



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Scienze MM.FF.NN.

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA

Curriculum Biologia Generale

Elaborato di Laurea

**Studio del Genere *Apodemus* spp mediante un nuovo approccio di
analisi tricológica: applicazioni su campioni museali**

Tutor:

Prof.ssa LAURA GUIDOLIN

Dipartimento di Biologia

Co-tutor:

Dott. NICOLA TORMEN

Laureando:

Matteo Seren

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

RIASSUNTO	pag. III
1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1. Ordine Rodentia	pag. 1
1.2. Genere <i>Apodemus</i>	pag. 1
1.3. Le specie oggetto di studio	pag. 2
1.4. Il pelo	pag. 5
2. OBIETTIVI	pag. 7
3. MATERIALI E METODI	pag. 9
3.1. Analisi tricologica	pag. 9
3.2. Elaborazione dati	pag. 14
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 17
5. CONCLUSIONE	pag. 21

BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO

L'Ordine Rodentia comprende al suo interno un gran numero di specie, comparse nel Paleocene in Asia centrale.

Tra le specie più numerose troviamo topi e ratti, distribuiti più o meno uniformemente su tutto il territorio europeo, e non solo, grazie alla loro ottima capacità di adattamento ad ogni tipo di ambiente naturale, dai più caldi, come il deserto, a quelli freddi delle regioni del nord, agli ambienti umidi delle foreste.

In questo studio sono stati presi in considerazione solo 2 specie di topi selvatici, appartenenti al Genere *Apodemus*, *Apodemus agrarius* Pallas, 1771, ed *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834, presenti anche sul territorio italiano: la specie *A. agrarius* è limitata solo alle regioni del nord-est, mentre la specie *A. flavicollis* è distribuita uniformemente su tutto il territorio, ad eccezione delle isole.

Lo studio dell'analisi tricologica vuole mettere in risalto le possibili differenze microscopiche tra queste 2 specie, attraverso le analisi statistiche parametrica e/o non parametrica, basate sulle misurazioni di aree e perimetri delle scaglie di cuticola e cellule di medulla, sia a livello dello *shield* che dello *shaft*, su peli di individui maschili e femminili di entrambe le specie.

Si è cercato, grazie a questo studio, di verificare se le differenze riscontrabili tra i peli possano essere utili per trovare differenze visibili tra le due specie. Si è posto, come ipotesi H_0 , che le differenze tra le popolazioni campionarie fossero dovute al caso. I p-value sono stati fissati ai valori $p < 0.05$ (statisticamente significativo), $p < 0.01$ (molto significativo) e $p < 0.001$ (altamente significativo). Per scelta vengono commentati principalmente i risultati con livello di significatività pari a $p < 0.001$. Sono risultate così differenze entro animale tra le due zone di *shield* e *shaft*, senza però rilevare differenze significative tra i due sessi; in ogni caso i risultati ottenuti hanno portato a un riscontro positivo ai fini della ricerca, con valori statistici altamente significativi, permettendomi di affermare che le due specie di *Apodemus* sono riconoscibili anche dall'analisi del pelo, almeno in relazione ai campioni tricologici analizzati ed ai soggetti di origine.

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Ordine Rodentia

l'Ordine Rodentia appartiene alla Classe Mammalia. È il gruppo più numeroso in termine di specie, ne comprende circa 2300 divise in 5 sottordini e 33 famiglie; si presume che la comparsa dell'ordine nel Paleocene sia da collocarsi in Asia centrale dove è vissuto l'antenato comune a tutte le specie di roditori (Capizzi & Santini, 2007).

Presenta una distribuzione cosmopolita, arrivando a colonizzare più o meno tutte le terre emerse, occupando così una gran varietà di nicchie ecologiche: deserto, foreste tropicali, zone umide, praterie, montagne ed ecosistemi sia agricoli che urbani (Capizzi & Santini, 2007).

Considerando la grande varietà di adattamenti, essi si distinguono in specie arboricole e terrestri con corpo robusto, zampe corte e coda lunga (esempio *Rattus* sp.), in specie adattate ad una vita sotterranea con corpo cilindrico, coda corta, padiglioni auricolari ridotti e occhi piccoli (esempio *Microtus subterraneus*) ed in specie adattate alla vita semiacquatica (esempio *Arvicola amphibius*, Linnaeus, 1758) (Spegnesi & De Marinis, 2002).

Il carattere che contraddistingue i Roditori, rispetto agli altri mammiferi, è la dentatura, provvista di un solo paio di incisivi, su entrambe le arcate, molto sviluppati ed a crescita continua, robusti e ricurvi a forma di scalpello; quelli superiori sono di dimensioni maggiori rispetto a quelli inferiori. Tale peculiarità deriva dal fatto che questi animali, rodendo costantemente alimenti e qualsiasi cosa capitino loro di avvicinare, usurano i denti, mantenendo allo stesso tempo una perfetta affilatura della linea dentaria, cosa essenziale per la sopravvivenza. Inoltre, essi possiedono una dentatura incompleta dovuta alla mancanza dei canini e dei premolari anteriori, creando così uno spazio subito dietro gli incisivi chiamato diastema dentario, seguito da premolari e molari spesso simili tra loro (Locatelli & Paolucci, 1998).

1.2 Genere *Apodemus*

Appartiene alla Famiglia *Muridae*, la quale annovera topi, topolini e ratti; comprende specie che vivono in zone temperate della regione Paleartica, come Europa, Africa nord-occidentale, Asia settentrionale e centrale e parte dell'Indonesia. Presenta forme esterne murine prive di particolari modificazioni; le orecchie sono prive delle valvole per chiudere il meato, la coda non ha capacità prensili (Toschi, 1965).

Comprende i topi selvatici e si divide in 2 sottogeneri, *Apodemus* e *Sylvaemus*, rappresentati in Italia rispettivamente da *A. agrarius*, *A. alpicola*, *A. flavicollis* e *A. sylvaticus*. I topi selvatici presentano una distribuzione molto ampia, soprattutto in zone boschive e prati; occasionalmente entrano nelle abitazioni per

cercare cibo e riparo durante l'inverno. Le tane sono scavate sotto le rocce, o tra le radici, ed a volte utilizzano nidi abbandonati dagli uccelli nelle cavità degli alberi (Locatelli & Paolucci, 1998).

Animali prevalentemente notturni, si muovono con andatura saltellante, grazie alle zampe posteriori particolarmente sviluppate; hanno un'alimentazione molto varia, che permette loro di adattarsi facilmente alla disponibilità di cibo presente nell'ambiente colonizzato. Si nutrono prevalentemente di semi e frutta e, grazie ai particolari incisivi, hanno la capacità di aprire nocchie e di strappare le brattee dalle pigne per arrivare ai semi; in caso di necessità si nutrono anche di insetti (Locatelli & Paolucci, 1998).

Una caratteristica interessante degli individui di questo genere è l'autotomia caudale, cioè la capacità di perdere la coda, o parte di essa, in caso di attacco posteriormente da parte di un predatore; è una capacità molto rara nei Mammiferi (Krapp *et al.*, 1981; Liem *et al.*, 2002).

1.3 Specie oggetto di studio



Regno: Animalia
Phylum: Chordata
Classe: Mammalia
Ordine: Rodentia
Famiglia: Muridae
Genere: *Apodemus*
Sottogenere: *Apodemus*
Specie: *Apodemus agrarius* Pallas, 1771

Figura 1.1 *Apodemus agrarius* (foto L. Klaser)

Il topo selvatico a dorso striato (Figura 1.1) presenta un mantello dalla colorazione marroncina, con un'evidente striscia nera che corre lungo tutto il dorso partendo dalla base del collo fino all'attaccatura della coda; il ventre è grigio chiaro o bianco, con orecchie più piccole rispetto a quelle degli altri topi selvatici e la lunghezza della coda è inferiore rispetto alla lunghezza testa-corpo (Capizzi & Santini, 2007).

A. agrarius è attivo principalmente di giorno, con predilezione delle ore crepuscolari, periodi durante i quali si nutre di nocchie, granaglie, bacche e vegetali in genere. È diffuso maggiormente nelle zone pianeggianti e collinari, vivendo nei biotopi umidi con elevata diversità ambientale; lo si trova anche nelle aree marginali di boschi e campi coltivati e nelle aree cespugliose come siepi e boschetti (Capizzi & Santini, 2007).

Crea tane all'interno di gallerie scavate nel terreno dagli individui stessi, anche se spesso riutilizzano quelle realizzate da altri micromammiferi. Presentano una ghiandola sebacea caudale molto sviluppata, anche rispetto agli altri topi, che produce una secrezione oleosa importante per la comunicazione con gli altri individui. Il periodo riproduttivo inizia con la primavera e termina verso la fine

dell'autunno. La fase di gestazione dura 23 giorni seguita dalla nascita di una prole da 3 a 8 piccoli; con un periodo riproduttivo così lungo e una gestazione corta le femmine di *A. agrarius* partoriscono generalmente 3 volte l'anno (Capizzi & Santini, 2007).

L'alimentazione è molto variegata, si nutre, infatti, di erbe, germogli, semi di piante erbacee ed arboree, nonché di cibo di origine animale come larve di artropodi, adulti di insetti, lombrichi e molluschi gasteropodi.

Stupisce il fatto che questa specie, pur avendo una dieta così diversificata, non abbia una distribuzione maggiore; si ritiene che tra i fattori limitanti vi siano le condizioni climatiche, la predazione dovuta ai rapaci e ai serpenti. Negli ecosistemi forestali è probabile che giochi un ruolo fondamentale la competizione per il cibo con altri roditori terricoli presenti nello stesso ambiente, ad esempio il topo selvatico a collo giallo e l'arvicola rossastra. Infatti, quando sono presenti queste 2 specie, per *A. agrarius* sono generalmente registrati una minore densità, una maggiore mortalità dei piccoli e un aumento dell'emigrazione degli individui sessualmente maturi (Capizzi & Santini, 2007).

È una specie diffusa su un vastissimo areale che si estende dall'Europa centrale, ad ovest, fino al Caucaso a sud ed alla Corea e Cina ad est; lo ritroviamo anche in alcune isole della Corea, Giappone e Taiwan. In Italia invece la diffusione è limitata alla pianura dell'Italia nord-orientale, quindi in Friuli-Venezia Giulia, Trentino, Veneto e alcune località della Lombardia (Capizzi & Santini, 2007; Mitchel-Jones *et al.*, 1999).



Regno: Animalia
Phylum: Chordata
Classe: Mammalia
Ordine: Rodentia
Famiglia: Muridae
Genere: *Apodemus*
Sottogenere: *Sylvaemus*
Specie: *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834

Figura 1.2 *A. flavicollis* (foto H. Bobdal)

Chiamato anche topo selvatico dal collo giallo presenta un mantello marroncino-brunastro sul dorso che scema ad un rossiccio sui fianchi fino al bianco sul ventre (Fig. 1.2). Occhi grandi e sporgenti ed orecchie molto sviluppate. Presenta sempre una macchia golare dello stesso colore dei fianchi che raramente diviene un collare completo nelle popolazioni meridionali. Di dimensioni leggermente maggiori, rispetto al topo selvatico, e con una coda spesso più lunga della lunghezza testa-corpo; anche la colorazione presenta delle distinzioni nette tra i colori, a differenza del topo selvatico dove sono più sfumate. Queste differenze sono visibili quasi esclusivamente negli individui adulti (Capizzi & Santini, 2007).

Vive in habitat ben caratterizzati, la specie è legata, infatti, alle aree forestali, siano esse boschi di conifere o di latifoglie; si trova dai boschi della pianura fino a

quelli montani, prediligendo i boschi d'alto fusto, ma lo si trova anche in quelli cedui invecchiati, dove è presente facilmente in simpatia col topo selvatico, al quale lascia le zone più scoperte o soggette a tagli frequenti (Capizzi & Santini, 2007).

Si muove esclusivamente di notte con un picco di attività nel cuore della fase di oscurità. Scava gallerie profonde mediamente 50 cm, ma possono raggiungere anche 1,5 m. I nidi sono costituiti prevalentemente di foglie, all'interno dei quali accumulano semi e piccoli invertebrati artropodi. Probabilmente più individui utilizzano la stessa tana con lo scopo di contenere la dispersione del calore corporeo (Capizzi & Santini, 2007).

Il periodo riproduttivo per le popolazioni dell'Europa centro-settentrionale avviene tra febbraio/marzo ed ottobre, raramente in inverno, sempre preceduto da annate di abbondante produzione di semi da parte delle piante forestali. Per quanto riguarda le aree mediterranee, la riproduzione nel periodo invernale avviene con maggior frequenza; la prole per ogni parto è compresa tra un minimo di 2 a un massimo di 11 piccoli, mediamente ne nascono da 5 a 7 a seconda della località (Capizzi & Santini, 2007).

La dieta è principalmente granivora basata su ghiande, faggioline, nocciole, castagne e altri tipi di semi, ma durante il periodo primaverile-estivo il cibo privilegiato sono i piccoli invertebrati, soprattutto stadi giovanili e adulti di insetti, a volte gasteropodi, funghi, frutti e bacche (Capizzi & Santini, 2007).

La densità di questa popolazione è sì fortemente influenzata dalla presenza di cibo, ma, soprattutto, dalla quantità di semi prodotti in autunno dalla piante arboree forestali, come querce e faggi; questo perché un'abbondante produzione di semi in autunno, oltre a migliorare la sopravvivenza degli individui nella stagione fredda, riesce a condizionare in modo positivo l'andamento della riproduzione, sia incrementando il numero dei riproduttori in primavera sia permettendo ad alcuni individui di riprodursi nella stagione invernale.

La predazione influenza maggiormente la popolazione, quando quest'ultima è particolarmente abbondante. I principali predatori sono: carnivori (esempio donnola, ermellino, faina e martora), strigiformi (esempio allocco) e serpenti (esempio cervone, colubro d'Esculapio e biacco, vipera comune, marasso nelle Alpi) (Capizzi & Santini, 2007).

Specie molto diffusa sul territorio eurasiatico, dalla Spagna settentrionale fino al sud della Svezia e Finlandia; verso est raggiunge gli Urali, l'Armenia e la Turchia, mentre a sud fino alla Siria, Libano ed Israele. È una specie che vive anche in Inghilterra e Galles e in alcune isole mediterranee dall'Adriatico all'Egeo. In Italia risulta essere presente su tutto il territorio, con numeri più bassi nella pianura Padana, nelle aree costiere e in quelle zone dove la pressione antropica ha ridotto la presenza di habitat ideali; totale assenza della specie in Sardegna e Sicilia (Capizzi & Santini, 2007, Mitchel-Jones *et al.*, 1999).

1.4 Il pelo

I peli sono derivati cornei caratteristici della classe Mammalia, strutture omologhe alle squame dei rettili e alle penne degli uccelli. La presenza del pelo permette l'isolamento e protezione dell'animale dall'ambiente esterno ed, insieme al metabolismo elevato, ha consentito, inoltre, lo sviluppo nei Mammiferi dell'endotermia, cioè della regolazione del calore rilasciato dalle reazioni metaboliche esotermiche affinché la temperatura corporea rimanga costante.

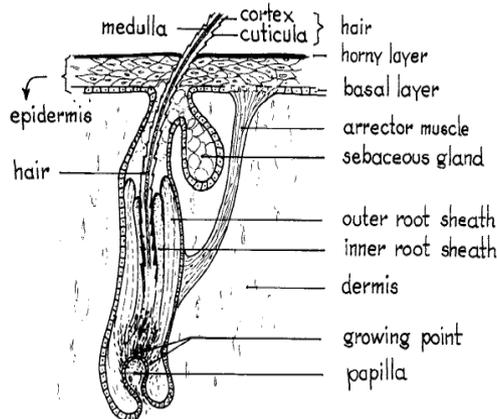


Figura 1.3 Sezione anatomica del derma superiore con evidenziata la porzione pilifera

Un pelo (Fig. 1.3) ha origine da una gemma di tessuto epiteliale che sprofonda nel derma e si allarga a formare un bulbo pilifero, il quale accoglie nella sua porzione basale una papilla dermica. Una porzione epidermica sovrastante il bulbo si separa dall'epitelio circostante seguendo la forma di un cono, il quale comprende due distinte regioni, il cono del pelo, interna, e l'astuccio esterno chiamato follicolo pilifero. Il cono del pelo si accresce a discapito delle sottostanti cellule epiteliali del bulbo, le quali seguono

lo stesso destino di quelle presenti nel foglietto epidermico, riempiendosi però di un maggior contenuto di cheratina e di pigmenti che conferiscono rispettivamente resistenza e colorazione, lucentezza al pelo stesso. La rottura dello strato epidermico dovuta alla pressione esercitata dal fusto del pelo consente la fuoriuscita del pelo stesso, derivato dall'allungamento del cono (Teerink, 1991).

Dalla parete superiore del follicolo ha origine poi un incavo che si svilupperà nella ghiandola esocrina alveolare ramificata specializzata, la ghiandola sebacea, la cui funzione è secernere del liquido oleoso, il sebo, il quale serve a detergere, lubrificare ed impermeabilizzare il pelo stesso (Liem *et al.*, 2002). Nella parete inferiore del follicolo si inserisce un fascio di fibre muscolari lisce che costituiranno il muscolo erettore del pelo. In molte specie è poi possibile osservare gruppi di follicoli raggruppati insieme, i quali traggono origine da protuberanze di un follicolo primario, sviluppandosi in follicoli secondari, i cui fusti del pelo emergeranno dalla stessa apertura utilizzata dal fusto del pelo del follicolo primario (Teerink, 1991).

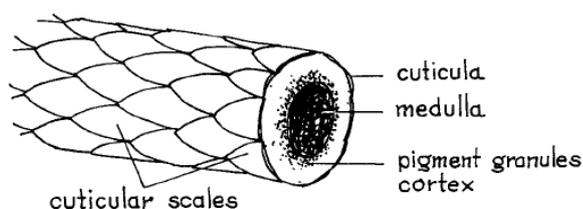


Figura 1.4 Sezione trasversale di fusto pilifero

Ad una visione microscopica a basso ingrandimento, un pelo è composto da tre strati identificabili dall'esterno all'interno in cuticola, corteccia e medulla (Fig. 1.4), tutti e tre specie-specifici, la cui struttura della parte esposta non cambia

in quanto le cellule che li compongono sono morte. La cuticola, strato a contatto con l'ambiente esterno, è formata da un gran numero di scaglie di cheratina sovrapposte. La corteccia, strato intermedio tra cuticola e medulla, è costituita da cellule cheratinizzate e raggrinzite, le quali però, rivestono poca importanza nell'analisi tricologia con approccio morfo metrico. È, infine, da osservare la presenza nella corteccia di granuli di pigmenti, i quali conferiscono la colorazione del pelo. La medulla è costituita da cellule morte, raggrinzite, che la caratterizzano per la presenza di ampi spazi riempiti d'aria, con funzione principalmente isolante dal punto di vista termico.

La pelliccia di un animale è composta da svariate tipologie di pelo, quali ad esempio pelo di copertura, sottopelo (predominante nella pelliccia, ma di scarso valore per l'identificazione perché è il tipo di pelo più comune nel pelame), vibrisse e aculei, distinti sulla base della loro forma, durezza e colorazione.

Solamente il pelo di copertura ha una certa rilevanza a livello tassonomico. Il pelo di copertura o di difesa è il pelo lungo e rigido che presenta ispessimento nella sua parte distale, lo *shield*, ed un restringimento in quella prossimale alla radice, lo

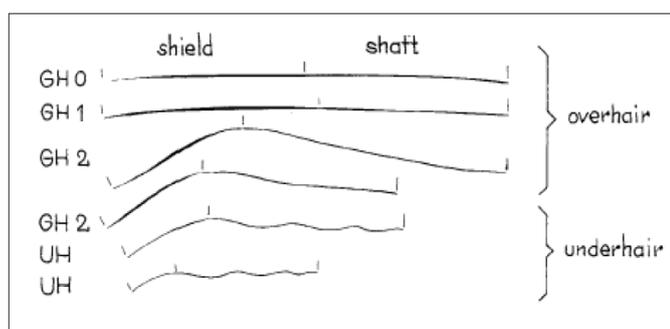


Figura 1.5 Tipologie di pelo classificate (da Teerink)

shaft (Teerink, 1991).

Questa tipologia di pelo annovera tre sue componenti, i peli GH 0, GH 1 e GH 2 (Fig. 1.5).

Il raro GH 0, caratteristico nei roditori, è un pelo lungo, solido, dalla punta aguzza, con *shield* più sottile rispetto alle forme GH 1 e GH 2.

Il pelo GH 1 è dritto, duro e più frequente rispetto al pelo GH 0.

La forma GH 2 ancora più numerosa di GH 1 ed è riconoscibile dalle altre due perché *shield* e *shaft* formano un angolo. Lo *shaft* si presenta generalmente dritto anche se in alcune specie può assumere un aspetto ondulato (Teerink, 1991).

Capitolo Secondo

OBIETTIVI

Nell'ambito della ricerca faunistica, l'analisi tricologica si pone quale metodo di indagine non cruento ed estremamente efficace. Con questo lavoro intendo approfondire l'uso di tale metodica d'indagine, tramite un approccio multidisciplinare.

Con lo scopo di evidenziare differenze microscopiche tra 2 specie di micro mammiferi, appartenenti allo stesso Genere, *Apodemus agrarius* e *Apodemus flavicollis*, analisi microscopiche saranno affiancate allo studio dell'analisi dei dati raccolti mediante statistica parametrica e/o non parametrica, fornendo così le basi per la creazione di una relazione tecnica.

In particolare, il mio lavoro si inserisce in uno studio più ampio, che sarà così completato mediante l'analisi delle immagini digitali di medulla e cuticola ottenute al microscopio ottico a luce trasmessa, editate ed analizzate attraverso l'utilizzo del Software Open source ImageJ 1.45d ed annessa analisi dei dati mediante il Software di statistica R 2.13.

Capitolo Terzo

MATERIALI E METODI

3.1. Analisi tricologica

Questo tipo di analisi consente, generalmente, di risalire alla specie di mammifero a cui appartiene il pelo osservato, grazie alla specie-specificità di questo derivato epidermico.

Per la preparazione dei vetrini vengono presi in considerazione solamente peli a crescita completa, ovvero GH1 e GH2 del dorso dell'animale, in quanto presentano le peculiarità più caratteristiche delle componenti che costituiscono medulla e cuticola.

I peli GH1 e GH2 in posizione centrale e laterale genericamente contengono caratteristiche simili tra loro e, quindi, di difficile classificazione; anche il pelo UH non viene preso in considerazione, in quanto è il tipo di pelo più comune nel pelame e quindi di scarso valore per l'identificazione.

Le caratteristiche di GH1 e GH2 più importanti per la classificazione sono:

- immagine della cuticola nello *shaft* e nella parte prossimale dello *shield*
- medulla fotografata nella parte più spessa dello *shield*
- margini della medulla nella parte più spessa dello *shield*.

Seguendo la procedura classica di preparazione del vetrino, prima di tutto è necessario che i peli vengano puliti e liberati dal grasso. Per questo vengono lavati in acqua tiepida miscelata con detergente neutro e successivamente risciacquati in acqua.

Per identificare la specie è necessaria la preparazione di preparati che mettano in evidenza:

- le caratteristiche della cuticola che si ottengono con il calco del pelo
- le caratteristiche della medulla che si ottengono attraverso l'osservazione del pelo integro.

Il lavoro di tesi è stato prodotto interamente su campioni museali di pelo, provenienti dalla collezione del Museo della Facoltà di Scienze Naturali dell'Università Pedagogica di Penza (Russia), per la maggior parte preparati in precedenza, di cui sono state acquisite le immagini delle porzioni utili con l'ausilio di un software di acquisizione (Leica IM500 Image Manager), in applicazione ad un microscopio Leica DRM a 200 e 400 ingrandimenti.

Preparazione cuticola

Le caratteristiche della cuticola non possono essere osservate in modo appropriato senza l'utilizzo di tecniche particolari di preparazione. Secondo la metodologia classica (Teerink, 1991) l'allestimento del preparato cuticolare può avvenire attraverso l'utilizzo di gelatine, polivinile o, semplicemente, attraverso l'uso dello smalto per unghie. Nei preparati osservati è stato utilizzato il metodo di allestimento più veloce, il quale consiste nell'utilizzo di un prodotto di uso comune, ovvero lo smalto per unghie trasparente, molto rapido nell'asciugarsi.

L'allestimento del vetrino è avvenuto secondo la seguente procedura: una striscia di smalto è stata stesa sul vetrino, si sono attesi alcuni secondi affinché raggiungesse l'adeguata consistenza, e si è adagiato su di essa con una pinzetta il pelo.

Successivamente il pelo è stato rimosso ed il risultato finale è

l'ottenimento del calco del pelo, che è stato analizzato al microscopio per la visualizzazione delle caratteristiche della cuticola.

La cuticola è formata da un gran numero di scaglie di cheratina sovrapposte (Fig. 3.1), la parte distale di ciascuna scaglia giace sopra la parte prossimale di quella vicina e, come risultato, ciascun pelo ha meno resistenza dalla base alla punta. La forma e la dimensione delle scaglie varia a seconda della posizione del pelo.

La disposizione di queste scaglie, rispetto all'asse longitudinale del pelo, può essere:

- **trasversa**: se queste formano angoli retti con l'asse e predomina la loro larghezza rispetto alla lunghezza;
- **longitudinale**: se le scaglie sono parallele all'asse, e la loro lunghezza è maggiore della larghezza;
- **intermedia**: se la lunghezza e larghezza delle scaglie sono simili.

Inoltre, i margini delle scaglie possono essere piani, ovvero senza rientranze, leggermente ondulati oppure increspatisi. In questo studio non vengono prese in considerazione le forme dei margini cuticolari.

Si riconoscono cinque diverse forme cunicolari:

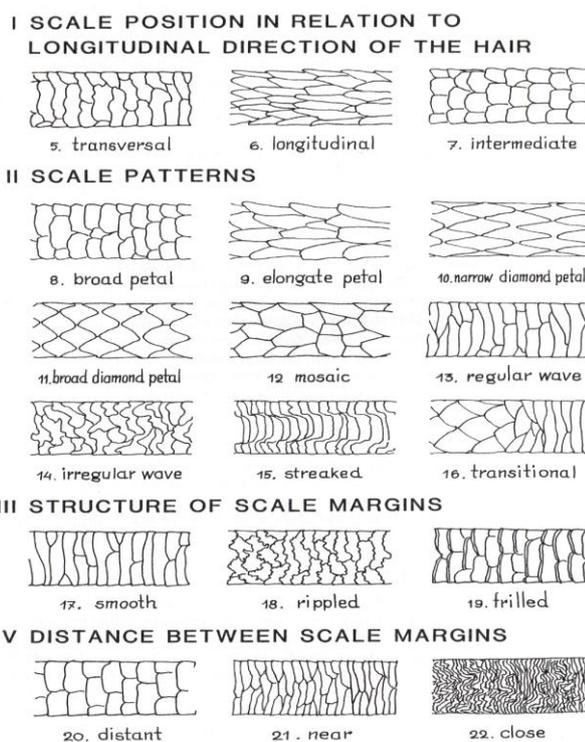


Figura 3.1 Schema delle forme cuticolari (secondo Teerink)

- modello petaloide: aspetto simile a quello assunto dai petali di un fiore (presente in due varianti, larga, quindi con scaglie ampie, o allungata, cioè una forma intermedia tra quella larga e il modello a diamante petaloide);
- modello a diamante petaloide: quando le scaglie che lo compongono si sovrappongono in modo tale da assumere l'aspetto regolare che ricorda le sfaccettature dei diamanti (modello stretto con scaglie lunghe e strette, e modello largo con scaglie piuttosto corte);
- modello a mosaico: dove scaglie adiacenti hanno margini quasi dritti;
- modello ondulato: scaglie posizionate trasversalmente (ondulato regolare con onde leggere, irregolare con onde più profonde, oppure striato solo in peli con un solco nello shield);
- modello transizionale: si presenta tra due forme cunicolari nelle regioni di confine prossimale e distale (Teerink, 1991).

Preparazione medulla

La medulla è costituita da cellule morte, raggrinzite, che la caratterizzano per la presenza di ampi spazi intercellulari riempiti d'aria. La medulla (Fig. 3.2) può essere unicellulare, se costituita da un solo strato di cellule, o pluricellulare, se costituita da due o più strati. Secondo la metodologia classica (Teerink, 1991) ai fini dell'identificazione, la medulla è stata analizzata prima e dopo la penetrazione di olio di paraffina, che rimpiazza completamente o parzialmente l'aria nelle cavità intercellulari. La medulla che appare scura al microscopio diventa trasparente dopo la penetrazione dell'olio,

cosa che migliora l'analisi della struttura e la posizione delle cellule che si erano raggrinzite. La procedura per la preparazione prevede, dopo l'utilizzo dell'olio di paraffina, il suo posizionamento su un vetrino con lo *shield* rivolto verso il lato sinistro del vetrino, e la sua copertura con un vetrino copri oggetto il quale viene fissato, ai suoi angoli al vetrino con gocce di colla.

Le cellule che costituiscono la medulla possono acquisire le seguenti forme (Fig. 3.2):

- modello a scala: solitamente limitata allo *shaft*; è caratterizzata dalla presenza di spazi intercellulari che assumono una forma che ricorda le

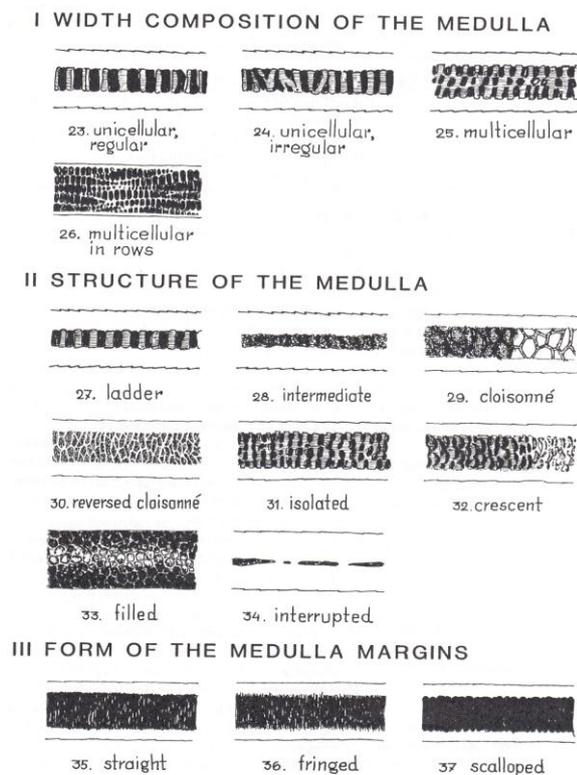


Figura 3.2 Sezione trasversale di fusto pilifero

lettere X, Y, V, M, N anche in posizione rovesciata, conferendo così alla medulla una forma a scala;

- intermedio: simile alla forma a scala, anche se poco distinta e limitata nella regione di *shaft*;
- cloisonné: costituita da cellule i cui sottili prolungamenti si intrecciano a rete;
- cloisonné rovesciato: composta da più strati di cellule voluminose e da spazi intercellulari che si incontrano formando una rete, le cellule sono granulari; questo modello è multicellulare ma le cellule non giacciono in filari;
- isolato: con cellule chiaramente distinguibili per la presenza di ampi spazi intercellulari che le separano, le cellule vanno da una forma arrotondata fino ad una allungata;
- crescente: le cellule lunghe ed incurvate si assottigliano verso le parti terminali, molte di queste toccano e si sovrappongono alle altre;
- piena: forma multicellulare dove le cellule sembrano ricoprire l'intera larghezza del pelo, rendendo la corteccia sottile e difficile da distinguere;
- interrotta: così chiamata per l'assenza di cellule in alcune regioni midollari.

Un'altra caratteristica medullare importante all'identificazione è rappresentata dalla forma dei margini:

- dritti: formano una linea piana e dritta;
- sfrangiati: si estendono all'interno della corteccia piccole sporgenze;
- arrotondati: una serie di porzioni convesse, arrotondate formano i margini della medulla. (Teerink, 1991)

Elaborazione dei dati

L'analisi tricologica che ho svolto completa uno studio precedentemente iniziato;

sesso	animale n°	razza	
		<i>A. agrarius</i>	<i>A. flavicollis</i>
maschio	1	25b	51a
		25l	51h
	2	35c	55a
		35i	55m
	3	39i	57f
		39c	57n
femmina	1	21a	45d
		21g	45i
	2	27c	43l
		27g	43e
	3	33f	47b
		33l	47m

Tabella 1 Specifiche dei campioni analizzati

il mio lavoro è stato quello di analizzare cuticola e medulla di due Specie di topo selvatico del Genere *Apodemus* per valutare l'esistenza di evidenti differenze microscopiche, ai fini del riconoscimento, basandomi sul fatto che il pelo di ogni mammifero ha una sua specie-specificità.

Come si può vedere in Tabella 1 ho utilizzato peli, scelti casualmente, di 6 maschi e 6 femmine, (3

per specie) dove per ognuno avevo a disposizione foto di cuticola e medulla, dalle quali raccoglievo dati dallo *shield* e dallo *shaft*.

Usando il programma ImageJ 1.45d (Abramoff, *et al.*, 2004; Rasband, 1997-2001), su ogni foto ho suddiviso la porzione di pelo in 5 rettangoli di lavoro consecutivi (aree campionarie), di larghezza 50 μm , all'interno dei quali ho potuto misurare area e perimetro di ogni scaglia di cuticola e ogni cellula della medulla (Figura 3.3). In totale, il conteggio del numero di aree campionate (blocchi di 5 aree campionarie) è stato di 240, con le seguenti specifiche:

- 2 razze x 2 sessi x 3 soggetti per sesso x 2 tipologia di forme (Cuticola e Medulla) x 2 aree (Shaft e Shield) x 5 blocchi consecutivi per zona (ciascuno di lunghezza 50 μm) = 240 serie di dati

Alla fine delle misurazioni sono riuscito a raccogliere 3266 perimetri, e di conseguenza le corrispettive aree, con una media di 13.6 misurazioni per rettangolo/blocco; tutti i dati sono stati poi riportati in un foglio Excel[®] elaborati editati per l'analisi mediante R 2.13.

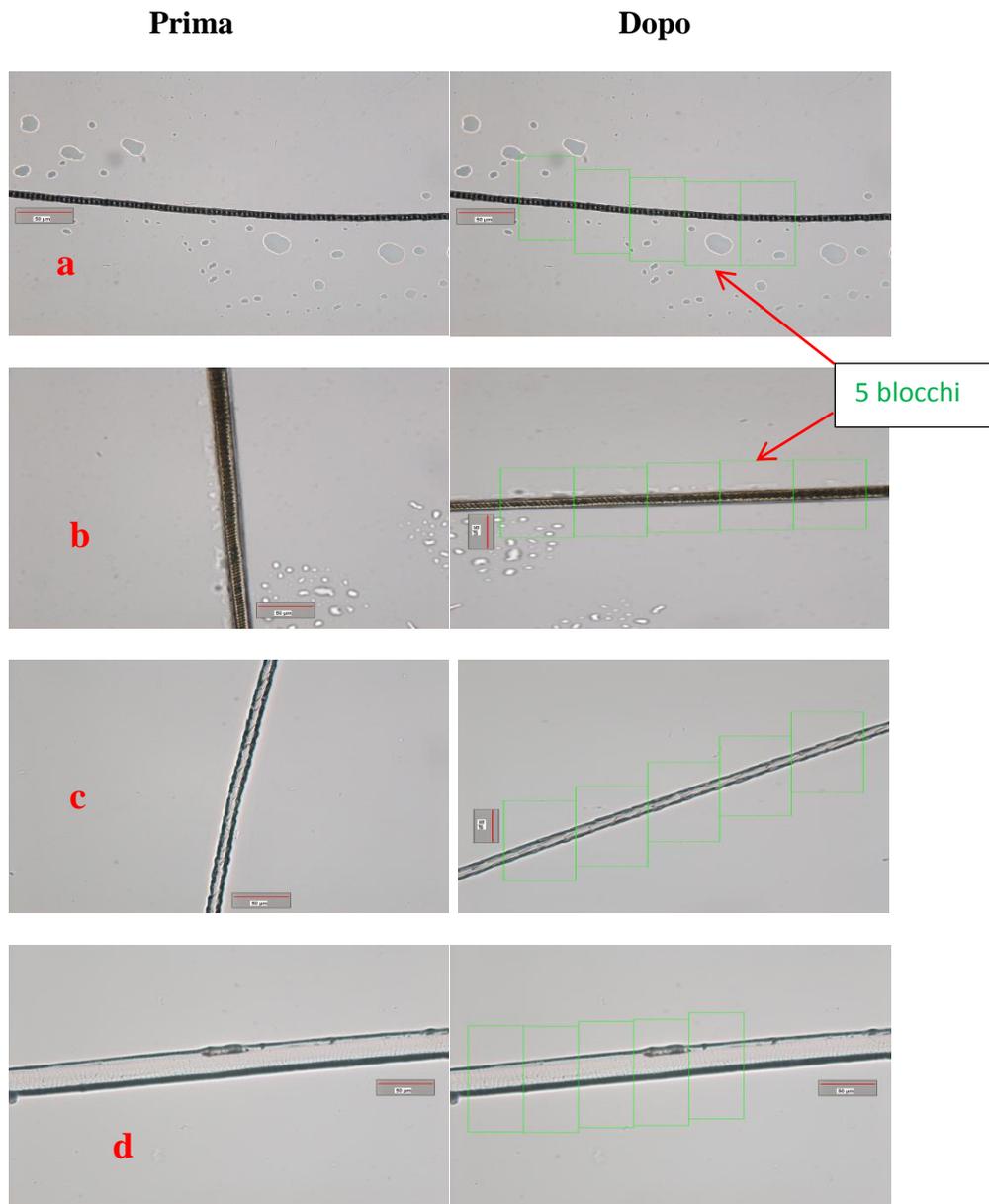


Figura 3.3 Medulla e cuticola: a) medulla *shaft* (maschio), b) medulla *shield* (femmina) di *A. agrarius*, rispettivamente; c) cuticola *shaft* (maschio), d) cuticola *shield* (femmina) di *A. flavicollis*, rispettivamente

3.2 Elaborazione dei dati

Il mio lavoro è mirato a cercare di verificare se vi sono delle effettive differenze tra le due specie oggetto d'indagine, basandosi semplicemente sull'analisi tricologica dei campioni di pelo già presenti in laboratorio.

Sono stati utilizzati 12 peli totali, uno per ogni soggetto analizzato, di cui 3 maschi e 3 femmine *agrarius*, 3 maschi e 3 femmine *flavicollis*. L'analisi si è basata sulle misurazioni di area e perimetro delle scaglie cuticolari e delle cellule medullari, di ogni pelo, presenti in aree campione contigue (blocchi) sia appartenenti allo *shield* che allo *shaft*.

Tutti i dati sono stati poi raccolti in un foglio Excel ed elaborati mediante un programma di statistica Open source, R 2.13.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Si è proceduto a verificare la normalità della distribuzione campionaria dei dati mediante il test di normalità di Shapiro-Wilk; siccome la campana dei dati risultava troppo spostata da un lato presentando una coda molto più lunga dell'altra, si è provato a normalizzare la distribuzione per poter procedere con l'analisi della varianza parametrica, ma non avendo ottenuto risultati giudicati soddisfacenti per ogni variabile considerata, si è optato per l'uso della statistica non parametrica, la quale non richiede presupposti di normalità. In questo caso, data la gran quantità di dati raccolti, circa 3200 misurazioni, la scelta della statistica non parametrica mi ha condotto, presumibilmente, agli stessi risultati ottenibili da quella parametrica. Quindi sono state determinate le relazioni intercorrenti tra i dati mediante l'esecuzione del test di Kruskal-Wallis ed il *post hoc* Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn (pacchetto coin e multcomp, in R), dove si riteneva necessario.

Ho posto come ipotesi H_0 che le differenze tra le popolazioni campionarie di dati siano dovute al caso; i livelli di significatività sono stati fissati a $p < 0.05$ (statisticamente significativo), $p < 0.01$ (molto significativo) e $p < 0.001$ (altamente significativo).

Capitolo Quarto

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sappiamo già che attraverso l'uso dell'analisi strutturale del pelo è possibile risalire a determinare la specie a cui appartiene, dato l'alto grado di specie-specificità del derivato epidermico, come già dimostrato da Teerink (1991). Tuttavia l'analisi si basa esclusivamente sulla capacità dell'operatore di riconoscere precisamente il perimetro delle varie cellule, cosa non sempre così facile, visto che a volte i preparati sono di difficile interpretazione e questo può portare l'operatore all'errore; errore che può essere ridotto dal gran numero di misurazioni eseguite. In tabella 2 sono riportati i risultati delle analisi svolte: si è partiti misurando ogni possibile combinazione di dati iniziando a confrontare serie di dati riguardanti determinate zone del pelo (es. *shaft* medullare di tutte le femmine; oppure shield e shaft cuticolari dello stesso preparato, eseguendo sia confronti intraspecifici che interspecifici) sino ad arrivare al confronto finale, che risponde all'obiettivo di questo lavoro, tra le due specie in analisi; una sorta di piramide rovesciata dove si parte da un'analisi del dettaglio microscopico per arrivare all'analisi generale usando tutti i dati a disposizione riferendoli alla variabile specie, ovvero dimostrare se la differenza tra i peli può essere usata per trovare delle differenze tra le due specie. Per brevità i risultati dei test post hoc vengono riportati in un file PDF allegato alla presente tesi.

Tabella 2 Risultati dei test di Kruskal-Wallis sulle variabili indagate

Variabile	Dataset	By	TUTTE E 2 LE SPECIE				A. AGRARIUS				A. FLAVICOLLIS			
			AREA	PERIMETRO	AP_RAP	AP_LOG2	AREA	PERIMETRO	AP_RAP	AP_LOG2	AREA	PERIMETRO	AP_RAP	AP_LOG2
Specie	full	Specie	***	***	**	**	---	---	---	---	---	---	---	---
Animale	full	Animale	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Sesso	full	Sesso	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Pelo	full	Pelo	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Tipo	full	Tipo	***	***	**	**	***	***	n.s.	n.s.	***	***	n.s.	n.s.
	full	TipoSpecie	***	***	**	**	---	---	---	---	---	---	---	---
	Subset by Male	MaleSpecie	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Subset by Female	FemaleSpecie	***	***	***	***	***	***	n.s.	n.s.	***	***	n.s.	n.s.
	Subset by S1	Tipo	---	---	---	---	***	***	n.s.	n.s.	---	---	---	---
	Subset by S2	Tipo	---	---	---	---	***	***	***	***	---	---	---	---
	Subset by S3	Tipo	---	---	---	---	***	***	***	***	---	---	---	---
	Subset by S4	Tipo	---	---	---	---	***	***	***	***	---	---	---	---
	Subset by S5	Tipo	---	---	---	---	***	***	***	***	---	---	---	---
	Subset by S6	Tipo	---	---	---	---	***	***	***	***	---	---	---	---
	Subset by S7	Tipo	---	---	---	---	---	---	---	---	n.s.	**	***	***
	Subset by S8	Tipo	---	---	---	---	---	---	---	---	n.s.	n.s.	***	***
	Subset by S9	Tipo	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***	n.s.	n.s.
	Subset by S10	Tipo	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***	n.s.	n.s.
Subset by S11	Tipo	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***	***	***	
Subset by S12	Tipo	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***	***	***	
Zona	full	Zona	***	***	n.s.	n.s.	***	***	**	**	**	***	***	***
	full	ZonaSpecie	***	***	***	***	---	---	---	---	---	---	---	---
	Subset by Male	MaleSpecie	***	***	**	**	***	***	**	**	n.s.	n.s.	***	***

Legenda tabella:

- AP_rap: rapporto area-perimetro
- AP_log2: logaritmo base 2 di Ap
- Full: considera tutti i dati
- Tipo: cuticola/medulla
- Zona: shield/shaft
- S: soggetto n°
- Pelo: indicato da numeri e lettere (es: 25b)
- *: statisticamente significativo
- **: molto significativo
- ***: altamente significativo
- n.s: non significativo
- : dati insufficienti

Si è partiti dalla valutazione della variabile Tipo/Zona/Pelo riferita ad ogni singolo soggetto. Come si può notare dalla tabella, si è rilevato che c'è alta significatività, ovvero ci sono delle evidenti differenze tra shield e shaft a livello di cuticola e medulla nello stesso soggetto; nella colonna "2 specie" non è possibile avere risultati perché è presente solo un dato per riga. Con la variabile TipoZona ritroviamo gli stessi risultati precedenti relativi al singolo soggetto, ma se prendiamo in considerazione i subset femmine/maschi notiamo subito che anche qui è presente un alto grado di significatività soprattutto tra le due specie, quindi sia i maschi che le femmine di *agrarius* presentano evidenti differenze dagli individui *flavicollis* per quanto riguarda le

combinazioni cuticola/medulla shield/shaft.

Per quanto riguarda il confronto dei dati in base al singolo blocco, sono stati riscontrati risultati soddisfacenti, in quanto proprio la non significatività dei test indica che non è possibile un riscontro di significatività in base alla specie esaminando solo una porzione molto piccola di pelo, e che le porzioni adiacenti dello stesso pelo non sono statisticamente differenti, come ci si poteva aspettare.

Analizzando i dati di ogni soggetto in riferimento alla variabile zona, cioè cuticola o medulla, si è potuta constatare un'alternanza di risultati non significativi, poco significativi e significativi sia nella specie *A. agrarius* che *A. flavicollis*, fino ad altamente significativi se si prende in considerazione il sottoinsieme femmine/maschi in relazione a FemmineSpecie e MaschiSpecie, quindi c'è differenza tra le femmine delle due specie e i maschi delle stesse.

Risultati simili si presentano anche a livello della variabile "Tipo"; quello che invece preme sapere, ai fini della ricerca svolta, sono i risultati elencati nelle prime quattro righe della tabella 2: Specie, Animale, Sesso, Pelo che rappresentano il sunto dell'intero tabellone e forniscono la risposta alla domanda fondamentale dell'intero lavoro: "È possibile che le differenze riscontrabili tra i peli possano essere usate per trovare differenze tra specie dello stesso Genere?"

Dai risultati ottenuti si può notare l'alta significatività riscontrabile nelle analisi inerenti alle variabili Pelo ed Animale, che indicano una differenza tra i dodici peli studiati, il che ci porta a poter affermare con una certa sicurezza che esiste una evidente differenza tra le due specie oggetto di studio *A. agrarius* e *A. flavicollis*, almeno in merito ai campioni analizzati.

Capitolo Quinto

CONCLUSIONE

Questa interessante ricerca, svolta seguendo il metodo d'indagine dell'analisi tricológica su base morfometrica, ci ha permesso di confermare l'ipotesi secondo cui il pelo presenta specie-specificità, mettendo in evidenza diversità microscopiche tra due specie di Genere comune.

Il lavoro svolto è stato lungo ed impegnativo riguardo la raccolta delle misurazioni, ma soprattutto per l'analisi statistica; ciò nonostante rappresenta solo una minima parte dello studio che potrebbe concernere la microteriofauna selvatica, e non solo.

Infatti, sarebbe utile protrarre la ricerca per un periodo più lungo, in modo tale da prendere in considerazione nel confronto altre specie, che potrebbero poi essere inserite in un database che raccolga tutte le informazioni possibili riguardanti il pelo di ogni singola specie campionata, in modo tale da facilitare il lavoro di ricerca faunistica nel territorio.

Questo tipo di studio, poi, si è rilevato un metodo molto utile, non cruento, poco costoso e, soprattutto, non invasivo, dato che il reperimento dei campioni si basa principalmente sull'utilizzo di "reperti" ritrovati sul terreno o acquisiti mediante il facile utilizzo di strumenti quali trappole a cattura in vivo o hair-tube (Tormen, *et al.*, 2009a 2009b).

BIBLIOGRAFIA

ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P.J., RAM, S.J. (2004). "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, volume 11, 7: 36-42.

CAPIZZI D., SANTINI L. (2007). *I roditori italiani*. Antonio Delfino Editore.

LIEM K. F., BEMIS W. E., WALKER W. F., GRANDE L. (2002). *Anatomia comparata dei Vertebrati una visione funzionale ed evolutiva*. EdiSES Napoli.

LOCATELLI R., PAOLUCCI P. (1998). *Insettivori e piccoli roditori del Trentino*. Provincia Autonoma di Trento. Servizio Parchi e Foreste demaniali. Parco Adamello Brenta. Parco naturale Paneveggio Pale di San Martino. Museo Tridentino di Scienze Naturali Collana naturalistica.

MITCHELL-JONES A. J., AMORI G., BOGDANOWICZ W., KRYŠTUFEK B., REIJNDERS P. J. H., SPITZENBERGER F., STUBBE M., THISSEN J. B. M., VOHRALÍK V. & ZIMA J. (1999). *The atlas of European Mammals*. Societas Europaea Mammalogica Poyser Natural History.

STOPPINI E. (2009). *Censimento della microteriofauna terricola nell'area del parco Valcorba (Pozzonovo, pd) mediante metodi incruenti: dati preliminari*. Tesi di laurea, Fac. Scienze MM.FF.NN., Università di Padova, A.A. 2008/2009.

TEERINK B.J. (1991). *Hair of west european mammals*. Atlas and identification key. Cambridge University Press.

TORMEN N., GUIDOLIN L., RAZZARA E., STOPPINI E., CASSANDRO M. (2009a). *L'analisi tricologica nello studio delle specie a rischio. Un nuovo approccio metrico: dati preliminari*. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova, **71: 214**.

TORMEN N., TASSONI T., GUIDOLIN L. (2009b) *Studio della microteriofauna mediante tecniche non invasive: live-traps e analisi tricologiche*. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova, **71: 215**.

TOSCHI A. (1965). *Fauna d'Italia VII. Mammalia. Lagomorpha, Rodentia, Carnivora, Artiodactya, Cetacea*. Calderini Bologna Edizioni.

TOSCHI A. & LANZA B. (1959). *Fauna d'Italia IV. Mammalia. Generalità, Insectivora, Chiroptera*. Calderini Bologna Edizioni.

Siti consultati

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RASBAND W.S., *ImageJ*, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011.