

Riassunto. L'obiettivo del nostro studio è quello di descrivere un metodo efficace per l'inseminazione artificiale nei serpenti. Dieci serpenti (4.6) adulti e in salute sono stati selezionati per l'esperimento: *Pantherophis guttatus* 1.3; *Hydrodynastes gigas* 1.1; *Corallus hortulanus* 1.1; and *Sanzinia madagascariensis* 1.1; l'estrazione del seme è stata eseguita mediante il massaggio dei gastrostegi (squame ventrali) del terzo caudale del corpo per due o tre minuti. Le femmine sono state selezionate in base all'attività ovarica determinata ecograficamente. L'inseminazione artificiale è stata eseguita solamente in quelle femmine che presentavano follicoli pre-ovulatori. Usando un endoscopio rigido l'urodelo è stato visualizzato attraverso la cloaca, il seme raccolto è stato quindi depositato nell'ovidotto mediante l'uso di un catetere connesso ad una siringa. La tecnica non ha prodotto risultati nella *S. madagascariensis* e nell'*H. gigas*. Due delle femmine di *P. guttatus* hanno deposto uova fertili due mesi dopo la procedura. Le schiuse sono avvenute dopo circa 60 giorni. La femmina di *C. hortulanus* ha dato alla luce i piccoli dopo circa 120 giorni. L'estrazione del seme mediante il massaggio dei gastrostegi del terzo caudale (caudal third massage), e la successiva inseminazione con il seme fresco si sono dimostrati un metodo efficace per la riproduzione assistita dei serpenti in cattività. L'inseminazione artificiale è un metodo essenziale per lo sviluppo di efficaci programmi di conservazione *ex-situ*.

Caratterizzazione della formula leucocitaria della lucertola muraiola (*Podarcis muralis*) per le popolazioni italiane

Roberto SACCHI^{1*}, Stefano SCALI², Marco MANGIACOTTI¹, Alan J. COLADONATO¹, Silvia PITONI¹, Marco A.L. ZUFFI⁴, Mattia FALASCHI³

¹ Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, Università degli Studi di Pavia, Via Taramelli 24 – 27100 Pavia,

* Corresponding author: roberto.sacchi@unipv.it

² Museo di Storia Naturale di Milano, Corso Venezia, 55 – 20121 Milano

³ Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26 – 20133 Milano

⁴ Museo di Storia Naturale di Calci, Università degli Studi di Pisa, Via Roma 79 – 56011 Calci (PI)

Riassunto. Caratterizzare le risposte fisiologiche ai fattori di stress ambientali in individui appartenenti a popolazioni selvatiche è di primaria importanza nella conservazione delle specie nei loro habitat. La quantificazione dei livelli plasmatici dei glucocorticoidi surrenali è una delle procedure più diffuse per valutare lo stress fisiologico negli animali selvatici. Tuttavia, i test ormonali sono costosi e possono essere difficili da eseguire in condizioni di campo. Per esempio, la valutazione dello stress attraverso la misurazione del corticosterone plasmatico richiede una quantificazione del valore basale che deve avvenire entro pochi minuti dalla cattura (in genere 2-3 minuti), anche se nella maggior parte delle specie il tempo esatto non è stato definito con precisione. La formula leucocitaria ha il potenziale per essere un metodo affidabile per misurare lo stress nei vertebrati in modo alternativo al dosaggio ormonale. Per esempio, i neutrofili (eterofili negli uccelli e nei rettili) e i linfociti rispondono in modo opposto allo stress, in modo tale che il loro rapporto è in genere positivamente correlato ai glucocorticoidi circolanti e all'entità del fattore di stress. Anche l'aumento del numero totale di leucociti (leucocitosi) o l'aumento del numero di eosinofili (eosinocitosi) sono stati utilizzati come *proxy* dello stress, ma con risultati contrastanti. Rispetto all'analisi ormonale, l'analisi della formula leucocitaria ha due grandi vantaggi: 1) il

conteggio dei globuli bianchi a partire da strisci di sangue è più semplice ed economico, 2) la risposta iniziale dei leucociti inizia entro poche ore (o giorni), rendendo più semplice la valutazione di una linea di base. L'interpretazione della formula leucocitaria rimane tuttavia difficile in quanto il profilo dei leucociti non sempre fornisce informazioni sulla capacità degli individui di innescare una risposta immunitaria. Un serio problema per l'interpretazione dei conteggi differenziali dei leucociti è la quasi totale mancanza di informazioni sugli intervalli di riferimento (media e intervalli di variazione) per individui "normali", specialmente per le popolazioni selvatiche. Senza una definizione dei livelli basali è praticamente impossibile stabilire se i conteggi osservati in un dato individuo siano alti o bassi rispetto al profilo leucocitario di conspecifici sani. Questo studio si focalizza sulla definizione dei valori di riferimento della formula leucocitaria della lucertola muraiola (*Podarcis muralis*) in tutto l'areale italiano e sulla valutazione di come tali valori cambino in relazione a sesso, stagione e gradiente geografico. L'analisi è stata condotta tra marzo e settembre del periodo 2010-2016 in 54 siti, su di un campione di 794 individui (498 maschi e 296 femmine). I dati raccolti hanno permesso di definire con precisione (CV=13%) i valori basali della specie e di individuare differenze sessuali, oscillazioni stagionali e variazioni in relazione alla latitudine.

Abstract. Characterizing the physiological responses of wild animals to stressors, including human-induced landscape changes, is an important question with deep implications for both animal conservation and theoretical issues. Quantifying the levels of adrenal glucocorticoid hormones in plasma are one of the most popular procedure for assessing physiological stress in animals. However, hormone assays are expensive and may be difficult in field situations. For example, the assessment of stress through measurement of plasma corticosterone requires a quantification of the baseline value that must occur within a few minutes of capture (usually 2-3 minutes), even if in most species the exact time has not been defined accurately. The leukocyte formula has the potential to be a reliable method for measuring stress in vertebrates in an alternative way to hormone dosage. For example, neutrophils (heterophils in birds and reptiles) and lymphocytes respond in opposite ways to stress, so that their relationship is generally positively correlated to circulating glucocorticoids and to the magnitude of the stress factor. Also the increase in the total number of leukocytes (leukocytosis) or the increase in the number of eosinophils (eosinocytosis) have been used as a proxy of stress, but with conflicting results. Compared to hormonal analysis, leukocytes has two major advantages: 1) the count of white blood cells starting from blood smears is simpler and cheaper, 2) the initial response of leukocytes begins within a few hours (or days), making it easier to evaluate a baseline. However, the interpretation of the leukocyte formula remains difficult because the leukocyte profile does not always provide information on the ability of individuals to trigger an immune response. A serious problem for the interpretation of differential leukocyte counts is the almost complete lack of information on the reference intervals (mean and variation intervals) for "normal" individuals, especially for wild populations. Without a definition of the baseline levels it is practically impossible to establish whether the counts observed in a given individual are high or low compared to the leukocyte profile of healthy conspecifics. This study focuses on the definition of the reference values for the Common wall lizard (*Podarcis muralis*) throughout the Italian range and on the evaluation of how these values change in relation to sex, season and geographical cline. The analysis was conducted between March and September 2010-2016 in 54 sites, on a sample of 794 individuals (498 males and 296 females). The data collected

allowed to define with precision (CV = 13%) the basal values of the species and to identify sexual differences, seasonal oscillations and variations in relation to the latitude.

The reproductive biology of the Italian wall lizard, *Podarcis siculus*

Marco A.L. ZUFFI^{1*}, Valentina TITONE¹, Annamaria NISTRÌ², Chloe ADAMOPOULOU³, Marco MANGIACOTTI⁴, Roberto SACCHI⁴, Stefano SCALI⁵

1 Museum Natural History, University of Pisa, Via Roma 79 56011 Calci (Pisa), Italy. * Corresponding author: marco.zuffi@unipi.it

2 Museum Natural History, Zoological Section "La Specola", University of Florence, Via Romana 17 - 50125 Florence, Italy

3 Zoological Museum, Department of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis GR-157 84 Athens, Greece

4 Department of Earth and Environmental Sciences, University of Pavia, Via Taramelli 24, 27100 Pavia, Italy

5 Museum Natural History, corso Venezia 55, 20121 Milan, Italy

Riassunto. La riproduzione di *Podarcis siculus* è stata studiata approfonditamente solo negli anni '70, con messa in evidenza di tutto il ciclo di sviluppo degli ovari, follicoli e oociti durante l'intero ciclo stagionale, descrivendo chiaramente il periodo ovulatorio. Sebbene *P. siculus* sia una lucertola ampiamente distribuita in Italia, non è nota la variabilità dei modelli riproduttivi, come il numero di covate per stagione, la dimensione di covata (alcuni dati aneddotici sono degli anni '80), ma anche la dimensione delle uova o, ancora, la variazione geografica e altitudinale del sistema riproduttivo. La nostra ricerca presenta per la prima volta il più ampio data set riproduttivo delle femmine di *P. siculus*, rappresentativo dell'intero areale italiano e di alcune altre località. Abbiamo considerato solo esemplari di collezione. Abbiamo selezionato femmine catturate tra marzo e agosto, il periodo noto di ovulazione. Abbiamo però analizzato non solo femmine adulte (SVL \geq 50 mm), ma anche più piccole e giovani (SVL \geq 40 mm), e alcune altre al di fuori del periodo riproduttivo come animali di confronto. Una femmina è considerata riproduttiva (RF) quando almeno un follicolo è di colore grigio, giallo o marrone e più grande degli altri follicoli non sviluppati, normalmente biancastri. Quando l'ovario era evidentemente non in sviluppo, l'esemplare è stato codificato come femmina non riproduttiva (NRF). Le uova hanno due forme principali, arrotondate (sferiche) o allungate (ellittiche). Le uova arrotondate sono uova in sviluppo (follicoli ovarici all'inizio dell'ovulazione e oociti ovarici agli ultimi stadi della vitellogenesi). Le uova allungate sono oociti nei dotti ovarici. Abbiamo misurato unicamente quei follicoli e quegli oociti che non apparivano modificati in dimensione e forma. Abbiamo preso il diametro delle uova sferiche e il diametro maggiore di quelle ellittiche. Abbiamo però escluso il diametro minimo per ridurre o eliminare ogni possibile errore dimensionale dovuto a danneggiamenti occorsi durante il campionamento o la fissazione in liquido. Le uova allungate erano completamente senza o parzialmente con guscio. Non abbiamo mai trovato uova con guscio completo. In generale, le femmine non differiscono nella SVL e nella lunghezza del tronco (TRL) tra il continente e le grandi isole, mentre le RF sono significativamente più lunghe delle NRF; RF e NRF sono più lunghe nelle isole maggiori rispetto al continente (interazione stato riproduttivo \times area). La SVL aumenta significativamente e positivamente da Ovest a Est ($\rho_{\text{longitude}} = 0,199$, $P < 0,0001$, $n = 645$) e da Nord a Sud ($\rho_{\text{latitude}} = -0,327$, $P < 0,0001$, $n = 645$). La dimensione di covata è di $4,4 \pm 1,6$ uova (1-11). Entrambi SVL e TRL correlano positivamente con la dimensione di covata ($r_{\text{SVL}} = 0,557$, $P < 0,0001$, $n = 619$; $r_{\text{TRL}} =$