oggetto di protezione si avvierà all'estinzione, scendendo al di sotto del limite minimo di vitalità per la sua popolazione (Caughley e Gunn 1996).

Il consumo umano di Anfibi e Rettili, sebbene molto inferiore a quello di pesci, uccelli e mammiferi, è tuttavia significativo. Per quanto riguarda i Rettili (ad esempio coccodrilli, iguane, serpenti e soprattutto tartarughe marine) il consumo si concentra su specie di grandi dimensioni e a vita lunga, che spesso proprio a causa del ritardo nel raggiungimento della maturità sessuale e delle difficoltà riproduttive mancano della capacità demografica per un recupero della popolazione, se eccessivamente sfruttata. Per quanto riguarda gli Anfibi, gli Anuri sono stati prelevati in grandissimo numero in tutto il mondo, principalmente per scopi alimentari: le specie provenienti dall'India e da altre zone dell'Asia sono tuttora inviate sui mercati alimentari del Nord America e dell'Europa. La Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (UN Food and Agriculture Organization, FAO) stima che tra il 1987 e il 1998 almeno 5200 tonnellate di rane siano state prelevate dall'ambiente ogni anno. Negli Stati Uniti il prelievo di rane per scopi alimentari è iniziato intorno alla metà del 1800, come documentato nel caso di *Rana aurora* (Anura, Ranidae), una specie un tempo comune e ora quasi ovunque estinta. Durante la “corsa all'oro” in California, dal 1888 al 1895, decine di migliaia di queste rane furono catturate e usate come cibo ogni anno. Già agli inizi del 1900 la popolazione di *R. aurora* era in declino e progressivamente sostituita da quella delle “rane toro” *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae) di dimensioni maggiori, che hanno contribuito in vario modo alla decimazione della specie originaria. Oggi *L. catesbeianus* è considerata una specie infestante ed invasiva che si è rivelata impossibile da eliminare (Vitt e Caldwell 2014).

Molti Anfibi sono stati raccolti per secoli non solo come cibo, ma anche come uso nella medicina tradizionale, come ornamento o come animali da compagnia: questo commercio ancora oggi coinvolge milioni di individui di Anfibi in tutto il mondo. Sebbene la U.S. Fish & Wildlife Service abbia un sistema di tracciamento di questo commercio, il controllo è difficile perché gli individui sono spesso indicati con il solo nome sistematico della famiglia e non con quello della specie (Vitt e Caldwell 2014). Su scala globale purtroppo non esiste ancora un database che tenga traccia dei numeri degli individui delle specie commercializzate che non siano indicati sulla lista del CITES.

1.2.6. Specie esotiche ed invasive

Le specie “non native” sono quelle che si trovano in habitat o regioni nelle quali non erano storicamente presenti o non si erano evolute. Altre specie “non native” possono invadere queste regioni e sono per questo definite “esotiche”, o “invasive”, a seconda degli effetti sull’ambiente e sulla flora e fauna locali. Le specie “esotiche” sono specie introdotte in un’area nella quale non si sono evolute, ma che non causano particolari danni. Molte specie “esotiche”, come la patata e il mais, sono parte integrante del nostro stile di vita. Le specie “invasive”, al contrario, causano gravi danni ecologici, sanitari ed economici ad una particolare regione (Vitt e Caldwell 2014). Le specie invasive ed esotiche possono essere introdotte in un determinato habitat attraverso vie intenzionali o non intenzionali. Le introduzioni intenzionali comprendono quelle a scopo alimentare o da compagnia, oppure, come nel caso degli insetti, per il controllo biologico: nella maggior parte dei casi queste specie sono innocue o benefiche, ma possono diventare invasive se, una volta introdotte, sono rilasciate in natura in modo incontrollato, arrecando danni alla fauna e flora locale. Le introduzioni non intenzionali comprendono specie che raggiungono nuove regioni tramite il commercio di legname, piante ornamentali e altro materiale spedito in tutto il mondo, oppure trasportate nell’acqua di zavorra e sentina delle navi.

Solo in tempi recenti si è iniziato a studiare l’impatto delle specie invasive sugli Anfibi, oltre al fatto che gli stessi Anfibi possono diventare in alcuni casi diventare specie invasive se trasportati (intenzionalmente o no) lontano dalle aree di origine. Studi recentissimi hanno esaminato l’impatto negativo dell’invasione di alcune specie di lombrichi asiatici su una popolazione nordamericana della salamandra *Plethodon cinereus* (Caudata, Plethodontidae) (Ziemba et al. 2016). Le foreste temperate a sud del confine del Wisconsin erano originariamente prive di lombrichi, che furono introdotti dai coloni europei ed asiatici insieme alle piante portate dai loro luoghi di origine e si diffusero a causa dell’uso come esche per la pesca e in agricoltura. I lombrichi si nutrono negli strati superficiali di foglie morte e detriti organici, riducendone quindi il contenuto in microinvertebrati, che a loro volta sono la fonte primaria di cibo per i giovani e gli adulti della salamandra. Questi studi dimostrano la complessità delle alterazioni che possono avvenire in un determinato ambiente quando una o più specie non native raggiungono nuove aree e diventano invasive (Ziemba et al. 2016).

L’impatto maggiormente disastroso per le specie native di Anfibi avviene tuttavia a causa dell’introduzione di vertebrati predatori nelle isole, che hanno molte caratteristiche favorevoli per il successo delle invasioni da parte di specie esotiche (Vitt e Caldwell 2014). I ratti, trasportati accidentalmente dall’uomo, hanno decimato le popolazioni di uccelli e Rettili in quasi ogni isola che hanno colonizzato e continuano a rappresentare una grave minaccia per le specie autoctone. I gatti, domestici o rinselvatichiti, sono abili cacciatori e predano un gran numero di Anfibi e Rettili nelle aree suburbane e rurali nelle isole di tutti i continenti.

Alcune specie di Anfibi sono diventate a loro volta invasive e stanno causando seri danni ecologici ed economici. E' stato già discusso in precedenza il caso della rana toro, *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae) introdotta come cibo ed ora stabilmente presente in molte aree degli Stati Uniti. La specie è voracemente carnivora e si nutre di numerose altre specie, dagli artropodi ai piccoli mammiferi, compresi i propri girini e altre specie di rane: in molti habitat nei quali è stata introdotta la rana toro ha eliminato tutte le altre specie native di Ranidi. Il rospo marino gigante *Rhinella marina* (Anura Bufonidae) originario del Centro e Sud America, è una delle specie di Anuri più invasive perché ha colonizzato l'Oceania, le Filippine, l'Australia, la Nuova Guinea e il sud della Florida. La sua introduzione è stata intenzionale per il controllo biologico dello scarabeo della canna da zucchero, *Dermolepida albobirtum* (Coleoptera Scarabeidae). Dato che l'espansione di *R. marina* è avvenuta in aree già ecologicamente degradate, inizialmente non sono state trovate prove chiare della sua influenza negativa sulle popolazioni locali: studi successivi hanno però dimostrato che in Australia le sue secrezioni velenose ("bufotossine") avevano causato avvelenamenti di animali domestici e selvatici ed indotto nel tempo specifici adattamenti nelle specie locali (Shine et al. 2016). Questo Anfibio è ora inserito nella lista delle 100 specie più invasive al mondo (Global Invasive Species Database 2016).

Un'altra specie invasiva tra gli Anuri è *Eleutherodactylus coqui* (Anura Elutherodactylidae), rana di piccole dimensioni originaria di Puerto Rico, trasportata accidentalmente alle Hawaii nel 1988 tramite commercio orticolo e vivaistico, e considerata una delle 100 specie più invasive al mondo (Global Invasive Species Database 2016). La specie è caratterizzata da un fastidioso richiamo notturno dei maschi, molto acuto e ripetitivo (il nome della specie è onomatopeico: il suono "KO" serve per allontanare i rivali, e il suono "KI" per richiamare le femmine). Come tutte le specie del suo genere, *E. coqui* non necessita di acqua e si riproduce tutto l'anno: può raggiungere una densità di 20000 individui per ettaro, che ogni notte catturano fino a 114000 prede. Ha quindi non solo un impatto fortemente negativo sugli ambienti forestali, ma anche costi sociali elevati nei confronti di residenti e turisti, a causa del forte rumore notturno provocato dai richiami di migliaia di individui (Bernard e Mautz 2016). All'inizio dell'invasione nelle Hawaii, la popolazione era limitata e furono messi in atto tentativi locali per eliminarla, ma non ebbero successo perché la specie non era considerata un serio problema ambientale e il commercio di prodotti ortofrutticoli non era controllato in modo sufficiente da impedire nuove invasioni. In più, nonostante fossero stati pubblicati manifesti e volantini informativi, molte persone continuavano ad introdurre queste rane di aspetto esotico come novità nei propri giardini, anche se il loro trasporto era stato reso illegale dal 1998. La popolazione si è quindi diffusa in modo esplosivo in più di 200 luoghi delle Hawaii ed attualmente si ritiene che sia impossibile eliminarla (Bernard e Mautz, 2016). Le infestazioni di *E. coqui* hanno abbassato il valore

economico delle abitazioni e degli hotel in alcune aree e alcuni residenti hanno addirittura deciso di lasciare le Hawaii pur di non ascoltare più il fastidioso richiamo di queste rane. L'unico tentativo di eliminare la specie che abbia avuto successo riguarda la località di Wahiawa sull'isola di Oahu: la risposta dei residenti è stata immediata dopo la scoperta della presenza della specie e ha richiesto otto anni di trattamenti ripetuti con acido citrico (letale per le rane ma non nocivo ad altre specie), insieme con una rimozione sistematica della vegetazione che offriva riparo alle rane (Vitt e Caldwell 2014). La storia di questa invasione dovrebbe servire da monito per altre isole, ma purtroppo alcune popolazioni di questa rana sono state recentemente scoperte sull'isola di Guam. Per evitare i danni enormi di tipo ecologico, economico e sociale causati dalle specie invasive sarebbero necessarie azioni immediate non appena il problema si presenta.

1.2.7. Salvaguardia e conservazione degli Anfibi

Con la progressive diminuzione e/o modificazione degli habitat naturali, il problema della salvaguardia delle specie e la conservazione degli ecosistemi diventa sempre più un argomento di tipo economico e amministrativo. La situazione ideale è il mantenimento di vaste aree che contengano habitat diversi senza alcun intervento umano, tranne per quanto riguarda la protezione dall'asportazione illegale di risorse naturali causato dal bracconaggio e dal taglio abusivo di alberi. Vi sono ancora aree di questo tipo ma, come precedentemente menzionato, le attività di sfruttamento che avvengono nelle regioni circostanti le aree naturali o le riserve conducono comunque al declino delle specie animali e vegetali che vivono in queste aree. Per salvare specie ed ecosistemi è quindi necessaria una gestione attiva ed efficiente, attraverso l'istituzione di rifugi ecologici inviolabili ("sanctuaries") in grado di controllare le attività negative intorno al rifugio, oltre ad una corretta gestione degli animali in cattività e del ripopolamento eseguito con animali allevati o provenienti in altre aree naturali. Questi programmi sono stati oggetto di discussione e controversie per più di 20 anni ma solo ora si sta iniziando a comprendere quali siano i fattori che ne determinano il successo o il fallimento (Vitt e Caldwell 2014).

Un punto fondamentale nello stabilire una riserva o un rifugio è quanto debba essere grande l'area da proteggere. Le dimensioni della riserva dipendono in modo assoluto dalla specie o dal gruppo di specie che si intende proteggere, ed è richiesta una conoscenza approfondita e dettagliata della storia naturale di tutte le specie coinvolte e degli habitat necessari per tutti gli stadi del ciclo biologico. Come in tutti gli argomenti legati alla conservazione, si deve raggiungere un compromesso tra la quantità di spazio necessaria secondo i biologi conservazionisti, quella necessaria alle popolazioni locali e quella necessaria per interessi economici e governativi. Le discussioni

scientifiche sono fondamentali per stabilire quali debbano essere le aree considerate al alta biodiversità (“hot spots”) che richiedono protezione immediata, l’estensione e la forma delle riserve, la distanza minima tra riserve, le attività umane ad impatto negativo nei pressi della riserva, e la forma dei corridoi che collegano le riserve. Sono problemi molto complessi e difficili da risolvere. Un primo argomento di discussione riguarda se sia meglio conservare singole specie, oppure comunità ed ecosistemi. Molti biologi sostengono ovviamente il secondo obiettivo, ma è più facile ottenere il sostegno dei politici e del grande pubblico se si identifica una “specie iconica” da proteggere. Ad esempio, il panda maggiore, *Ailuropoda melanoleuca* (Carnivora, Ursidae) o il gorilla di montagna, *Gorilla beringei beringei* (Primates Hominidae) attirano l’attenzione del pubblico, ottenendo il sostegno economico necessario per la conservazione e la fondazione di riserve. Il vantaggio di queste “specie iconiche” è che sono di grandi dimensioni, quindi richiedono la protezione di grandi aree e contenenti habitat diversi, proteggendo in questo modo molte altre specie e comunità. Lo svantaggio principale è che la conservazione di singole specie può diventare tanto concentrata sulla “specie iconica” da perdere la prospettiva della necessità di conservare interi habitat ed ecosistemi (Vitt e Caldwell 2014).

Poiché le riserve naturali sono stabilite per impedire l’estinzione di specie, è fondamentale il concetto di popolazione minima vitale (“minimum viable population”, MVP) di una data specie. Come precedentemente menzionato, l’MVP è stato calcolato solo per alcune specie, principalmente mammiferi, ma non vi sono dati precisi di MVP per nessuna specie di Anfibi (Vitt e Caldwell 2014). Ad esempio, negli Stati Uniti le leggi federali prescrivono la protezione di ogni area umida di dimensioni superiori a 0.4 ettari, ed anche la necessità di stabilire intorno ad ogni area umida una zona terrestre “tampono” per proteggerla da intrusioni e interferenze. Tuttavia anche le leggi federali più restrittive proteggono meno del 50% di questi territori. Gli adulti di molti Anfibi delle zone umide conducono una vita terrestre, tranne che al momento della riproduzione e dello sviluppo. Ad esempio, gli adulti di alcune specie di *Ambystoma* si spostano in media di 125 metri dal bordo dello stagno dove si riproducono e a volte a distanze ancora maggiori. Assumendo che l’area con la distanza media contenga il 50% della popolazione, la zona “tampono” dovrebbe estendersi almeno 164 metri oltre il bordo dello stagno, in modo da comprendere le attività terrestri del 95% della popolazione (Vitt e Caldwell 2014). Questi dati fanno comprendere quanto sia difficile identificare e realizzare uno spazio sufficiente alla salvaguardia di una specie, o un certo numero di specie, in una data comunità. Stime riguardanti i mammiferi di piccola taglia indicano un’area tra 100 e 1000 km². E’ presumibile che specie di Anfibi non migratori richiedano aree meno estese: dati riguardanti l’urodelo *Plethodon shenandoah*, endemico di un’area di 128 ettari nella foresta nazionale George Washington (Virginia) con 10 popolazioni, dimostrano che la specie ha resistito sia a passati eventi di esteso disboscamento

ed incendi, sia ad un recente evento di defogliazione completa della foresta, poiché vive sulle pendici collinari dell'area boscosa. Per la protezione della specie sarebbe quindi sufficiente un'unica area protetta rettangolare di circa 36 km², comprendente tutte le popolazioni isolate (Vitt e Caldwell 2014).

Il pericolo di estinzione delle popolazioni di piccole dimensioni è una minaccia costante perché gli habitat naturali sono continuamente soggetti a frammentazione. Il riconoscimento che le riserve non possono essere estese quanto richiesto dai conservazionisti e necessario per le popolazioni ha condotto al concetto di “corridoio biologico”. Se non si possono stabilire riserve estese, è possibile che tante piccole riserve collegate da “corridoi biologici” di habitat naturali siano comunque utili? Dal punto di vista concettuale, i corridoi biologici sembrano una soluzione soddisfacente, anche se i critici sollevano problemi come l'aumento di mortalità lungo i corridoi, a causa della concentrazione dei predatori e dell'incapacità delle specie a scarsa diffusione di sfruttare corridoi ristretti. La tecnica dei “corridoi ristretti” è stata ampiamente applicata nella gestione delle risorse naturali prima che ne fosse stabilita l'efficacia: purtroppo i pochi risultati disponibili confermano ampiamente le ipotesi dei critici riguardo al fatto che non siano realmente efficaci per la maggior parte delle specie (Vitt e Caldwell 2014).

1.2.8. Gestione delle popolazioni in cattività e loro trasferimento

Gli Anfibi possono essere mantenuti in cattività per periodi brevi o prolungati: la cattività temporanea (per periodi comunque brevi) può proteggere uno o più stadi del ciclo vitale per aumentare la sopravvivenza della specie in un momento particolarmente critico. È possibile fare riprodurre alcune specie in cattività ed usarle in seguito per trasferimenti (“translocation”) o ripopolamenti diretti in zone in cui la specie si è estinta, o per rinvigorire le poche popolazioni ancora presenti in natura. Il trasferimento di specie, che comprende l'incremento numerico, la ricollocazione nel territorio di origine o il popolamento di un nuovo territorio, è definito come il rilascio intenzionale di individui per stabilire o incrementare la popolazione di una data specie. La specie prescelta è tipicamente in declino o in pericolo di estinzione, sebbene le introduzioni possono comprendere il rilascio intenzionale o non intenzionale di individui in una località o un habitat estraneo alla specie. Il ripopolamento consiste nel rilascio di individui di una data specie in un luogo nel quale la specie si è estinta, mentre l'incremento numerico è il rilascio di individui di una specie in una località in cui la specie è ancora presente. Tutti i tipi di trasferimento sono ampiamente usati in campo conservazionistico, sebbene vi siano controversie su ciascuna di queste strategie.

Il successo nella conservazione degli Anfibi tramite la cattività è stato variabile, con aspetti positivi e negativi. La riproduzione in cattività di specie animali per affezione o per hobbistica è divenuta una impresa commerciale su larga scala a partire dal 1990. Tuttavia, tranne nel caso del rospo africano *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae) e della tartaruga dalle orecchie rosse *Trachemys scripta elegans* (Testudinae Emydidae) tutti gli Anfibi e i Rettili per questo tipo di mercato sono stati quasi esclusivamente presi in natura fino alla fine degli anni '80. Ancora oggi le popolazioni naturali sono una fonte principale per questo commercio, ma l'allevamento in cattività ora fortunatamente si è molto diffuso. Si discute ancora se questo allevamento in cattività per motivi hobbistici abbia effettivamente ridotto la domanda di Anfibi presi in natura o abbia invece purtroppo incrementato la domanda per le specie più rare e più minacciate. L'esistenza di hobby o collezionismo di questo tipo ha certamente contribuito ad aumentare le conoscenze sulla biologia di molte specie, e ha fornito agli appassionati animali di allevamento in buona salute e longevi: nonostante quanto si creda, però, l'allevamento in cattività per scopi hobbistici non fornisce animali adatti per il trasferimento (Vitt e Caldwell 2014).

I successi nei programmi di trasferimento o di ripopolamento per Anfibi appositamente allevati in cattività per più di un anno sono stati scarsi (Germano e Bishop 2009). Solo il 50% dei trasferimenti effettuati per gli Anfibi e il 30% di quelli per i Rettili ha avuto successo. Le percentuali di successo sembrano associate al numero di individui rilasciati (generalmente più di 1000) e alla correttezza delle motivazioni per il trasferimento. In generale i trasferimenti per scopi conservazionistici hanno avuto una percentuale di successo intorno al 40%, mentre quelli determinati da conflitti tra interessi umani e salvaguardia di specie naturali hanno avuto percentuali di successo intorno al 12%. I trasferimenti per scopi di ricerca hanno una percentuale di successo pari a zero (Germano e Bishop 2009). Sembra paradossale che queste percentuali siano così basse, considerando che il rilascio accidentale di un numero relativamente piccolo di individui di specie alloctone, come ad esempio nel caso di *Rhinella marina* o del pitone della Birmania, *Python bivattatus* (Squamata, Pythonidae), può produrre una popolazione molto numerosa e provocare un'invasione su larga scala (Vitt e Caldwell 2014). È chiaro che i fattori alla base del successo di una colonizzazione intenzionale o accidentale sono molto complessi e legati alla specie. Alcuni zoo e riserve naturali sono riusciti a mantenere e a fare riprodurre specie di Anfibi in declino o in via di estinzione, in alcuni casi per molte generazioni, ma solo in pochi casi si è ottenuto un effettivo ripopolamento in zone in cui la specie si era estinta. La maggior parte dei programmi di questo tipo è però fallita in primo luogo per la difficoltà di identificare il problema ambientale preciso responsabile del declino della popolazione originaria, di solito correlato alla sparizione o alla modifica drastica dell'habitat. Un altro fattore fondamentale è la pressione esercitata dai predatori (umani compresi) o da ratti, gatti rinselvatichiti e altre specie

che in vari modi provocano il declino della popolazione. La scarsa variabilità e altri fattori genetici rendono molto difficile mantenere in cattività gruppi vitali di popolazioni molto piccole e prossime all'estinzione. I programmi orientati alla conservazione tengono conto di queste difficoltà, ma quelli che hanno scopi commerciali o hobbistici raramente lo fanno, anzi, sono spesso interessati ad incrementare linee genetiche aberranti, perché di maggiore valore economico. Un esempio di questi interessi è quello del rospo delle Baleari *Alytes muletensis* (Anura, Alytidae) ("ferreret"), noto inizialmente allo stato fossile e considerato estinto nell'arcipelago delle Baleari: alcune popolazioni isolate furono scoperte nel 2000 in remote gole montane dell'isola di Maiorca. Sembra che la specie sia stata in passato condotta quasi all'estinzione dalla predazione da parte della natrice viperina, *Natrix maura* (Squamata, Natricidae) introdotta dai Romani nell'arcipelago per motivi religiosi. Dopo la riscoperta, la specie è stata protetta legalmente, sono state stabilite riserve naturali e alcune colonie riproduttive in due zoo, ciascuna originata da un piccolo gruppo di individui. Queste colonie sono state usate per ripopolamenti: di otto tentativi, tre hanno avuto successo (le popolazioni hanno ricominciato a riprodursi in natura), uno è fallito e i risultati degli altri quattro non sono ancora chiari (Smith et al. 2017). Negli Stati Uniti, il rospo di Houston, *Anaxyrus houstonensis* (Anura, Bufonidae) è una specie endemica in pericolo di estinzione che vive solo nella Lost Pine Forest, una riserva di boschi di pino con suoli sabbiosi della regione sud-est del Texas. L'agricoltura e altre attività umane hanno ridotto la specie a poche popolazioni isolate in natura. La specie si è adattata alla riproduzione in cattività e lo zoo di Houston ha fornito adulti, uova e girini per il ripopolamento, ma nonostante gli sforzi per ripristinare la specie nei siti originari e in altri simili, nessuna nuova popolazione si è ricostituita. Nel settembre 2011 l'habitat naturale della specie è stato devastato dal più grande incendio boschivo nella storia del Texas (Bastrop County Complex Fire) e il futuro della popolazione naturale è ancora più incerto (Duarte et al. 2014).

I programmi di ripopolamento presentano inoltre pericoli potenziali, come ad esempio l'introduzione di malattie in popolazioni sane e l'eccesso di diversità genetica in una popolazione geneticamente stabile. Le piccole popolazioni isolate sono spesso fortemente adattate all'ambiente locale e a qualcosa di difficilmente valutabile da parte degli studiosi, cioè le micro-differenze tra ambienti dove vivono popolazioni vicine. L'incremento tramite un apporto esterno di individui con nuovi patrimoni genetici in una popolazione geneticamente stabile e adattata può cambiare i rapporti tra la popolazione residente e il suo ambiente (Vitt e Caldwell 2014). A lungo termine, il pool genetico può adattarsi all'ambiente locale, ma la risposta iniziale della popolazione locale può essere quella di una minore sopravvivenza: nel caso di una popolazione molto piccola, anche questo minimo declino nel numero di individui può causarne l'estinzione. Le pratiche di conservazione tramite trasferimento

devono quindi procedere con estrema cautela, raccogliendo tutte le informazioni possibili per evitare di causare ulteriori danni alla specie o alla popolazione che deve essere preservata.

Infine, perché abbia successo qualsiasi strategia di conservazione deve indurre cambiamenti nel modo di pensare della gente comune e di chi stabilisce le politiche regionali, nazionali e globali. Questa sfida è enorme, considerando quanto la gente sia comunemente “seppellita” dalla complessità della propria vita quotidiana e di quanto i politici siano perennemente concentrati su come procurarsi fondi e voti per le prossime elezioni. La ricerca ecologica correlata alla conservazione tende a finire quando i lavori scientifici sono pubblicati, perché gli scienziati cercano continuamente nuovi fondi o iniziano nuovi campi di studio per procedere nella loro professione (Vitt e Caldwell 2014). È necessario che gli scienziati abbiano un ruolo attivo nell’indirizzare le strategie di conservazione, ma l’attuale sistema universitario non premia questo tipo di attività. Gli scienziati inoltre dovrebbero istruire ed educare i politici, ma questo non è lo scopo per il quale sono stati addestrati. Inoltre, dato che le ricerche ecologiche e le pratiche di conservazione sollevano spesso difficili questioni etiche, sarebbe necessario dare priorità e stabilire standard internazionali per questo tipo di studi. Recentemente sono stati suggeriti modelli che possano informare e migliorare il processo etico di decisioni riguardanti l’ecologia e la conservazione delle comunità naturali (Minteer e Collins 2013). Ma il fatto che gli scienziati, i conservazionisti e i politici riescano a coordinare gli sforzi in modo efficace per ottenere la realizzazione di strategie di conservazione che diano buoni e tempestivi risultati è ancora una questione molto aperta.

1.3. Hylidae

Gli Hylidae o Ilidi (Anura; Neobatrachia; Hylidae) (Fig. 1.7) sono Anuri arboricoli del Nord e Sud America, Eurasia e Australia di dimensioni da molto piccole (12-20 mm negli adulti di *Litoria microbelos* e *Pseudacris ocularis*) a grandi (135-140 mm negli adulti di *Litoria infrafrenata* e *Osteopilus vasta*). Alcuni vivono sul terreno e le specie arboricole hanno ventose espanse sulle dita. Il cranio degli Ilidi ha palatini e frontoparietali appaiati. La colonna vertebrale ha otto vertebre presacrali olocordali, tutte proceli. I processi trasversi della vertebra sacrale sono scarsamente o moderatamente espansi, e la vertebra ha un’articolazione bicondila con l’urostilo. Gli individui postmetamorfici (o “postmetamorfi”) non hanno costole dorsali sulle vertebre presacrali. Il cinto pettorale è arcuato, con uno sterno ben distinto: il fibulare e il tibiale sono fusi alle loro estremità prossimali e distali. Una cartilagine intercalare è presente tra le falangi terminali e penultime di ciascun dito, e le punte delle falangi terminali sono appuntite in alcune specie che vivono sul terreno, mentre sono espanse in ventose (“*toepads*”) nelle specie arboree. Le larve hanno la bocca

parzialmente cheratinizzata e le camere branchiali destra e sinistra sono fuse posteriormente al cuore e svuotate da uno spiracolo sul lato sinistro della parte centrale del corpo. La riproduzione negli Iliidi è variabile, ma la maggior parte delle specie ha girini acquatici ed effettua amplessi ascellari. Molte specie depongono le uova negli stagni o nelle paludi, altre nelle acque correnti dei fiumi, altre ancora nelle piccole pozze d'acqua sugli alberi. Alcune specie del genere *Hypsiboas* costruiscono nidi sulle rive dei fiumi in piccoli vortici di fango morbido o sabbia, depositando le uova nei nidi all'interno di una pellicola superficiale. Alcune specie di questo gruppo sono note come "rane gladiatori" perché i maschi usano una spina acuta alla base del pollice durante le competizioni amorose.

La famiglia Hylidae comprende tre sottofamiglie (Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae), con 46 generi e 901 specie.

La sottofamiglia Hylinae comprende 40 generi, tra cui *Acris*, *Hypsiboas*, *Hyla* e *Pseudacris*, e 646 specie. La distribuzione di questa sottofamiglia comprende l'Eurasia fino al Nord Africa, l'arcipelago del Giappone e le Americhe. Le caratteristiche del gruppo comprendono una ossificazione variabile del cranio, di norma non completamente fuso, tranne che in alcune specie. Le pupille sono orizzontali e il muscolo interioideo della mandibola si estende posteriormente oltre la mascella inferiore, mentre il muscolo intermandibolare è scarsamente differenziato. Dal punto di vista ecologico gli Hylinae sono prevalentemente arboricoli, sebbene alcuni generi (ad esempio *Acris* e *Pseudacris*) siano terrestri o vivano nei prati. Alcune specie sono scavatrici e altre acquatiche. Il comportamento riproduttivo presenta vocalizzazioni dei maschi per attirare le femmine, e l'amplesso ascellare è stimolato dal contatto. La deposizione delle uova avviene in acqua, in luoghi che vanno dalle cavità degli alberi e delle Bromeliaceae fino agli stagni e ai laghi. Dalle uova escono girini che nuotano liberi e eseguono la metamorfosi a ranette. Le cure parentali non sono comuni ma sono presenti nelle "rane gladiatori": i maschi attirano con vocalizzi le femmine verso i nidi, e in seguito proteggono le uova e i girini. Alcune specie depongono le uova non fecondate nelle piccole riserve d'acqua delle Bromeliaceae o delle cavità degli alberi per nutrire i girini sviluppati dalle uova fecondate degli stessi genitori. Il genere *Pseudis* è costituito da rane quasi completamente acquatiche, con zampe palmate: nella regione del Chaco, quando laghi e fiumi si seccano in estate, *P. paradoxa* entra in letargo nel fango secco. Questa specie ha girini giganti lunghi 220 mm e pesanti 98g, tuttavia gli adulti sono di piccole dimensioni (circa un terzo di quelle dei girini).

La sottofamiglia Pelodyadinae comprende un solo genere (*Litoria*) con 197 specie, presenti in Australia e Nuova Guinea, ma anche in alcune isole dell'Indonesia e del sud Pacifico. Hanno ossificazione variabile del cranio e pupille orizzontali. Il muscolo interioideo della mandibola si estende posteriormente oltre la mascella inferiore, mentre il muscolo intermandibolare ha un elemento

apicale isolato. Sono Iliidi terrestri o arboricoli, ma alcuni sono semi-fossori. La specie terrestre *Litoria nasuta* è nota in Australia come “rana razzo” (“*rocket frog*”) a causa dei salti prodigiosi di oltre un metro. Il comportamento riproduttivo di questa sottofamiglia segue quello tipico degli Anuri: il maschio emette vocalizzi per attirare le femmine ma alcune specie sono prive di sacche vocali e emettono suoni molto deboli o nessun suono. L’amplesso è ascellare e stimolato dal contatto della femmina con il maschio. Le uova sono depositate prevalentemente in pozze temporanee o piccoli stagni e i girini nuotano liberi. Le cure parentali sono sconosciute nelle Pelodyadinae.

La sottofamiglia Phyllomedusinae comprende cinque generi (*Agalychnis*, *Cruziohyla*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa*), rispettivamente con 14, 2, 7, 5 e 30 specie. La distribuzione di questa sottofamiglia va dal Messico del sud all’Argentina. Le caratteristiche di questo gruppo comprendono una ossificazione variabile del cranio, normalmente mancante di estese fusioni come negli Hyalinae. Le pupille sono verticali, il muscolo interioideo si estende posteriormente oltre la mascella inferiore e il muscolo intermandibolare ha parti laterali accessorie. Dal punto di vista ecologico, le Phyllomedusinae sono quasi tutte arboricole (Fig. 1.7). Sebbene siano in grado di saltare, di solito camminano lentamente e metodicamente tra i rami, cercando cibo o luoghi dove sostare. Specie come *Phyllomedusa hypochondrialis* e *P. sauvagii* sono uricoteliche, eliminando acido urico e non urea per risparmiare acqua. Numerose specie possiedono secrezioni lipidiche della pelle che permettono di ridurre la perdita d’acqua a livello dell’epidermide. *P. sauvagii* usa gli arti posteriori in modo simile a quello di un contorsionista, per ricoprire l’intero corpo con questo secreto (“*wiping behaviour*”). È in grado inoltre di sopportare un eccesso di calore senza perdere ulteriormente acqua per evaporazione. Il nome della sottofamiglia (in greco “rane delle foglie”) deriva dal loro comportamento di deposizione delle uova: le specie depongono infatti generalmente sulle foglie o sui rami che sovrastano specchi d’acqua. Quando è ancora in amplesso con il maschio, la femmina sceglie un sito di deposizione e depone 100-150 uova, fecondate in seguito dal maschio. La coppia scende quindi verso l’acqua, in modo che la femmina possa idratarsi prima di tornare al sito originale e continuare la deposizione: la sequenza può essere ripetuta alcune volte. Non tutte le Phyllomedusinae depongono le uova in questo modo: *Phrynomedusa marginata* nasconde le uova nelle fessure degli alberi e *Cruziohyla calcarifer* deposita un piccolo gruppo di uova sopra una piccola riserva d’acqua che si forma nel cavo di alberi caduti.

1.4. Ranidae

La famiglia Ranidae (Anura, Neobatrachia, Ranoidea), o rane propriamente dette, comprendono 16 generi, tra cui *Lithobates*, *Pelophylax*, *Pseudorana* e *Rana*) con 347 specie. La

distribuzione di questa famiglia è cosmopolita, tranne che nell'estremo sud del continente americano e nella maggior parte del territorio australiano. Le caratteristiche di questo gruppo sono varie: la maggior parte delle specie è di dimensioni medie o grandi (la specie americana *Lithobates catesbeianus* raggiunge 85-180 mm, e quella della Nuova Guinea *Hylarana arfaki* 90-160 mm) (Fig. 17.41). Il cranio ha palatini e frontoparietali pari e la colonna vertebrale ha otto vertebre presacrali olocorde, tutte proceli tranne l'ultima vertebra presacrale, che ha una superficie biconcava. I processi trasversi della vertebra sacrale sono cilindrici, e questa vertebra ha un'articolazione bicondila con l'urostilo. Gli individui postmetamorfi non hanno coste dorsali sulle vertebre presacrali. Il cinto pettorale possiede uno sterno distinto e il fibulare e il tibiale sono fusi alle estremità prossimali e distali. Non vi è alcuna cartilagine intercalare tra le falangi terminale e penultima delle dita; le falangi terminali possono essere arrotondate, appuntite o a forma di T. Le larve hanno apparato boccale cheratinizzato, e le camere branchiali destra e sinistra sono fuse posteriormente al cuore e svuotate da uno spiracolo sul lato sinistro del corpo. Dal punto di vista ecologico, la maggior parte dei Ranidae vive tipicamente negli stagni, deponendo le uova in aggregati che formano una pellicola in superficie. I girini di solito eseguono la metamorfosi entro alcuni mesi, anche se specie come *L. catesbeianus* possono richiedere uno o due anni per eseguire la metamorfosi. Il genere *Amolops* si riproduce in acque correnti di ruscelli e fiumi, e tutti i suoi girini sono gastromizofori poiché possiedono una grande ventosa addominale per attaccarsi alle rocce nell'acqua corrente. Le specie del genere *Odorrana* sono dette "rane delle cascate" perché vivono nei fiumi di montagna in prossimità di foreste: emettono comunemente richiami da rocce in aree vicine alle cascate e possiedono una pelle odorosa ma fortemente tossica.

1.5. *Agalychnis callidryas*

Agalychnis callidryas (Cope, 1862) (Amphibia Anura: Hylidae), nota anche come "raganella dagli occhi rossi" ("red-eyed tree frog") (Fig. 1.8) è un Ilide arboricolo neotropicale e notturno, diffuso in tutta l'America Centrale, dalle regioni di Veracruz e Oaxaca in Messico a Panama e Columbia, e nel versante atlantico dell'America Settentrionale, dal livello del mare fino a 1250 m (Leenders 2001). Sono state segnalate anche nei giardini botanici di Cartagena (Columbia) (Ruiz-Carranza et al. 1996; Savage 2005). L'areale di distribuzione della specie è indicato nella Fig. 1.9.

Vive nelle foreste tropicali e in pianure e colline, purché vi siano nelle vicinanze corsi d'acqua o stagni. Le femmine raggiungono i 77 mm di lunghezza e i maschi 59 mm (Savage 2005). Il nome del genere deriva dal greco "aga" = molto, e "Lychnis", genere di piante il cui principale rappresentante ha fiori di colore rosso scarlatto, in riferimento al colore degli occhi: il nome della specie deriva dal greco "kallos" = bello, e "dryas", driade, una ninfa degli alberi e delle foreste. L'aspetto di questa raganella è infatti molto attraente e ha reso questa specie popolare come animale da affezione e per l'allevamento in cattività.

A. callidryas ha grandi occhi rossi sporgenti e laterali, con pupille nere e verticali, e un corpo snello, appiattito ed agile, di colore verde brillante sul dorso, con striature verticali gialle e blu sui fianchi e striature blu sulle parti prossimali degli arti (Fig. 1.8, 1.10) (Duellman 2001; Leenders 2001). La testa è rotonda con muso a tronco di cono e timpani visibili. Le dita sono corte e palmate, con estremità di colore rosso o arancione provviste di grandi ventose. La pelle, molto liscia, è morbida e fragile sul ventre e spessa e robusta sul dorso (Duellman 2001; Leenders 2001; Savage 2005). Il dorso è talvolta striato trasversalmente con sottili linee verde scuro negli individui provenienti dal Nicaragua o dal Costa Rica, o con piccoli puntini bianchi. Il numero di strisce sui fianchi aumenta nelle popolazioni da nord a sud e in alcune popolazioni caraibiche è presente una lunga striscia giallastra che collega la parte superiore delle strisce verticali, separando i fianchi blu dal dorso verde (Duellman 2001). I maschi adulti hanno fessure vocali pari ed un unico sacco vocale interno e mediano, oltre ad un ispessimento nuziale spinoso di colore grigio-marrone alla base di ciascun pollice (Savage 2005).

A. callidryas ha abitudini principalmente notturne, è una saltatrice eccellente ed è perfettamente adattata alla vita arboricola. Al contrario della maggior parte delle specie di Hylidae, non è velenosa e per proteggersi ha evoluto un tipico mimetismo riscontrabile nell'aspetto della pupilla verticale (segno distintivo di una specie velenosa). I grandi occhi rossi servono anche come adattamento difensivo, tramite un comportamento mimetico di apertura improvvisa dei grandi occhi rossi all'avvicinamento di un predatore (mimetismo deimatico) (Fig. 1.11). Lo spalancamento improvviso degli occhi può spaventare il predatore e dare il tempo alla raganella di fuggire. Durante il giorno *A. callidryas* resta immobile sulle foglie in una tipica posizione di riposo, coprendo i fianchi a strisce blu con le zampe posteriori ed infilando le estremità provviste di ventose arancioni sotto il ventre, chiudendo infine gli occhi rossi: in questo modo appare quasi completamente di colore verde, mimetizzandosi perfettamente tra le foglie (Fig. 1.11). La posizione aiuta inoltre a mantenere l'umidità del corpo e a mantenere la specie nascosta dai serpenti arboricoli, i suoi principali predatori. La specie vive nella foresta sempreverde stagionale e nelle foreste pluviali tropicali, in prossimità di corsi d'acqua, a temperature tra 24 e 28 gradi di giorno e tra 19 e 25 gradi di notte. Ha attività

crepuscolare e notturna ed arti adattati per afferrare i rami, spostandosi in modo caratteristico con movimenti lenti e molto marcati: è tuttavia anche una buona nuotatrice. Si nutre di falene, cavallette, grilli e altri insetti, e talvolta anche di rane più piccole. Le prede sono inghiottite intere ed ingerite con l'aiuto degli arti anteriori, con un movimento dei bulbi oculari verso l'interno che facilita una rapida deglutizione.

La specie è ovipara e si riproduce durante la stagione delle piogge, da maggio a novembre (Donnelly e Guyer 1994). I maschi iniziano il rituale di accoppiamento facendo vibrare i rami dove si trovano, per allontanare i rivali. Questo comportamento è stato il primo che abbia dimostrato l'uso della vibrazione nella comunicazione tra vertebrati arboricoli. Il maschio inizia quindi ad emettere al crepuscolo un suono aggressivo simile ad uno schiocco ("chack") per allontanare i rivali ed attirare l'attenzione delle femmine (Gray e Rand 1997) ripetuto ad intervalli di 8-60 secondi (Pyburn 1970; Duellman 2001). Se i livelli di umidità sono sufficienti, i maschi discendono verso le pozze d'acqua, continuando ad emettere i richiami: le femmine discendono a loro volta, si avvicinano ai maschi prescelti e permettono l'amplesso (Pyburn 1970). L'amplesso è ascellare (Fig. 1.12) e la femmina trasporta il maschio sul dorso per alcune ore, trasportandolo per alcuni minuti anche in acqua per assorbirne a sufficienza (D'Orgeix e Turner 1995). La femmina sceglie poi una foglia sovrastante uno stagno o una pozza d'acqua e depone circa 40 uova di colore verde per ogni ovideposizione (fino a 5 in un'unica notte), in un ammasso gelatinoso trasparente che serve a fare aderire le uova alle foglie e a mantenerle umide (Fig. 1.12) (Pyburn 1970; Warkentin et al. 2006a). Ciascun uovo appena deposto ha un diametro medio di 3.7 mm e alla schiusa raggiunge i 5.2 mm (Warkentin 2002). La deposizione delle uova avviene di solito su entrambi i lati della foglia, quindi la femmina ripiega la foglia per nascondere le uova a predatori come i serpenti arboricoli "occhio di gatto" (*Leptodeira settentrionale*). Le uova sono depositate nel terreno molto raramente (Pyburn 1970). La specie usa talvolta altri siti di deposizione, come piccole depressioni causate dall'uomo o dagli animali e piene d'acqua, sovrastate da vegetazione, rami e piccole piante sovrastanti cavità piene di acqua in alberi caduti e perfino la parte inferiore di apparecchi per la raccolta d'acqua (McCranie et al. 2003). I genitori possono proteggere la covata dal sole e dai predatori ripiegando la foglia sopra le uova e tenendola attaccata con la stessa massa gelatinosa che circonda le uova (Leenders 2001). Altre Phyllomedusinae proteggono le covate ripiegando le foglie sulle uova, ma altri autori affermano che questo comportamento per *A. callidryas* rifletta semplicemente il fatto di avere attaccato le uova a tipi particolari di foglie che tendono ad arrotolarsi (Duellman, 2001).

La fecondazione avviene immediatamente dopo la deposizione delle uova (D'Orgeix and Turner 1995; Leenders, 2001) e analisi molecolari hanno confermato che possono avvenire casi di paternità multipla (Briggs, 2008). Entro due settimane le uova si schiudono e nascono girini che

cadono in acqua. La schiusa comporta quindi un cambiamento di habitat, da subaereo ad acquatico, con un concomitante cambiamento di possibili predatori e pressione selettiva (Warkentin 1995). I girini possono sopravvivere fino a 20 ore senza acqua (Valerio 1971) e quelli che cadono sul terreno o restano attaccati alle foglie possono ancora sopravvivere se una pioggia tardiva li trascina in acqua, o se sono in grado di raggiungere l'acqua agitando la coda (Pyburn 1970).

Le uova di *A. callidryas* possono schiudere precocemente (plasticità fenotipica) quando un cambiamento delle condizioni ambientali o la presenza di predatori, segnalata da vibrazioni, rivela un pericolo per la sopravvivenza della covata. Nelle covate non disturbate gli embrioni si sviluppano in modo sincrono, ma schiudono in modo asincrono, tra 6 e 10 giorni dalla deposizione (Warkentin 2005), perché le larve ad un grado più avanzato di sviluppo sono meno vulnerabili agli attacchi dei predatori acquatici (Warkentin 1995; Warkentin 2005). Se invece sono disturbate, le covate schiudono in modo sincrono in 4-5 giorni, in risposta a 4 tipi diversi di rischi naturali: attacchi di serpenti, attacchi di vespe, infestazioni fungine ed eccesso di acqua. Anche l'ipossia può indurre la schiusa precoce. Questo evento è una decisione comportamentale causata dalla percezione di movimenti rapidi ed energici: gli embrioni che non subiscono questo movimento non schiudono anche se hanno raggiunto uno stadio adatto di sviluppo (Warkentin et al. 2006b). Il disturbo meccanico è quindi necessario e sufficiente per indurre una schiusa rapida e sincronizzata, ma è più complesso di una semplice risposta meccanica perché non avviene quando le uova sono toccate, raccolte o trasportate, e neppure in presenza di forti venti, piogge intense o stimoli visivi e chimici da parte di vespe o serpenti (Warkentin 2005). Sembra che gli embrioni di *A. callidryas* siano in grado di valutare il modello temporale delle vibrazioni del substrato, e che impieghino alcuni secondi o qualche minuto per elaborare le informazioni ed agire di conseguenza, distinguendo le vibrazioni provocate dall'attacco di un serpente da quello di un temporale (Warkentin et al. 2006b, 2007).

I girini sono piuttosto grandi e misurano 48 mm allo stadio 34 di Gosner (Gosner, 1960). La bocca è anteroventrale, con un disco orale completo e due file di dentelli superiori e tre file inferiori, con una piccola fessura mediana nella fila superiore (Duellman 2001; Savage 2005). Il corpo del girino è generalmente grigio-oliva dorsalmente e grigio bluastrò ventralmente (Fig. 1.12) ma può avere colori diversi a seconda dello stato emotivo o delle condizioni ambientali (Duellman 2001). Comunemente predati da larve di insetti, altri Anfibi e pesci, i girini restano in acqua da tre settimane ad alcuni mesi, fino alla metamorfosi: il tempo di metamorfosi è variabile in base alle condizioni ambientali. Dopo la metamorfosi, il colore dei girini cambia dal verde al marrone e gli occhi gialli diventano rossi: questi cambiamenti segnalano il raggiungimento dello stadio adulto. Gli individui giovani che superano le prime settimane dopo la metamorfosi si spostano all'interno di cavità in tronchi e piante come le Bromeliaceae, nutrendosi di moscerini e altri piccoli insetti (Stuart et al.

2008). A due anni sono maturi ed iniziano a riprodursi a 3 o 4 anni di età. L'aspettativa di vita nell'habitat naturale è da 3 a 5 anni.

La specie può tollerare un certo grado di modifiche dell'habitat, come ad esempio nelle aree dove è praticata la raccolta selettiva del legname, ma non si ritiene che possa sopravvivere nei luoghi nei quali la foresta è stata fortemente degradata (Stuart et al. 2008), anche se vi sono notizie della presenza di uova e girini in alcune aree ampiamente deforestate dell'Honduras (McCranie et al., 2003). La specie è inserita nella IUCN Red List of Threatened Species as "Least Concern" (The IUCN Red List 2016) per la sua ampia distribuzione in una popolazione considerata per il momento numerosa, adattabile, non frammentata e non in declino, anche se il suo habitat è considerato un ambiente a rischio. Può quindi rappresentare un modello per gli Anfibi e per gli Anuri, dato che è tra le poche specie non in pericolo. Il numero diploide di cromosomi di *A. callidryas* è 26 (Duellman e Cole 1965). La raganella dagli occhi rossi è molto apprezzata come animale da affezione: l'assenza di veleno, unito al suo aspetto particolarmente gradevole, ne ha favorito l'allevamento in cattività. Si può fare riprodurre *A. callidryas* abbastanza facilmente, tenendola in terrari appositamente umidificati, con piante tropicali come Bromeliaceae e altre epifite e pozze d'acqua ben aeree. L'habitat deve avere almeno 11-12 ore di luce e una temperatura media di 26-28 °C di giorno e 22-35 °C di notte. Per favorire la riproduzione è necessario simulare la stagione delle piogge una volta all'anno, in novembre o dicembre.

1.6. La pelle degli Anfibi

La pelle degli Anfibi (Fig. 1.13) è fortemente permeabile all'acqua e funziona anche come organo respiratorio fondamentale attraverso cui l'animale ottiene ossigeno ed espelle anidride carbonica: di conseguenza la pelle deve essere mantenuta umida per permettere lo scambio dei gas. Le specie acquatiche non hanno problemi di idratazione, anzi devono affrontare l'esposizione ad un eccesso di acqua. Le specie terrestri o arboree, invece, devono affrontare il problema opposto della perdita veloce di acqua, con rischio di disidratazione: la perdita rapida di acqua tramite evaporazione è un fattore limitante l'attività delle specie terrestri. Gli Anfibi hanno evoluto numerosi meccanismi fisiologici e comportamentali per affrontare la perdita o l'eccesso di acqua (regolazione idrica) e quindi per il mantenimento del loro bilancio osmotico. La temperatura influenza tutte le funzioni degli Anfibi, compreso il tasso metabolico, il movimento, la digestione, lo sviluppo e l'emissione di richiami, ed è strettamente collegata al bilancio idrico. Gli Anfibi assumono acqua principalmente

attraverso la pelle, un processo spesso denominato “bere cutaneo” (“*cutaneous drinking*”), ma possono ottenere acqua dal cibo (“acqua preformata”) e, in quantità limitata, attraverso i processi metabolici di digestione del cibo. A differenza dei Rettili e degli altri vertebrati, gli Anfibi non assumono acqua attraverso la bocca.

1.6.1. Ghiandole del tegumento

Gli Anfibi hanno diversi tipi di ghiandole epidermiche e dermiche (Fig. 1.14). Le ghiandole mucose e granulose (velenose) si trovano in tutti gli individui post-metamorfici (immaturi ed adulti) e sono numerose sulla testa, sul corpo e sugli arti. Entrambi i tipi di ghiandole sono pluricellulari, a forma di fiasco e con la parte secretoria (a forma di bulbo) all'interno dello strato spugnoso del derma. Il collo sottile della ghiandola si estende attraverso l'epidermide e si apre sulla sua superficie. Sebbene siano presenti su tutto il corpo, le ghiandole non sono distribuite uniformemente ed il loro ruolo ne determina la densità e la posizione. Le più abbondanti sono le ghiandole mucose: ve ne sono circa 10 per ogni ghiandola granulosa. Le ghiandole mucose sono particolarmente concentrate nella regione dorsale e secernono continuamente un secreto chiaro e leggermente mucoso, che mantiene un sottile strato umido sulla pelle. Le ghiandole dermiche di tipo olocrino producono peptidi antimicrobici cationici, geneticamente codificati, che sono rilasciati dopo uno stimolo e distruggono la maggior parte dei microrganismi infettivi. Le ghiandole granulose tendono a concentrarsi sulla testa e sulle spalle, presumibilmente perché i predatori attaccano per prime queste parti vulnerabili del corpo e ne sono allontanati quando percepiscono secreti velenosi o tossici prodotti da queste ghiandole. Le ghiandole granulose sono spesso aggregate in sistemi di macroghiandole, come ad esempio le ghiandole parotoidi di alcune rane e salamandre: di solito queste macroghiandole contengono ghiandole singole più complesse.

Le larve hanno una varietà maggiore di ghiandole epidermiche: la maggior parte sono unicellulari, ma molte di queste possono concentrarsi in un'unica regione, come ad esempio le ghiandole per la schiusa. Le ghiandole mucose unicellulari sono molto diffuse e secernono un rivestimento mucoso protettivo sull'epidermide. Questo rivestimento mucoso serve anche come lubrificante per favorire il flusso di acqua intorno alla larva durante il nuoto. Nell'epidermide larvale vi sono numerose cellule di Merkel e a fiasco (“*flask*”), ma non sono particolarmente abbondanti in nessuna regione. Le loro funzioni non sono chiare: le cellule di Merkel potrebbero essere meccanocettori, mentre le cellule a fiasco potrebbero essere coinvolte nell'equilibrio idrico-salino.

La pelle degli Anfibi può essere ruvida o liscia a seconda delle proiezioni del tegumento: alcune coinvolgono solo l'epidermide, altre l'epidermide e il derma. Gli annuli del tegumento dei Cecilidi e i solchi costali delle salamandre seguono la segmentazione della muscolatura assiale della colonna vertebrale. Ciascun annulo primario e ciascun solco costale si trova direttamente al di sopra dei miosetti (strati di tessuto connettivo) tra le masse muscolari: quindi il numero di annuli corrisponde a quello nelle vertebre del tronco. Nei Cecilidi questo schema è complicato dallo sviluppo di solchi secondari e terziari: quelli secondari appaiono direttamente al di sopra dei miosetti. Verruche, papille, escrescenze, tubercoli e creste nelle rane e nelle salamandre possono essere aggregazioni di ghiandole o semplicemente inspessimenti dell'epidermide o del sottostante derma. Sebbene gli Anfibi non abbiano squame epidermiche, hanno tuttavia strutture cheratinose: le punte delle dita ad artiglio della famiglia Pipidae, le protuberanze appuntite della famiglia Scafiopodidae, e la pelle butterata e spinosa di alcune rane e salamandre sono tutte costituite da strutture cheratinose, che persistono lungo tutto l'anno. Altre strutture cheratinose sono stagionali e di solito associate con la riproduzione: i maschi di molte salamandre e rane hanno cuscinetti nuziali cheratinosi sui pollici all'inizio della stagione dell'accoppiamento, altri sviluppano spine o tubercoli di cheratina sulla zampe anteriori o sul torace. Al termine della stagione riproduttiva, queste strutture specializzate per l'accoppiamento cadono e si sviluppano di nuovo nella successiva stagione riproduttiva. Le squame dermiche esistono solo nei Cecilidi, ma non in tutte le specie. Queste squame sono piatte e ossee, e si trovano in profondità entro tasche specializzate nei solchi annulari. Non è chiaro se queste squame siano omologhe a quelle dei pesci. Alcuni generi di Anuri come *Ceratophrys* e *Megophrys* hanno osteodermi, cioè placche ossee inserite o immediatamente adiacenti al derma. In altre specie di Anuri la pelle dorsale della testa è compatta e il tessuto connettivo del derma è co-ossificato con le ossa del cranio, una condizione nota come esostosi.

La pelle degli Anfibi è fortemente permeabile ed è un organo fondamentale di scambio gassoso nelle specie terrestri, semi acquatiche e acquatiche. La respirazione cutanea è presente anche in alcune specie di Rettili, ma è particolarmente sviluppata negli Anfibi (Fig. 1.15). Lo scambio di gas respiratori avviene per diffusione ed è facilitato da uno strato relativamente sottile di cheratina e da una ricca irrorazione di capillari nella pelle. I fattori limitanti lo scambio gassoso attraverso la pelle in acqua sono gli stessi che limitano gli scambi gassosi attraverso altre superfici respiratorie. Come per le branchie ed altre superfici respiratorie, la ventilazione della pelle è richiesta per superare gli ostacoli alla diffusione del gas. Ad esempio, il rospo del genere *Xenopus* può restare sommerso più a lungo e si muove meno frequentemente in acque in movimento in paragone ad acque ferme. Molte salamandre della famiglia Pletodontidae non hanno polmoni né branchie e sono prevalentemente terrestri: in questo caso la maggior parte degli scambi gassosi avviene tramite la pelle e, al contrario

di altre salamandre, non vi è separazione parziale del sangue ossigenato e venoso nel cuore. A causa di questa modalità di respirazione, molte di queste specie sono costrette a vivere in habitat ossigenati e freddi e a condurre un'attività molto scarsa: la quantità di ossigeno che hanno a disposizione è circa un terzo di quella di altri Anfibi nella stessa condizione. I Pletodontidi che vivono in ambienti tropicali e caldi, come ad esempio il genere *Bolitoglossa*, che vive nella foresta pluviale, sono attivi soprattutto nelle notti piovose. Le rane con rivestimenti impermeabile, sacrificano la capacità di respirazione cutanea per una maggiore resistenza della pelle a una perdita d'acqua. Altri Anfibi aumentano la capacità di respirazione cutanea tramite capillari che penetrano nello strato epidermico della pelle: questa modifica è spinta all'estremo in *Trichobatrachus robustus*, la “rana pelosa” (“*hairy frog*”), che ha dense proiezioni epidermiche sulle cosce e sui fianchi che aumentano la superficie destinata agli scambi gassosi (Fig. 1.16). Questa specie è nota anche come “*Wolverine Frog*”, per la presenza di artigli ossei retrattili, unici nel mondo animale, che possono essere sfoderati solo spezzando intenzionalmente l'osso (Fig. 1.16). La curiosa salamandra di grandi dimensioni *Cryptobranchus alleganiensis* (Caudata, Cryptobranchidae) (“*Ozark hellbender*”) che vive nei fiumi di montagna degli Stati Uniti orientali, ha pieghe cutanee estesamente vascolarizzate sui lati del corpo, attraverso le quali acquisisce il 90% dell'ossigeno ed elimina il 97% dell'anidride carbonica (Guimond e Hutchison 1973). Questa salamandra usa i polmoni prevalentemente per galleggiare e non per respirare. La rana del lago Titicaca, *Telmatobius culeus*, che vive a grande profondità in questo lago delle Ande, ha polmoni ridotti e non emerge in superficie per respirare: la pelle, fortemente vascolarizzata, pende in larghe pieghe dal corpo e dalle zampe (Hutchison et al. 1976). Se il contenuto di ossigeno è molto basso, la rana ventila la pelle oscillando la testa. Altre specie di rane, salamandre e Cecilidi hanno capillari epidermici che facilitano lo scambio gassoso.

La pelle dei girini è molto permeabile, come quella degli adulti: gli scambi gassosi attraverso la pelle sono prevalenti nei Bufonidae e in altre specie che non sviluppano polmoni se non dopo la metamorfosi. Le specie della famiglia Microhylidae ed altre delle famiglie Leptodactylidae e Pipidae hanno branchie ridotte, che aumentano la dipendenza dalla respirazione cutanea.

1.6.2. Ghiandole sierose negli Anuri

Una vasta letteratura è disponibile riguardo alle ghiandole sierose degli Anuri, comprendente una documentazione completa e aggiornata sulle caratteristiche generali di questi organi e sui peculiari tratti funzionali della loro unità secretoria (Delfino 1991; Delfino et al. 2014).

Per quanto riguarda gli aspetti generali delle ghiandole sierose (Delfino 1991), è noto che esse si sviluppano da singole “cellule madri” localizzate nell’epidermide larvale le quali si moltiplicano per clonazione sotto il controllo di ormoni dell’asse endocrino ipotalamico-ipofisario-tiroideo (McGarry e Vanable 1969a,b; Hayes e Gil 1995). Questi abbozzi si approfondano nel derma sottostante, rimodellando le connessioni tra l’epidermide e il derma (Delfino et al. 1985). Nel corso della loro crescita in profondità, le cellule dell’abbozzo ghiandolare si localizzano a vari livelli della pelle, ognuno dei quali rappresenta uno specifico microambiente. Le cellule che permangono nell’epidermide vanno incontro ad una evoluzione cheratinica, dando origine al dotto ghiandolare; quelle che si collocano a livello del piano basale epidermico condividono le caratteristiche indifferenziate di questo strato cellulare e costituiscono il tratto intercalare, cioè la matrice rigenerativa ghiandolare; infine, dalle cellule che raggiungono il derma si svilupperà il complesso dell’unità secernente (o adenomero) e della guaina contrattile (o mioepitelio). E’ possibile che al differenziamento del mioepitelio periferico rispetto alle cellule secernenti interne concorrano i contatti con fibre nervose autonome (ortosimpatiche) che in seguito regoleranno la contrazione di questa guaina mioepiteliale nelle ghiandole mature (Holmes et al. 1977; Holmes e Balls 1978; Delfino et al. 1982b). Il differenziamento secretorio del sincizio, che condivide caratteristiche metaboliche con le cellule nervose (produzione di amine e di peptidi con funzioni di segnalazione), sarebbe invece regolato da cellule provenienti dalla migrazione delle creste neurali (Delfino et al. 1985).

Il dotto ghiandolare è costituito da cheratinociti imbutiformi inseriti l’uno all’interno dell’altro (Delfino 1976); nonostante i frequenti desmosomi che ancorano tra di loro i cheratinociti, il dotto presenta una parete a struttura discontinua che consente a volte la fuoriuscita del prodotto di secrezione e la sua diffusione negli interstizi intraepidermici. Il tratto intercalare, o colletto, garantisce il *turnover* del complesso adenomero-mioepitelio, specialmente a seguito della estesa deplezione ghiandolare massiva che si osserva dopo stimolazione del mioepitelio con metodi fisici o farmacologici (Delfino 1980; Quagliata et al. 2008a). A sviluppo ultimato, la parte secernente è caratterizzata da una struttura di tipo sinciziale, ma la perdita dell’individualità cellulare avviene nel corso dello sviluppo ghiandolare (Spannhof 1954; Gillois-Chevalier 1960; Vanable 1964; Le Quang Trong 1967; Delfino 1977a,b). Il sincizio secernente nelle ghiandole sierose degli Anuri mostra un ordinamento strutturale con una chiara polarizzazione centripeta (Dockray e Hopkins 1975; Delfino 1979; Neuwirth et al. 1979): i nuclei, generalmente ellissoidali, sono localizzati alla periferia, mentre gli organuli appaiono in posizione più interna. Nelle ghiandole produttrici di composti steroidei, eventualmente associati a peptidi-proteine, vi è un esteso reticolo endoplasmatico ruvido, associato o no ad un esteso reticolo endoplasmatico liscio (Delfino 1977a,b; Neuwirth et al. 1979; Barberio et al. 1987; Delfino et al. 1995a,b; Delfino e Melis 1998; Delfino et al. 1999a, 2001a; Angel et al. 2003;

Arifulova et al. 2007; Delfino et al. 2010). Molto diffuso è anche l'apparato di Golgi (Delfino et al. 1995a, Delfino e Melis 1998; Delfino et al. 2001b; Angel et al. 2003; Arifulova et al. 2007; Delfino et al. 2010; Nosi et al. 2013).

Tra le caratteristiche funzionali dell'unità secernente vi è la capacità di “*storage*” prolungato del secreto sieroso nell'adenomero del citoplasma sinciziale: a questa caratteristica funzionale si associa la possibilità di una rielaborazione del secreto (“maturazione”) che procede a partire dal materiale rilasciato dall'apparato di Golgi (Delfino et al. 2014). Con il termine “maturazione” si definisce il complesso dei processi che portano il materiale rilasciato dall'apparato di Golgi al suo aspetto finale. Di norma la maturazione comporta una graduale condensazione il cui risultato finale è la produzione di unità discrete, isolate e distinte, di tipo granulare, che spiegano la denominazione alternativa delle ghiandole sierose come “ghiandole granulari”. Se il prodotto finale è rappresentato da formazioni delimitate da membrana con un comparto totalmente o parzialmente trasparente agli elettroni, in questo caso si parla di “ghiandola sierosa a contenuto vescicolare”. La distinzione morfologica granulo/vescicola non si applica tuttavia a tutti i secreti sierosi degli Anuri: si osserva spesso uno spettro morfologico continuo, che complica la comprensione delle differenze tra granuli mediocrementemente densi e vescicole a contenuto relativamente condensato. I meccanismi del processo maturativo sono fondamentalmente di due tipi: intensi scambi di materiale tra citoplasma e prodotto di secrezione, e confluenza tra prodotti secretori (Delfino et al. 2001a). Quando si realizzano gli scambi, è possibile che materiale del citosol entri nella composizione del secreto rilasciato dall'apparato di Golgi, determinando una composizione differenziata del prodotto all'interno dei granuli secretori. Al contrario, la confluenza dei prodotti di secrezione post-Golgi tende in generale a rendere omogeneo il prodotto (Neuwirth et al. 1979). I quadri di fusione tra vescicole secretorie e tra granuli presentano generalmente un meccanismo seriale e concatenato, favorito dalla stretta adesione tra membrane contigue (Delfino et al. 2001a; Delfino et al. 2010). Nel corso dello *storage* intracitoplasmatico, in molti granuli si osserva un “alone”, cioè uno spazio trasparente agli elettroni in cui si proiettano minute estroflessioni, simili a microvilli, provenienti dal citoplasma sinciziale (Fig. 1.17) (Delfino et al. 2001b). Questi “microvilli”, a volte ramificati in modo complesso ed insinuati in profondità nello spessore dei granuli, determinano un ampliamento della superficie di scambio tra sincizio e secreto (Delfino et al. 2001b). Il processo di trasferimento di sostanze dal sincizio al comparto granulare determina un progressivo arricchimento qualitativo e quantitativo del prodotto sieroso che va dalla periferia dell'unità secernente al suo centro (Delfino 1979).

1.6.3. Difese chimiche

Gli Anfibi e i Rettili producono un'ampia gamma di sostanze chimiche contro i predatori. I prodotti delle ghiandole cutanee granulari degli Anfibi possono variare da irritanti o leggermente disgustosi, a composti emetici e perfino letali. Le ghiandole granulari possono essere distribuite uniformemente sulla superficie dorsale nei Dendrobatidi, oppure concentrate in grandi masse, come nelle ghiandole parotoidi e nelle verruche dei Bufonidi. Masse ghiandolari, evidenti in urodeli e Anuri, hanno una collocazione adatta al loro uso difensivo. I generi *Rhinella*, *Bufo*, e *Anaxyrus* possiedono sulla testa grandi ghiandole parotoidi che producono bufadienolidi, composti steroidei presumibilmente destinati a allontanare i predatori. Le salamandre che usano la coda per difendersi, come ad esempio i generi *Bolitoglossa* e *Eurycea*, hanno un'elevata concentrazione di ghiandole difensive sulla coda: il predatore non è in grado di afferrare la salamandra senza entrare in contatto con il secreto ghiandolare. Alcune specie come *Salamandra salamandra* sono in grado di spruzzare sostanze chimiche difensive sotto pressione ad una distanza fino a 2 metri. Anche nei generi con comportamenti difensivi meno marcati e concentrazioni di ghiandole meno evidenti, come ad esempio *Hyla* e *Lithobates*, il predatore riceve una dose di secrezioni provenienti dalle ghiandole granulari non appena afferra la preda con la bocca: le secrezioni irritanti sono di norma sufficienti perché il predatore rilasci la preda. Alcune rane come *Trachycephalus venulosus* producono un secreto tossico coloso che fa aderire foglie e terriccio alla bocca e alle mascelle del predatore, facilitando la fuga della preda. Molti composti collosi hanno proprietà adesive impressionanti: quando è attaccata da piccoli serpenti, la piccolissima salamandra del genere *Batrachoseps* usa queste sostanze per impedire al serpente di ingoiarla: le secrezioni si spargono sul corpo del serpente, facendo in modo che lo stesso corpo e qualunque altra sostanza aderiscano tra loro, permettendo la fuga della salamandra. Né le salamandre né le rane subiscono gli effetti delle loro secrezioni adesive.

Un notevole numero di composti tossici e velenosi a funzione difensiva è stato identificato nella pelle degli Anfibi. Alcuni di questi composti sono di interesse farmacologico (Fig. 1.18). I composti sono compresi in quattro categorie: ammine biogeniche, peptidi, bufodienolidi e alcaloidi (Daly et al. 1987). Le ammine biogeniche comprendono la serotonina, l'epinefrina e la dopamina, tutti composti che influenzano le funzioni del sistema circolatorio e del sistema nervoso. I peptidi comprendono composti con funzioni anti-microbiche (Barberio et al. 1987; Mastromei et al. 1991; Simmaco et al. 1998) e peptidi regolatori, come la bradichinina, che modifica la funzione cardiaca, e la bombesina, di cui è stato recentemente dimostrato il ruolo angiogenetico nell'ontogenesi (Quagliata et al. 2008b).

I bufodienolidi e gli alcaloidi sono ugualmente in grado di modificare i meccanismi di trasporto e il metabolismo cellulare e quindi sono spesso altamente tossici. Le fonti di molti composti chimici presenti nella pelle degli Anuri sembra siano gli Artropodi di cui si nutrono, in particolare le

formiche (Daly 1998; Daly et al. 1994, 1999, 2002; Saporito et al. 2007) . In effetti, taluni generi delle famiglie Bufonidae, Microhylidae, Mantellidae e Dendrobatidae hanno una dieta specializzata basata sulle formiche e producono alcuni tra i composti più tossici delle loro ghiandole cutanee. L'ipotesi che alcune specie di Anuri regolino in modo ottimale l'introduzione di sostanze chimiche a scopo difensivo tramite la selezione delle prede è confermata dall'esame delle diete diverse di rane e lucertole nello stesso microhabitat. La correlazione tra la nutrizione a base di formiche (mirmecofagia) e tossine cutanee è meglio conosciuta nei Dendrobatidi: sembra che la mirmecofagia, la produzione di composti tossici o velenosi nella pelle e la colorazione aposematica si siano evolute indipendentemente e sulla base di relazioni filogenetiche abbiano subito una evoluzione convergente. Insieme alla mirmecofagia, sembra si siano evoluti anche altre caratteristiche comportamentali e biologiche, tra le quali un incremento di attività, stabilità della coppia riproduttiva per periodi prolungati, cure parentali più estese e nutrizione prolungata dei girini.

Anche le larve di molti Anfibi producono composti disgustosi che conferiscono protezione dai predatori, in particolare dai pesci. La palatabilità è diversa tra specie che condividono lo stesso habitat, ma anche tra specie strettamente imparentate. Le larve usano stimoli chimici per rilevare la presenza dei predatori e trovare un rifugio in loro presenza. Numerosi studi hanno dimostrato che i girini di Anuri e urodeli sono fenotipicamente plastici in risposta alla predazione: in condizioni sperimentali, i girini di alcune specie, se esposti a segnali chimici provenienti da larve di libellula, aumentano l'altezza delle pinne codali, presumibilmente per aumentare la velocità del nuoto e la probabilità di sopravvivenza. Le risposte flessibili dei girini alle condizioni ambientali, non solo riguardanti i fattori fisici, ma anche i diversi tipi di competitori e predatori, sono scarsamente studiate ma potrebbero avere ampie conseguenze ecologiche. Ad esempio, le larve della salamandra *Hynobius retardatus* sviluppano branchie più ampie quando sono esposte a basse concentrazioni di ossigeno e ad un maggiore rischio di predazione (Vitt e Caldwell 2014).

Come nei Rettili, anche negli Anfibi le ghiandole possono avere molteplici ruoli: quelle tossiche e perfino quelle più velenose hanno probabilmente anche altre funzioni, tra cui il riconoscimento individuale e specifico, i comportamenti territoriali e riproduttivi, la lubrificazione e l'impermeabilizzazione, oppure la protezione da batteri, funghi e parassiti.

2. SCOPO

L'obiettivo della tesi è un'indagine strutturale e ultrastrutturale sulla morfologia delle ghiandole cutanee di *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae) coinvolte nell'omeostasi idrica di questa specie, e sui processi di biosintesi e di maturazione del secreto. Lo studio si propone in particolare di esaminare in dettaglio la struttura ed evoluzione dei granuli secretori, sulla base dell'ipotesi che tra il comparto citoplasmatico e quello dei granuli si instaurino interazioni tali da condurre alla formazione di un prodotto molto condensato e che questi elementi si evolvano in substrutture altamente organizzate e specializzate per l'immagazzinamento intracitoplasmatico di peptidi e proteine. Come adattamento convergente, numerose specie di Anuri producono infatti un secreto maturo caratterizzato da substrutture altamente ripetitive, analizzabili tramite la trasformata celere di Fourier.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Esemplari studiati

Gli esemplari di *Agalychnis callidryas* (Anura Hylidae) utilizzati per questa ricerca sono stati ottenuti, conformemente alle regole internazionali di tutela delle specie presenti in natura, durante una campagna di studio sulla biodiversità della foresta pluviale organizzata dallo Smithsonian Tropical Research Institute (STRI), San Miguel (Repubblica di Panama). La raccolta è stata effettuata nella riserva forestale di Gamboa, Distretto di Colòn (Panama) da giugno ad agosto 2008. Tutti i campionamenti di esemplari adulti, larve e ovature sono stati eseguiti secondo le regole internazionali per la tutela di specie presenti in natura e secondo i regolamenti previste dalle leggi dello stato di Panama, a cui appartiene la riserva forestale, e dello stesso STRI.

Nell'ambito di una campagna di ripopolamento della popolazione locale di specie di anfibi a rischio, l'STRI ha realizzato presso i suoi laboratori un sistema di "nursery". Le uova prelevate in natura appartenevano ad ovature deposte erroneamente in luoghi non sovrastanti raccolte d'acqua, come avviene di norma, ma al di sopra di zone fangose in corso di solidificazione: da queste ovature si sarebbero schiuse larve senza alcuna possibilità di sopravvivere. Le ovature sono state quindi prelevate e mantenute in condizioni simili a quelle naturali presso i laboratori STRI, ottenendo girini che sono stati allevati sino alla metamorfosi. La maggior parte di questi individui postmetamorfici sono stati rilasciati in ambienti forestali adatti alla loro sopravvivenza, in modo da favorire il ripopolamento delle specie. Alcuni individui allevati, a vari stadi di sviluppo, sono stati invece destinati a studi anatomici ed istologici.

3.2. Microscopia ottica ed elettronica

Un totale di 10 individui adulti e 10 larve appartenenti alla specie, allevati presso l'STRI, sono stati sacrificati senza sofferenza tramite anestesia con clorobutanolo (0.1% in soluzione acquosa). Le larve appartenevano all'intervallo di sviluppo 28-42 secondo la stadiatura di Gosner (Fig. 3.1), applicabile alla generalità degli Anuri (Gosner 1960). Dagli esemplari sacrificati sono stati prelevati lembi di 9 mm² della pelle dorsale. I frammenti di pelle sono stati immersi in prefissativo di Karnovsky (1965), 1M glutaraldeide-paraformaldeide in tampone cacodilato (sodio dimetil arsenato), pH 7.0, per 1 ora e 30 minuti a 4 °C, secondo procedure standard (Giachi et al. 2011). Dopo la prefissazione i frammenti, ripetutamente lavati in tampone cacodilato e conservati nello stesso tampone, sono stati trasportati presso il Laboratorio di Anatomia comparata e Citologia, Dipartimento

di Biologia, Università degli Studi di Firenze. I frammenti in tampone sono stati quindi postfissati in 0.1% tetrossido di osmio in tampone cacodilato per 1 ora e 30 minuti. Dopo un lavaggio in tampone cacodilato, i frammenti sono stati gradualmente disidratati in una serie crescente di concentrazioni di etanolo a 4°C, trasferiti in seguito in ossido di propilene e in concentrazioni crescenti di resina epossidica EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA) fino a resina pura, in cui sono stati mantenuti a temperatura ambiente per almeno 12 ore. La polimerizzazione è avvenuta a circa 70 °C in 72 ore. I blocchetti di resina contenenti i frammenti sono stati in seguito tagliati con un ultramicrotomo Ultratome III (LKB, Bromma, Svezia) (LKB, Bromma, Svezia) in sezioni semifini spesse 1.5 µm. Le sezioni semifini sono state raccolte a secco con un ago “a secco” e trasferite su una goccia di acetone al 10% in soluzione acquosa collocata su un vetrino coprioggetto: il vetrino è stato in seguito collocato su una piastra riscaldante. L'effetto combinato del solvente e della temperatura distende la sezione. Una volta evaporata la soluzione di acetone, la sezione aderisce al coprioggetto e può essere colorata con 1% blu di toluidina boracica per 30 secondi. Dopo la colorazione il vetrino è lavato in acqua deionizzata, asciugato sulla piastra e montato sul vetrino portaoggetto (Giachi et al. 2011; Rota et al. 2016). I preparati sono stati osservati con un microscopio ottico Leitz (Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, USA) e fotografati con una macchina fotografica Nikon Coolpix (Nital S.p.A., Moncalieri, Torino, Italia).

Per gli studi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), sezioni ultrasottili sono state ottenute con un ultramicrotomo NOVA (LKB, Bromma, Svezia). Una volta individuata nella sezione semifine l'area del campione da sottoporre all'ultramicrotomia, l'ampiezza della superficie di taglio è stata ridotta eliminando le parti del tessuto non rilevanti. Il dettaglio di interesse è stato inserito in un'area rettangolare, fissandone i vertici con leggeri segni puntiformi incisi con un ago. Usando una lametta rigida a filo sottile sono stati successivamente disegnati i lati del rettangolo e il materiale superfluo è stato rimosso con operazioni di taglio successive. Nel corso di questa operazione è stata continuamente verificata, mediante l'osservazione della sezione semifine e della faccia di taglio, la presenza dell'oggetto dello studio ultrastrutturale (una ghiandola o più ghiandole adiacenti) al centro dell'area rettangolare. Inoltre la rimozione del materiale in eccesso è avvenuta orientando la lametta secondo piani inclinati, in modo da ottenere un tronco di piramide. Con tale accorgimento si evita di eliminare materiale eventualmente interessante e si ottiene un campione stabile rispetto alla velocità di caduta del braccio porta-oggetti dell'ultramicrotomo sulla lama, evitando così le vibrazioni che si traducono nel “chattermark” delle sezioni ultrafini: con questo termine si intende la presenza di bande parallele alterne di diversa densità, dovute alla presenza successiva di diversi spessori.

Le operazioni di ultramicrotomia sono avvenute mediante l'impiego dell'ultramicrotomo Ultratome III (LKB), lo stesso usato nel corso delle operazioni di allestimento delle sezioni semifini.

L'accorgimento dell'uso di ultramicrotomi diversi nelle due fasi è dettato dal diverso livello di sollecitazione meccanica caratteristica delle due procedure: in altre parole all'ultramicrotomia è assegnato lo strumento più nuovo e meno usurato. Sull'ultramicrotomo è stato montato un dispositivo costituito da un prisma triangolare portante su uno degli angoli diedri minori una vaschetta delimitata anteriormente da una lama ottenuta da una scheggia di diamante. Riempiendo il piccolo contenitore con acqua distillata (la ditta produttrice sconsiglia l'uso di soluzioni idro-acetoniche che potrebbero alterare la stabilità del collante tra lama e vaschetta) si ottiene una superficie argentata sulla quale si disporrà, galleggiando, il nastro delle sezioni nel corso dell'ultramicrotomia. L'ultramicrotomo Ultratome III (LKB, Bromma, Svezia) si avvale della tecnologia dell'avanzamento termico finemente regolato del braccio porta-preparato. In queste condizioni, i valori di spessore impostati sull'unità di comando (in questo caso 50 nm) sono indicativi e variano notevolmente in base alle caratteristiche del mezzo includente (quali durezza ed elasticità) e del protocollo sperimentale. Come criterio empirico attendibile si impiega allora il colore interferenziale che caratterizza le sezioni ultrafini quando il dispositivo di illuminazione è inclinato in modo da determinare un colore argentato della superficie di acqua su cui flottano le sezioni. Si cerca di ottenere sezioni di colore variabile dal bianco-neve al giallo-burro: le prime consentono di ottenere immagini ad alta risoluzione, ma con contrasto relativamente basso; le seconde immagini con minore risoluzione e maggior contrasto. Una volta ottenuti un nastro o due nastri paralleli di sezioni, disposti nel centro della vaschetta, mediante un sottile ciglio fissato all'apice di una pipetta Pasteur si è proceduto a raccogliarli su una griglia di rame a maglia fitta, precedentemente immersa in una soluzione di cloroformio in un cui è stata disciolta una minima quantità di adesivo da nastro trasparente. In questo modo le sezioni raccolte per tensione superficiale sul retino che sfiora dall'alto la superficie dell'acqua restano stabilmente ancorate alla maglia di rame. I retini sono stati quindi asciugati per essere sottoposti alla colorazione per accentuare il contrasto di base conferito al materiale dalla post-fissazione in osmio. Per la colorazione si utilizzano sali di altri metalli pesanti che, distribuendosi, per precipitazione, in modo selettivo sulle strutture tramite la superficie esposta in seguito al taglio, aggiungono il loro effetto all'arresto degli elettroni determinato dall'osmio nel corso dell'osservazione. I retini, con le sezioni disposte in alto, sono stati immersi due volte in una soluzione idro-alcolica satura di acetato di uranile (25 mg/ml) e in una soluzione alcalina di citrato di piombo (2 mg/ml). Ciascuna delle due procedure di colorazione è stata seguita da un accurato lavaggio. Le indagini ultrastrutturali sono state effettuate con un microscopio elettronico Philips M300 (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) presso il Laboratorio di Anatomia comparata e Citologia, Dipartimento di Biologia, Università di Firenze, a differenza di potenziale pari a 80 KV, tale da coniugare un buon contrasto con una adeguata risoluzione. Si sono ottenute immagini analogiche a ingrandimento crescente (dal generale al

particolare) su una pellicola a “fine grain release” che sono state successivamente trasformate in formati digitali (TIFF o PSD). I fotogrammi (di profilo quadrato e di 35mm di lato) sono stati acquisiti tramite il sistema DiIMAGE Scan Dual IV (Konica Minolta, Milano, Italia).

3.3. Analisi delle immagini tramite trasformata di Fourier

Le immagini dei granuli al TEM sono state analizzate calcolando la trasformata veloce di Fourier (FFT) (Nosi et al. 2013), tramite la procedura fornita dal Software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java 2016). Al fine di escludere che le variazioni della messa a fuoco e dell’astigmatismo correlato potessero influire sul procedimento, sono stati valutati eventuali effetti del fuori-fuoco su campioni di controllo, ed è stata riscontrata l’assenza di alterazioni significative in ogni dominio di frequenza di interesse per questo studio (Nosi et al. 2013).

4. RISULTATI

4.1. Ghiandole lipidiche in larve postmetamorfiche e adulti

Le caratteristiche strutturali ed ultrastrutturali di una categoria ghiandolare piuttosto rara dell'apparato cutaneo degli Anuri, e comunque mai descritta in *Agalychnis callidryas*, sono illustrate nella Fig. 4.1. Si tratta di ghiandole caratterizzate da tratti tipici delle unità sierose, e tuttavia provviste di elementi morfologici propri. La Fig. 4.1A mostra un dettaglio al microscopio ottico dell'epidermide dorsale di una larva postmetamorfica a quattro arti (stadio 42 di Gosner): si osserva una di queste ghiandole, già presenti nelle larve a questo stadio. L'unità secernente appare a struttura sinciziale ed è dotata di nuclei disposti in singola fila alla periferia. La regione centrale del sincizio contiene un materiale vescicolare: non è ancora presente un lume ghiandolare vero e proprio, tranne quello di estensioni limitate che si osserva nel tratto intercalare. La cavità intercalare, o lume del colletto, è separata dal sincizio sottostante tramite l'interposizione di lembi citoplasmatici di spessore sufficiente al loro riconoscimento, provenienti dalle cellule indifferenziate che compongono il colletto. Questa barriera laminare, di norma continua, mostra a volte discontinuità attraverso le quali il secreto vescicolare penetra nel lume intercalare. E' evidente anche il mioepitelio, specialmente nelle regioni in cui la guaina contrattile è distanziata rispetto al sincizio secernente. Negli adulti di *A. callidryas* queste peculiari ghiandole hanno un aspetto ancora più diversificato rispetto alle unità ghiandolari sierose e mucose (Fig. 4.1B). Il secreto vescicolare è aumentato ed occupa la quasi totalità del sincizio, tranne all'estrema periferia contenente i nuclei. Il lume del tratto intercalare è ampio, occupando circa un terzo del volume dell'unità secernente sinciziale. Come di norma, una barriera citoplasmatica laminare formata da una cellula del tratto intercalare ne costituisce il pavimento, separandolo dal materiale vescicolare sottostante (Fig. 4.1B).

Le osservazioni condotte al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) confermano nelle ghiandole dell'adulto le caratteristiche precedentemente evidenziate e forniscono ulteriori elementi informativi. La regione più interessante è quella al confine tra il tratto intercalare e il sincizio secretorio (Fig. 4.1C), nella quale si osservano nette differenze morfologiche tra le cellule laminari del tratto intercalare e l'aspetto del secreto vescicolare all'interno del sincizio secretorio. A maggiore ingrandimento (Fig. 4.1D) il prodotto di secrezione appare molto più eterogeneo rispetto alla morfologia vescicolare evidente al microscopio ottico, e comparabile a quello osservato nelle ghiandole a lipidi degli adulti del genere *Phyllomedusa* (Delfino et al. 1998a; Rota et al. 2016) Nel lume del tratto intercalare (Fig. 4.1C, D) sono presenti strutture a profilo poligonale, che corrispondono probabilmente a residui del materiale emesso dal sincizio. La barriera laminare che

separa il lume del tratto intercalare dal sincizio è costituita da più cellule che, in corrispondenza delle loro regioni di connessione formano intricate strutture digitiformi ad aspetto labirintico (Fig. 4.1D, E). A maggiore ingrandimento (Fig. 4.1E) queste strutture digitiformi appaiono chiaramente prive di desmosomi: si tratta quindi di espansioni delle lamine citoplasmatiche, che costituiscono un ampliamento funzionale della superficie delle cellule che delimitano il lume del tratto intercalare. L'analisi ultrastrutturale a maggiore ingrandimento rivela inoltre dettagli dei depositi secretori all'interno del sincizio (Fig. 4.1F), di forma genericamente ellissoidale e contenenti materiale polimorfico a vari gradi di densità: strutture elettrondense si alternano ad altre meno elettrondense, opache o trasparenti agli elettroni. Esaminando al TEM la regione alla periferia ghiandolare, si osserva un interstizio relativamente ampio e trasparente che separa il sincizio dal mioepitelio (Fig. 4.1G, H). In questo spazio trasparente sono contenuti sottili prolungamenti neuritici con mitocondri a matrice elettrondensa e un citoscheletro costituito da neurotubuli paralleli, lungo i quali appaiono minute strutture vescicolari (Fig. 4.1G). Le immagini a minore ingrandimento consentono di evidenziare regioni ghiandolari periferiche relativamente estese, individuando l'assenza di membrane plasmatiche tra nuclei contigui (Fig. 4.1H) e i dettagli del reticolo endoplasmatico all'interno del sincizio (Fig. 4.1H, I). Il reticolo endoplasmatico rugoso forma cisterne appiattite e generalmente parallele, mentre il reticolo endoplasmatico liscio presenta profili vescicolari e tubulari: sono inoltre visibili numerosi mitocondri con matrice elettrondensa (Fig. 4.1L).

4.2. Ghiandole sierose in larve e adulti

Le ghiandole sierose dell'epidermide di *A. callidryas* sono state studiate in larve premetamorfiche allo stadio 28 di Gosner, in larve postmetamorfiche agli stadi 40 e 42, e in esemplari adulti. Nelle larve premetamorfiche di *A. callidryas* allo stadio 28 di Gosner non si osservano abbozzi ghiandolari di alcun tipo, ma le indagini morfologiche al microscopio ottico evidenziano le peculiari caratteristiche dell'epidermide larvale, che presenta elementi cellulari esclusivi appartenenti alle larve, le cosiddette “*skein cells*” (Giachi et al. 2011). Si tratta di elementi di forma poliedrica, spesso appiattiti e paralleli rispetto alle superfici cutanee, immediatamente identificabili per la presenza di una matrice citoplasmatica trasparente (Fig. 4.2A). La forma poliedrica riflette la stretta adesione reciproca delle cellule, che tendono a crescere ulteriormente procedendo verso l'esterno (Fig. 4.2A-E). Studi ultrastrutturali precedenti hanno rivelato la presenza di un peculiare citoscheletro di tonofilamenti alla periferia di queste cellule (Giachi et al. 2011).

Nelle larve postmetamorfiche allo stadio 40 di Gosner si osserva la coesistenza di caratteristiche larvali (“*skein cells*”) con tratti anatomici che preannunciano lo stadio adulto, cioè la

presenza di abbozzi ghiandolari (Fig. 4.2C-E) derivati dalle rispettive “cellule madri”. Questi precoci organi secernenti, localizzati al di sotto del piano basale dell’epidermide, appaiono come ghiandole in miniatura (Fig. 4.2C), ancora parzialmente contenute nello spessore dell’epidermide (Fig. 4.2D) e circondati da un alone trasparente, primordio del derma lasso, il cui sviluppo è concomitante con quello ghiandolare. In base alla loro morfologia, alcune di queste possono essere già considerate di tipo sieroso (Fig. 4.2E). Negli abbozzi delle ghiandole mucose gli adenoblasti (le future cellule secernenti) mantengono limiti definiti e una propria individualità (Fig. 4.2D), mentre in quelli a evoluzione sierosa gli adenoblasti fondono il proprio citoplasma, raggiungendo una struttura sinciziale (Fig. 4.2E). In queste ultime ghiandole l’evoluzione in senso secernente è rapida e appare già avanzata negli abbozzi ancora parzialmente contenuti nello spessore dell’epidermide, il microambiente originario (Fig. 4.2E). Questo indica che a questo stadio postmetamorfico le linee cellulari costitutive delle ghiandole si sono già separate.

Nelle larve postmetamorfiche allo stadio 42 di Gosner i cheratinociti hanno quasi completamente sostituito le poliedriche “*skein cells*” (Fig. 4.2F, G). Negli abbozzi delle ghiandole sierose, ormai totalmente collocati nel derma, il citodifferenziamento secretorio mostra già granuli a vari gradi di condensazione (Fig. 4.2F), e una netta differenza con la morfologia delle ghiandole a evoluzione mucosa (Fig. 4.2G), nelle quali i mucoblasti mantengono limiti ben definiti e la propria individualità (Fig. 4.2F).

A questo stadio le ghiandole cutanee hanno ormai conseguito la tipica struttura dell’organo maturo, basate sull’articolazione funzionale del dotto, del tratto intercalare o colletto, della porzione secernente (o adenomero) e del mioepitelio (Fig. 4.2F), che fornirà le linee guida per la descrizione delle ghiandole nell’adulto. Nelle ghiandole mucose l’organizzazione dell’adenomero a cellule separate è evidenziata inoltre dagli ampi interstizi che si formano nel corso dell’attività secernente (Fig. 4.2G).

Negli adulti di *A. callidryas* le ghiandole sierose condividono le caratteristiche generali di queste ghiandole degli Anuri e degli Urodeli, ma la loro parte secernente presenta esclusivi tratti strutturali e ultrastrutturali. In questa specie le ghiandole raggiungono la massima densità in particolari regioni del dorso e risultano numerose nella regione del cinto pelvico, la parte probabilmente più esposta agli attacchi dei predatori naturali. Queste zone del dorso sono più spesse ed al loro spessore concorre la notevole profondità del derma lasso, che contiene la parte secernente delle ghiandole sierose: esiste infatti una stretta correlazione tra le dimensioni dell’adenomero e lo spessore del microambiente dermico che lo contiene. In queste regioni dell’epidermide gli adenomeri sierosi sono spesso strettamente aderenti l’uno all’altro, senza l’interposizione di ghiandole mucose (Fig. 4.3A-C): nelle regioni di maggiore addensamento la forma sferica o ellissoidale degli adenomeri

è notevolmente modificata perché l'aumento di dimensioni delle ghiandole le rende contigue tra loro (Fig. 4.3B, C).

L'esiguo spazio connettivale interposto tra gli adenomeri può contenere rare cellule provenienti dal derma lasso, come fibroblasti, fibrociti e cromatofori (Fig. 4.3B, C). I cromatofori trovano invece uno spazio adeguato al confine tra l'epidermide e il derma (Fig. 4.3C): in questa regione di transizione le cellule contenenti pigmenti di varia natura appaiono sovrapposte e regolarmente stratificate, formando unità cromatiche in cui i melanofori rappresentano, con i loro sottili prolungamenti, gli elementi dinamici per la modulazione del colore cutaneo. L'andamento del derma compatto è variabile e dipende dal grado di addensamento delle ghiandole sierose: dove le ghiandole sono contigue, la componente densa del derma risale sino a portarsi a ridosso dell'epidermide (Fig. 4.3A, B).

I dettagli morfologici delle varie componenti ghiandolari sono visibili nella Fig. 4.3B: si osserva il percorso intraepidermico del dotto, molto tortuoso, e il colletto, o tratto intercalare, tipicamente collocato al confine tra epidermide e derma, rivela un aspetto ad imbuto rovesciato e una composizione basata su elementi cellulari indifferenziati. L'adenomero, dotato di un esiguo lume, a continuazione del lume del tratto intercalare, presenta la caratteristica struttura sinciziale, con distribuzione periferica dei nuclei in singolo strato ed un tipico accumulo intracitoplasmatico del secreto (Fig. 4.3B). Il mioepitelio è formato da cellule fusiformi che delimitano il complesso profilo della porzione intradermica della ghiandola. L'elevato grado di adesione degli adenomeri spesso non lascia spazi interposti: qualora ve ne siano di esigui, il derma compatto risale per un certo tratto, determinando un tipico aspetto ondulato della componente connettivale (Fig. 4.3C). In rari casi, ad elevato ingrandimento l'adenomero ha un profilo irregolare ed il mioepitelio appare relativamente ispessito, mentre il citoplasma sinciziale mostra minute cavità e un carico ridotto di secreto (Fig. 4.3D): questa morfologia probabilmente riflette precedenti eventi di emissione secretoria.

In tutte le sezioni longitudinali appare evidente il corredo cellulare alla base della pigmentazione cutanea (Fig. 4.3A-D). Si riconoscono tre strati di cromatofori regolarmente sovrapposti: procedendo dal derma verso l'alto, è presente uno strato di melanofori, uno di pterinofori ed uno di guanofori (o iridofori). Le immagini presentate non sono a colori, ma in natura i tre tipi di cromatofori hanno rispettivamente colore scuro, giallo e azzurro. I tre strati costituiscono un'unità funzionale dinamica finalizzata alla mimetizzazione, nell'ambito della quale un ruolo fondamentale spetta ai melanofori, contenenti melanina, in grado di disperdere il proprio pigmento nei prolungamenti citoplasmatici orientati verso la superficie cutanea. Gli pterinofori ed iridofori forniscono risposte cromatiche diverse a seconda dell'angolo di incidenza della luce sui propri microcristalli (Sumida et al. 2016).

E' possibile ottenere un quadro sintetico dell'organizzazione anatomica dei tre tipi ghiandolari cutanei negli adulti di *A. callidryas* esaminando al microscopio ottico sezioni tangenziali dei campioni di epidermide (Fig. 4.3E). In queste sezioni si riconoscono le unità mucose, ad ampio lume trasparente, le unità lipidiche, caratterizzate da una cavità intercalare delimitata da un rivestimento cellulare, e quelle sierose caratterizzate da un adenomero sinciziale e dall'assenza di lume (Fig. 4.3E). La regione centrale è costituita dal derma lasso, riconoscibile per la matrice trasparente e per la presenza di cellule caratteristiche di questa componente cutanea.

L'ultrastruttura delle ghiandole sierose di *A. callidryas* è descritta a partire dalle regioni periferiche verso quelle centrali del complesso funzionale mioepitelio-unità secernente. Alla periferia ghiandolare è riconoscibile la guaina contrattile costituita dal mioepitelio, che appare separata dal sincizio secernente, ricco di vescicole e granuli a complessa morfologia, tramite un sottile interstizio trasparente agli elettroni (Fig. 4.4 A). Il sincizio secernente è ricco di vescicole a complessa morfologia. Lo spazio tra la guaina contrattile e il citoplasma multinucleato dell'adenomero è attraversato da sottili prolungamenti citoplasmatici provenienti dai due comparti contigui, unitamente a processi di spessore maggiore che si connettono reciprocamente tramite tipici desmosomi (Fig. 4.4B). Sul versante stromale, il plasmalemma delle cellule contrattili è provvisto di un complesso dispositivo giunzionale, rappresentato da una lamina basale e da emidesmosomi (Fig. 4.4B). I rapporti tra la guaina muscolare e il sincizio secernente possono essere complicati da spesse proiezioni citoplasmatiche provenienti dalle fibrocellule miste che occupano la maggior parte dell'interstizio periferico (Fig. 4.4C). Anche in questi casi, tuttavia, rimangono spazi sufficientemente ampi da accogliere terminazioni neuritiche (Fig. 4.4D), caratterizzate da neurotubuli paralleli e vescicole sinaptiche dal contenuto fortemente elettrondenso ("*dense core*"), tipico delle vescicole con neurotrasmettitori adrenergici presenti a livello delle sinapsi neuro-muscolari della componente ortosimpatica del sistema nervoso autonomo.

4.3. Maturazione dei granuli secretori nelle ghiandole sierose

A seconda della fase funzionale osservata, la parte secernente delle ghiandole sierose può contenere granuli a morfologia estremamente eterogenea (Fig. 4.5A) o marcatamente omogenea (Fig. 4.5B-D). Nel secondo caso i granuli rivelano una matrice con substruttura ripetitiva, basata su moduli ricorrenti di forma subsferica con diametro di circa 70 nm, tra i quali risaltano particelle più voluminose, di diametro variabile tra 400 e 800 nm (Fig. 4.5C, D). Nelle regioni periferiche libere dalla presenza del materiale secretorio si osserva un abbondante reticolo endoplasmatico di tipo rugoso, con peculiari formazioni sferoidali risultanti dalla stretta associazione di addensamenti

concentrici con andamento parallelo (Fig. 4.5D). I nuclei del sincizio risultano piuttosto distanziati e non facilmente distinguibili ad ingrandimenti intermedi. La natura sinciziale dell'unità secernente è chiaramente identificabile a basso ingrandimento (Fig. 4.5A) in base ai nuclei periferici inseriti in un citoplasma non ripartito da sistemi di membrana appartenenti al plasmalemma. Le aree periferiche libere dal secreto sono di estensione variabile in rapporto alla quantità di secreto prodotto nella ghiandola. Oltre alla presenza di un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso (Fig. 4.6A-D), i campi citoplasmatici esterni dell'adenomero sono caratterizzati da un ricco corredo di mitocondri con matrice moderatamente elettrondensa e creste ben organizzate (Fig. 4.5B), caratteristici di una fase metabolica in cui sono sintetizzate moderate quantità di ATP.

Interposti tra le cisterne del reticolo endoplasmatico si trovano a volte depositi di materiale secretorio di modesta entità e di aspetto finemente granulare, probabilmente rilasciato da corpi di Golgi poco lontani (Fig. 4.5C). In queste regioni periferiche si trovano inoltre peculiari associazioni del reticolo endoplasmatico rugoso in forma di cisterne appiattite, con un andamento curvilineo regolare. Questi profili del reticolo endoplasmatico, associati reciprocamente in modo parallelo, delimitano tra loro regioni citoplasmatiche fortemente elettrondense (Fig. 4.5D). In base alla loro morfologia, queste formazioni potrebbero rappresentare la fase iniziale dell'assemblaggio delle strutture subsferiche osservate nella Fig. 4.4B.

In posizione distale rispetto al reticolo endoplasmatico rugoso ed in posizione intermedia tra questo e i primi granuli secretori, si identifica agevolmente l'apparato di Golgi, in forma di pile di sacculi. In sezione, l'ampiezza di questi profili chiusi appare variabile, da una forma appiattita (Fig. 4.6A) a una piuttosto dilatata (Fig. 4.6B-D). Per quanto coinvolto nella produzione di lisosomi primari, il cui compito è la demolizione dei sottoprodotti dell'attività ghiandolare (Fig. 4.6B), l'attività principale dell'apparato di Golgi è indirizzata alla formazione del secreto sieroso, come dimostrato dalla comune substruttura del contenuto delle vescicole post-golgiane e di quello dei pregranuli (Fig. 4.6C). La Fig. 4.6D mostra una regione citoplasmatica contigua a quella mostrata nella Fig. 4.5B, in cui appare un gruppo attivo di cisterne di Golgi (o dittiosoma) accanto ad un reticolo endoplasmatico contenente le formazioni sferoidali costituite da dense strutture concentriche osservate anche nella Fig. 4.5D. Le vescicole post-golgiane confluiscono reciprocamente, dando origine a depositi secretori più ampi di forma sferoidale, nei quali il tenue prodotto di secrezione subisce un peculiare processo, cioè una evoluzione graduale che porta alla comparsa di substrutture (o moduli) di forma circolare, con diametro di circa 70 nm (Fig. 4.5A). Queste dimensioni corrispondono a quelle dei granuli di aspetto omogeneo visibili nelle Fig. 4.4C e 4.4D. Con il procedere di questa condensazione, si rileva progressivamente una distinzione tra due componenti secretorie: la matrice non strutturata, che va incontro a una opacizzazione generalizzata, e le

substrutture modulari, che si mantengono relativamente trasparenti agli elettroni (Fig. 4.6B). Queste strutture possono confluire in modo seriale, dando origine a complessi grossolanamente labirintici (Fig. 4.6C). Con il procedere di questa evoluzione differenziale, i granuli secretori si riscontrano più frequentemente nelle regioni intermedio-centrali degli adenomeri. Si tratta di depositi sierosi, risultanti dall'aggregazione serrata delle substrutture modulari, la cui individualità è resa ancora più evidente dal materiale opaco che le delimita e ne definisce il profilo in sezione (Fig. 4.6D). Come precedentemente descritto, la regolare ripetizione delle substrutture è localmente interrotta dalla presenza di corpi elettrondensi di dimensioni intorno a 400 nm (Fig. 4.6D). Questi corpi molto opachi agli elettroni sono coinvolti in un proprio processo di trasformazione, consistente in un incremento numerico e nel conseguimento di una forma più regolare, a volte complicata da processi di fusione seriale (Fig. 4.7A-D e 4.8A-C).

I granuli caratterizzati da substrutture ripetitive appaiono in numero elevato nella regione intermedio-centrale dell'adenomero (Fig. 4.4C, D; Fig. 4.8B, C). Il loro graduale accumulo tende a ridurre al minimo l'ampiezza delle regioni citoplasmatiche interposte: questo effetto appare evidente nelle immagini a moderato ingrandimento, ed è accompagnato dalla progressiva adesione dei granuli (Fig. 4.8C). Nei casi di adesione più stretta, si realizzano le condizioni di un possibile confluenza tra i depositi secretori. La fusione tra i corpi densi inseriti nel prodotto a struttura periodica rappresenta una fase più avanzata della maturazione sierosa, unitamente al loro incremento numerico. Come risultato dei due processi concomitanti, il materiale elettrondenso tende a occupare parti sempre più estese dei granuli, riducendo marcatamente lo spazio a disposizione delle substrutture modulari (Fig. 4.4A), che comunque si mantengono evidenti alla periferia dei granuli stessi (Fig. 4.8D). Nel corso di questi processi maturativi, a maggiore ingrandimento si osservano i dettagli della progressiva condensazione del materiale all'interno del granulo (Fig. 4.9A). Ad ingrandimento intermedio si evidenzia il contrasto tra il contenuto disperso del granulo immaturo e quello più condensato del granulo a maturazione avanzata, nel quale la componente a struttura ripetitiva si sta riducendo a isole sparse e alla regolare distribuzione periferica (Fig. 4.9B). Le immagini ad ingrandimento minore forniscono un quadro completo dell'entità del processo, mostrando in granuli contigui il graduale prevalere della componente opaca non periodica e la parallela condensazione di quella a struttura ripetitiva, in quantità minore (Fig. 4.9C). Qualunque sia l'entità relativa dei due processi e quale dei due prevalga sull'altro, la loro concomitanza porta a granuli di elevata densità, in cui la struttura ripetitiva è notevolmente mascherata, se non del tutto scomparsa (Fig. 4.9D). L'imponenza e la coerenza dei processi maturativi descritti indirizza l'analisi ultrastrutturale a individuare a livello morfologico i meccanismi alla base di questa evoluzione. I primi dati emergono dall'indagine a basso ingrandimento su ampie aree citoplasmatiche: in queste analisi i granuli in varie

fasi maturative mostrano ampi spazi trasparenti agli elettroni (“aloni”) interposti tra il loro contenuto e il fondo estremamente condensato del citoplasma sinciziale (Fig. 4.10A). Il comparto di questi “aloni”, determinati dallo scollamento della membrana limitante il granulo, contiene minute strutture di densità pari a quella del fondo del sincizio (Fig. 4.10B). Ad una osservazione più dettagliata è possibile evidenziare la continuità di queste minute formazioni con il citoplasma sinciziale (Fig. 4.10C): si tratta infatti di sottili microvilli. Oltre a questo quadro frequente, un ulteriore aspetto caratterizzante la maturazione è l’estroffessione dell’alone verso il citoplasma perigranulare: questa estroffessione suddivide il sincizio in parti evidenziate dal fondo trasparente delle evaginazioni (Fig. 4.10D). I quadri descritti possono essere presenti anche contemporaneamente, determinando un incremento rilevante dell’interfaccia sincizio-granulo ed un conseguente e vantaggioso potenziamento degli scambi tra i due comparti.

4.4. Analisi delle substrutture ripetitive tramite trasformata celere di Fourier

La successione delle fasi del processo di maturazione dei granuli nelle ghiandole sierose è stata descritta precedentemente (Fig. 4.7-4.10). In queste ghiandole il secreto immaturo si presenta come un materiale rarefatto, finemente granulare e scarsamente strutturato, nell’ambito del quale compaiono rari moduli sferoidali (Fig. 11A). Lo spettro di frequenza calcolato in base alla trasformata celere di Fourier (FFT) da queste immagini (Fig. 11B) mostra una nube di punti dispersa attorno ad un centro e il grafico lineare non rivela picchi di rilievo (Fig. 11C). I granuli di maturità intermedia (Fig. 11D) presentano un secreto scarsamente elettrondenso e la struttura ripetitiva è relativamente riconoscibile; sono chiaramente visibili numerosi centri di condensazione. L’analisi tramite FFT (Fig. 11E) mostra una componente spettrale poco evidente, il cui picco è identificabile nel grafico lineare in un valore intorno a 70 nm (Fig. 11F). In uno stadio più avanzato di maturazione i granuli sono caratterizzati da un incremento nel numero dei motivi strutturali ripetitivi, mentre le componenti elettrondense tendono a fondersi a catena (Fig. 11G). La componente spettrale FFT mostra come questi elementi siano aumentati significativamente in numero rispetto alla condizione precedente (Fig. 11H). La forma approssimativamente circolare della componente è dovuta al fatto che gli elementi ripetitivi non hanno un orientamento definito. A questo stadio avanzato di maturazione il grafico lineare mostra che la dimensione delle strutture modulari è intorno a 70 nm (Fig. 11I). Nei granuli secretori prossimi allo stadio terminale di condensazione il prodotto sieroso è ormai prevalentemente elettrondenso e al suo interno sono ancora presenti motivi strutturali ripetitivi trasparenti agli elettroni (Fig. 11L). Rispetto agli stadi precedenti, il numero di questi motivi strutturali è esiguo, e la FFT calcolata su queste immagini (Fig. 11M) non è molto diversa da quella

ricavata negli stadi iniziali di maturazione (Fig. 11D). Una nube di punti si condensa tuttavia intorno al centro dell'immagine, indicando la permanenza di motivi strutturali ripetuti le cui dimensioni, in base al grafico lineare, si mantengono intorno a 70 nm. (Fig. 11N).

5. DISCUSSIONE

5.1. Ghiandole a lipidi

L'identificazione di ghiandole specializzate per la sintesi e il rilascio di lipidi cutanei, per la prima volta descritte in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae) si presta a una duplice considerazione, di ordine sia tassonomico sia morfologico.

Dal punto di vista sistematico risulta dimostrato che le unità secernenti di tipo lipidico, caratterizzate da specifici tratti ultrastrutturali, non sono esclusive del genere *Phyllomedusa*, e suggeriscono l'opportunità di estendere l'indagine ad altri generi della sottofamiglia Phyllomedusinae. La pelle dorsale di numerose specie di Anuri arboricoli regola la perdita transcutanea di acqua attraverso lipidi cutanei (Withers et al. 1984) prodotti da ghiandole appartenenti al comune tipo mucoso (Lillywhite et al. 1997) o a quello sieroso (Barbeau e Lillywhite 2005), oppure a voluminosi aggregati ("macroghiandole") localizzate all'estremità cefalica (Warburg et al. 2000). Nei due tipi ghiandolari mucosi e sierosi, le molecole apolari si affiancano ai rispettivi comuni prodotti: proteoglicani nel caso delle unità mucose, proteine e peptidi nel caso delle unità sierose. Gli Hylidae del genere-tipo *Hyla arborea* producono un materiale lipidico di colore chiaro, evidenziabili mediante i coloranti di tipo "Sudan" (Blaylock et al. 1976; Lacombe et al. 2000; Antoniazzi et al. 2013). Osservati al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), i prodotti lipidici delle ghiandole delle specie della sottofamiglia Phyllomedusinae appaiono sotto forma di vescicole (Blaylock et al., 1976) o granuli (Lacombe et al. 2000), costituiti da substrutture trasparenti o moderatamente opache agli elettroni, e di forma bastoncellare (Delfino et al., 1998b,c; Nosi et al., 2002; Sevinc et al., 2005). Questa sottofamiglia spalma i lipidi sulla superficie corporea tramite un repertorio motorio stereotipato, il "*wiping behaviour*" (Blaylock et al., 1976) che si osserva anche nelle Hylinae, per quanto in forma meno elaborata (Barbeau e Lillywhite 2005), e si è evoluto in modo indipendente anche nelle specie arboricole della famiglia Rhacophoridae (Lillywhite et al. 1997). Ampliando lo studio ad altri generi di Phyllomedusinae, Blaylock e collaboratori (1976) avevano individuato rare e minute ghiandole a lipidi in *Agalychnis* (syn. *Pachymedusa*) *dacnicolor*, mentre un'altra specie dello stesso genere, *A. annae*, risultava completamente priva di unità secernenti di questo tipo.

In base ai dati ottenuti, le ghiandole a lipidi risultano invece presenti in *A. callidryas*: la loro distribuzione è piuttosto sparsa, quindi potrebbero ridurre la perdita di acqua per traspirazione solo in aree cutanee molto localizzate. Probabilmente queste ghiandole rappresentano un preadattamento anatomico in *A. callidryas*, al quale nel genere *Phyllomedusa* si è associato l'elaborato quadro

motorio del *wiping behaviour*. Attraverso questo repertorio motorio, che si è evoluto indipendentemente anche in altre specie arboree incapaci di produrre lipidi cutanei, *Phyllomedusa* spalma prodotti idrofobi su ampie aree cutanee, una strategia efficace per la sopravvivenza in ambienti xerofitici.

Dal punto di vista morfo-funzionale è necessario prendere in considerazione le caratteristiche cellulari generali delle ghiandole lipidiche in *A. callidryas* e nelle Phyllomedusinae. Queste ghiandole presentano caratteri condivisi con quelle di tipo sieroso, il principale dei quali corrisponde alla struttura sinciziale dell'unità secernente (Delfino et al. 1998a,b; Nosi et al. 2002; Sevinc et al. 2005; Rota et al. 2016). Il concetto di sincizio secernente, risalente ai lavori pionieristici di Faraggiana (1938a,b), implica una serie di corollari funzionali strettamente interconnessi, come la peculiare polarizzazione funzionale delle varie regioni ghiandolari, l'immagazzinamento intracitoplasmatico del secreto e la sua evoluzione maturativa, solo apparentemente statica (Delfino 1991; Delfino et al. 2014). Il sincizio secernente appare funzionalmente polarizzato in quanto i suoi nuclei appaiono disposti in un unico strato alla periferia. La regione centrale del sincizio corrisponderebbe all'insieme degli apici dei singoli adenociti (le cellule ghiandolari). Anche la distribuzione degli organelli biosintetici (il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi) segue un andamento centripeto, con le strutture di Golgi orientate con il lato cis prossimale e il lato trans distale. Gli stessi aspetti maturativi rivelano una progressione con gradiente centripeto, per cui il prodotto secretorio con aspetti avanzati occupa il citoplasma centrale. Un ulteriore aspetto che accomuna le ghiandole lipidiche a quelle sierose è rappresentato dalla presenza di un'innervazione diretta tramite rapporti sinaptici di tipo adrenergico, quindi ortosimpatico (Delfino et al. 1998c). Insieme a questi tratti condivisi, le ghiandole a lipidi mostrano comunque un aspetto esclusivo, rilevato dalle osservazioni: un lume di media ampiezza, nettamente isolato rispetto al sincizio tramite estroflessioni laminari delle cellule del tratto intercalare. Nelle ghiandole sierose degli Anuri il lume ghiandolare è poco più che una cavità virtuale, circoscritta dal plasmalemma del sincizio localizzato al di sotto del tratto intercalare (Delfino et al. 1998a). Le cellule del tratto intercalare formano una sorta di "tappo", limitato al confine tra lume ghiandolare e lume del tratto intercalare. La regione citoplasmatica che sigilla il lume delle ghiandole lipidiche rappresenta una barriera che impedisce un rilascio graduale del secreto lipidico. E' stata tuttavia descritta la presenza occasionale di discontinuità nella barriera, in corrispondenza dei confini tra le cellule: queste discontinuità sono tali da consentire la fuoriuscita del secreto (Nosi et al. 2002). La presenza di nematodi ospiti all'interno delle ramificazioni del lume nelle ghiandole a lipidi rappresenta una prova indiretta dell'esistenza di varchi che permetterebbero ai nematodi provenienti dall'esterno di attraversare la lamina citoplasmatica (Sevinc et al. 2005).

5.2. Ghiandole sierose

Già nelle larve avanzate di *A. callidryas* le ghiandole sierose presentano un'organizzazione morfologica relativamente elaborata. Ognuna delle parti costitutive della ghiandola occupa un proprio microambiente: il dotto ghiandolare è contenuto nei primi strati dell'epidermide, con cheratinociti caratterizzati da un gradiente maturativo dalla periferia al centro del lume. Il colletto è collocato in corrispondenza del piano basale dell'epidermide, ed è costituito da cellule indifferenziate. Il complesso adenomero-mioepitelio è inserito nel derma lasso, un microambiente caratterizzato da una grande varietà di segnali molecolari: ormoni che provengono da sorgenti lontane o vicine (paracrine), o da neurotrasmettitori. E' noto che la guaina mioepiteliale delle ghiandole sierose degli Anuri si contrae a seguito di impulsi ortosimpatici garantiti da un'innervazione diretta. I tratti esclusivi degli adenomeri sierosi sono già visibili all'esame al microscopio ottico. La struttura sinciziale che compare nelle larve avanzate comporta una polarizzazione funzionale di tipo centripeto, che corrisponde a quella di tipo basale-apicale dei singoli adenociti mucosi (mucociti). La polarizzazione centripeta consiste nella localizzazione periferica dei nuclei e nella concentrazione del secreto nella regione centrale del citoplasma. Come corollario di questo tipo di polarizzazione, il secreto sieroso effettua un processo maturativo che procede con un gradiente diretto verso il centro dell'adenomero. In *A. callidryas* le ghiandole sierose cutanee mostrano l'organizzazione strutturale e i dettagli ultrastrutturali tipici di questi organi secernenti nell'ordine degli Anuri, ma se si esclude l'unità secernente, le altre componenti ghiandolari non differiscono da quelle descritte anche negli Urodela (Delfino et al. 1982a, 1986) e, per quanto ricavabile dagli scarsi dati in letteratura, anche negli Apodi (Fox 1983). La discussione di queste ghiandole verterà quindi principalmente sull'unità secernente, dato che questa regione ghiandolare svolge le funzioni metabolicamente rilevanti. All'interno della struttura sinciziale tipica di queste ghiandole, esistono variazioni correlabili alla notevole biodiversità di questo ordine e alle molteplici funzioni adattative espresse da questi organi. Questi aspetti possono essere correlati ad una comune derivazione, oppure ad una evoluzione convergente, e suggeriscono una categorizzazione delle ghiandole sierose secondo aspetti morfologici omogenei. I seguenti tratti differenziabili, riconoscibili nelle unità secernenti sierose tramite un confronto con altri gruppi di Anuri saranno quindi considerati analiticamente in base ai dati ottenuti tramite la microscopia elettronica:

- l'estensione del citoplasma periferico libero dal secreto e contenente gli organuli della biosintesi secretoria, e lo stato funzionale di questi organuli;
- la quantità di prodotto di secrezione contenuto al centro dell'unità secernente;
- la varietà o l'omogeneità morfologica che caratterizza i granuli secretori e/o le vescicole secretorie;

- la natura dei meccanismi che il sincizio secernente mette in atto per conseguire una varietà morfologica del secreto (“maturazione”);
- il riconoscimento di un eventuale gradiente maturativo.

L'estensione del citoplasma periferico libero dal secreto del sincizio deve essere valutata accuratamente, con particolare attenzione all'osservazione di sezioni longitudinali della ghiandola che interessino almeno marginalmente il colletto. L'ampiezza della regione del sincizio libera dal secreto riflette direttamente lo stato funzionale, maggiore nelle fasi in cui la biosintesi del secreto prevale sull'immagazzinamento che si accompagna alla maturazione (Delfino 1991; Delfino et al. 2014). Le ghiandole descritte in questo studio sembrano trovarsi in fasi funzionali intermedie, poiché ampie quantità di prodotto sieroso si accompagnano a evidenti quadri di produzione. La biosintesi sierosa in *A. callidryas* si esprime con un imponente reticolo endoplasmatico, accompagnato da numerose cisterne di Golgi. La presenza di un esteso reticolo endoplasmatico conferma la natura proteica del secreto sieroso, evidenziata anche dalla struttura dei granuli. Gli aspetti degli apparati di Golgi mostrano invece l'assenza di una attività di condensazione. In altre specie, la condizione è molto diversa: nelle ghiandole sierose di esemplari adulti di *Bombina pachypus* (Delfino 1976, 1977a,b) e *Discoglossus* sp. (Delfino 1979) il citoplasma periferico è per lo più povero di organuli della biosintesi, o al più contiene voluminosi lisosomi secondari, come in *Pelobates cultripes* (Delfino et al. 1992, 2014). È opportuno ricordare che il citoplasma periferico povero di organuli rappresenta una condizione generalizzata tra gli Anuri, a meno che non si tratti di ghiandole in ripresa secretoria successiva alla deplezione sperimentale (Quagliata et al. 2008b).

Anche nelle fasi funzionali intermedie la parte centrale dell'unità secernente contiene quantità rilevanti di secreto, che tendono ad accrescersi grazie al progredire della biosintesi. Il carico secretorio riduce l'ampiezza della fascia periferica del sincizio, portando i nuclei immediatamente a ridosso dei granuli, e si accompagna alla scomparsa quasi totale dell'apparato della biosintesi. Contemporaneamente anche il citoplasma interposto tra i granuli tende a ridursi con il loro progressivo avvicinamento. Il fondo del citoplasma sinciziale interposto tra i granuli tende a diventare trasparente agli elettroni. Questo quadro morfologico è stato in passato erroneamente interpretato come la presenza di un lume in questo tipo di ghiandole, in contrasto con le caratteristiche funzionali delle ghiandole cutanee sinciziali, sia di quelle sierose sia di quelle lipidiche (Rota et al. 2016): in realtà queste ghiandole immagazzinano il loro prodotto in sede citoplasmatica e la presenza del lume è limitata alla sola regione del tratto intercalare.

L'affollamento dei granuli nella regione centrale della ghiandola crea le condizioni perché avvengano processi di confluenza, con quadri particolarmente rilevanti nelle ghiandole a prodotto

vescicolare (Delfino et al. 2014). A parte alcune specie che producono granuli opachi agli elettroni già a partire dal lato trans dei sacculi dell'apparato di Golgi (Delfino 1977a,b; 1979), la presenza di processi maturativi di condensazione è una caratteristica diffusa, che comporta un elevato grado di varietà morfologica nell'ambito della medesima unità secernente e tra unità differenti, quando queste si trovino in diverse fasi secretorie. La contemporanea presenza di ghiandole del medesimo tipo in differenti stadi funzionali non deve essere confusa con il polimorfismo delle ghiandole sierose, cioè la coesistenza nello stesso individuo di due (Bertossi 1937; Faraggiana 1937; Delfino 1976; 1977a,b; Delfino et al. 1990; 1998a,b,c; 1999a; Melzer et al. 2011) o tre tipi diversi (Delfino et al. 2015) di ghiandole sierose, alle quali competono funzioni specifiche.

L'osservazione dei granuli in fase intermedia di maturazione in *A. callidryas* ha evidenziato come in questa specie l'evoluzione funzionale coinvolga i tipi principali descritti tra gli Anuri (Delfino 2001a; Delfino et al. 2014). Tra questi meccanismi, la fusione dei comparti contenenti depositi contigui di secreto sembra meno rilevante, perché coinvolge granuli in fase avanzata di condensazione. Appaiono invece spesso rappresentati i quadri di ampliamento delle superfici all'interfaccia tra secreto e sincizio, indicando un potenziamento degli scambi tra i due comparti.

Per quanto il progressivo accumulo di secreto possa mascherare la successione dei depositi sierosi a vari stadi maturativi, l'indagine ultrastrutturale evidenzia la gradualità del processo di condensazione che caratterizza la maturazione. In sintesi, il processo coinvolge la comparsa di strutture periodiche all'interno di un materiale finemente granulare, che rappresenta il prodotto già elaborato nell'apparato di Golgi; questa fase è seguita dallo sviluppo di una sorta di substruttura labirintica; e quindi dalla comparsa di moduli di dimensioni costanti, con un diametro di 70 nm. Questa evoluzione è stata descritta nel Leptodattilide *Physalaemus biligonigerus* (Delfino et al. 2001a) e nell'Ilide *Scinax nasica* (Terreni et al. 2003). In *A. callidryas* un elemento di differenza rispetto alle specie di confronto è la coesistenza tra prodotto a substruttura periodica e materiale denso che ricorda l'aspetto dei granuli maturi nelle ghiandole sierose della raganella italiana *Hyla intermedia* (Delfino et al. 1994), precedentemente nota come *H. arborea*. In *A. callidryas* i depositi fortemente opachi agli elettroni e non strutturati tendono a prevalere al termine della maturazione, per cui i granuli definitivi non mostrano più tracce dell'originale substruttura ripetitiva. Un simile tipo di evoluzione è stato riscontrato nelle "macroghiandole" inguinali di *Physalaemus biligonigerus* (Leptodactylidae) (Delfino et al. 1999b), alle quali è attribuita una funzione secretoria: si tratta probabilmente di una strategia che consente di mantenere in sede intracitoplasmatica un secreto tossico o repellente, bloccando i domini molecolari attivi all'interno dell'impalcatura compatta del granulo. Oltre a questi elevati livelli di condensazione, la presenza di una regolare periodicità dei granuli, da una fase intermedia ad una fase sub-terminale della maturazione, consente di inserire le ghiandole sierose di

A. callidryas tra quelle di altre specie non necessariamente correlate dal punto di vista filogenetico ed appartenenti alle famiglie Hylidae, Pseudidae e Leptodactylidae. Queste specie producono un secreto sieroso caratterizzato da substrutture cilindriche o subsferiche (Nosi et al. 2013).

Lo studio dei grafici lineari ricavati dalle analisi tramite trasformata celere di Fourier (FFT) relative ad alcuni stadi di maturazione ha rivelato componenti ripetitive con dimensioni di circa 70 nm, simili a quelle precedentemente rilevate (Nosi et al. 2013). La FFT è uno strumento matematico ampiamente utilizzato nell'ambito dell'elaborazione e analisi di immagini. Questo algoritmo è infatti impiegato da tutti i filtri presenti nei diversi programmi di elaborazione delle immagini, compresi quelli specializzati nella trattazione digitale di dati scientifici. Quando è applicata ad una immagine (o spazio reale), la procedura riporta le sue componenti in uno "spazio coniugato", detto "spettro di frequenze". La posizione e il valore di ogni singolo punto nello spettro corrispondono all'orientamento, alla dimensione e alla ripetitività di una componente che si trova nello spazio reale. Grazie a questo processo, la FFT è efficace nell'evidenziare, quantificare e riassumere la presenza di componenti ripetitive in immagini di microscopia ottica o elettronica. Nella presente ricerca, lo studio morfometrico tramite FFT dello sviluppo di una peculiare substruttura ripetitiva nel secreto sieroso cutaneo rappresenta un esempio di analisi di un processo di "*pattern formation*", nel quale la graduale comparsa delle substrutture periodiche si accompagna al rilevamento contemporaneo di componenti quantitative indicative delle loro dimensioni (Delfino et al. 2014).

5.3. Ghiandole larvali

L'indagine morfologica ha evidenziato nelle larve premetamorfiche di *A. callidryas* la presenza di "*skein cells*", a forma poliedrica, identificabili per la presenza di una matrice citoplasmatica trasparente. Studi precedenti hanno rivelato la presenza di un citoscheletro di tonofilamenti alla periferia di queste cellule (Giachi et al. 2011). I tonofilamenti penetrano all'interno di prolungamenti citoplasmatici che si insinuano tra le cellule, anche tra quelle localizzate a distanze elevate dall'origine dei lunghi processi cellulari. Il quadro morfo-funzionale che emerge è quello di cellule in grado di svolgere un ruolo di sostegno meccanico, basato sulle interazioni tra una pressione interna dovuta a un elevato grado di turgore e una resistenza periferica garantita dal citoscheletro dei tonofilamenti. Le "*skein cells*" sarebbero in grado di ottimizzare il loro ruolo meccanico tramite i lunghi processi citoplasmatici (Giachi et al., 2011).

Negli stadi postmetamorfici appaiono abbozzi ghiandolari cutanei i cui adenoblasti mantengono limiti definiti e una propria individualità nel caso di evoluzione mucosa ed assumono una forma sinciziale nel caso di evoluzione sierosa. Nello stadio larvale più avanzato esaminato in

questo stadio (stadio 42 di Gosner) appaiono anche i cheratinociti e le ghiandole cutanee assumono la struttura dell'organo maturo, con un dotto, un tratto intercalare o colletto, un adenomero e cellule mioepiteliali circostanti. Nelle ghiandole mucose si osservano adenomeri con ampi spazi interstiziali.

Per quanto nella specie in esame il progressivo accumulo di secreto possa mascherare la successione dei depositi sierosi in vari stadi maturativi, distribuendoli in modo apparentemente casuale, l'indagine ultrastrutturale mette in evidenza la sostanziale gradualità del processo di condensazione che caratterizza la maturazione. In sintesi il processo comporta la comparsa di motivi periodici nel contesto di un materiale finemente granulare, che rappresenta il prodotto post-Golgi; lo sviluppo di una sorta di substruttura labirintica ed infine, in base alle analisi eseguite mediante trasformata veloce di Fourier (FFT) la comparsa di moduli di dimensioni costanti con un diametro di circa 70 nm. Questa evoluzione è stata descritta tanto nel Leptodattilide *Physalaemus biligonigerus* (Delfino et al. 2001b), quanto nell'Ilide *Scinax nasica* (Terreni et al. 2003). Un elemento di differenza rispetto alle specie di confronto è rappresentato dalla coesistenza tra prodotto a substruttura periodica e materiale denso, che ricorda l'aspetto dei granuli maturi della raganella italiana *Hyla intermedia* (Delfino et al. 1994), precedentemente classificata come *H. arborea*. Nel materiale studiato in questa tesi, i depositi molto opachi agli elettroni e non strutturati tendono a prevalere al termine della maturazione, per cui i granuli definitivi non mostrano più evidenze dell'originale substruttura ripetitiva. Un tipo simile di evoluzione coinvolge la "macroghiandole" inguinali di *P. biligonigerus* (Delfino et al. 1999b), alle quali viene attribuita una funzione difensiva anti-predatoria; si tratterebbe probabilmente di una strategia che consente di contenere in sede intracitoplasmatica un secreto tossico o repellente, bloccando i domini molecolari attivi nella struttura molto serrata del granulo. Al di là di questa estrema condensazione, la presenza di una regolare periodicità dei granuli, almeno da una fase intermedia della maturazione a una fase sub-terminale, consente di inserire le ghiandole sierose di *A. callidryas* tra quelle di diverse specie non necessariamente correlate dal punto di vista filogenetico, appartenenti a Ilidi, Pseudidi e Leptodattilidi, che producono un secreto sieroso caratterizzato da subunità cilindriche o subsferiche.

6. CONCLUSIONI

Uno dei dati più rilevanti emersi dalle indagini eseguite nel corso di questi studi è stato l'identificazione nella specie esaminata, *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae) di ghiandole sinciziali specializzate per la produzione di lipidi ("cere cutanee") con caratteristiche strutturali e ultrastrutturali identiche a quelle descritte nel genere affine *Phyllomedusa*. Dal punto di vista degli adattamenti morfo-funzionali dell'apparato cutaneo nei Vertebrati, le ghiandole lipidiche degli Anuri rappresentano una categoria "nuova" di organi esocrini, in quanto descritti solo di recente e per certi versi confrontabili con le ghiandole sebacee. Rispetto a queste formazioni annesse ai peli dei Mammiferi, le ghiandole lipidiche (*wax glands*) degli Anuri svolgono una funzione analoga, basata sulla forte somiglianza nella composizione del secreto: in entrambi i casi il prodotto è di natura lipidica e svolge il ruolo di isolante nei confronti di molecole polari come l'acqua. Nel caso degli Anuri queste proprietà idrorepellenti consentono la regolazione del flusso di acqua transcutaneo, mentre nel caso dei Mammiferi il ruolo è quello di proteggere il pelo e concorrere alla formazione di una barriera isolante nei confronti degli scambi termici. Un secondo importante elemento emerso da questo studio riguardo alle ghiandole lipidiche è la struttura sinciziale della loro unità secernente. È noto che un citoplasma multinucleato (tipico di un sincizio) rappresenta la caratteristica che più di ogni altra identifica negli Anuri le ghiandole sierose. Il fatto che l'adenomero produttore di secreto lipidico sia costituito da un sincizio documenta un ulteriore aspetto della flessibilità fisiologica delle ghiandole degli Anuri, che esprime in chiave evolutiva la plasticità adattativa di questi organi. Le ghiandole lipidiche rappresenterebbero quindi una sottocategoria delle unità sierose, con le quali condividerebbero fondamentali caratteristiche strutturali e ultrastrutturali (Delfino et al. 1998a; Rota et al. 2016).

L'indagine sulle ghiandole sierose in *A. callidryas* ha fornito ulteriori elementi per la comprensione della natura dei granuli che rappresentano il loro prodotto di secrezione. I modelli citologici classici che descrivono gli aspetti ultrastrutturali della secrezione peptidica-proteica delle ghiandole esocrine si limitano di norma alla fase Golgiana del processo. A questo livello compaiono le strutture discrete che rappresentano gli elementi costitutivi del secreto, definite come vescicole o granuli in base al livello di condensazione del loro contenuto. L'indagine sul secreto delle ghiandole sierose degli Anuri permette di studiare in modo più approfondito le tappe di maturazione del secreto stesso, che avvengono in posizione distale rispetto alle cisterne di Golgi. La maturazione rappresenta un interessante e poco studiato aspetto dell'attività delle ghiandole sierose cutanee: in questo studio, tuttavia, l'applicazione di tecniche di indagine ultrastrutturale ha permesso di chiarire alcuni aspetti complessi della maturazione del secreto. La comprensione del processo maturativo, definibile anche

come fase post-Golghiana della secrezione sierosa, è aumentata di pari passo con il riconoscimento del valore funzionale dello “*storage*” nel ciclo funzionale delle ghiandole sinciziali. In animali stabulati, mantenuti al riparo da fattori di lesioni e/o stress (“*noxiae*”), di norma il prodotto sieroso è destinato a permanere lungamente nel citoplasma sinciziale; un ristagno secretorio è stato tuttavia descritto anche in esemplari che abbiano rilasciato il secreto in seguito a stimoli indotti da cause esterne, poiché l’espulsione del secreto raramente è totale. La maturazione che caratterizza la lunga permanenza del secreto (o “ristagno”) interviene variando sia la composizione sia lo stato fisico del contenuto dei granuli o delle vescicole post-Golghiane. Le trasformazioni dello stato fisico del prodotto si manifestano chiaramente alle indagini al TEM con un incremento della densità agli elettroni o una fluidificazione del prodotto stesso. La composizione del contenuto eterogeneo delle vescicole o dei granuli post-Golghiani può essere modificata tramite immissione di altro materiale mediante la confluenza tra membrane limitanti, o per trasporto attivo di molecole sintetizzate nel citoplasma (Barni et al. 1987). La modifica dello stato fisico comporta il trasporto di acqua dalla vescicola (o granulo) al citoplasma (condensazione) o dal citoplasma alla vescicola (fluidificazione).

Il processo di condensazione comporta l’incremento degli scambi tra il sincizio e il materiale secretorio, reso evidente dall’ampiamiento della superficie dell’interfaccia tra i due compartimenti (Delfino et al. 2001b). La condensazione del materiale dei granuli può avvenire per punti focali del contenuto, e in questo modo si individuano in generale unità discrete di dimensioni costanti (70 nm) che conferiscono ai granuli maturi una substruttura ripetitiva (Nosi et al. 2013) simile a quella rilevata nei granuli di *A. callidryas*. Nel corso della maturazione, il processo di condensazione può portare anche alla perdita di questa substruttura modulare, come avviene nelle ghiandole con funzione antipredatoria (Delfino et al. 1999b) e nelle unità sierose descritte in questo studio.

L’organizzazione di tipo modulare con substruttura strettamente addensate consente di immagazzinare in un singolo granulo quantità elevate di materiali in volumi limitati. Lo stato di elevata condensazione può “mascherare” l’attività biologica, neutralizzando nel corso del ristagno intracitoplasmatico gli eventuali effetti di auto-intossicazione nel caso di prodotti coinvolti nella difesa chimica contro predatori, parassiti e microrganismi. I dati ultrastrutturali che caratterizzano l’evoluzione morfologica nel corso del ristagno dei granuli prodotti dalle ghiandole sierose sono stati confermati da studi biochimici. In alcune specie di Hylidae la maturazione del “veleno” (o secreto tossico) cutaneo comporta una enantiomerizzazione post-traduzionale degli aminoacidi componenti i peptidi secreti (Auvynet e Rosenstein 2009; de Magalhaes et al. 2013). L’ipotesi concorda con la presenza di composti con attività enantio-selettiva nei prodotti sierosi cutanei degli Anuri (Negri et al. 2000, Weldon et al. 2006). Si può avanzare quindi l’ipotesi che i granuli possano essere usati come organuli-modello per studiare lo *storage* intracitoplasmatico di peptidi citotossici.

Il quadro che emerge dai risultati ottenuti in questo studio, confrontati con i dati in letteratura, fornisce una rappresentazione innovativa dei granuli secretori prodotti dalle ghiandole sinciziali della pelle degli Anuri. Questi granuli a contenuto eterogeneo non costituirebbero quindi strutture di deposito inerte, ma all'interno della loro membrana limitante sarebbe contenuto un microambiente isolato dalla matrice citoplasmatica sinciziale, nel contesto del quale possono essere attivamente modificate le condizioni chimico-fisiche coinvolte nell'aggregazione di molecole secretorie fondamentali, come le proteine. Tra queste condizioni modificabili si possono citare il grado di compattazione del materiale, il pH, la temperatura, lo stato di idratazione, l'osmolarità ed eventuali stress meccanici (Cromwell et al. 2006, Jing et al. 2012), oltre alla presenza di interazioni tra prodotti e sistemi di membrana (Delfino et al. 2001a,b; Bucciantini et al. 2011). In definitiva i granuli secretori rappresenterebbero veri e propri organuli delimitati da membrana ("*storage organelles*"), coinvolti non solo nell'immagazzinamento dei prodotti sierosi ma anche nella loro modifica sino al raggiungimento del secreto definitivo, diverso dal prodotto post-Golgiiano iniziale ed immaturo.

Sulla base dei dati riportati in questo studio, il valore fondamentale della conoscenza morfo-funzionale delle ghiandole sierose degli Anuri risulta evidente al fine della programmazione di iniziative di conservazione. In questi Tetrapodi pionieri, solo parzialmente adattati all'ambiente subaereo ed esposti a molteplici sfide per la propria sopravvivenza (da parte di fattori ambientali critici, agenti infettivi e/o infestanti, predatori e consumatori) le ghiandole sierose rappresentano una risorsa insostituibile inserita in un apparato che costituisce una interfaccia tra organismo e ambiente esterno. In questa cornice eco-etologica si inserisce una considerazione filogenetica che ne sottolinea l'esclusività, poiché questi organi esocrini scompaiono sostanzialmente negli Amnioti (Rettili e Uccelli) con annessi cutanei cornei di rivestimento (squame o loro derivati quali le penne). Nei Mammiferi, le ghiandole cutanee sono ben rappresentate, ma i loro tratti anatomici sono completamente nuovi (nelle unità sebacee) o solo parzialmente sovrapponibili (nelle unità tubulari) rispetto alle ghiandole degli Anuri.

7. RINGRAZIAMENTI

Vorrei esprimere la mia profonda gratitudine a tutte le persone che mi hanno permesso di realizzare questo progetto di ricerca.

Desidero ringraziare in primo luogo la Prof.ssa Marilena Leis, mia “tutor” in questi tre anni: mi ha sempre aiutato e sostenuto, sorreggendomi con fiducia, affetto e pazienza, particolarmente nei momenti difficili che ho attraversato.

Ringrazio profondamente il Prof. Giovanni Delfino ed i suoi collaboratori Dr. Gianfranco Tanteri e Dr. Gilberto Montori, del Dipartimento di Biologia dell’Università degli Studi di Firenze, per avermi messo a disposizione il materiale necessario e la strumentazione indispensabile per il completamento del progetto di ricerca, e per avermi dato costantemente fondamentali insegnamenti, preziosi consigli ed insostituibile sostegno.

Vorrei ringraziare per il loro aiuto anche il Dr. Marco Pezzi e il Dr. Massimo Lanfredi, del gruppo di ricerca di Ecologia urbana diretto dalla Prof.ssa Leis, ed inoltre il Prof. Gilberto Grandi, il Dr. Vincenzo Aiello e la Dr.ssa Milvia Chicca, per avermi fornito sostegno e supporto in varie fasi della stesura della tesi.

Vorrei infine ringraziare tutta la mia famiglia, che mi ha continuamente supportato e “sopportato” in questi anni, e le mie amiche Elisabetta ed Antonella che mi hanno accolto con grande affetto e allegria nelle loro belle case di Firenze.

8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Angel R., Delfino G., Parra G. J. 2003. Ultrastructural patterns of secretory activity in poison cutaneous glands of larval and juvenile *Dendrobates auratus* (Amphibia Anura). *Toxicon* 41: 29-39.
- Antoniazzi M.M., Neves P.R., Mailho-Fontana P.L., Rodrigues M.T., Jared C. 2013. Morphology of the parotoid macroglands in *Phyllomedusa* leaf frogs. *J. Zool. London* 291: 42-50.
- Arifulova I., Delfino G., Dujsebajeva T., Fedotovskikh G., Nosi D., Terreni A. 2007. Serous cutaneous glands in the South American horned frog *Ceratophrys ornata* (Leptodactyliformes Chthonobatrachia Ceratophryidae): Ultrastructural expression of poison biosynthesis and maturation. *J. Morph.* 268: 690-700.
- Auvynet C., Rosenstein Y. 2009. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J.* 276: 6497-6508.
- Barbeau R.B., Lillywhite H.B. 2005. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *J. Exp. Biol.* 208: 2147-2156.
- Barberio C., Delfino G., Mastromei G. 1987. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous "venom" of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata pachypus*). *Toxicon* 25:899-909.
- Barni S., Bernocchi G., Bottiroli G. 1987. Histochemistry and morphology of the secretory granules of skin venom glands of *Rana esculenta* during the active and hibernating period. *Arch. Biol.* 98: 391-406.
- Berger L., Speare R., Daszak P., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin L., Slocombe R., Ragan M., Hyatt A.D., McDonald K.R., Hines H.B., Lips K.R., Marantelli G., Parkes H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9031-9036.
- Bernard R.F., Mautz W.J. 2016. Dietary overlap between the invasive coqui frog (*Eleutherodactylus coqui*) and the Hawaiian hoary bat (*Lasiurus cinereus semotus*) on the Island of Hawai'i. *Biol. Invasions* 18: 3409-3418.
- Bertossi F. 1937. Sulle ghiandole granulose cutanee di *Bombinator igneus* Laur. *Monitore Zool. It.* 48: 341-344.
- Blaustein A.R., Johnson P.T.J. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.* 1: 87-94.
- Blaylock L.A., Ruibal R., Platt-Aloia K. 1976. Skin structure and wiping behaviour of phyllomedusine frogs. *Copeia* 1976: 283-295.
- Briggs V.S. 2008. Mating patterns of red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* and *A. moreletii*. *Ethology*, 114: 489-498.
- Brizzi R., Corti C., Delfino G., Drewes R. 2004. Ultrastructural patterns of secretory activity in serous cutaneous glands of the Pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura Hylidae). *Ital. J. Zool. (Suppl.)* 2: 77-80.

- Bucciantini M, Nosi D, Forzan M, Russo E, Calamai et al. 2011 Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1. *FASEB J* 26: 818-831.
- Canestrelli D., Zampiglia M., Nascetti G. 2013. Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in contemporary and historical samples of the endangered *Bombina pachypus* along the Italian Peninsula. *PLoS ONE* 8(5): e63349.
- Caughley G., Gunn A. 1996. Conservation biology in theory and practice. Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Cope E.D. 1862. Catalogue of the reptiles obtained during the explorations of the Parana, Paraguay, Vermejo, and Uruguay Rivers, by Captain Thos. J. Page, U.S.N., and of those procured by Lieut. N. Michler, U.S. Top. Eng., Commander of the expedition conducting the survey. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*, 14: 346-359.
- Cromwell M.E., Hilario E., Jacobson F. 2006. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* 8: 572-579
- D'Orgeix C.A., Turner B.J. 1995. Multiple paternity in the red-eyed treefrog *Agalychnis callidryas* (Cope). *Mol. Ecol.* 4: 505-508.
- Daly J.W. 1998. Thirty years of discovering Arthropod alkaloids in Amphibian skin. *J. Nat. Prod.* 61: 162-172.
- Daly J.W. Secunda S. I. Garraffo H.M. Spande T.F. Wisnieski A. Cover J.F. Jr. 1994. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32: 657-663.
- Daly J.W., Garraffo H.M. 1999. An arthropod origin for bioactive alkaloids of amphibian skin. *An. Acad. Nac. Cienc. Exactas Fis. Nat. B.* 51: 9-20.
- Daly J.W., Kaneko T., Wilham J., Garraffo H.M., Spande T.F., Espinosa A., Donnelly M.A. 2002. Bioactive alkaloids of frog skin: Combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxin have an arthropod source. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13996-14001.
- Daly J.W., Myers C.W., Whittaker N. 1987. Further classification of skin alkaloids from Neotropical poison frogs (Dendrobatidae) with a general survey of toxic/noxious substances in the Amphibia. *Toxicon* 25: 1023-1095.
- De Magalhaes M.T.Q., Barbosa E.A., Prates M.V., Verly R.M., Munhoz V.H.O., de Araujo I.E., Bloch C. 2013. Conformational and functional effects induced by D- and L-amino acid epimerization on a single gene encoded peptide from the skin secretion of *Hypsiboas punctatus*. *PLoS ONE* 8: e59255.
- Delfino G. 1976. Structural and ultrastructural aspects of the cutaneous granular glands in *Bombina variegata* (L.) (Amphibia Anura Discoglossidae). *Monitore Zool. Ital.* 10: 421-448.
- Delfino G. 1977a. Development of serous gland anlagen in the skin of *Bombina variegata pachypus* (Bonaparte) larvae. Preliminary findings by light and electron microscopy. *Boll. Zool.* 44: 145-148.
- Delfino G. 1977b. Il differenziamento delle ghiandole granulose cutanee in larve di *Bombina variegata pachypus* (Bonaparte) (Anfibio: Anuro: Discoglosside). *Ricerca al microscopio ottico e al microscopio elettronico. Arch. Ital. Anat. Embriol.* 82 337-363.

- Delfino G. 1979. Le ghiandole granulose cutanee di *Alytes cisternasii* Boscà e *Discoglossus pictus* Otth (Anfibi Anuri Discoglossidi): Struttura ultrastruttura e alcuni dati citochimici. Arch. Ital. Anat. Embriol. 84: 81-106.
- Delfino G. 1980. L'attività rigeneratrice del tratto intercalare nelle ghiandole granulose cutanee dell'ululone *Bombina variegata pachypus* (Bonaparte) (Anfibio Anuro Discoglosside); studio sperimentale al microscopio elettronico. Arch. Ital. Anat. Embriol. 85: 283-310.
- Delfino G. 1991. Ultrastructural aspects of venom secretion in anuran cutaneous glands. In: Tu A.T. (ed.). Handbook of Natural Toxins Vol. 5: Reptile venoms and toxins. Marcel Dekker Inc., New York, USA, p. 777-802.
- Delfino G., Alvarez B.B., Brizzi R., Cespedez J.A. 1998c. Serous cutaneous glands of Argentine *Phyllomedusa* Wagler 1830 (Anura Hylidae): secretory polymorphism and adaptive plasticity. Trop. Zool. 11: 333-351.
- Delfino G., Amerini S., Mugelli A. 1982b. *In vitro* studies on the "venom" emission from the skin of *Bombina variegata pachypus* (Bonaparte) (Amphibia Anura Discoglossidae). Cell Biol. Int. Rep. 6: 843-850.
- Delfino G., Brizzi R., Alvarez B.B., Gentili M. 1999b. Granular cutaneous glands in the frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura Leptodactylidae): comparison between ordinary serous and "inguinal" glands. Tissue Cell 31: 576-586.
- Delfino G., Brizzi R., Alvarez B.B., Kracke-Berndorf R. 1998a. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura Hylidae) secretory patterns during ontogenesis. Tissue Cell 30: 30-40.
- Delfino G., Brizzi R., Alvarez B.B., Taddei L. 1999a. Secretory polymorphism and serous cutaneous glands heterogeneity in *Bufo granulosis* (Amphibia Anura). Toxicon 37: 1281-1296.
- Delfino G., Brizzi R., Calloni C. 1985. Dermo-epithelial interactions during the development of cutaneous gland anlagen in Amphibia: A light and electron microscope study on several species with some cytochemical findings. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 99: 225-253.
- Delfino G., Brizzi R., Calloni C. 1986. Mixed cutaneous glands in Amphibia: an ultrastructural study on urodele larvae. Zool Jahrbüch (Anat.) 114: 325-344.
- Delfino G., Brizzi R., Calloni C. 1990. A morpho-functional characterization of the serous cutaneous glands in *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). Zool. Anz. 225: 295-310.
- Delfino G., Brizzi R., Calloni C. 1994. Serous cutaneous glands in the tree-frog *Hyla arborea arborea* (L.): origin ontogenetic evolution and possible functional implications of the secretory granule substructure. Acta Zool. (Stockholm) 75: 27-36.
- Delfino G., Brizzi R., Calloni C., 1982a. Development of cutaneous glands in *Salamandrina terdigitata* (Lacépède 1788) (Amphibia: Urodela); findings by light and electron microscopy. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 96: 948-971.
- Delfino G., Brizzi R., De Santis R., Melosi M. 1992. Serous cutaneous glands of the western spadefoot *Pelobates cultripes* (Amphibia: Anura): an ultrastructural study on adults and juveniles. Arch. Ital. Anat. Embriol. 97: 109-120.

- Delfino G., Brizzi R., Feri L. 1995b. Chemical skin defence in *Bufo bufo* an ultrastructural study during ontogenesis. *Zool. Anz.* 234: 101-111.
- Delfino G., Brizzi R., Jantra S., Feri L. 1995a. Post-Golgian maturative processes during the biosynthesis of poison secretion in cutaneous glands of the European common toad *Bufo bufo*. *J. Nat.* 4: 97-113.
- Delfino G., Brizzi R., Kracke-Berndorf R., Alvarez B.B. 1998b. Serous gland dimorphism in the skin of *Melanophryniscus stelzneri* (Anura Bufonidae). *J. Morph.* 237: 19-32.
- Delfino G., Giachi F., Malentacchi C., Nosi D. 2015. Ultrastructural evidence of serous gland polymorphism in the skin of the tungara frog *Engystomops pustulosus* (Anura Leptodactylidae). *Anat. Rec.* 298: 1659-1667.
- Delfino G., Giachi F., Nosi D. 2014. Poison storage and maturation in serous cutaneous glands of anurans: an integrative ultrastructural outlook. In: Lambert H editor. *Frogs: genetic diversity, neural development and ecological implications*. New York: Nova Publishers. p 1-71.
- Delfino G., Giachi F., Nosi D., Malentacchi C. 2010. Serous cutaneous glands in *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae): an ontogenetic ultrastructural study on secretory product biosynthesis and maturation. *Copeia* 2010: 27-37.
- Delfino G., Melis G. 1998. Serous cutaneous glands in the natterjack *Bufo calamita* (Anura Bufonidae): the fundamental role of aggregation processes during poison maturation. *Zool. Anal. Complex Sys.* 101: 53-66.
- Delfino G., Nosi D., Brizzi R., Alvarez B.B. 2001b. Serous cutaneous glands in the paludicoline frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura Leptodactylidae): patterns of cytodifferentiation and secretory activity in premetamorphic specimens. *Acta Zool. (Stockholm)* 82: 149-158.
- Delfino G., Nosi D., Giachi F. 2001a. Secretory granule-cytoplasm relationships in serous glands of anurans: ultrastructural evidence and possible functional role. *Toxicon* 39: 1161-1171.
- Dias P.C. 1996. Sources and sinks in population biology. *Trends Evol. Ecol.* 11: 326-330.
- Dockray G.J., Hopkins C.R. 1975. Caerulein secretion by dermal glands in *Xenopus laevis*. *J. Cell. Biol.* 64: 724-733.
- Donnelly M., Guyer C. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in an assemblage of Neotropical hylid frogs. *Oecologia* 98: 291-302.
- Duarte A., Brown D.J., Forstner M.R.J. 2014. Documenting extinction in real time: decline of the Houston toad on a primary recovery site. *J. Fish Wildl. Manag.* December 5: 363-371.
- Duellman W.E. 2001. *The hylid frogs of Middle America*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York, USA.
- Duellman W.E., Cole C.J. 1965. Studies of chromosomes of some anuran amphibians. *Syst. Zool.* 14: 139-143.
- Faraggiana R. 1937. Sulla presenza di due tipi di ghiandole granulose nella pelle di *Bombinator pachypus* Fitz. *Monitore Zool. Ital.* 48: 13-16.
- Faraggiana R. 1938a. Ricerche istologiche sulle ghiandole cutanee granulose degli Anfibi Anuri. I. *Bufo vulgaris* e *Bufo viridis*. *Archo Ital. Anat. Embriol.* 39: 327-376.

- Faraggiana R. 1938b. La struttura sinciziale e il meccanismo di secrezione delle ghiandole cutanee granulose di Anfibii Anuri. *Monitore Zool. Ital.* 49: 105-108.
- Fisher R.N., Shaffer H.B. 1996. The decline of amphibians in California's Great Central Valley. *Cons. Biol.* 10: 1387-1397.
- Fox H. 1983. The skin of *Ichthyophis* (Amphibia Caecilia): an ultrastructural study. *J. Zool. Lond.* 199: 223-248.
- Frost D.R., Grant T., Faivovich J., Bain R.H., Haas A., Haddad C.F.B., De Sá R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C.D.M., Wheeler W.C. 2006. The amphibian tree of life. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 297: 1-370.
- Funk W.C., Caminer M., Ron S.R. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proc. R. Soc. B* 279: 1806-1814.
- Germano J.M., Bishop P.J. 2009. Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Cons. Biol.* 23: 7-15.
- Giachi F., Tanteri G.F., Malentacchi C., Delfino G. 2011. Larval epidermis of the Red Eye Tree Frog *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae): ultrastructural investigation on the Kugelzellen, specialised forms of the constitutive skein cell line. *Anat. Rec.* 294: 1601-1610.
- Gillois-Chevalier. 1960. Histogenèse des glandes cutanées d'*Alytes obstetricans* Laur. *Archs Anat. Microsc.* 49: 281-306.
- Glor R.E., Vitt L.J., Larson A. 2001. A molecular phylogenetic analysis of diversification in Amazonian *Anolis* lizards. *Mol. Ecol.* 10: 2661-2668.
- Gosner K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes of identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Gower D.J., Wilkinson M. 2003. Conservation biology of caecilian amphibians. *Cons. Biol.* 19: 45-55.
- Gray L.A., Rand A.S. 1997. A daybreak chorus in the frog, *Agalychnis callidryas*. *J. Herpetol.* 31: 440-441.
- Guimond R.W., Hutchison V.H. 1973. Aquatic respiration: an unusual strategy in the hellbender *Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis* (Daudin). *Science* 182: 1263-1265.
- Hayes T.B., Falso P., Gallipeau S., Stice M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exper. Biol.* 213: 921-933.
- Hayes T.B., Gill T.N. 1995. Hormonal regulation of skin gland development in the toad (*Bufo boreas*): the role of the thyroid hormones and corticosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99: 161-168.
- Heinicke M.P., Duellman W.E., Hedges S.B. 2007. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 10092-10097.
- Holmes C., Balls M. 1978. *In vitro* studies on the control of myoepithelial cell contraction in the granular glands of *Xenopus laevis* skin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 255-263.

- Holmes C.H., Moondi P.S., Rao R.R., Balls M. 1977. *In vitro* studies on the effects on granular gland secretion in *Xenopus laevis* skin of stimulation and blockade of alpha and beta adrenoreceptors of myoepithelial cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 1: 263-270.
- Hutchison V.H., Haines H.B., Engbretson G. 1976. Aquatic life at high altitude: respiratory adaptations in the Lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Respir. Physiol.* 27: 115-129.
- Jing Y, Borys M, Nayak S, Egan S, Qian Y, Pan S-H, Li ZJ. 2012. Identification of cell culture conditions to control protein aggregation of IgG fusion proteins expressed in Chinese hamster ovary cells. *Process Biochem.* 7: 69-75.
- Johnson P.T.J., Sutherland D.R. 2003. Amphibian deformities and *Ribeiroia* infection: an emerging helminthiasis. *Trends Parasitol.* 19: 332-335.
- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137.
- Lacombe C., Cifuentes-Diaz C., Duria I., Auber-Thomay M., Nicolas P., Amiche M. 2000. Peptide secretion in the cutaneous glands of South American tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an ultrastructural study. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 631-641.
- Laurance W.F., Nascimento H.E.M., Laurance S.G., Andrade A., Ewers R.M., Harms K.E., Luizao R.C.C., Ribeiro J.E. 2007. Habitat fragmentation, variable edge effects, and the landscape-divergence hypothesis. *PLoS ONE* 2: e1017.
- Le Quang Trong N.Y. 1967. Structure et développement de la peau et des glandes cutanées de *Nectophrynoides occidentalis* Angel. *Archs Zool. exper. gén.* 108: 589-610.
- Leenders T. 2001. A guide to amphibians and reptiles of Costa Rica. Zona Tropical Edition, Miami, Florida, USA.
- Lillywhite HB, Mittal AK, Garg TK, Agrawal N. 1997. Integumentary structure and relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *J Exp Lond*: 243: 675-687.
- Longcore J.E., Pessier A.P., Nichols D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.
- Louv R. 2008. Last Child in the Woods: Saving our Children from Nature Deficit Disorder. Algonquin Books, Chapel Hill, North Carolina, USA.
- Mastromei G., Barberio C., Pistolesi S., Delfino G. 1991. A bactericidal protein in *Bombina variegata pachypus* skin venom. *Toxicon* 29: 321-328.
- McCranie J.R., Wilson L.D., Townsend J.H. 2003. *Agalychnis callidryas* (Red-eyed Treefrog). *Reproduction. Herpetol. Rev.* 34: 43.
- McGarry M.P., Venable J.W. 1969a. The role of cell division in *Xenopus laevis* skin gland development. *Develop. Biol.* 20: 291-303.
- McGarry M.P., Venable J.W. 1969b. The role of thyroxine in the formation of gland rudiments in the skin of *Xenopus laevis*. *Develop. Biol.* 20: 426-434.
- Melisch R. 1998. Wildlife trade, sustainable use, and conservation implications from a WWF and TRAFFIC perspective. In *Conservation, Trade and Sustainable Use of Lizards and Snakes in Indonesia*. W. Erdelen (Ed.), pp. 1-8. Rheinbach, Germany.

- Melzer S., Clerens S., Bishop J. P. 2011. Differential polymorphism in cutaneous glands of *Liopelma* species. *J. Morphol.* 272: 1716-1130.
- Mendelson J.R., Lips K.R., Gagliardo R.W., Rabb G.B., Collins J.P., Diffendorfer J.E., Daszak P., Ibanez R., Zippel K.C., Lawson D.P., Wright K.M., Stuart S.N., Gascon C., Silva H.R., Burrowes P.A., Joglar R.L., Marca E.L., Lotters S., du Preez L.H., Weldon C., Hyatt A., Rodriguez-Mahecha J.V., Hunt S., Robertson H., Lock B., Raxworthy C.J., Frost D.R., Lacy R.C., Alford R.A., Campbell J.A., Parra-Olea G., Bolanos F., Domingo J.J.C., Halliday T., Murphy J.B., Wake M.H., Coloma L.A., Kuzmin S.L., Price M.S., Howell K.M., Lau M., Pethiyagoda R., Boone M., Lannoo M.J., Blaustein A.R., Dobson A., Griffiths R.A., Crump M.L., Wake D.B., Brodie E.D. 2006. Biodiversity – Confronting amphibian declines and extinctions. *Science* 313: 48.
- Minteer B.A., Collins J.P. 2013. Ecological ethics in captivity: balancing values and responsibilities in zoo and aquarium research under rapid global change. *ILAR J.* 54: 41-51.
- Negri L., Melchiorri P., Lattanti R. 2000. Pharmacology of amphibian opiate peptides. *Peptides* 21: 1639-1647.
- Neuwirth M., Daly J.W., Myers C.W., Tice L.W. 1979. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (Dendrobatidae). *Tissue Cell.* 11: 755-771.
- Noble G.K. 1922. The phylogeny of the Salientia. I. The osteology and the thigh musculature: their bearing on classification and physiology. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 46: 1-67.
- Nosi D., Delfino G., Quercioli F. 2013. Serous cutaneous glands in anurans: Fourier transform analysis of the repeating secretory granules substructure. *Naturwissenschaften* 100: 209-218.
- Nosi D., Terreni A., Alvarez B.B., Delfino G. 2002. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Anura Hylidae): response by different gland types to norepinephrine stimulation. *Zoomorphology* 121: 139-148.
- Pyburn W.F. 1970. Breeding behavior of the leaf-frogs *Phyllomedusa callidryas* and *Phyllomedusa dacnicolor* in Mexico. *Copeia* 2: 209-218.
- Quagliata S., Malentacchi C., Giachi F., Delfino G. 2008a. Chemical skin defence in the Eastern fire-bellied toad *Bombina orientalis*: an ultrastructural approach to the mechanism of poison gland rehabilitation after discharge. *Acta Herpetol.* 3: 139-153.
- Quagliata S., Pacini S., Punzi T., Malentacchi C., Ruggiero M., Delfino G. 2008b. Bombesin promotes vasculogenesis and angiogenesis in chick chorio-allantoic membrane: a morphometric structural and ultrastructural study. *J. Morph.* 269: 72-83.
- Roelants K., Haas A., Bossuyt F. 2011. Anuran radiations and the evolution of tadpole morphospace. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 8731-8736.
- Rota E., Canteri G., Montori G., Giachi L., Delfino G., Sever M. 2016. Skin of the red eye tree frog *Agalychnis callidryas* (Hylidae, Phyllomedusinae) contains lipid glands of the type described in granulose the genus *Phyllomedusa*. *Anat. Rec.* 300: 503-506.
- Ruiz-Carranza P.M., Ardila-Robayo M.C., Lynch J.D. 1996. Lista actualizada de la fauna de Amphibia de Colombia. *Revista Acad. Colomb. Ci. Exact.* 20: 365-415.

- Saporito R.A., Donnelly M.A., Norton R.A., Garraffo H.M., Spande T.F., Daly J.W. 2007. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8885-8890.
- Savage J.M. 2005. *The amphibians and reptiles of Costa Rica*. University of Chicago Press, Chicago, Michigan, USA.
- Semenza J.C., Tolbert P.E., Rubin C.H., Guillette L.J., Jackson R.J. 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environm. Health Persp.* 105: 1030-1032.
- Sessions S.K., Ruth S.B. 1990. Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *J. Exper. Zool.* 254: 38-47.
- Sevinc M., Nosi D., Brizzi R., Terreni A., Malentacchi C., Delfino G. 2005. Ultrastructural study on host-guest relationships between anuran serous cutaneous glands and nematodes. *Caryologia* 58: 122-131.
- Shine R, Wang S., Madani G., Armstrong K.N., Zhang L., Li Y-M. 2016. Using genetic data to predict the vulnerability of a native predator to a toxic invader. *Endang. Species Res.* 31: 13-17.
- Simmaco M., Mignogna G., Barra D. 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47: 435-450.
- Sinervo B., Méndez-de-la-Cruz F., Miles D.B., Heulin B., Bastiaans E., Villagrán-Santa Cruz M., Lara-Resendiz R., Martínez-Méndez N., Calderón-Espinosa M.L., Meza-Lázaro R.N., Gadsden H., Javier Avila L., Morando M., De la Riva I.J., Sepulveda P.V., Duarte Rocha C.F., Ibargiuengoytía N., Puntriano C.A., Massot M., Lepetz V., Oksanen T.A., Chapple D.G., Bauer A.M., Branch W.R., Clobert J., Sites J.W. 2010. Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science* 328: 894-899.
- Smith R.K., Meredith H., Sutherland W.J. 2017. Amphibian Conservation. In: Sutherland W.J., Dicks L.V., Ockendon N., Smith R.K. (eds). *What Works in Conservation*, pp 9-65. Open Book Publishers, Cambridge, UK.
- Sokol O.M., 1977. A subordinal classification of frogs (Amphibia: Anura). *J. Zool.* 182: 505-508.
- Spannhoff L. 1954. Zur Genese Morphologie und Physiologie der Hautdrüsen bei *Xenopus laevis* Daudin. *Wiss. Z. Humboldt Univ. Berl. Math. Naturwiss. Reihe* 3: 295-305.
- Stanley S.M. 2016. Estimates of the magnitudes of major marine mass extinctions in Earth history.
- Stuart S.N., Hoffmann M., Chanson J.S., Cox N.A., Berridge R.J., Ramani P., Young B.E. (eds.) 2008. *Threatened Amphibians of the World*. Conservation International, Arlington, Virginia, USA.
- Sumida M., Islam M.M., Igawa T., Kurabayashi A., Furukawa Y., Sano N., Fujii T., Yoshizaki N. 2016. The first see-through frog created by breeding: description, inheritance patterns, and dermal chromatophore structure. *Sci. Rep.* 6: 24431.
- Terreni A., Nosi D., Greven H., Delfino G. 2003. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation in comparison with larval glands in specimens of other families. *Tissue Cell* 35: 274-87.
- Valerio C.E. 1971. Ability of some tropical tadpoles to survive without water. *Copeia* 2: 364-365.

- Van Bocxlaer I., Roelants K., Biju S.D., Nagaraju J., Bossuyt F. 2006. Late Cretaceous vicariance in Gondwanan amphibians. PLoS ONE 1: e74.
- Vanable J.W. 1964. Granular gland development during *Xenopus laevis* metamorphosis. Develop. Biol. 10: 331-357.
- Vitt L.J., Caldwell J.P. 2014. Herpetology. An introductory biology of amphibians and reptiles. 4th Ed., Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA.
- Warburg M. R. Rosenberg M. Roberts J.R. Heatwole H. 2000. Cutaneous glands in the Australian hylid *Litoria caerulea* (Amphibia Hylidae). Embryol 201: 341-348.
- Warkentin K.M. 1995. Adaptive plasticity in hatching age: A response to predation risk trade-offs." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3507-3510.
- Warkentin K.M. 2002. Hatching timing, O₂ availability and external gill regression in the treefrog, *Agalychnis callidryas*. Physiol. Biochem. Zool. 75: 155-164.
- Warkentin K.M. 2005. How do embryos assess risk? Vibrational cues in predator-induced hatching of red-eyed treefrogs. Animal Behav. 70: 59-71.
- Warkentin K.M., Buckley C.R., Metcalf K.A. 2006a. Development of red-eyed treefrog eggs affects efficiency and choices of egg-foraging wasps. Animal Behav. 71: 417-425.
- Warkentin K.M., Caldwell M.S., McDaniel J.G. 2006. Temporal pattern cues in vibrational risk assessment by embryos of the red-eyed treefrog, *Agalychnis callidryas*. J. Exper. Biol. 209: 1376-1384.
- Warkentin K.M., Caldwell M.S., Siok T.D., D'Amato A.T., McDaniel J.G. 2007. Flexible information sampling in vibrational assessment of predation risk by red-eyed treefrog embryos. J. Exper. Biol. 210: 614-619.
- Weldon P.J., Kramer M., Gordon S., Spande T.F., Daly J.W. 2006. A common pumiliotoxin from poison frogs exhibits enantioselective toxicity against mosquitoes. Proc. Natl. Acad. USA 103: 17818-17821.
- Withers P.C., Hillman S.S., Drewes R.C. 1984. Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. J. Exp. Zool. 232: 11-17.
- Ziemba J.L., Hickerson C.M., Anthony C.D. 2016. Invasive Asian earthworms negatively impact keystone terrestrial salamanders. PLoS ONE 11: e0151591.

Siti Web

“100 of the World’s Worst Invasive Alien Species”. Global Invasive Species Database. <http://www.iucngisd.org/gisd/?st=100ss> Accessed 24 October 2016.

Amphibian Ark. 2016. <http://www.amphibianark.org/> Accessed 10 November 2016.

Global Amphibian Assessment. 2005.

http://www.pacificbio.org/initiatives/ESIN/News/global_amphibian_assessment.htm Accessed 15 November 2016.

Image Processing and Analysis in Java. 2016. <http://rsbweb.nih.gov/ij/> Accessed 27 October 2016.

Natural Teachers Network Guide and Web Resources. 2015. <http://www.childrenandnature.org/wp-content/uploads/2015/05/NTN-eguide-2015ALL.pdf> Accessed 15 November 2016.

The IUCN Red List of Threatened Species 2016. <http://www.iucnredlist.org/> Accessed 16 November 2016.

United States Environmental Protection Agency. 2017. <http://www.epa.gov/climatechange/basics/>. Accessed 10 January 2017.

World Population Clock website. 2017. <http://www.worldometers.info/world-population/> Accessed 24 January 2017.

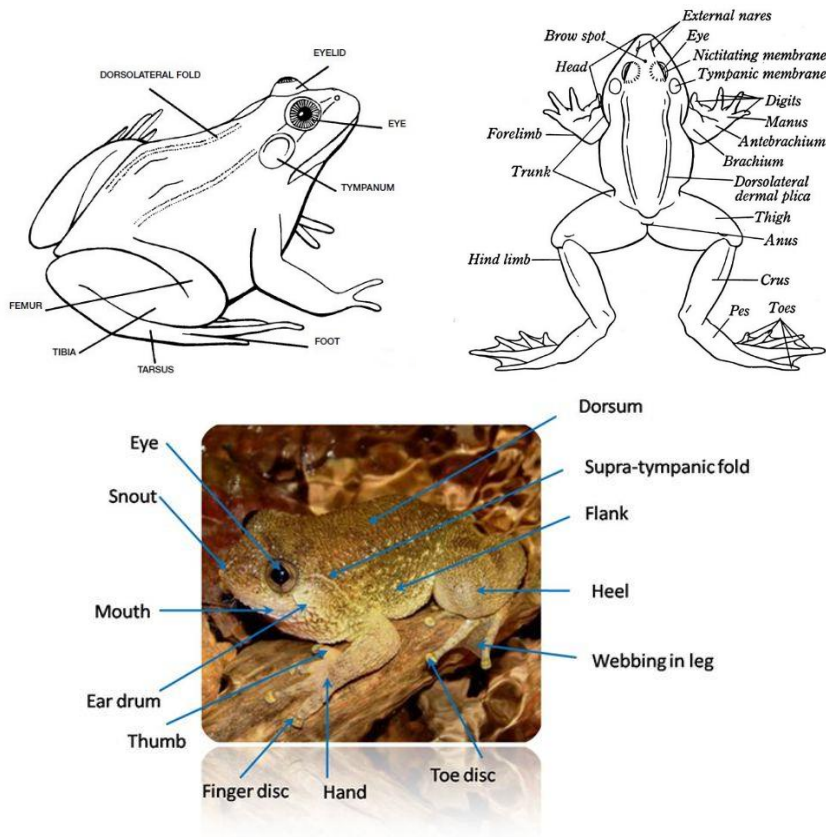


Fig. 1.1. Anatomia tipica degli Anuri. La specie rappresentata in alto a destra è *Pelophylax esculentus* (Anura, Ranidae), quella in alto a sinistra è *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae).

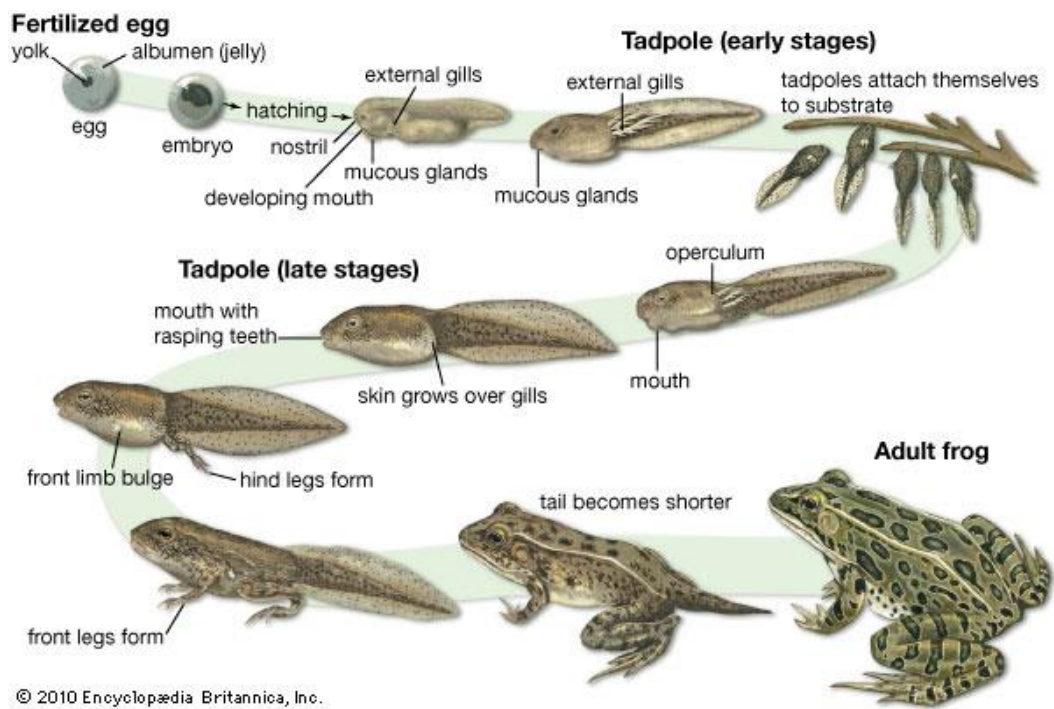


Fig. 1.2. Riproduzione negli Anuri. In alto, amplesso in *P. esculentus*. In basso, principali stadi di sviluppo degli Anuri.

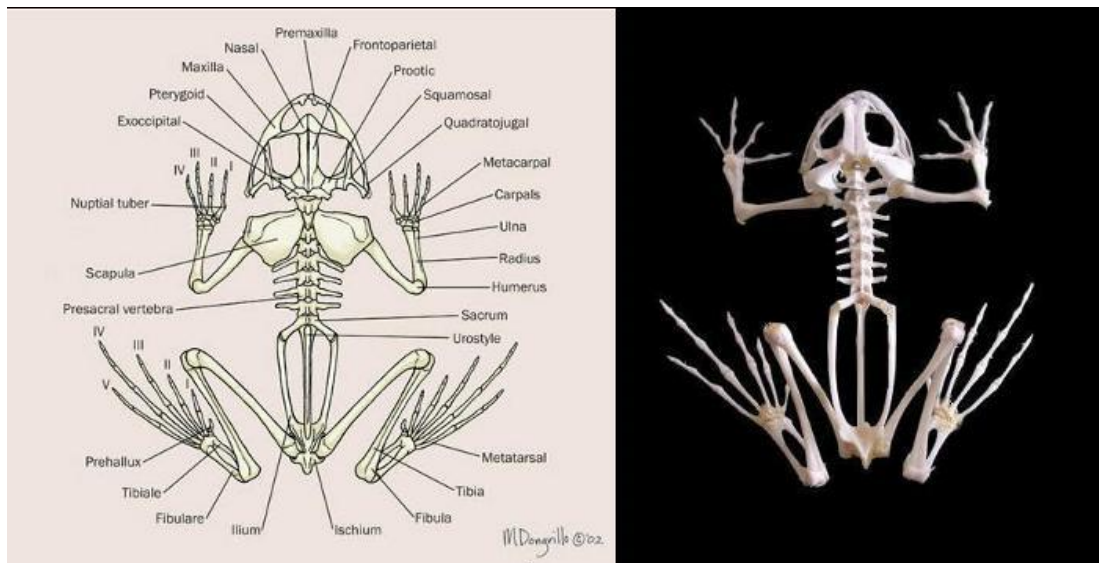
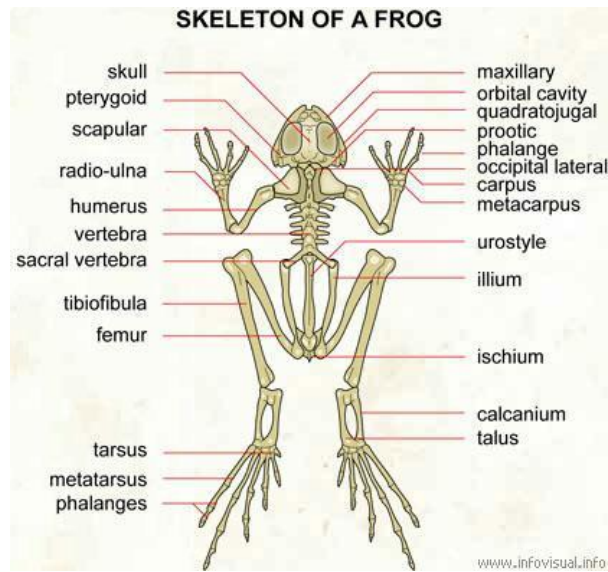


Fig. 1.3. Anatomia dello scheletro osseo di un Anuro.

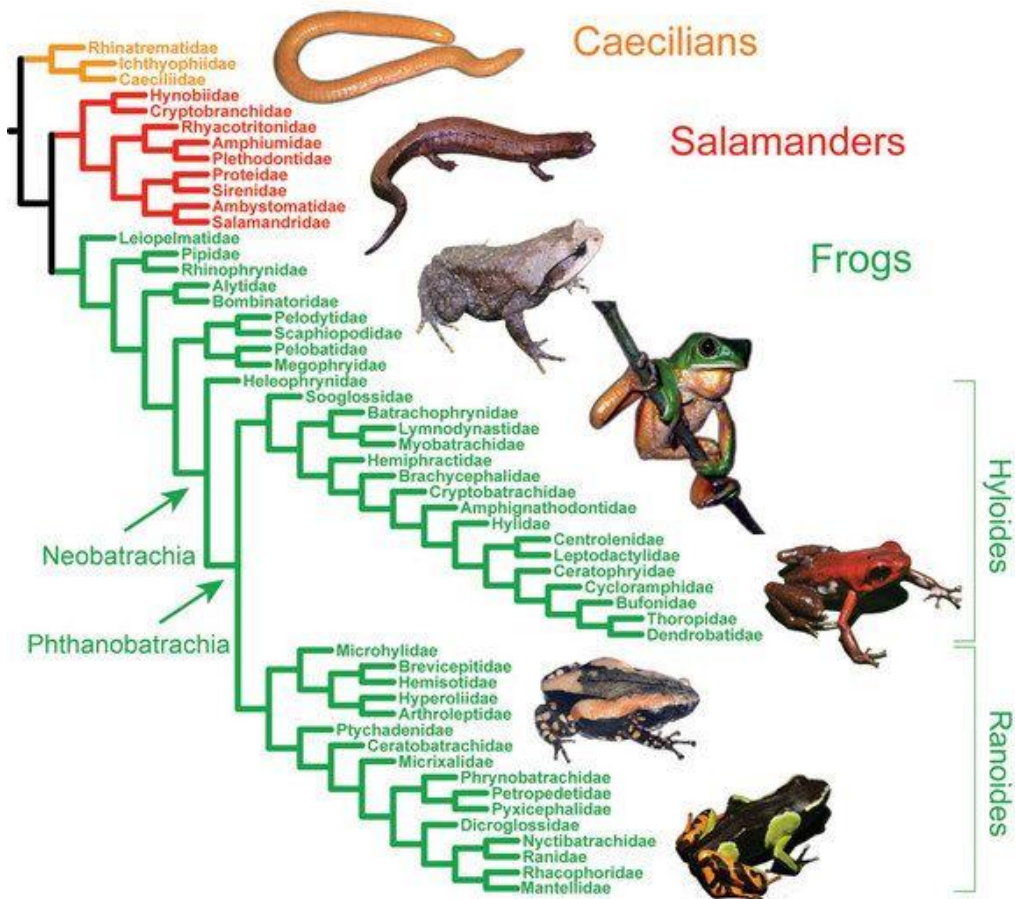


Fig. 1.4. Albero filogenetico degli Anfibi (da Vitt e Caldwell 2014).

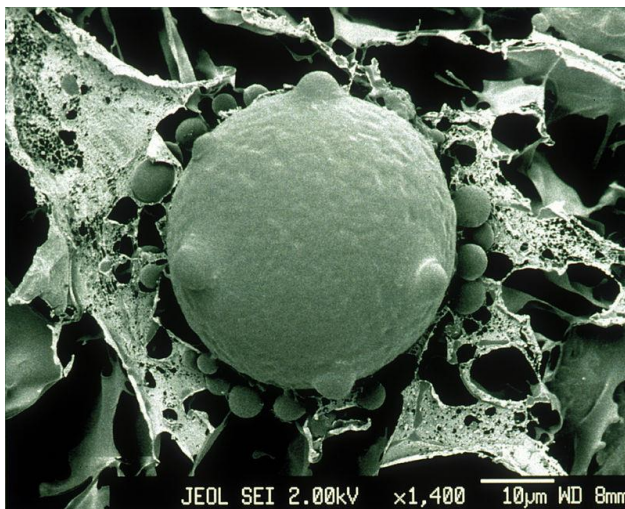
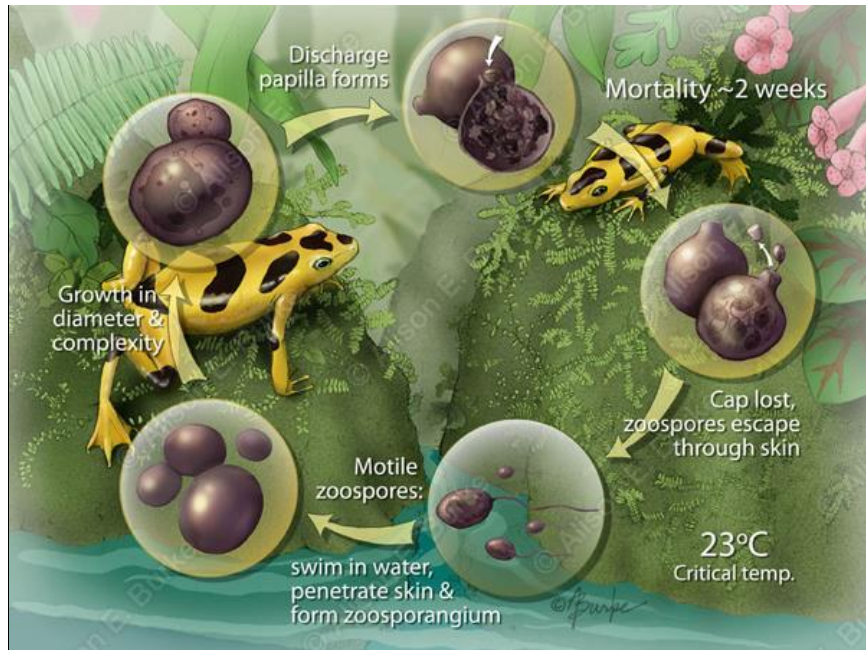


Fig. 1.5. *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (1999) (Chytridiomycota Rhyzopydiales). In alto: ciclo biologico del fungo. In basso a sinistra, zoospore fotografate al microscopio elettronico a scansione. In basso a destra: zoospore nell'epidermide di *Atelopus varius* (Anura, Bufonidae); le frecce indicano i tubicini attraverso cui fuoriescono le zoospore. Barra = 35 µm.

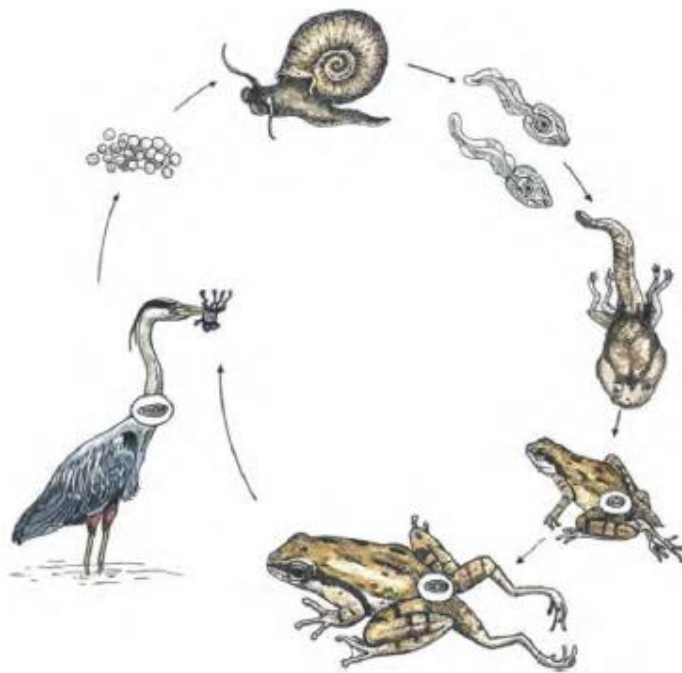


Fig. 1.6. Deformità negli Anuri. In alto, zampa soprannumeraria cresciuta dalla mandibola in un esemplare di *Anaxyrus woodhousii* (Anura, Bufonidae) proveniente dall'Oklahoma. In basso, zampe deformi e soprannumerarie in anfi infettati dal trematode parassita *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda, Echinostomida). (Da Blaustein e Johnson 2003).



Fig. 1.7. Specie rappresentative delle famiglie Hylidae e Ceratophrydae. In alto a sinistra, *Litoria leucova* (Pelodryadinae); in alto a destra, *Cruziohyla calcarifer* (Phyllomedusinae). In basso a sinistra, *Telmatobius necopinus* (Telmatobiinae); in basso a destra, *Ceratophrys cornuta* (Ceratophrynae). (Da Vitt e Caldwell 2014).



Fig. 1.8. *Agalychnis callidryas* (Cope, 1862) (Amphibia Anura: Hylidae), “raganella dagli occhi rossi” (“red-eyed tree frog”).

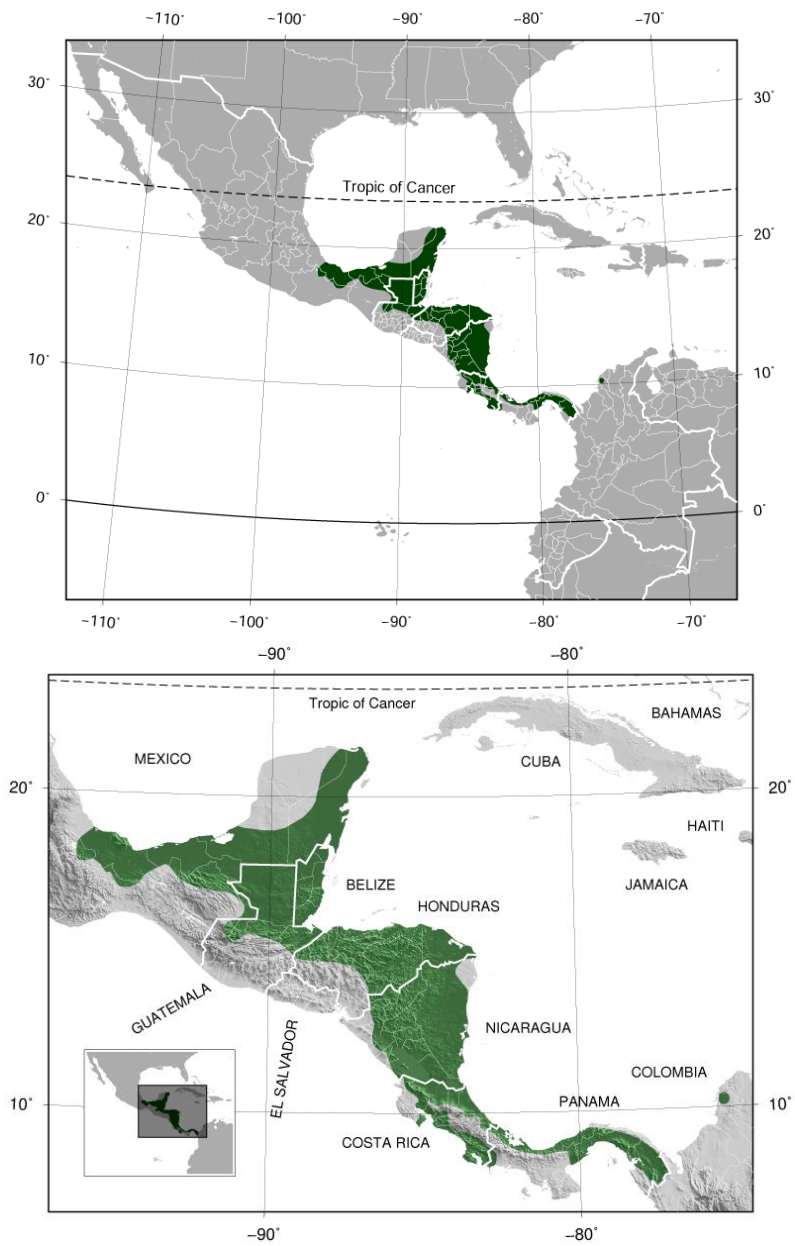


Fig. 1.9. Areale di distribuzione di *A. callidryas*.

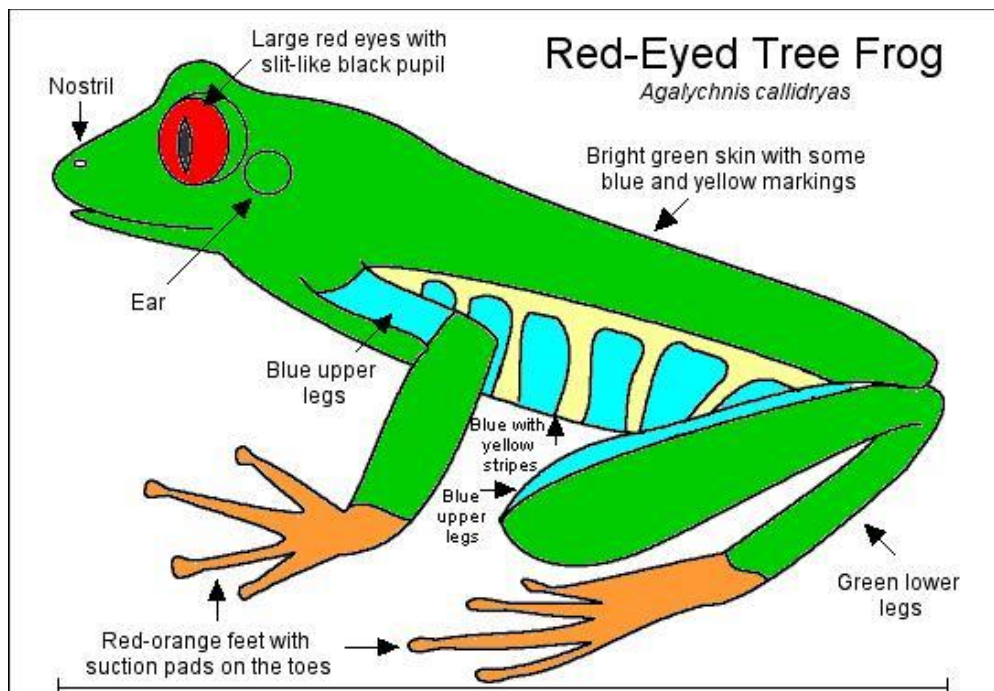


Fig. 1.10. Parti del corpo e caratteristica livrea di *A. callidryas*.



Fig. 1.11. *A. callidryas*, aspetti di mimetismo diurno e notturno (in alto) e deimatico (in basso).



Fig. 1.12. Riproduzione in *A. callidryas*. In alto, adulti in accoppiamento. In basso a sinistra, uova in ammasso gelatinoso aderente alle foglie; in basso a destra, larva postmetamorfica.

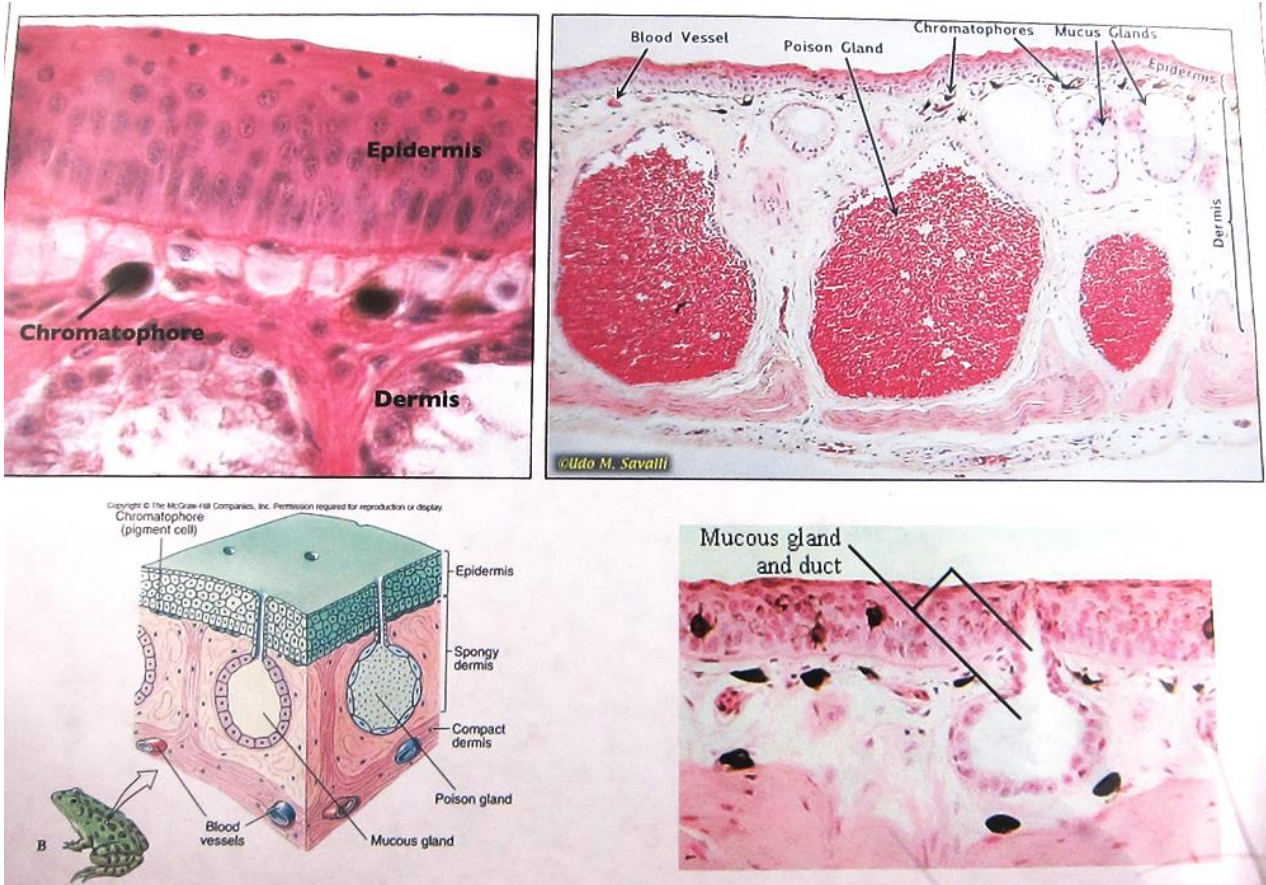
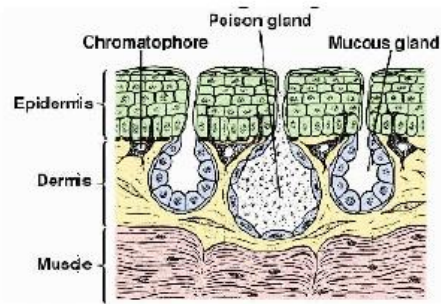
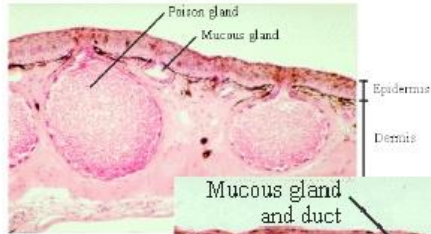


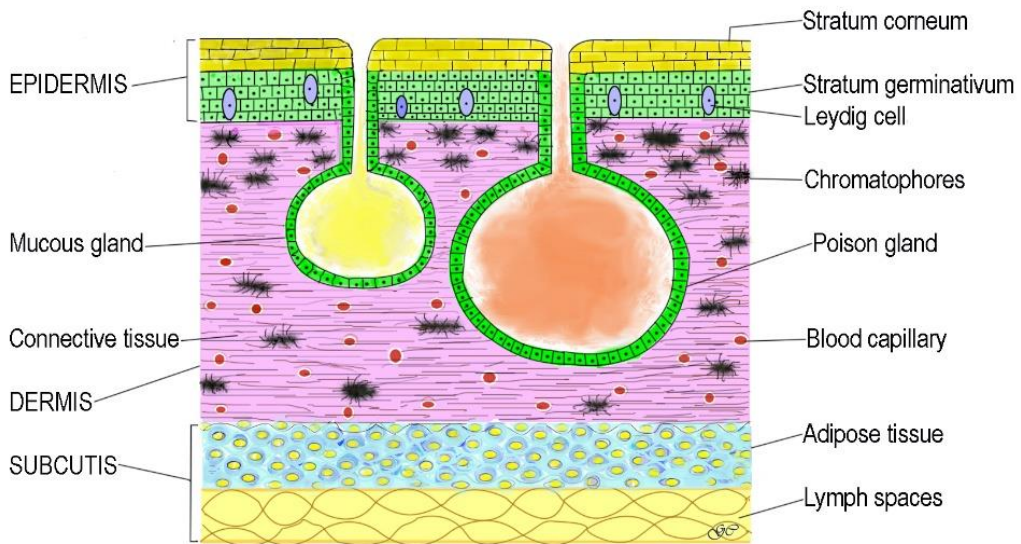
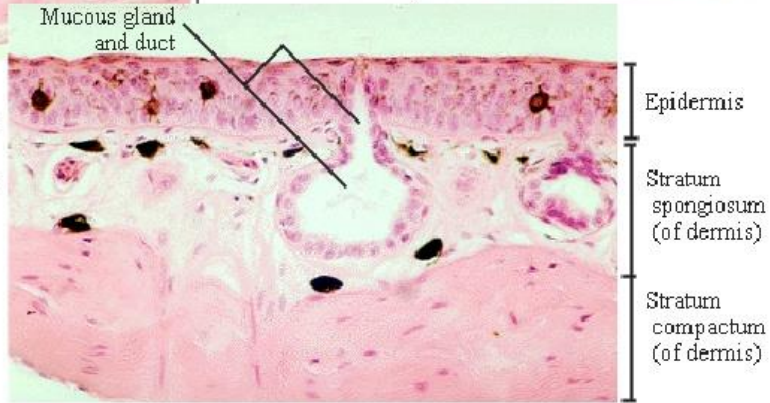
Fig. 1.13. Struttura della pelle (epidermide) degli Anfibi.

FROG SKIN



Mucus gland = cuboidal epithelial cells

Poison glands = simple squamous to columnar



VERTICAL SECTION OF SKIN OF FROG

Fig. 1.14. Ghiandole cutanee negli Anuri.

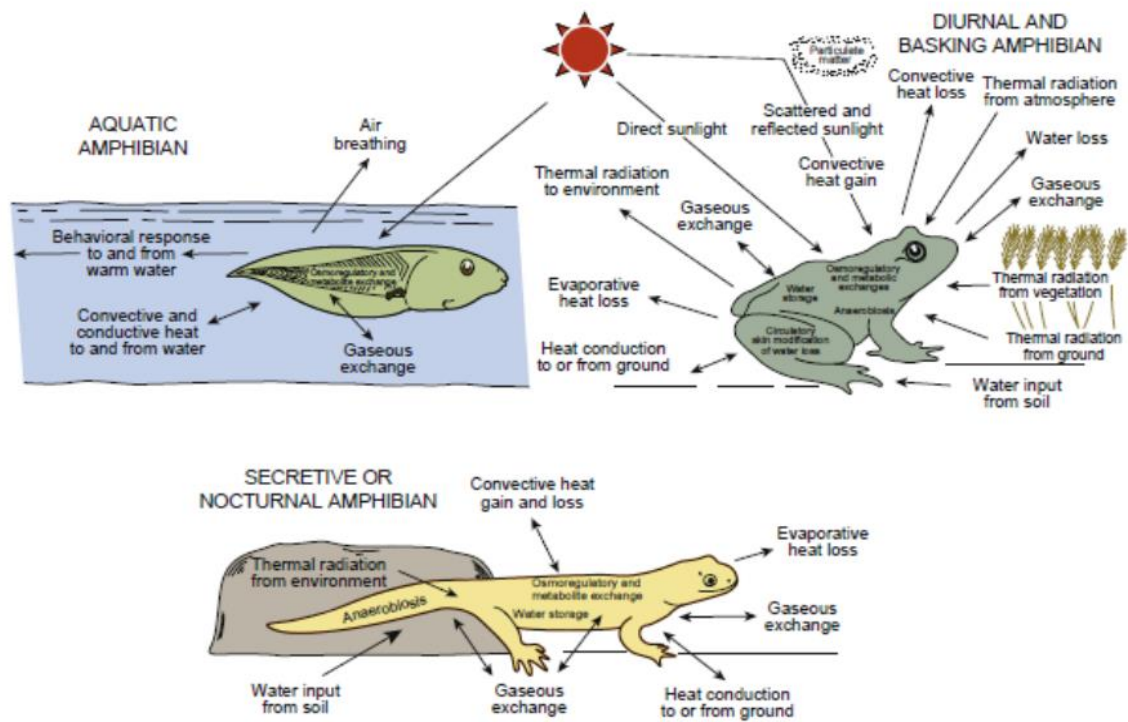


Fig. 1.15. Regolazione degli scambi gassosi attraverso la pelle e dell'equilibrio idrico negli Anuri e negli Urodeli (da Vitt e Caldwell 2014).



Fig. 1.16. *Trichobatrachus robustus* (Anura, Arthrolepidae), “hairy frog”, con espansioni epidermiche su cosce e fianchi (in alto) e artigli ossei retrattili (“Wolverine frog”) (in basso).



Fig. 1.17. Schema di una tipica unità secretoria sierosa negli Anuri basata su immagini al microscopio elettronico a trasmissione (Delfino et al. 2001b). **A.** Sezione trasversale dell'adenomero di una ghiandola sierosa. **B.** Strutture subcellulari che amplificano le superfici di scambio tra il secreto e il citoplasma: microvilli (freccia), espansioni citoplasmatiche (punte di freccia) ed estensioni del compartimento perigranulare (freccie curve).



Fig. 1.18. Composti di interesse farmacologico prodotti dagli Anuri.

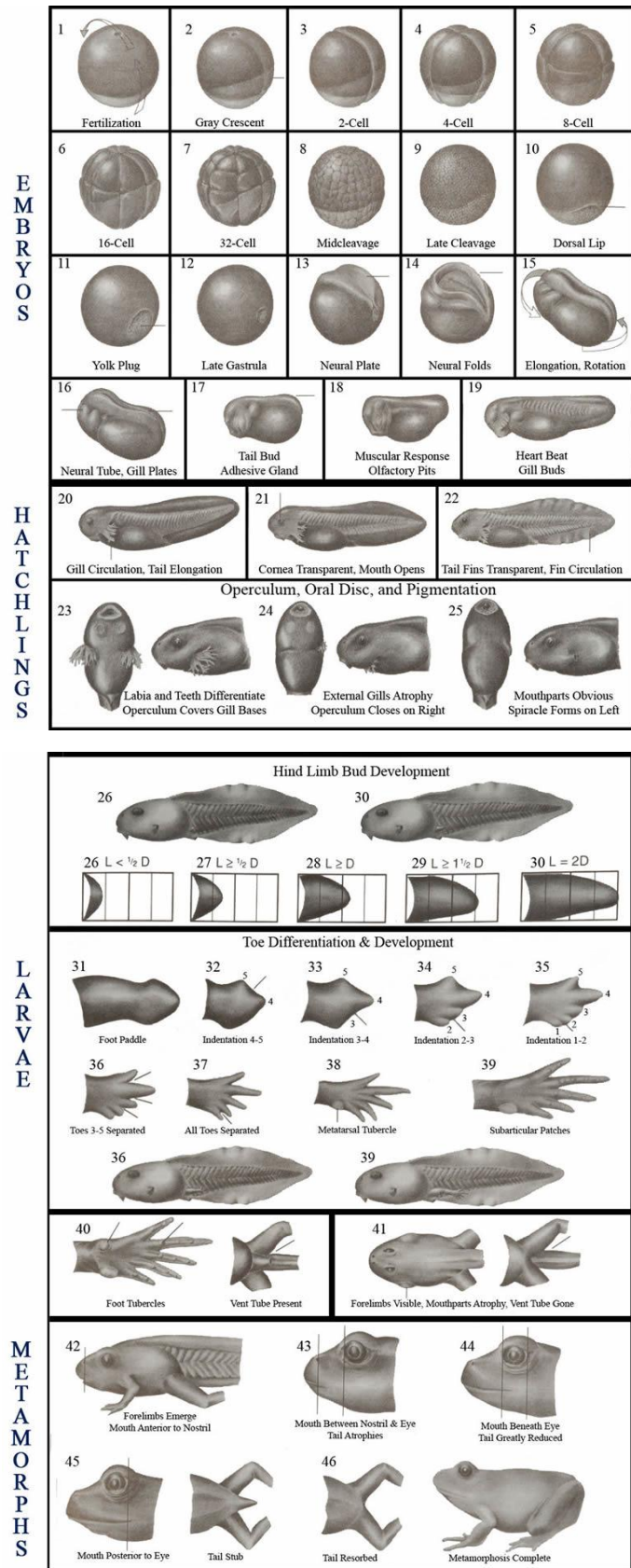


Fig. 3.1. Stadi di sviluppo degli Anuri secondo Gosner (1960).

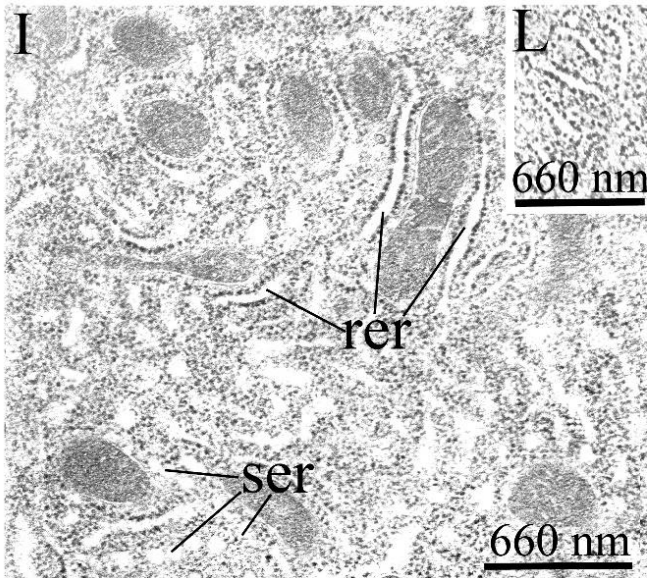
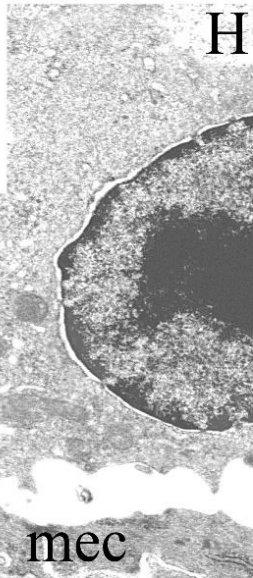
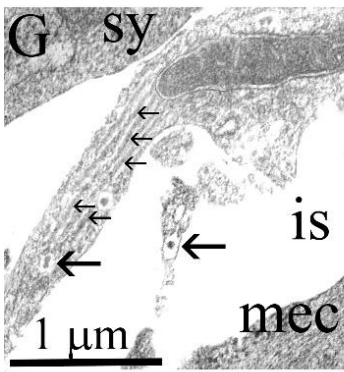
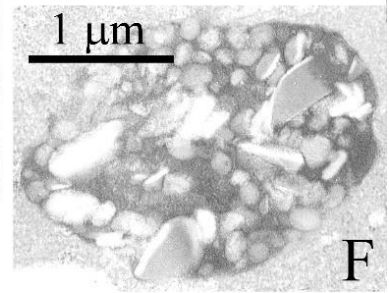
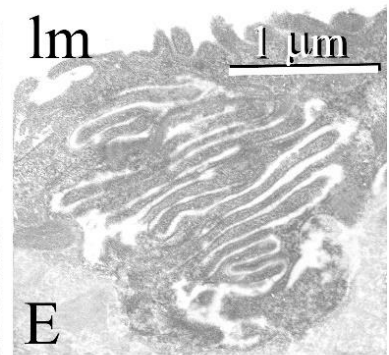
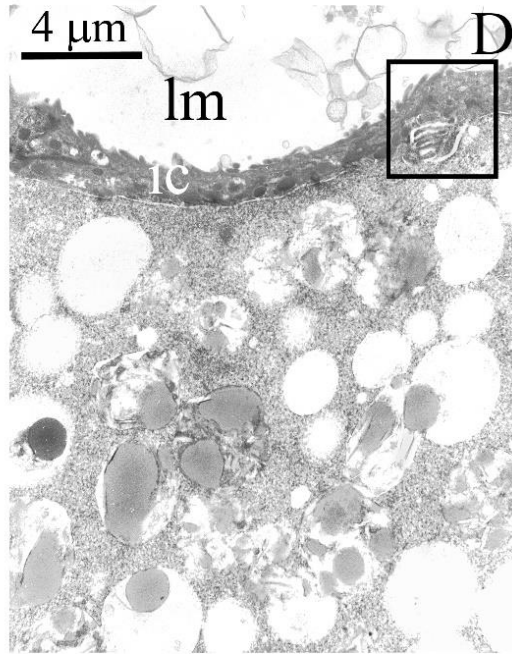
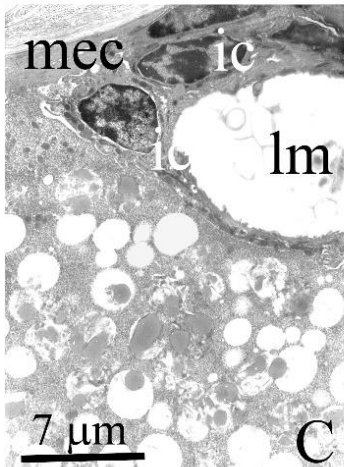
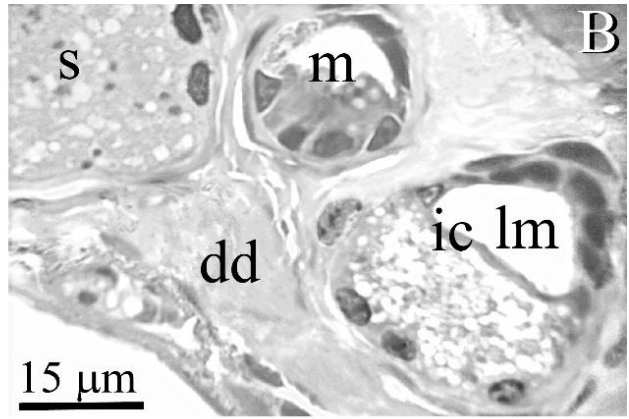
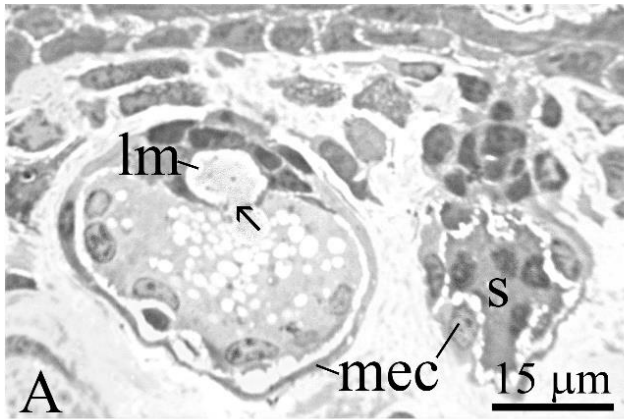


Fig. 4.1. Caratteristiche delle ghiandole lipidiche specializzate nell'epidermide dorsale di *Agalychnis callidryas* al microscopio ottico (A, B) e al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (C-L). **A.** Larva postmetamorfica allo stadio 42: ghiandola lipidica (a sinistra) e ghiandola sierosa (s) che ha emesso il secreto; il prodotto lipidico (freccia) fuoriesce dal sincizio verso il lume (lm) attraverso una discontinuità nella barriera citoplasmatica del tratto intercalare; mec, cellula mioepiteliale. **B.** Adulto: sono distinguibili le diverse caratteristiche di una ghiandola sierosa (s), di una ghiandola mucosa (m) e di una ghiandola lipidica, in basso a destra. L'unità secretoria mucosa consiste di cellule separate. La comparazione con l'immagine in A mostra che le ghiandole lipidiche nelle larve postmetamorfiche hanno raggiunto la loro morfologia definitiva; dd, strato denso del derma. **C.** Adulto: l'immagine al TEM mostra il lume (lm) del tratto intercalare (ic) costituito da cellule indifferenziate. **D.** Dettaglio dell'immagine in C, che mostra le cellule laminari del tratto intercalare (ic), con citoplasma più denso rispetto a quello del sincizio; il sincizio contiene molto materiale secretorio a varia densità. Nel lume del tratto intercalare (lm) si osserva materiale estruso, probabilmente di tipo lipidico. Il quadrato delimita una regione contenente strutture digitiformi formate dalle cellule laminari del tratto intercalare. **E.** Regione contenente strutture digitiformi delle cellule laminari del tratto intercalare in una sezione seriale adiacente a quella di D, a maggiore ingrandimento: le strutture digitiformi si intersecano reciprocamente tramite sottili processi citoplasmatici. **F.** Larva postmetamorfica allo stadio 42: depositi secretori lipidici all'interno del sincizio a forte ingrandimento, caratterizzati da uno spiccato polimorfismo. **G.** Adulto, ghiandola lipidica: assone contenuto nell'interstizio (is) tra il mioepitelio (mec) e il sincizio secretorio (sy); in alto è visibile un mitocondrio a matrice elettrondensa; le frecce piccole indicano i neurotubuli dell'assone, le frecce grandi indicano vescicole con regione centrale elettrondensa. **H.** Adulto, regione periferica della ghiandola lipidica: non si osserva alcuna membrana plasmatica tra i nuclei ai due lati opposti dell'immagine. Il sincizio contiene gruppi di elementi del reticolo endoplasmatico rugoso (rer) e liscio (ser). **I.** Larva postmetamorfica allo stadio 42: periferia del sincizio secretorio con gruppi di elementi del reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, alternati a mitocondri con matrice elettrondensa. **L.** Adulto, ghiandola lipidica: profili del reticolo endoplasmatico rugoso allo stesso ingrandimento in I.

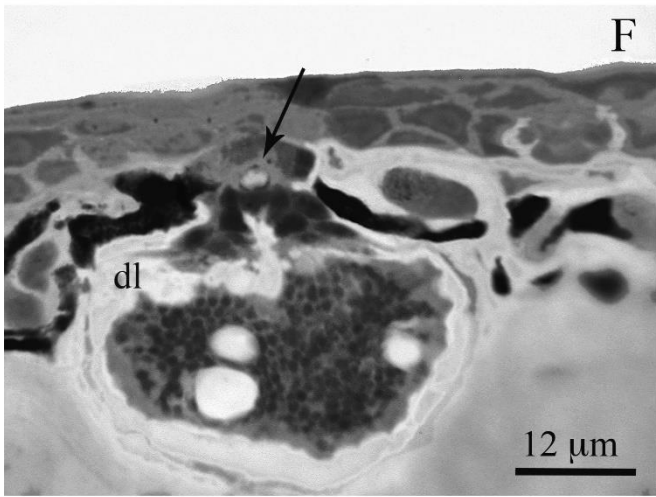
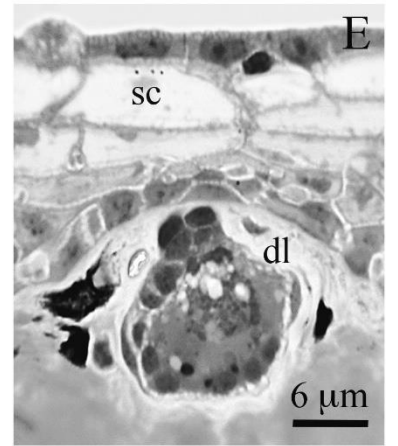
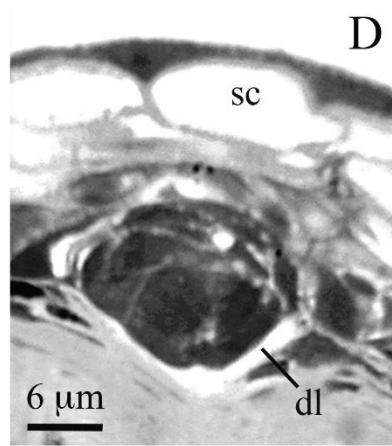
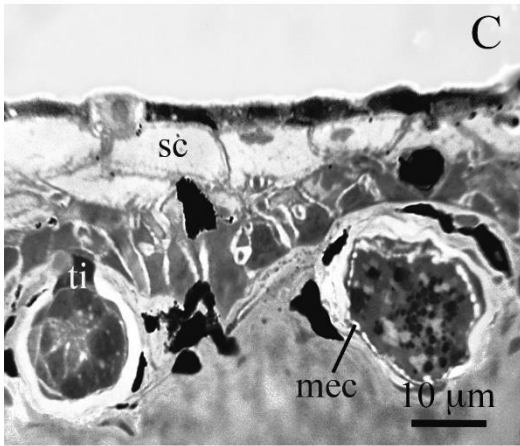
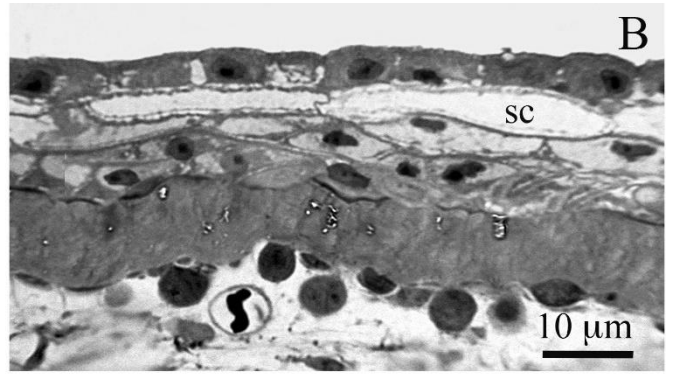
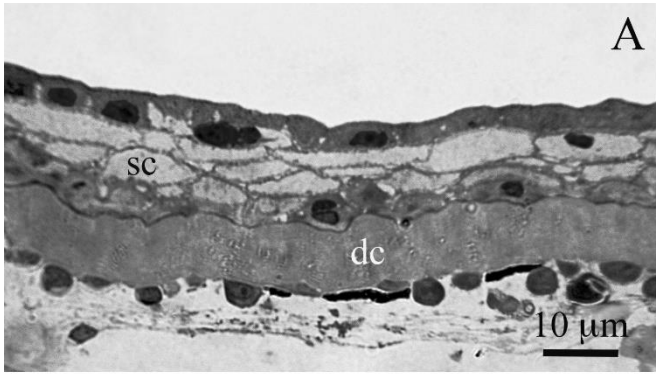


Fig. 4.2. Aspetti strutturali dell'epidermide dorsale e degli abbozzi ghiandolari in larve di *A. callidryas* agli stadi 28, 40 e 42 di Gosner, osservati al microscopio ottico in sezioni trasversali. **A.** Sezione di epidermide di una larva premetamorfica allo stadio 28: l'epidermide poggia su un derma compatto (dc) ed è costituita da uno strato basale, da due strati di voluminose cellule poliedriche con citoplasma trasparente ("skein cells", sc) e da uno strato di cellule superficiali di forma cuboidale. **B.** Si osserva l'aumento di volume verso l'esterno delle "skein cells". **C.** Sezione di epidermide di una larva postmetamorfica allo stadio 40: in questa fase larvale, caratterizzata dalla permanenza delle "skein cells" sono presenti i primi abbozzi delle ghiandole sierose: si tratta di ghiandole in miniatura il cui adenomero, circondato dai mioblasti del futuro mioepitelio (mec) mostra i primi depositi secretori. L'abbozzo di sinistra, sezionato secondo il diametro maggiore, mostra il futuro colletto (ti). **D.** Abbozzo sieroso ancora parzialmente contenuto nello spessore dell'epidermide e circondato dal primordio del derma lasso (dl). **E.** Adenomero di un abbozzo ghiandolare sieroso contenente nel citoplasma numerosi granuli secretori di varia densità. **F.** Sezione di epidermide di una larva postmetamorfica allo stadio 42: i cheratinociti hanno quasi completamente sostituito le "skein cells" e l'abbozzo della ghiandola sierosa mostra già componenti strutturali mature, come il dotto (freccia), l'adenomero secernente di tipo sinciziale con granuli a vari gradi di condensazione, e gli interstizi tra il sincizio secretorio e le cellule mioepiteliali; dl, derma lasso. **G.** Abbozzo di ghiandola mucosa nell'epidermide di una larva postmetamorfica allo stadio 42. Si nota la differenza nella struttura dell'adenomero, composto da cellule separate e non da un sincizio: la struttura a cellule separate è evidenziata dagli ampi interstizi presenti tra i mucoblasti.

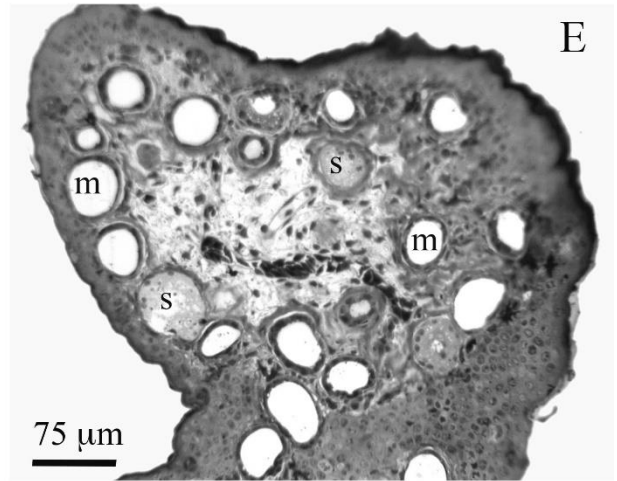
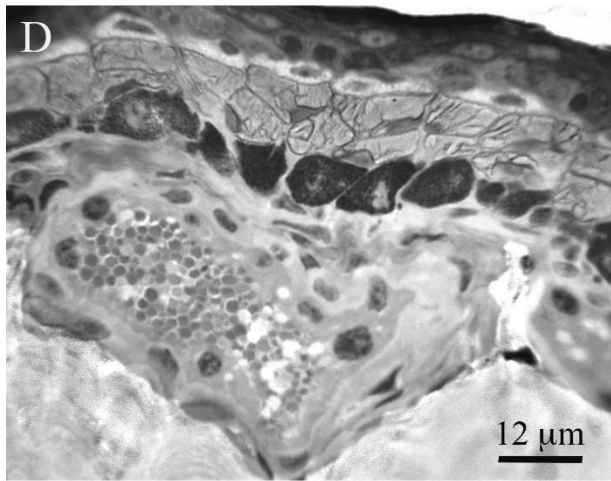
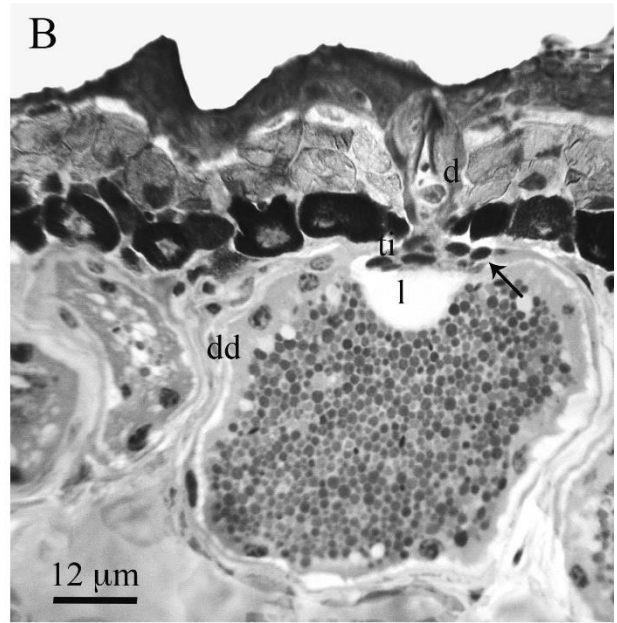
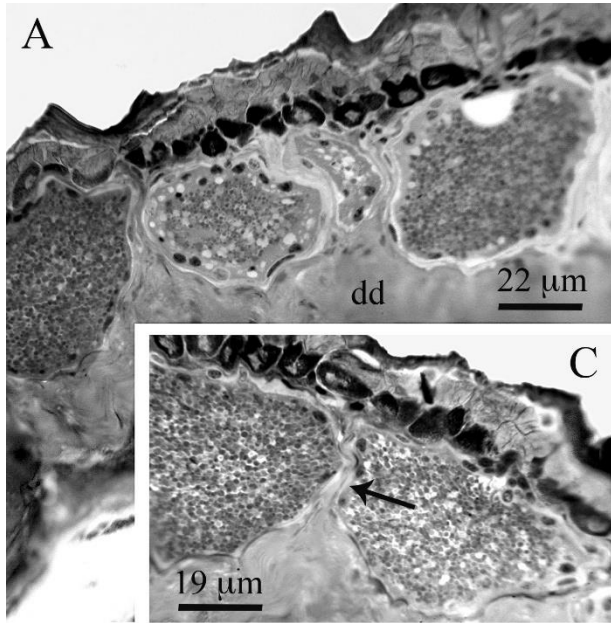


Fig. 4.3: Aspetti strutturali delle ghiandole sierose in adulti di *A. callidryas* osservate al microscopio ottico in sezione trasversale. **A.** Immagine a basso ingrandimento che mostra un'area della superficie cutanea dorsale caratterizzata da un'alta densità di ghiandole sierose, contenenti materiale secretorio di aspetto variabile. **B.** Immagine a maggiore ingrandimento di una sezione seriale adiacente a quella in A, che evidenzia le strutture della ghiandola: il dotto (d) che percorre l'intero spessore dell'epidermide, il lume (l) delimitato da un rivestimento corneo continuo con quello superficiale; il colletto (ti), costituito da cellule indifferenziate ed embricate (freccia); l'adenomero, provvisto di un lume di ampiezza ridotta e contenente granuli secretori a varia densità, e la singola fila di nuclei periferici, circondati da un esiguo citoplasma privo di secreto. La struttura a sinistra corrisponde ad una unità secernente che si insinua tra due adenomeri adiacenti, espressione dell'elevato grado di affollamento di ghiandole in questa regione dell'epidermide. Tra le ghiandole contigue, la componente densa del derma (dd) risale sino a portarsi a ridosso dell'epidermide. **C.** Immagine di un'altra regione dell'epidermide che evidenzia l'esiguo spazio connettivale tra gli adenomeri (freccia). **D.** Immagine di un adenomero ad ingrandimento elevato che mostra numerose e minute cavità alternate ai granuli, probabilmente risultato di una precedente emissione secretoria. Si riconoscono tre strati di cromatofori interposti tra la ghiandola e il piano basale dell'epidermide. **E.** Immagine tangenziale a basso ingrandimento che evidenzia unità mucose (m) ad ampio lume trasparente ed unità sierose (s) caratterizzate da struttura sinciziale e dall'assenza di lume. La regione centrale della sezione è occupata dal derma lasso, riconoscibile per la presenza di una matrice trasparente e di cellule caratteristiche di questa componente cutanea.

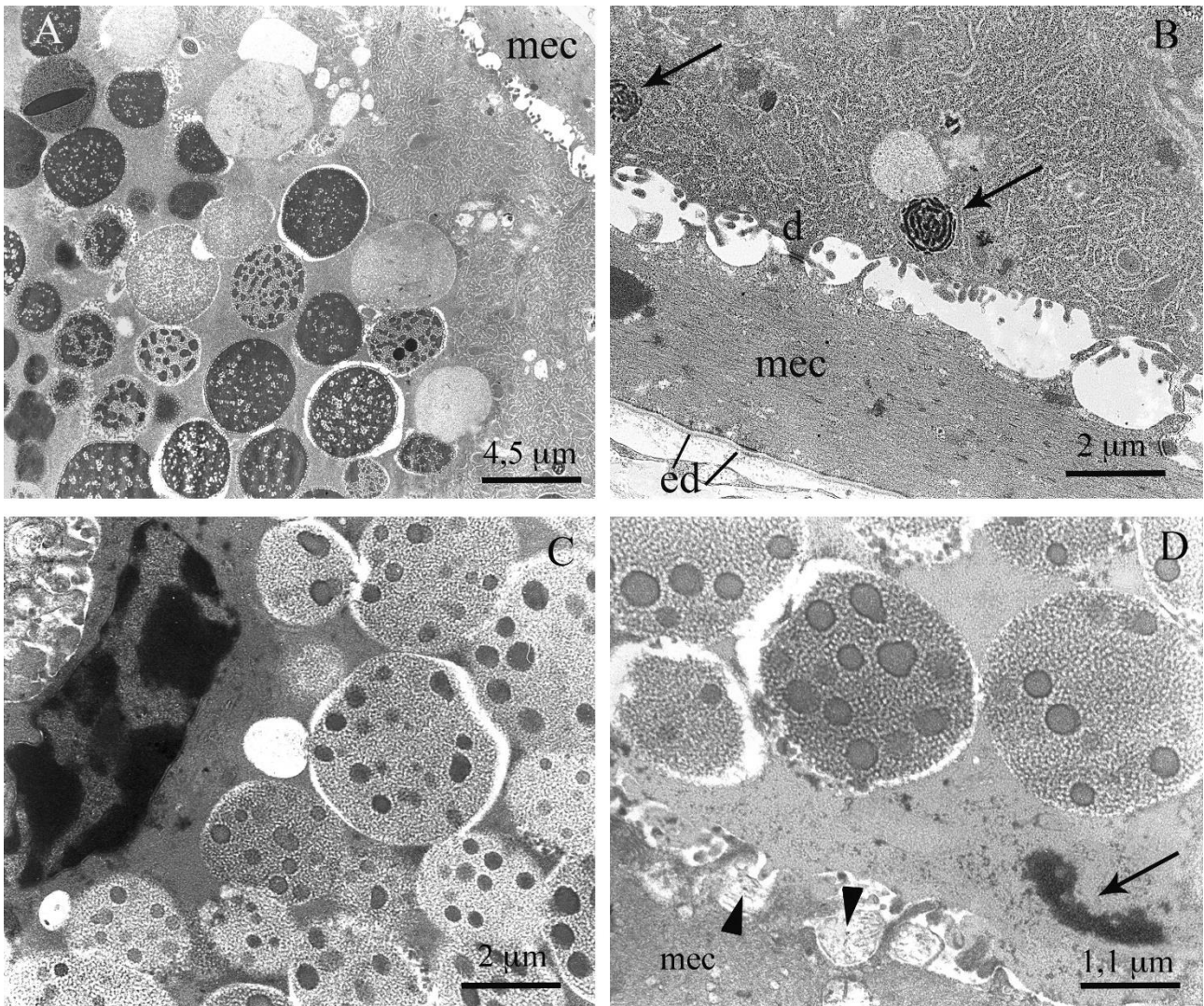


Fig. 4.4. Rapporti tra mioepitelio e sincizio secernente in ghiandole sierose dell'epidermide di adulti di *A. callidryas* esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). **A.** Nel sincizio sono visibili gli aspetti caratteristici del secreto sieroso ed alla periferia ghiandolare è riconoscibile il mioepitelio. L'interstizio tra mioepitelio (mec) e sincizio presenta sottili proiezioni citoplasmatiche provenienti da ambedue i versanti. **B.** Tra le proiezioni citoplasmatiche si osservano giunzioni desmosomiali (d) e sul versante stromale il mioepitelio forma numerosi emidesmosomi (ed). Le frecce indicano caratteristiche formazioni sferoidali associate al reticolo endoplasmatico rugoso. **C.** I processi citoplasmatici dell'interstizio si presentano come proiezioni piuttosto spesse: è visibile un nucleo del sincizio, caratterizzato in sezione da un profilo arcuato. **D.** Nell'interstizio periferico si osservano terminazioni neuritiche di natura ortosimpatica, con vescicole sinaptiche "dense core" (punte di freccia). La freccia indica un nucleo in sezione tangenziale.

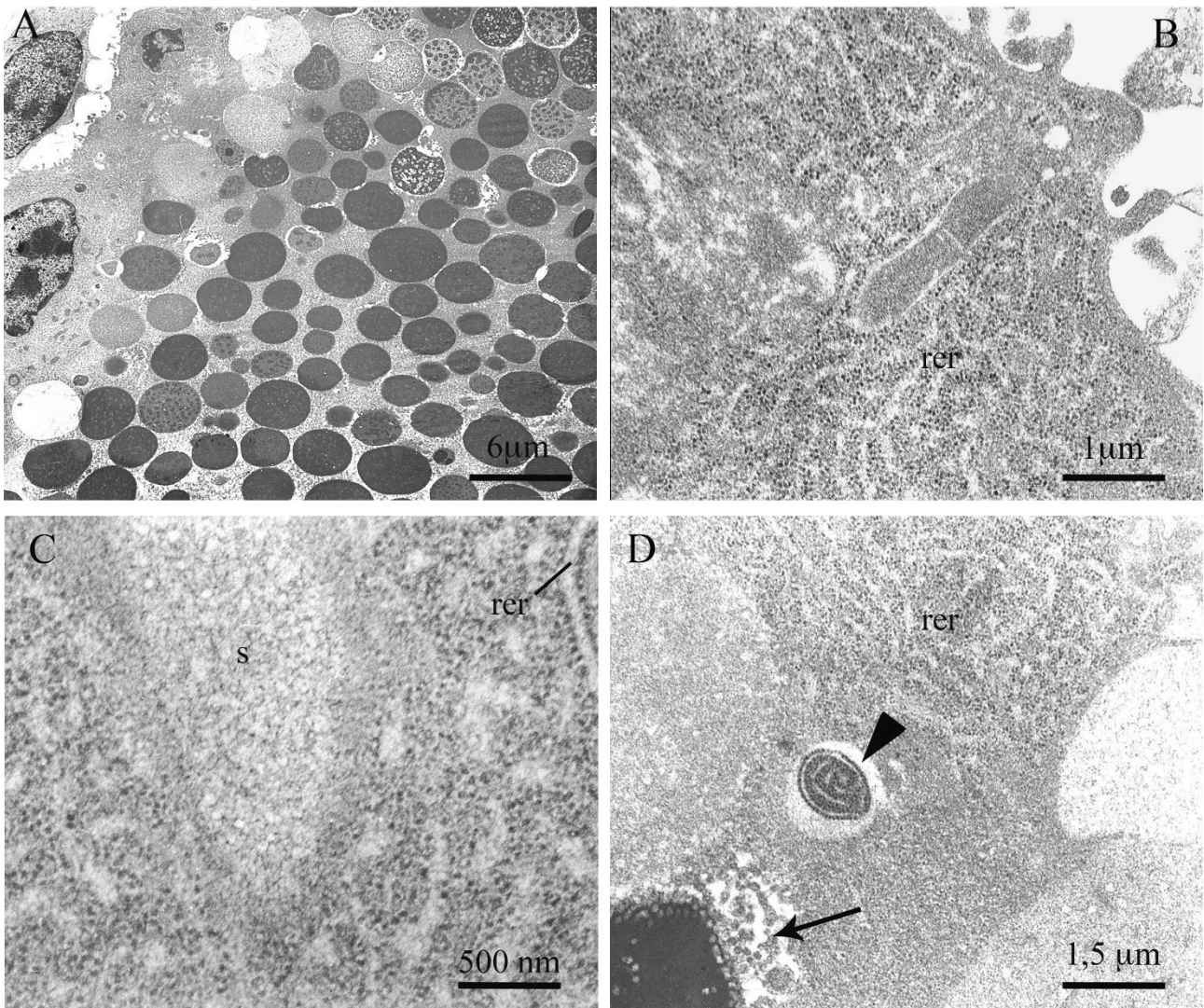


Fig. 4.5. Caratteristiche del sincizio secernente in ghiandole sierose dell'epidermide di adulti di *A. callidryas* esaminate al TEM. La periferia dell'adenomero contiene i nuclei del sincizio, distribuiti in singolo strato, un esteso reticolo endoplasmatico (rer) e numerose vescicole secretorie. **A.** Due nuclei del sincizio, chiaramente riconoscibili in comparazione a quelli delle cellule mioepiteliali, sono visibili in alto a destra. Il secreto sieroso presenta un'evidente eterogeneità, espressione di un processo di maturazione centripeta. **B.** Mitocondrio con matrice di densità media. Le cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso sono generalmente appiattite. **C.** Accumulo di secreto sieroso immaturo (s) tra profili del reticolo endoplasmatico rugoso. **D.** Le regioni periferiche dell'adenomero contengono peculiari associazioni di cisterne parallele del reticolo endoplasmatico rugoso con andamento circolare (punta di freccia), che delimitano citoplasma sinciziale addensato. La freccia indica le estroflessioni dello stesso citoplasma nell'alone perighiandolare.

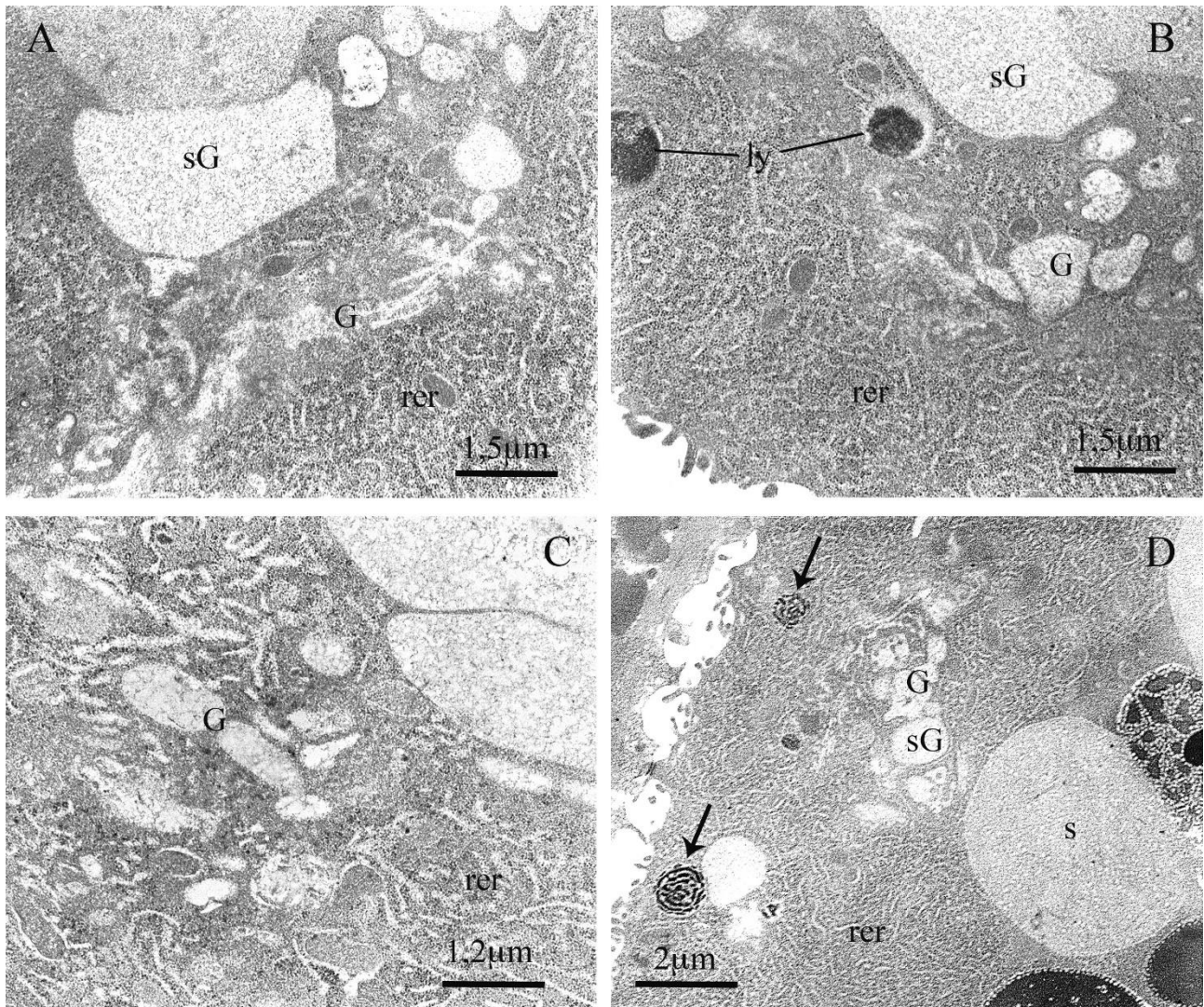


Fig. 4.6. Attività dell'apparato di Golgi e caratteristiche del reticolo endoplasmatico rugoso nel sincizio di ghiandole sierose epidermiche di adulti di *A. callidryas* esaminate al TEM. **A.** Sacculi appiattiti e faccia trans dell'apparato di Golgi (G), in contiguità con il proprio prodotto (sG), costituito da vescicole di varie dimensioni; rer, reticolo endoplasmatico rugoso. **B.** Lisosomi primari (ly) e prodotto di secrezione (sG) in prossimità di una cisterna di Golgi sezionata marginalmente (G). **C.** Prodotto rilasciato dall'apparato di Golgi con aspetto del tutto simile a quello del secreto sieroso immaturo nella Fig. 4.5C. **D.** Il materiale appena prodotto dall'apparato di Golgi (sG) appare meno denso del secreto immaturo (s). Le frecce indicano peculiari aggregati sferoidali di strutture addensate.

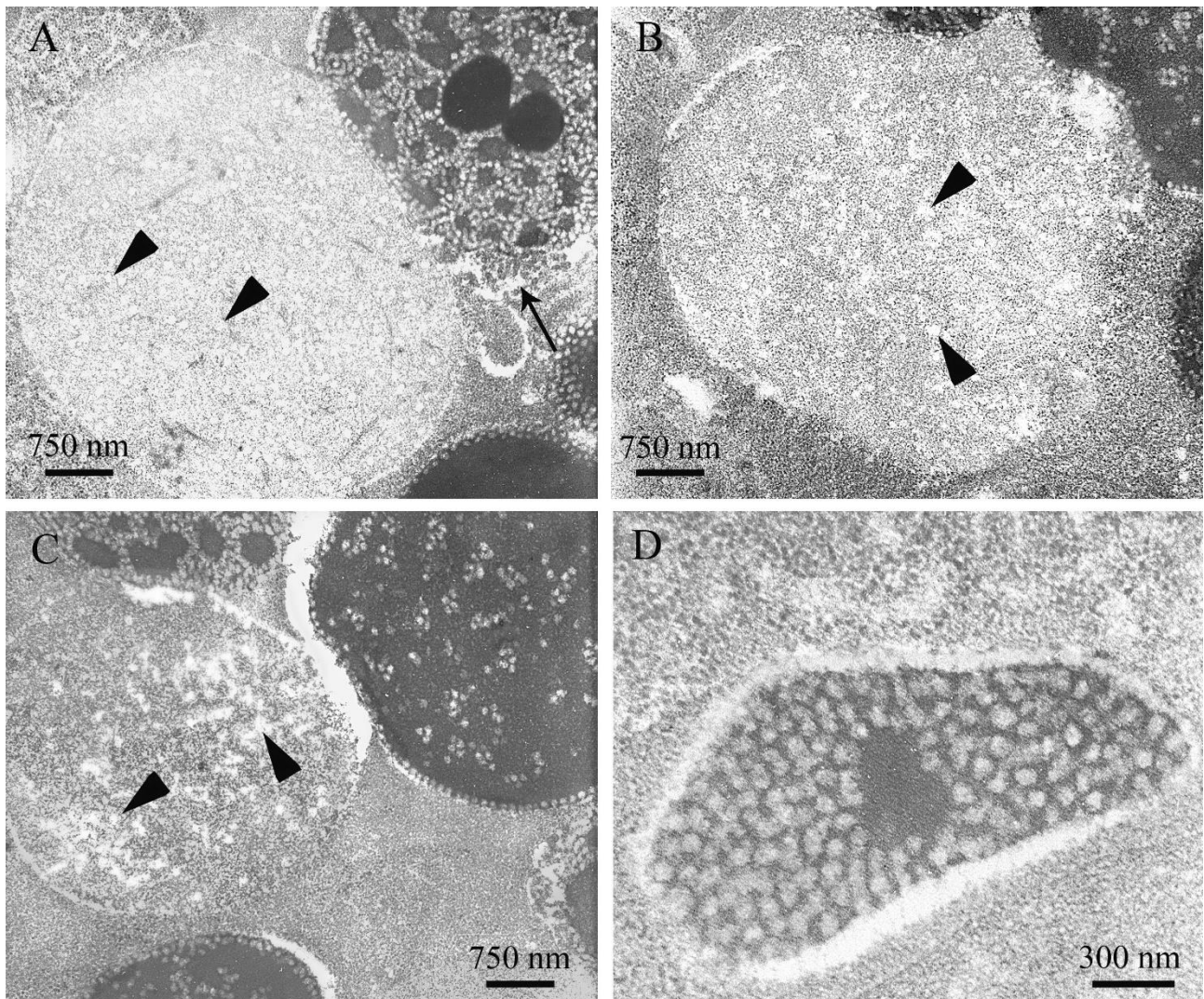


Fig. 4.7. Quadri ultrastrutturali della granulogenesi in ghiandole sierose sinciziali di adulti di *A. callidryas*. **A.** Pregranulo (a sinistra) e granulo in fase intermedia di maturazione (a destra): nel primo compaiono le prime subunità modulari (punte di freccia); nel secondo sono presenti nell'alone quadri caratteristici dei processi che promuovono la maturazione (freccia). **B.** Il pregranulo mostra la condensazione della sua matrice non periodica e la comparsa delle prime strutture ripetitive (punte di freccia). **C.** La condensazione della matrice del granulo, iniziale in Fig. 4.7A e B, appare più marcata, mentre la componente ripetitiva mostra strutture labirintiche (punte di freccia). **D.** Granulo a livello intermedio di maturazione che mostra un evidente contrasto tra la componente ripetitiva e quella amorfa, rappresentata da un singolo addensamento centrale elettrondenso.

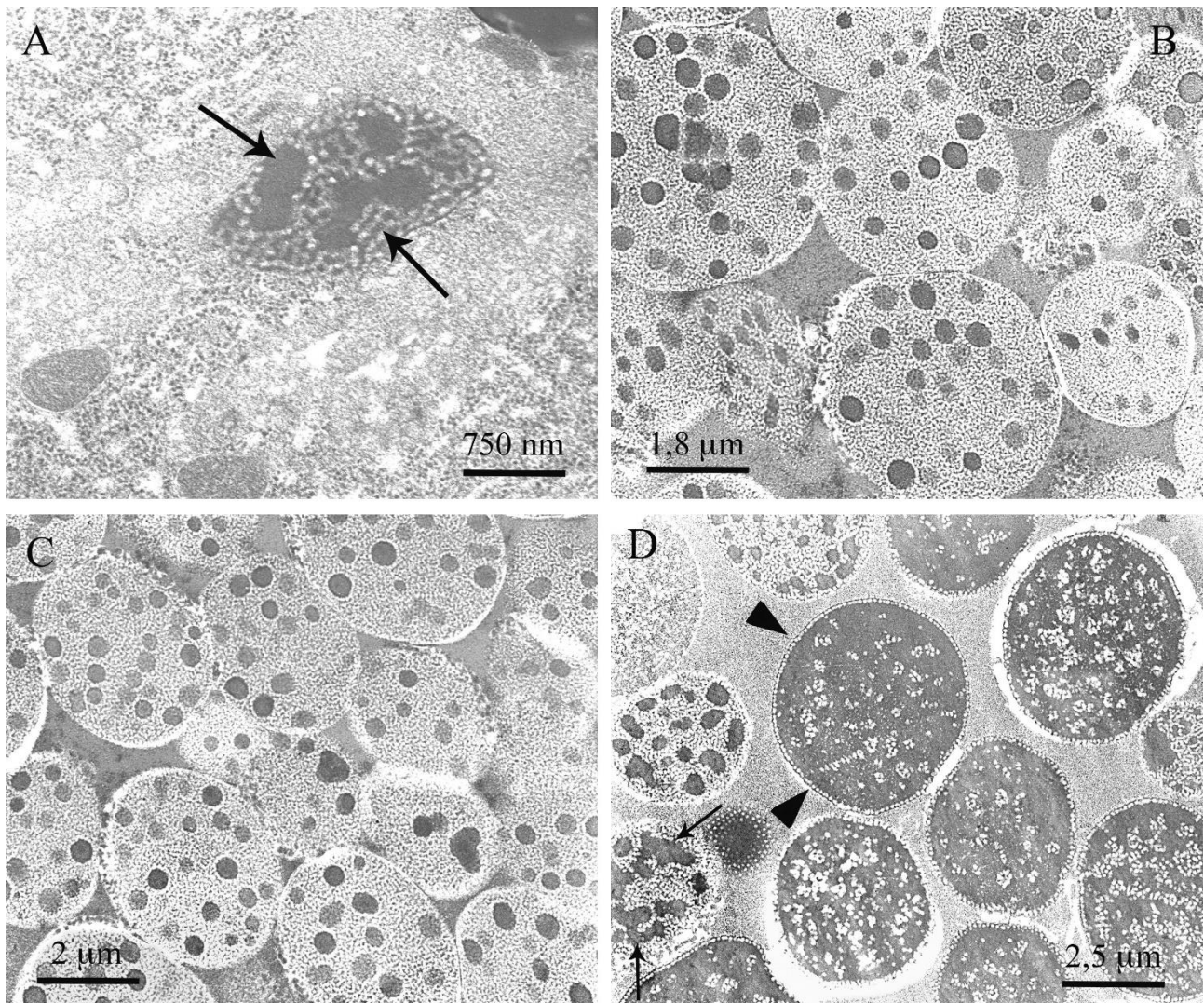


Fig. 4.8. Quadri ultrastrutturali delle fasi intermedie della maturazione dei granuli in ghiandole sierose dell'epidermide di adulti di *A. callidryas*. **A.** In questo granulo i depositi densi intercalati tra le substrutture modulari presentano dimensioni e forma generalmente costanti, anche se processi di fusione seriali (freccie grandi) possono talvolta modificarne sensibilmente l'aspetto. **B, C.** Le due immagini ad ingrandimenti decrescenti mostrano la progressiva adesione reciproca tra i granuli, corrispondenti a una fase intermedia di maturazione. **D.** I processi di fusione seriale portano alla comparsa di strutture dense con forma molto irregolare (freccie piccole), il cui incremento numerico e dimensionale conduce ad un progressivo mascheramento della struttura ripetitiva, che resta comunque evidente alla periferia dei granuli (punte di freccia).

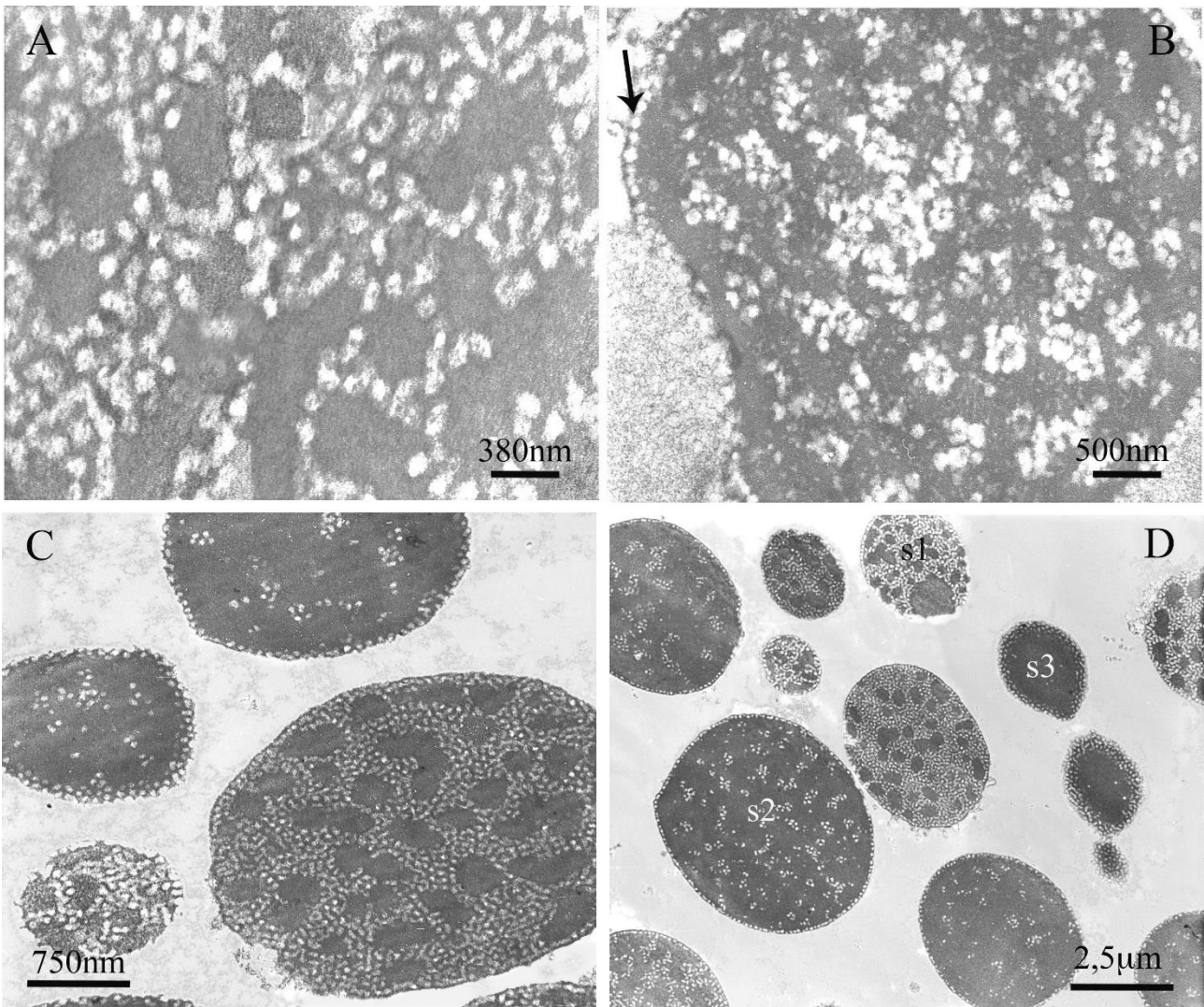


Fig. 4.9. Quadri ultrastrutturali delle fasi avanzate della maturazione dei granuli in ghiandole sierose dell'epidermide di adulti di *A. callidryas*. **A.** Dettagli della progressiva condensazione del materiale all'interno del granulo: la componente periodica è ridotta a gruppi che tendono ad isolarsi. **B.** Confronto tra un granulo immaturo con materiale disperso (in basso a sinistra) e un granulo avanzato, con una componente principale densa ed amorfa ed una minoritaria in cui si riconoscono moduli ripetitivi. La freccia indica le substrutture periodiche disposte alla periferia del granulo. **C.** Granuli in progressiva condensazione maturativa (s1, s2, s3). **D.** Granuli maturi nei quali la substruttura ripetitiva è mascherata parzialmente o totalmente.

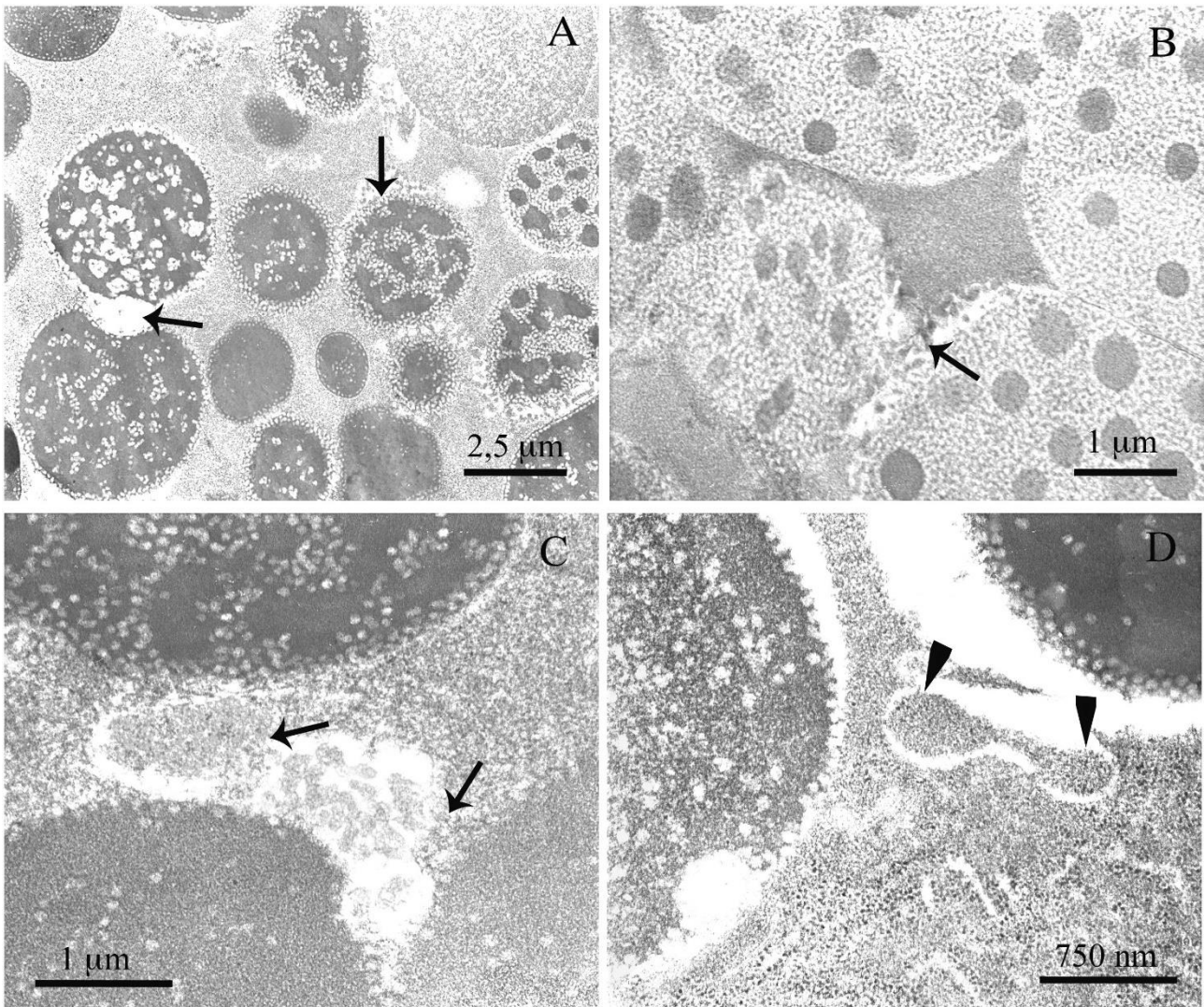
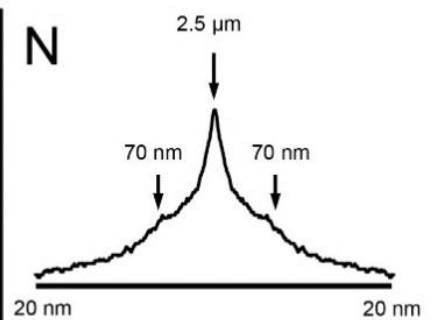
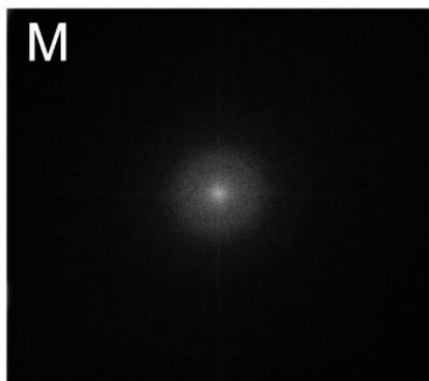
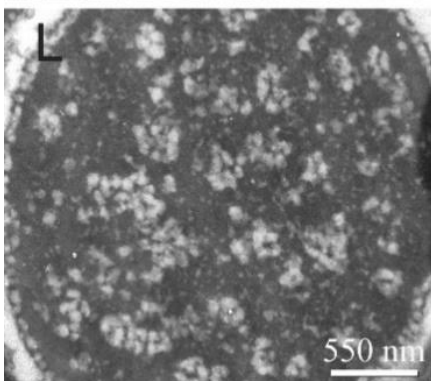
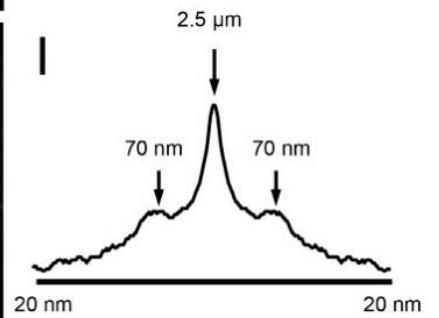
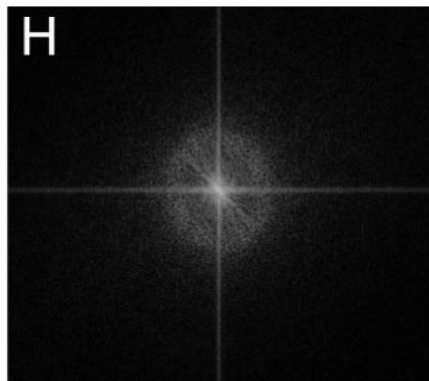
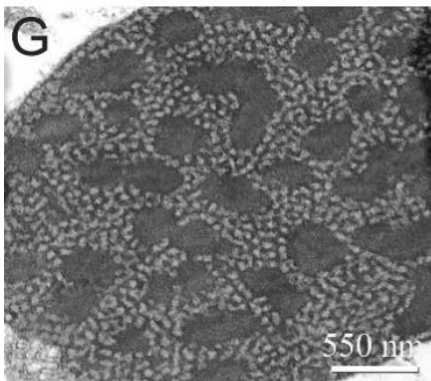
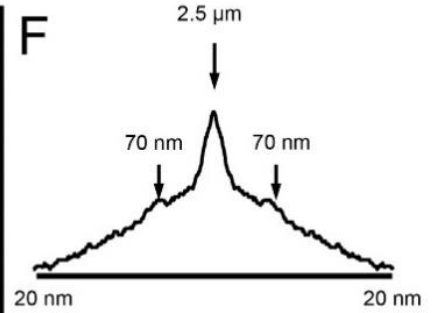
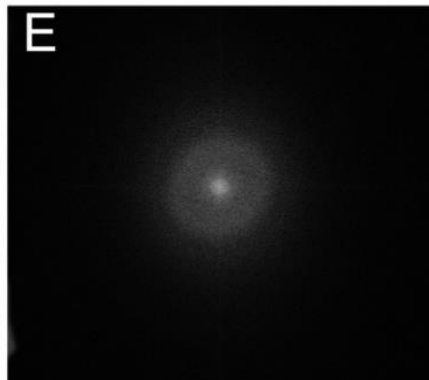
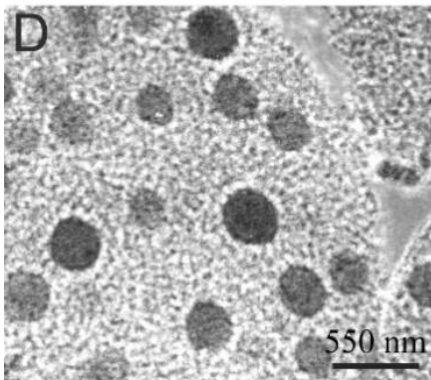
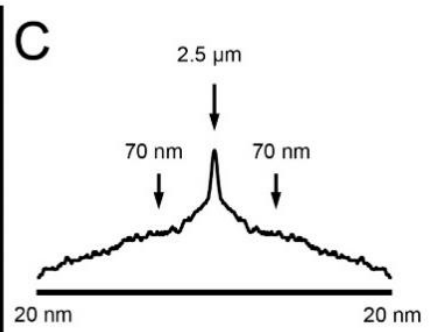
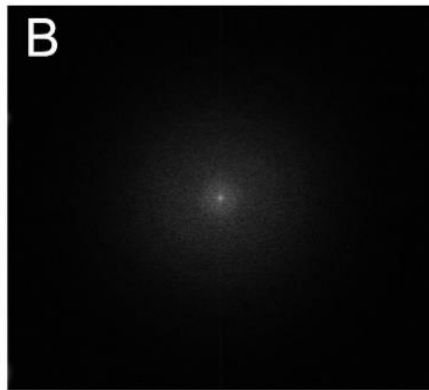
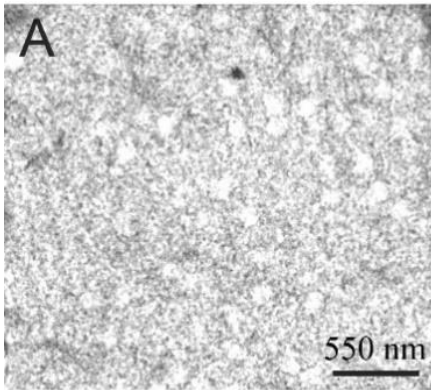


Fig. 4.10. Aspetti morfologici ultrastrutturali dei probabili meccanismi che promuovono la maturazione dei granuli nelle ghiandole sierose di adulti di *A. callidryas*. **A.** L'interfaccia secreto-sincizio è caratterizzata da evidenti spazi (freccie). **B.** Gli spazi perighiandolari ("aloni"), derivati dal distacco della membrana limitante il granulo, sono occupati da minute formazioni (freccia). **C.** Le formazioni sono caratterizzate da una densità pari a quella del fondo del sincizio e appaiono in continuità con il citoplasma sinciziale (freccie). **D.** L'alone perighiandolare si estroflette verso il sincizio, suddividendolo in parti (punte di freccia).



2.5 μm

Fig. 4.11. Analisi delle substrutture ripetitive dei granuli nelle ghiandole sierose di *A. callidryas* tramite trasformata veloce di Fourier (FFT). **Colonna a sinistra:** granuli di secreto a vario grado di maturazione. **Colonna al centro:** spettri di frequenza FFT ottenuti dai fotogrammi precedenti. **Colonna a destra:** grafici lineari ottenuti dai rispettivi spettri FFT. **A-C.** Secreto immaturo scarsamente strutturato, con rari moduli sferoidali; lo spettro FFT mostra una nube di punti dispersa intorno al centro e nessun picco di rilievo è visibile nel grafico lineare. **D-F.** Granuli di maturità intermedia, con secreto scarsamente elettrondenso, struttura ripetitiva riconoscibile e centri di condensazione; la componente spettrale è ancora poco evidente e il grafico lineare presenta picchi in corrispondenza del valore dimensionale di 70 nm. **G-I.** Stadio avanzato di maturazione, con incremento dei motivi strutturali ripetitivi e fusione delle componenti elettrondense; la componente spettrale è intensa e il grafico lineare conferma che le strutture hanno dimensioni intorno a 70 nm. **L-N.** Granuli prossimi allo stadio terminale di condensazione, con prodotto sieroso prevalentemente elettrondenso ma ancora contenente strutture ripetitive trasparenti agli elettroni; lo spettro FFT è simile a quello degli stadi iniziali di maturazione, ma la nube al centro indica la permanenza di motivi strutturali ripetuti le cui dimensioni si mantengono intorno a 70 nm.