



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"FISIOLOGIA E COMPORTAMENTO"

CICLO XXIII

COORDINATORE Prof. GUIDO BARBUJANI

**MECCANISMI DI ORIENTAMENTO
NELLA LUCERTOLA CAMPESTRE:
BUSSOLA A POLARIZZAZIONE
E RUOLO DELL'OCCHIO PARIETALE**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/05

Dottoranda

Dott. Giulia Beltrami

Tutore

Prof. Augusto Foà

Anni 2008/2011

INDICE

<u>INTRODUZIONE GENERALE</u>	1
LA BUSSOLA A POLARIZZAZIONE: STUDI PRECEDENTI	2
MECCANISMI DI ORIENTAMENTO ED HOMING NEI RETTILI	4
L'OCCHIO PARIETALE NEI RETTILI	6
Esperimento 1: "PERCEZIONE DELLA LUCE POLARIZZATA NEL LACERTIDE <i>P. sicula</i>"	10
1. INTRODUZIONE	11
2. MATERIALI E METODI	17
2.1. ANIMALI	17
2.2. CATTURA E STABILIZZAZIONE	18
2.2.2. La marcatura degli animali	19
2.3. APPARATO SPERIMENTALE	20
2.4. CONDIZIONI DI RILASCIO	25
2.4.1. Misurazione dell'orientamento bussolare nelle lucertole	26
2.5. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	26
2.5.1. Pre-Training	26
2.5.2. Training	27
2.5.3. Criterio di apprendimento	28
2.5.4. Test con E-vector ruotato	28
2.5.5. Refreshing Training	29
2.5.6. Test con Occhio Parietale coperto (PAR-P)	29
2.5.7. Test di Controllo	30
2.6. ANALISI STATISTICA	30
3. RISULTATI	33
3.1. ULTIMO LANCIO DI TRAINING	33
3.2. TEST CON E-VECTOR RUOTATO	33

3.3. REFRESHING TRAINING	34
3.4. TEST CON OCCHIO PARIETALE COPERTO (PAR-P)	34
3.5. TEST DI CONTROLLO	34
4. DISCUSSIONE _____	38
Esperimento 2: “BUSSOLA A POLARIZZAZIONE IN <i>P. sicula</i>: SOLO ALCUNE LUNGHEZZE D’ONDA SONO COINVOLTE” _____	42
1. INTRODUZIONE _____	43
2. MATERIALI E METODI _____	47
2.1. ANIMALI	47
2.2. APPARATO SPERIMENTALE	47
2.3. CONDIZIONI DI RILASCIO	51
2.4. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	52
2.4.1. Pre-Training	53
2.4.2. Training	53
2.4.3. Criterio di apprendimento	54
2.4.4. Tests	54
2.4.4.1. Test in luce Bianca ed E-vector ruotato	54
2.4.4.2. Test in luce colorata: con E-vector parallelo ed E-vector ruotato	55
2.5. ANALISI STATISTICA	56
3. RISULTATI _____	57
3.1. ULTIMO LANCIO DI TRAINING	57
3.2. TEST IN LUCE BIANCA CON E-VECTOR RUOTATO	57
3.3. TEST IN LUCE BLU: CON E-VECTOR PARALLELO E CON E-VECTOR RUOTATO	57
3.4. TEST IN LUCE VERDE AD ALTA RADIENZA SPETTRALE E A BASSA RADIENZA SPETTRALE: CON E-VECTOR PARALLELO E CON E-VECTOR RUOTATO	58
3.5. TEST IN LUCE ROSSA ED E-VECTOR PARALLELO	59
3.3. TEST IN LUCE TURCHESE: CON E-VECTOR PARALLELO E CON E-VECTOR RUOTATO	59

4. DISCUSSIONE	62
Esperimento 3: “ LA BUSSOLA A POLARIZZAZIONE IN <i>P. sicula</i> E’ CRONOMETRICA?”	65
1. INTRODUZIONE	66
2. MATERIALI E METODI	69
2.1. ANIMALI	69
2.2. APPARATO SPERIMENTALE	69
2.3. CONDIZIONI DI RILASCIO	72
2.4. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	73
2.4.1. Procedura sperimentale: “Controllo dell’Apparato sperimentale”	74
2.4.2. Procedura sperimentale: “La Bussola a Polarizzazione è cronometrica?”	75
2.4.3. Pre-Training	75
2.4.4. Training	75
2.4.5. Criterio di apprendimento	76
2.4.6. Test	76
2.5. ANALISI STATISTICA	76
3. RISULTATI	78
3.1. “CONTROLLO DELL’APPARATO SPERIMENTALE”	78
3.1.1. Analisi del Criterio di apprendimento	78
3.2. “LA BUSSOLA A POLARIZZAZIONE E’ CRONOMETRICA?”	80
3.2.1. Ultimo lancio di Training	80
3.2.2. Test di Controllo	80
3.2.3. Fast Clock-shift Test	80
4. DISCUSSIONE	82
CONCLUSIONI GENERALI	86
BIBLIOGRAFIA	89
APPENDICE A: Beltrami <i>et al.</i> (2010) “A sky polarization compass in lizards: the central role of the parietal eye”	

INTRODUZIONE GENERALE

Il mio progetto di dottorato ha avuto come obiettivo quello di approfondire la conoscenza dei meccanismi di orientamento nei Rettili, e nello specifico, di studiare la bussola a polarizzazione nella lucertola campestre *Podarcis sicula*. I tre anni di dottorato hanno coinciso ciascuno con 3 diversi interrogativi sperimentali, l'uno propedeutico del successivo. La scrittura di questo elaborato ha quindi seguito la subpartizione della mia attività di ricerca. Ad una introduzione generale seguirà l'Esperimento 1 dal titolo **“Percezione della Luce Polarizzata nel lacertide *Podarcis sicula*: il Ruolo dell'Occhio Parietale”**, in cui si è voluto indagare se il nostro animale modello fosse in grado di percepire la luce polarizzata ed utilizzarla per orientarsi. Una parte essenziale di questo esperimento è stata destinata all'individuazione dell'organo deputato a questa percezione, l'occhio parietale (i presenti risultati sono stati pubblicati in Beltrami *et al.* del 2010, riportato in Appendice A). In seguito troviamo l'Esperimento 2 dal titolo **“Bussola a Polarizzazione in *Podarcis sicula*: solo alcune Lunghezze d'Onda sono coinvolte”** che ha avuto come obiettivo quello di analizzare quale parte dello spettro luminoso fosse coinvolta nella percezione della luce polarizzata. Infine si svilupperà l'Esperimento 3 dal titolo **“La Bussola a Polarizzazione in *Podarcis sicula* è cronometrica?”** pianificato allo scopo di investigare, in condizioni naturali, se *P. sicula* sia equipaggiata da un meccanismo bussolare cronometrico. Dopo le 3 sezioni sperimentali, che vedono all'inizio una introduzione specifica e sono concluse da una breve discussione, saranno le conclusioni generali a terminare l'elaborato.

Per rispondere ai vari e complessi interrogativi posti è stato necessario avvalerci della preziosa collaborazione di colleghi del Dipartimento di Fisica dell'Università di Ferrara (Prof. Ferruccio Petrucci e Dott. Antonio Parretta) che hanno progettato e realizzato una struttura perfetta per indagare l'orientamento del nostro animale modello tramite luce polarizzata. Il risultato di questa collaborazione è stata la realizzazione di un apparato sperimentale in cui fosse possibile controllare tutte le numerose variabili della luce polarizzata.

LA BUSSOLA A POLARIZZAZIONE: STUDI PRECEDENTI

I precursori dello studio sulla sensibilità degli animali alla luce polarizzata sono Santschi (1923), Crozier e Mangelsdorf (1924), Verkhovskaya (1940) e von Frisch (1949).

Santschi, in uno dei suoi primi esperimenti sulle formiche, depolarizzò la luce con un grosso filtro sopra il loro home-range, provocandone il totale disorientamento. Nonostante i risultati del suo esperimento però Santschi non ne trasse conclusioni, che vennero invece elaborate molti anni dopo da Wehner e Rossel, i quali determinarono la correlazione fra la percezione della polarizzazione della luce e l'utilizzo per l'orientamento (Wehner & Rossel, 1985, p. 13).

Diversi decenni prima Crozier e Mangelsdorf (1924) furono i primi a usare il prisma di Nicol, attraverso cui la dispersione della luce appariva linearmente polarizzata, per studiare il comportamento di larve di mosca e scarafaggio. Osservandone il comportamento, essi non riscontrarono un significativo discernimento fra luce polarizzata e non polarizzata, fenomeno che invece fu notato da Verkhovskaya (1940) in *Drosophila*.

Il primo esperimento che mise in relazione la luce polarizzata con l'orientamento fu effettuato da von Frisch (1949), il quale dimostrò, per la prima volta, che in assenza di disco solare visibile, il pattern di luce polarizzata risulta essere il segnale bussolare più importante utilizzato dalle api (*Apis mellifera*) per orientarsi.

Stockhammer (1956) fu il primo a ipotizzare che gli insetti, essendo in possesso di fotorecettori dicroici, riescono a percepire la direzione dell'E-vector della luce linearmente polarizzata.

I primi esperimenti in cui venne utilizzata la luce linearmente polarizzata, furono proprio quelli eseguiti da Stockhammer nel 1956 sull'ape (*Apis mellifera*).

L'utilizzo dei pattern di distribuzione dell'E-vector come riferimento per orientarsi è stato quindi dimostrato in una varietà di *taxa* animali.

Negli Insetti, gli studi sull'orientamento tramite luce polarizzata sono numerosi e in alcune specie questi hanno raggiunto un notevole stato di avanzamento. Per molte specie entomologiche il pattern di polarizzazione del cielo è risultato un forte segnale per guidare rotte bussolari e migratorie, come per l'ape europea *Apis mellifera* (von Frisch, 1949;), la formica del deserto *Cataglyphis bicolor* (Wehner, 1992), la farfalla

monarca *Danaus plexippus* (Reppert *et al.*, 2004), il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* (Wolf *et al.*, 1980) e il ragno ripario *Arctosa variana* (Papi & Tongiorgi, 1963). Interessante è lo studio di Brownell e Weber (1995) sugli scorpioni *Hadrurus arizonensis* e *Paruroctonus mesaensis*, che pur essendo animali notturni si è scoperto riescono a percepire la luce polarizzata ed a utilizzarla per orientarsi: il significato adattativo di questo meccanismo di percezione è ad oggi sconosciuto.

Nei Pesci, come negli Anfibi, le informazioni a riguardo sono scarse e gli esperimenti effettuati soffrono purtroppo di artefatti sperimentali e incorrono spesso in errori dovuti allo scorretto utilizzo della luce polarizzata; è quindi difficile interpretare i dati ad oggi esistenti in letteratura (Horvath & Varjú, 2003).

La Classe degli Uccelli merita un approfondimento a parte. E' stato infatti dimostrato che durante le migrazioni e le performance di homing, numerose specie ornitologiche si orientano grazie a stimoli multipli (Able, 1993), i quali possono essere la posizione del disco solare (Kramer 1952, 1957, 1959), il pattern stellare (Emlen, 1970), il campo geomagnetico (Merkel & Wiltschko, 1965; Wiltschko, 1968) e il pattern di luce polarizzata (Phillips & Waldvogel, 1982, 1988); inoltre per alcune specie, come per esempio il colombo viaggiatore *Columba livea* (Papi, 1976), risulta fondamentale per l'homing utilizzare una mappa olfattiva. Il primo ad ipotizzare che gli uccelli possano utilizzare la luce polarizzata durante la migrazione o nell'homing fu Donald R. Griffin nel 1950 ad un congresso (cf. Montgomery & Heinemann, 1952). Da segnalare è l'importante esperimento di orientamento tramite luce polarizzata condotto da Helbig e Wiltschko (1989) sulla capinera (*Sylvia atricapilla*), un migratore notturno. Gli autori conclusero che gli individui di questa specie riescono a percepire la luce polarizzata durante l'alba e il tramonto. Esperimenti successivi hanno inoltre determinato che gli esemplari della stessa specie la utilizzano per orientarsi (Helbig, 1990). Nel 1998 Wiltschko e colleghi pubblicarono uno studio su *Zosterops lateralis* in cui conclusero che il passeriforme australiano usasse il pattern di luce polarizzata per orientarsi al tramonto; purtroppo, essendo che i loro esperimenti di manipolazione del campo magnetico iniziavano mezz'ora prima del tramonto, si può quindi solo supporre che gli animali si orientassero utilizzando segnali celesti.

Alla luce di questi numerosi studi però il meccanismo di una bussola cronometrica che percepisce la luce polarizzata è stato ben studiato e delineato solamente in due

gruppi di invertebrati, le api (Von Frisch, 1949) e le formiche del deserto (Wehner, 1992), mentre la comprensione del fenomeno è ancora particolarmente incompleta per quanto riguarda i vertebrati (Freake, 1999).

MECCANISMI DI ORIENTAMENTO ED HOMING NEI RETTILI

La quantità dei dati sull'orientamento dei Rettili denota un panorama di ricerche scarso in cui gli studi sulla capacità di homing e sull'orientamento alla bussola solare del Sottordine dei Lacertilia (Sauri) provengono esclusivamente dalle tre famiglie Lacertidi, Iguanidi e Phrynosomatidi.

Nei Rettili l'orientamento verso una particolare meta può riguardare sia il ritorno all'area nativa per fini riproduttivi, sia il ritorno al proprio rifugio dopo un'escursione dell'area circostante.

Uno dei casi maggiormente illuminanti sul ritorno in territori riproduttivi è rappresentato dalla specie di tartaruga verde *Chelonia mydas*, che dalle coste del Brasile (luogo di foraggiamento) si dirige sulla piccola isola di Ascension (luogo di riproduzione) a 1400 miglia marine dalla costa. I meccanismi di navigazione rimangono ancora pressoché sconosciuti, si ipotizza però che fattori olfattivi e bussole astronomiche potrebbero svolgere un ruolo importante (Carr, 1965).

I primi studi in merito all'orientamento dei Rettili vennero effettuati da Noble (1934) sul sauro nordamericano *Sceloporus undulatus*, di cui venne saggiata la capacità di homing.

Le tartarughe di acqua dolce *Terrapene carolina*, *Chrysemys picta* e *Trionyx spinifer* utilizzano segnali celesti per orientarsi nella direzione di casa e potrebbero possedere una bussola a polarizzazione (De Rosa & Tylor, 1980), come la tartaruga di terra *Gopherus polyphemus* (Gourley, 1974).

Murphy (1981) ha scoperto che la bussola solare governa i movimenti verso e dalla riva dei giovani di alligatore americano (*Alligator mississippiensis*).

Nei serpenti, alcune prove riguardanti l'orientamento mediante informazioni provenienti dal cielo, in animali dislocati fuori dall'home-range, sono state ottenute da Gregory e colleghi (1987). Il serpente a sonagli occidentale (*Crotalux atrox*) ha abilità di

orientarsi grazie a segnali provenienti dal sole (Landreth, 1973), e i serpenti acquatici *Regina septemvittata* e *Natrix sipedon* possono usare il sole come segnale bussolare per orientarsi da e verso la riva. In questi serpenti è stata dimostrata la presenza di un sistema bussolare solare cronometrico.

Alcune specie di lucertole, come *Sceloporus jarrovi* (Ellis-Quinn & Simon, 1989), *Sceloporus orcutti* (Weintraub, 1970) e *Dipsosaurus dorsalis* (Krekorian, 1977), sono in grado di ritornare alla tana dopo un dislocamento di 200-300 m. *Sceloporus jarrovi* inoltre è la prima specie di lucertola nella quale esperimenti di dislocamento hanno dimostrato alcuni meccanismi sensoriali con cui è equipaggiata (Ellis-Quinn & Simon, 1991): esemplari di questa specie riescono ad orientarsi in direzione della tana per mezzo di segnali celesti. Coprendo l'occhio parietale si interferisce con il meccanismo di homing e gli animali risultano disorientati. Per quanto riguarda gli studi sulle specie europee, da citare sono i lavori di Foà e colleghi (1990) che sottolineano in *Podarcis sicula* la ottima capacità di orientamento e di homing da località ad esse sconosciute.

Ulteriori dati riguardano anche *Lacerta agilis* e *Lacerta vivipara*, capaci di rientri dall'esterno del loro home-range, rispettivamente da 70 e 100 m (Strijbosh *et al.*, 1983).

Sebbene vi siano molte informazioni riguardanti l'homing nei Rettili, il ruolo dei segnali celesti nell'orientamento cronometrico è stato studiato solo in alcune tartarughe di acqua dolce, tartarughe di terra, alligatori, serpenti e lucertole (Chelazzi, 1992).

Lawson nel 1985 ha proposto un ruolo della bussola a polarizzazione nell'orientamento dei serpenti *Thamnophis radix*, ma questa ipotesi non è mai stata confermata sperimentalmente.

L'orientamento alla bussola solare è stato dimostrato nel ramarro *Lacerta viridis* (Fischer, 1961), in *Uma notata* (Adler & Phillips, 1985), in *Sceloporus jarrovi* (Ellis-Quinn & Simon, 1991) e nella lucertola campestre *Podarcis sicula* (Foà *et al.*, 2009).

Ad oggi, tra circa 6000 specie di rettili viventi, solo in 4 lucertole è stata dimostrata la capacità di percepire la polarizzazione: *Uma notata* (Adler & Phillips, 1985), *Sceloporus jarrovi* (Ellis-Quinn & Simon, 1991) o *Tiliqua rugosa* (Freake, 1999) e *Podarcis sicula* (Beltrami *et al.*, 2010): prove dell'esistenza di una bussola a polarizzazione provengono da esperimenti in laboratorio, nei quali *Uma notata* è stata in grado di utilizzare i pattern di luce polarizzata per l'orientamento alla bussola (Adler & Phillips, 1985), e *Tiliqua rugosa* è stata in grado di orientarsi mediante luce polarizzata (Freake, 1999).

Ancora molto c'è da scoprire sull'utilizzo della bussola a polarizzazione nei Rettili, sull'implicazione che l'occhio parietale può avere nella percezione della luce polarizzata e quanto questa informazione può essere impiegata nell'orientamento alla bussola. In questo scenario, di totale mancanza di informazioni riguardanti lo studio della bussola a polarizzazione nei Rettili, il mio progetto di dottorato ha avuto come scopo quello di studiare i meccanismi comportamentali alla base di questo processo di orientamento ed ha visto come specie modello la lucertola campestre *Podarcis sicula*. Il piano sperimentale si è inserito in un progetto più ampio del gruppo di ricerca in Etologia dell'Università di Ferrara, riguardante lo studio dei meccanismi di orientamento nei Lacertidi, iniziato con una indagine sulla bussola solare, sempre in *P. sicula* (Foà *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda lo studio dei meccanismi di orientamento animale nei Rettili, l'approccio comportamentale ricopre un ruolo predominante rispetto ad altri approcci, questo perché l'esigenza primaria è quella di creare una solida conoscenza, fino ad ora mancante, dei diversi e complessi meccanismi comportamentali alla base del processo di orientamento, che in seguito possa permettere ad altre discipline, come per esempio la genetica e l'elettrofisiologia, di approcciarsi a tale ricerca.

L'OCCHIO PARIETALE NEI RETTILI

L'occhio parietale, anche conosciuto come organo parietale o terzo occhio, è una struttura presente principalmente nella classe dei Rettili, e più precisamente in alcune specie della famiglia dei Lacertidi. Anatomicamente è una parte del tetto dell'epitalamo; in cui si identificano due evaginazioni, impari e mediane, costituenti il complesso epifisario: la prima evaginazione è costituita dall'epifisi (l'organo pineale, o ghiandola pineale) che si trova nella parte posteriore del diencefalo ed ha funzione maggiormente endocrina, mentre nella parte anteriore troviamo l'organo parietale, chiamato anche occhio parietale, con funzione maggiormente fotorecettiva.

Nei Rettili il complesso pineale è composto dalla ghiandola pineale (intracraniale) e , nello *Sphenodon* e nelle lucertole, dall'occhio parietale (extracraniale).

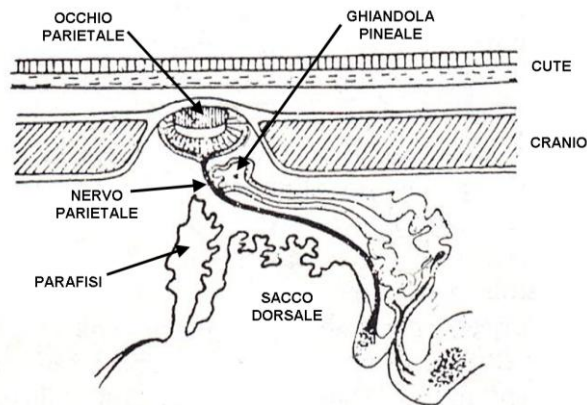


Figura I.I. Rappresentazione schematica del complesso pineale nei lacertidi (Padoa, 1986).

Per la risposta fotoperiodica i Rettili possono contare su recettori extraoculari multipli che concorrono alla stessa funzione degli occhi laterali nei Mammiferi; i fotorecettori extraoculari includono i fotorecettori cerebrali profondi, localizzati in diversi siti cerebrali, e il complesso pineale.

Poco ancora è conosciuto riguardo all'occhio parietale nelle lucertole.

L'occhio parietale consiste in una lente dorsale e in una retina ventrale, entrambe situate al di sotto della cornea trasparente; esso è disposto superficialmente, in corrispondenza di un foro parietale della volta cranica, e al di sotto di una squama epidermica traslucida nella zona mediana dorsale della testa (Kent, 1997).

La retina ha una struttura in sé primitiva ma ben sviluppata: è composta unicamente da cellule fotorecetrici simili a coni (Hamasaki & Eder, 1977) e cellule gangliari, insieme agli assoni delle cellule gangliari che formano il nervo parietale. Il nervo parietale innerva distinte aree del cervello (regioni talamiche, ipotalamiche e telencefaliche), ma non si proietta fino alla regione deputata alla funzione visiva (Engbretson, 1992; Quay, 1979).

La principale funzione dell'occhio parietale sembra essere quella di fare da trasduttore foto-neuroendocrino, cioè di convertire gli stimoli fotici in un segnale neuroendocrino, la melatonina (Firth & Kennaway, 1980). Inoltre gioca un importante ruolo nella termoregolazione agendo come dosimetro di radiazioni (Eakin, 1973).

Studi su *Anolis carolinensis* e *Podarcis sicula* è stato dimostrato che l'occhio parietale in queste specie di rettili non è implicato nel controllo del ritmo circadiano dell'attività locomotoria (Underwood, 1983; Foà, 1991).

Grazie a studi molecolari Hamasaki e Eder (1977) proposero che la disposizione dei fotorecettori all'interno dell'occhio parietale delle lucertole potesse essere adatto per l'analisi del pattern di polarizzazione della luce. I segmenti più esterni protrudono all'interno del lumen dell'occhio parietale, e così viene a formarsi un anello di fotorecettori posto su di un piano perpendicolare alla luce che entra nell'occhio (Adler, 1976). Dato che ogni fotorecettore nell'anello è massimamente sensibile ad una particolare direzione dell'E-vector, questa sistemazione circolare dei recettori potrebbe, in teoria, essere utilizzata per determinare l'angolo di polarizzazione della luce solare.

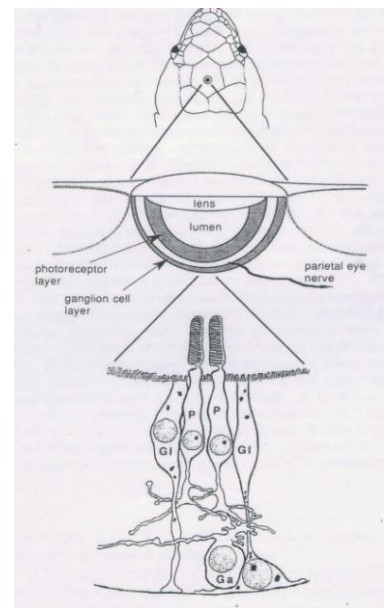


Figura I.II. Schematizzazione dell'occhio parietale e dei suoi recettori (Solessio *et al.*, 1993).

Grazie ad ulteriori analisi molecolari è emerso che l'organo parietale manifesta una risposta cromatica alla luce visibile (Engbretson, 1992; Solessio & Engbretson, 1993, 1999), più precisamente per le frequenze del blu (430 nm) e del verde (495 nm), mentre analisi elettrofisiologiche hanno dimostrato che è insensibile alla spettro infrarosso (Miller & Wolbarsht, 1962); inoltre sintetizza melatonina, ma in quantità sensibilmente più ridotte che la ghiandola pineale (Tosini & Menaker, 1998).

In generale la presenza dell'occhio parietale ha una forte connotazione adattativa come dimostra il fatto che questo complesso è assente nei rettili delle zone tropicali e semi-tropicali, mentre è presente nei rettili della fascia temperata, fattore che supporta l'ipotesi che l'occhio parietale è anche implicato nella termoregolazione (Gundy *et al.*, 1975). E' stato infatti osservato che in seguito a ablazione, o oscuramento, dell'occhio parietale, le lucertole spendono più tempo esposte al sole; in aggiunta, questi animali mostrano un aumento nell'attività locomotoria e percorrono distanze maggiori rispetto ai controlli che hanno subito una falsa operazione (Ellis-Quinn & Simon, 1991; Solessio & Engbretson, 1993; Freake, 1999). L'occhio parietale esplica inoltre un'importante ruolo nel comportamento di homing (Bissinger, 1980): studi effettuati nel sauro *Sceloporus jarrovi* (Ellis-Quinn & Simon, 1991) e nello scincide australiano *Tiliqua rugosa* (Freake, 2001) dimostrano che queste specie utilizzano per l'orientamento e nell'homing una bussola solare cronometrica e che, coprendo l'occhio parietale, questo

comportamento si riduce drasticamente, se paragonato ai controlli con l'occhio parietale scoperto.

I risultati di Ellis-Quinn e Simon (1991) sono stati confermati da studi recenti compiuti su *P. sicula*, il cui orientamento è stato saggiato outdoor in un Morris water-maze, con il disco solare sempre visibile (Foà *et al.*, 2009). Le lucertole sono state testate, in presenza di disco solare, con l'occhio parietale coperto da uno strato di lacca nera, mostrando di non essere più in grado di orientarsi correttamente. I risultati hanno così dimostrato che questo l'occhio parietale di *P. sicula* funge da unico mediatore nella percezione della luce solare (senza il coinvolgimento cioè della ghiandola pineale o dei fotorecettori cerebrali profondi) permettendo così alle lucertole di orientarsi mediante bussola cronometrica.

Come già detto in precedenza, una parte degli esperimento condotti in questa tesi è servita a dimostrare che l'occhio parietale non svolge solo un ruolo centrale nell'uso della bussola solare, ma anche per il funzionamento della bussola a polarizzazione.

Esperimento 1

**“PERCEZIONE DELLA LUCE
POLARIZZATA NEL LACERTIDE**

Podarcis sicula:

IL RUOLO DELL’OCCHIO PARIETALE”

1. INTRODUZIONE

Durante il giorno una bussola cronometrica basata sulla percezione di riferimenti astronomici potrebbe funzionare utilizzando due differenti stimoli: l'azimut solare e/o il pattern di luce polarizzata. Se un animale conosce la direzione teorica del proprio spostamento, un punto di riferimento che gli permette di trasformare tale direzione teorica in direzione pratica verso cui spostarsi nel mondo reale è l'azimut del sole (la proiezione del sole sul piano orizzontale). Per fare questo è necessario che l'animale conosca i cambiamenti dell'azimut solare nel corso della giornata. In alternativa, può essere utilizzato il pattern di luce polarizzata, la cui distribuzione è altamente prevedibile in ogni momento del giorno, in relazione alla posizione del sole (Wehner, 1992). Il sole è importante per l'orientamento anche in quanto fonte di luce polarizzata. La luce solare infatti, attraversando l'atmosfera, assume un certo grado di polarizzazione lineare, sia quando incontra singole molecole presenti in atmosfera (single scattering), come per esempio azoto e ossigeno, oppure quando viene a contatto con le nubi, le quali generano un effetto di dispersione multipla sulla radiazione incidente (multiple scattering) (Bohren & Huffman, 1983).

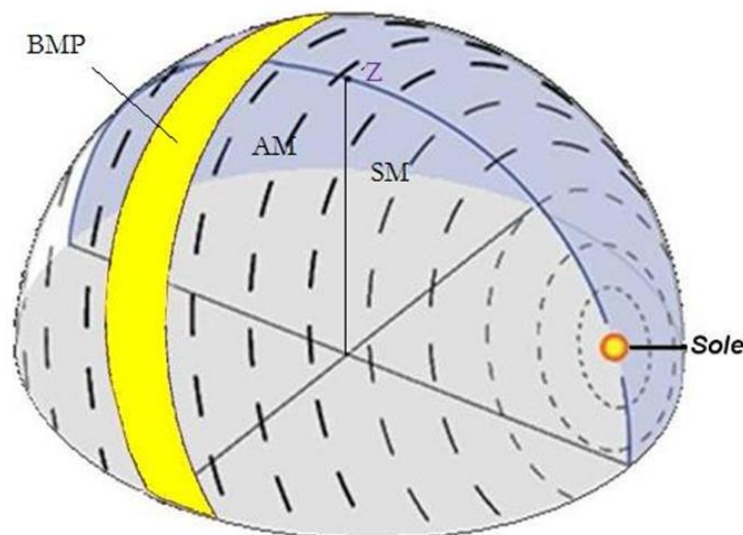


Figura 1.1. Orientamento teorico degli E-vectori nella volta celeste. Nella direzione del sole la luce risulta non polarizzata (meridiano solare, SM), così come nella direzione opposta al sole (meridiano anti-solare, AM), mentre il massimo grado di polarizzazione si ha per angoli di dispersione pari a 90° . I valori di polarizzazione aumentano spostandosi dal meridiano solare fino ad un angolo di 90° (corrispondente al massimo di polarizzazione, BMP), per poi decrescere gradualmente fino alla verticale corrispondente alla posizione opposta al sole (AM) (Wehner & Rossel, 1985).

Tale processo, detto “polarizzazione per scattering” genera nel cielo un complesso pattern di polarizzazione in cui ad ogni punto del cielo è associato un vettore E (E-vector: componente elettrica del vettore elettromagnetico costituente l’onda luminosa) caratterizzato da un certo angolo e grado di polarizzazione. La percentuale di polarizzazione in questo pattern è minima attorno al sole ed aumenta gradualmente fino ad essere massima in corrispondenza della Banda di Massima Polarizzazione (BMP). Essendo tale pattern solidale col sole, la BMP all’alba e al tramonto forma un anello che attraversa lo zenit risultando massimamente percepibile da parte degli animali.

Il meccanismo bussolare che utilizza il pattern naturale di luce polarizzata viene definito “Bussola a Polarizzazione” (von Frisch, 1949). Come la bussola solare, basata sulla percezione dell’azimut solare, la bussola a polarizzazione richiede un meccanismo cronometrico per compensare i cambiamenti di posizione, attraverso la volta celeste, del pattern di luce polarizzata, che cambia al variare dell’altezza del sole e del suo movimento apparente (Brines & Gould, 1982).

In diverse specie di lucertole è stato dimostrato esistere un meccanismo bussolare cronometrico (Freake, 2001), ma non è ancora stato chiarito se questi rettili utilizzino una bussola basata sulla percezione dell’azimut solare, una bussola basata sulla percezione del pattern di luce polarizzata, oppure entrambe.

Per quanto concerne studi sull’orientamento mediante bussola cronometrica, Adler e Phillips (1985) dimostrarono, per la prima volta negli studi sui Rettili, che il sauro americano *Uma notata* riusciva a orientarsi correttamente mediante l’utilizzo di segnali celesti. Nella prima fase sperimentale gli animali sono stati sottoposti ad uno sfasamento orario (clock-shift) dell’orologio biologico interno di circa 6 ore, che corrispondono ad una deviazione della posizione del sole nella volta celeste di circa 15° all’ora. Quando gli stessi animali vennero testati, compirono una deviazione orientativa di circa 90°, confermando così l’utilizzo di una bussola cronometrica, che poteva essere basata sia sull’azimut solare, sia sulla percezione del pattern naturale di luce polarizzata. Nella seconda fase sperimentale gli animali vennero addestrati outdoor a cercare riparo in una tana, con il solo il pattern di luce polarizzata come stimolo orientante ed in assenza del disco solare. Il test avvenne invece indoor, sotto una sorgente artificiale che emetteva luce linearmente polarizzata. Quando testati gli animali mostrarono un orientamento bimodale che, secondo gli autori, seguiva l’orientamento stesso dell’E-

vector allo zenit presente in natura al momento del test (calcolato in base alla posizione dell'azimut solare nel preciso momento in cui la lucertola viene testata). In questo studio gli autori fornirono, per la prima volta in letteratura, la prova dell'esistenza di una sensibilità alla luce polarizzata in un Rettile, rilevarono cioè che le informazioni provenienti dalla luce polarizzata possono essere utilizzate dagli animali per orientarsi, riuscendo a compensare la rotazione giornaliera del pattern di E-vectors.

Eguualmente Ellis-Quinn e Simon (1991) hanno dimostrato l'importanza della bussola solare nell'homing di *Sceloporus jarrovi*: agli animali del gruppo sperimentale venne coperto l'occhio parietale con vernice nera, ai controlli venne coperta di vernice una squama accanto all'occhio parietale e il gruppo dei supercontrolli non venne sottoposto a nessun trattamento. I tre gruppi furono dislocati a 150 m di distanza dal confine del loro home-range individuale: ad alcuni individui per ogni gruppo fu permesso di percepire informazioni di natura visiva durante il tragitto, ai rimanenti individui venne impedita la visuale. I dati confermarono l'ipotesi che sia i punti di riferimento visivi (landmarks) sia l'utilizzo di una bussola solare cronometrica hanno concorso in eguale misura all'orientamento degli animali, nell'ultimo caso anche in presenza di cielo parzialmente nuvoloso, che nello specifico caso, potrebbe significare orientamento mediante luce polarizzata, infatti gli individui con l'occhio parietale coperto da vernice ridussero sensibilmente la loro performance di homing.

Un ulteriore esperimento volto a dimostrare l'esistenza di una bussola a polarizzazione è quello effettuato da Freake (1999) sullo scincide australiano *Tiliqua rugosa*. Nella prima fase sperimentale, gli animali vennero addestrati all'esterno in corridoi con pareti rialzate, avendo così accesso alla luce diffusa del cielo (quindi alla luce polarizzata) ma non alla visione diretta del disco solare. Successivamente, vennero testati in un'arena circolare, sempre posizionata outdoor, nelle stesse condizioni sperimentali: i risultati hanno mostrato un orientamento bimodale parallelo all'asse di addestramento. Nel secondo esperimento, per accertare la dipendenza delle performance orientative dalla percezione dell'E-vector, gli animali sono stati addestrati e testati in laboratorio, nello stesso apparato sperimentale utilizzato nell'esperimento outdoor e una sorgente che emetteva luce linearmente polarizzata. Al momento del test, la direzione dell'E-vector è stata ruotata di 45° rispetto all'asse di addestramento: i

risultati evidenziano il tentativo delle lucertole di seguire il cambiamento d'inclinazione dell'asse, dimostrando di sapere utilizzare la direzione dell'E-vector per orientarsi.

Nel 2001 lo stesso Freake studiò le strategie di orientamento sempre in *T. rugosa*, dislocando esemplari all'esterno del loro home-range naturale, verso una meta sconosciuta. Negli esperimenti è stato impedito ad alcuni animali di percepire informazioni di natura visiva durante il dislocamento, altri invece avevano la possibilità di percepire riferimenti visivi. Gli animali che non avevano percepito alcuna informazione visiva dimostrarono una scarsa capacità di orientamento verso casa, gli animali dell'altro gruppo invece si orientarono in maniera corretta. Tuttavia, quando le lucertole, durante lo spostamento, potevano vedere solo il cielo ma non il paesaggio circostante, dimostravano un orientamento verso casa ugualmente buono, quanto quello degli animali dislocati senza limitazioni visive. Questo ha dimostrato che le lucertole, se pur in modo ridotto, riuscivano a ricavare dalla semplice visione del cielo, anche parzialmente coperto (cioè col disco solare non visibile) le informazioni necessarie per l'orientamento verso casa, nel caso specifico questa informazione potrebbe essere proprio il pattern di polarizzazione della luce.

L'utilizzo di una bussola a polarizzazione può portare diversi vantaggi all'animale rispetto ad una bussola solare, questo perché il pattern di luce polarizzata è percepibile anche se il disco solare nuvoloso oppure oscurato da copertura vegetale, ammesso che almeno una porzione di cielo azzurro sia visibile o che il cielo non sia coperto interamente da uno spesso strato di nubi. Lucertole di piccole dimensioni, come *P. sicula*, si trovano a fronteggiare situazioni nelle quali devono ripararsi sotto la vegetazione, per esempio per nascondersi dai predatori o per termoregolarsi in giornate calde e soleggiate, allo stesso tempo hanno necessità di orientarsi all'interno e verso i loro territori o le loro tane, oppure in direzione di fonti di cibo conosciute: tutto questo può rendere altamente adattativo l'utilizzo di una bussola a polarizzazione.

Adler e Phillips (1985) e Freake (1999) ipotizzarono che la bussola a polarizzazione fosse mediata dall'occhio parietale. Questa idea è supportata da dati anatomici forniti da Hamasaki ed Eder (1977) sulla disposizione dei fotorecettori all'interno dell'occhio parietale, che, come precedentemente scritto, agevolerebbe la percezione dell'E-vector della luce polarizzata.

Fino ad ora non ci sono prove che l'occhio parietale delle lucertole svolga un ruolo funzionale nella bussola a polarizzazione. Esperimenti di campo, rispettivamente eseguiti sul sauro americano *S. Jarrovi* e su *T. rugosa*, mostrano che un occhio parietale intatto è necessario per compiere corrette performance di homing in presenza di disco solare. In *S. jarrovi* (Ellis-Quinn & Simon, 1991) le autrici dislocano gli animali a 150 m dall'home-range, coprendo alle lucertole sperimentali l'occhio parietale con pittura nera, e alle lucertole controllo pitturando solo il contorno dell'occhio parietale: i risultati hanno mostrato che gli animali sperimentali non sono stati in grado di rientrare nell'home-range, al contrario del gruppo dei controlli. Per quanto riguarda *T. rugosa* (Freaque, 2001), gli animali sono stati dislocati ad 800 metri dal loro home-range: al gruppo degli sperimentali viene coperto l'occhio parietale da un foglio di alluminio mentre l'occhio parietale del gruppo dei controlli rimane perfettamente scoperto. I risultati hanno mostrato che il gruppo delle lucertole sperimentali è stato incapace di orientarsi e di ritornare alla loro tana. In entrambi gli studi è emerso quindi che l'occhio parietale coperto, che sia da pittura o da alluminio, riduce quindi la motivazione degli animali all'homing ed ha un ruolo nel loro processo di ritorno nell'home-range e di orientamento all'interno di luoghi familiari.

Nonostante l'importanza degli esperimenti sopracitati, continuano a mancare dati certi che permettono di identificare l'occhio parietale come possibile mediatore del funzionamento di un meccanismo bussolare che sia questo solare o a polarizzazione.

In questo panorama di dati, in cui i risultati sono pochi e spesso non conclusivi, il gruppo di Etologia di Ferrara, guidato dal Prof. Augusto Foà, ha effettuato uno studio sul lacertide *Podarcis sicula*: in giornate soleggiate, all'interno di una variante del Morris water-maze posta outdoor, le lucertole saggiate hanno dimostrato di utilizzare la bussola solare (Morris, 1984; Foà *et al.*, 2009). Lo studio di Foà e colleghi denota maggiore criticità rispetto ai precedenti studi accennati fino ad ora: gli animali infatti venivano sottoposti sia al clock-shift sia alla copertura dell'occhio parietale, procedura cui nessuna delle specie di questi sauri è stata sottoposta. I risultati (Foà *et al.*, 2009) mostrarono che: 1. Le lucertole, sotto il sole e in assenza di altri segnali visivi, hanno imparato a nuotare direttamente in direzione della piattaforma nascosta; 2. L'apprendimento della corretta direzione è mediato da una bussola cronometrica; 3. E'

necessario un occhio parietale intatto per orientarsi nella direzione appresa con disco solare visibile.

L'Esperimento 1 ha avuto come scopo quello di approfondire le conoscenze relative ai meccanismi di orientamento bussolare di *P. sicula*. *In primis* indagando se questo lacertide si orienti con una bussola che usa come direzione di riferimento la coordinata azimutale ottenuta osservando il disco solare (bussola solare) oppure gli E-vectors della luce solare polarizzata (bussola a polarizzazione). Il secondo interrogativo a cui ho cercato di dare risposta è stato quello riguardante il ruolo dell'occhio parietale nel funzionamento della bussola a polarizzazione. Chiaramente il primo passo è stato quello di investigare, all'interno di un laboratorio, se la lucertola campestre riuscisse ad utilizzare una sorgente artificiale di luce linearmente polarizzata per orientarsi all'interno di un Morris water-maze. Dal momento che gli animali hanno dimostrato di avere questa capacità, siamo passati alla seconda fase sperimentale riguardante l'indagine del ruolo dell'occhio parietale in questo meccanismo orientativo: ad alcune lucertole è stato coperto l'occhio parietale per mezzo di una vernice nera e sono state saggiate sotto luce polarizzata.

2. MATERIALI E METODI

2.1. ANIMALI

Sono stati utilizzati esemplari adulti, sia di genere maschile che femminile, di *Podarcis sicula* (Rafinesque- Schmaltz, 1810).

La lucertola campestre è tra i rettili più diffusi in natura in Italia ed è soprattutto il lacertide mediterraneo con maggior capacità di propagazione e di adattamento ad ambienti diversi tra loro.

E' una lucertola eliofila e pratofila: nelle zone pianeggianti e collinari si rinviene nei prati e nei pascoli ricchi di vegetazione, nelle aree a macchia mediterranea e lungo i margini di sentieri e dirupi; nelle zone montane la si trova quasi esclusivamente ai margini dei boschi, in prossimità di muretti a secco e nei pascoli assolati. Non è raro scorgerla in zone diverse dai sopraelencati ambienti, poiché frequenta aree verdi anche notevolmente antropizzate.

Podarcis sicula è una lucertola di taglia media con corporatura robusta e testa grande e appuntita: i maschi raggiungono i 23 - 24 cm, la lunghezza dalla testa alla cloaca può raggiungere i 9 cm, mentre le femmine, di regola, sono di minori dimensioni. Le squame appaiono tondeggianti, piccole e poco carenate, con presenza di macchie azzurre o nere nella zona latero-ventrale.



Figura 2.1. Esemplare di *Podarcis sicula*. ♣

La banda occipitale è formata da macchie nere che nei soggetti di sesso maschile appaiono più evidenti e scure. Le striature dorsolaterali sono a volte continue, ma non a contatto con la zona temporale.

La parte ventrale del corpo è chiara con sfumature verdastre e con presenza di *pori femorali* negli esemplari di sesso maschile, atti a secernere un'abbondante sostanza cerosa nel periodo riproduttivo.

La colorazione dorsale è generalmente verde nei nostri esemplari, ma i caratteri cromatici sono molto variabili secondo la geonemia, ulteriore segno dell'adattabilità di tale specie.

In ambiente controllato, *P. sicula* è una specie che si presta ad una facile stabulazione: possiede facili gusti alimentari ed è soggetta a una bassa incidenza di mortalità; inoltre i suoi ritmi circadiani, oggetto di studio da decenni, sono ben noti (Foà *et al.*, 1992).

2.2. CATTURA E STABULAZIONE

Esemplari adulti di *Podarcis sicula* sono stati catturati nel periodo marzo-giugno (sotto l'autorizzazione del Parco Delta Po dell'Emilia Romagna, nei pressi dei lidi ferraresi). Dopo la cattura, sono stati immediatamente trasportati nello stabulario di Etologia dell'Università di Ferrara (longitudine 12° 21' 44"E, latitudine 45° 03' 73"N) e sistemati in terrari (100 x 55 x 52 cm di altezza) allestiti in precedenza con circa 6 cm di torba sul fondo, mattoni forati e altri arricchimenti ambientali che potessero fornire loro rifugio e spazi idonei alla termoregolazione. Acqua e cibo (larve del coleottero *Tenebrio molitor*) venivano forniti *ad libitum*.

I terrari erano tutti esposti a condizioni di un ciclo L:D corrispondenti ad un fotoperiodo naturale.

Ogni terrario era riscaldato da lampadine a incandescenza (Siccatherm 250W, Osram GmbH, Monaco, Germania) poste in una delle estremità, ad una altezza di 60-70 cm. La posizione della fonte di calore era volutamente resa asimmetrica in quanto forniva alle lucertole un vasta range di temperature, tali da effettuare una termoregolazione simile a quella che erano solite avere in condizioni naturali: la temperatura variava dai 36°C direttamente sotto la lampada, ai 22°C all'estremità opposta del terrario. Erano inoltre presenti lampadine a raggi UV, atte a stimolare la sintesi della vitamina B3, indispensabile per l'assorbimento del calcio nei Rettili.

Gli animali sono stati mantenuti in queste condizioni per tutto il corso degli esperimenti.

Lo stabulario era provvisto di un'unica piccola finestra a cui precedentemente erano stati oscurati i vetri, l'unica luce presente all'interno della stanza proveniva quindi dalle lampadine a incandescenza e dai neon.



Figura 2.2. Esempio di lucertola campestre nello stabulario del gruppo di Etologia dell'Università di Ferrara. ♣

Alla fine degli esperimenti gli animali sono stati liberati nelle loro aree d'origine, assicurandosi che la marcatura fosse completamente svanita.

2.2.2. La marcatura degli animali

Il giorno prima di iniziare la procedura di Pre-training, ogni animale veniva prima fotografato nei minimi dettagli e poi marcato nella parte inferiore, in prossimità dell'attaccatura della coda, con colori atossici resistenti all'acqua.

Il codice di riconoscimento relativo ai colori usati nella marcatura degli animali era il seguente:

B = blu

W = bianco

R = rosso

G = giallo



Figura 2.3. Esemplici di *Podarcis sicula* marcati con un codice a due colori. ♣

La marcatura era regolarmente rinnovata dagli sperimentatori in modo da rendere il riconoscimento degli animali facile e immediato. Non si sono riscontrati cambiamenti comportamentali associabili alla marcatura effettuata.

2.3. APPARATO SPERIMENTALE

Per il presente esperimento è stata utilizzata una variante del Morris water-maze (Morris, 1984). L'apparato sperimentale (Fig. 2.6.) consisteva in una vasca in PVC opaca esagonale (diagonale 182 cm – apotema 72 cm – pareti laterali 93X40 cm), sollevata da terra da sette piedi di 82 cm di altezza. Durante l'intero periodo sperimentale la vasca era riempita con circa 320 litri di acqua, per un totale di 0.32 m³ e di 15±0.5 cm di altezza della colonna d'acqua, resa opaca grazie all'aggiunta di farina fossile. La sabbia di Diatomee (Clarcel, Ceca, Honfleur, Francia) è il residuo fossile di alghe della famiglia delle diatomee e, dato l'elevato potere imbibente, è stata utilizzata per opacizzare l'acqua dell'arena, in modo tale da rendere invisibili le piattaforme sommerse.

Il tutto era mantenuto a temperatura costante (29±1°C) grazie a due resistenze da acquario (modello Tetrattec HT300, Milano, Italia). Al centro di due lati opposti, a diretto

contatto con la parete, sono state collocate le mete che gli animali in futuro avrebbero dovuto imparare a raggiungere: le due piattaforme erano di plexiglass trasparente (23.7 X 16 X 2.5 cm) con piccoli sassi di colore chiaro in corrispondenza della superficie, ed erano montate su un piedistallo (11.5 cm dal fondo) che appoggiava sul fondo della vasca.



Figura 2.4. Posizione delle piattaforme all'interno della vasca. ♣

La vasca era poi circondata da uno spesso telo di stoffa nera (190 cm di altezza), questo per evitare che gli animali, dall'interno della vasca, avessero accesso ad altri stimoli orientativi all'infuori della luce polarizzata (Fig. 2.5.).



Figura 2.5. Come appariva la struttura dall'esterno. Si può notare il telo nero che circonda la il Morris water-maze e le lampade in posizione diametralmente opposte tra di loro. ♣

In diversi lati del telo erano stati ricavati dei piccoli fori spia per facilitare gli sperimentatori nell'osservazione del comportamento animale durante i lanci, e un foro in corrispondenza del quale era stata posta una videocamera digitale (modello JVC Everio GZ-MG21E, Yokohama, Giappone), che ha permesso agli sperimentatori di documentare il comportamento di ogni singolo animale sia in fase di addestramento (Training) sia in fase di test.

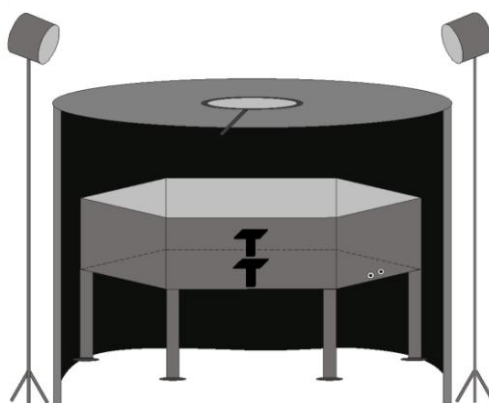


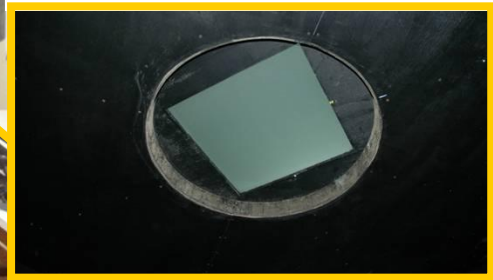
Figura 2.6. Schematizzazione della variante esagonale del Morris water-maze usato nell'esperimento. L'immagine mostra sia le due piattaforme montate sopra il loro piedistallo e collocate a diretto contatto con il centro di due lati opposti, sia il tetto di legno nero equipaggiato dal filtro polarizzatore. La tenda di stoffa nera oscurante è parzialmente rappresentata. Ulteriori dettagli sono riportati nella sezione dei Materiali e Metodi (da Beltrami *et al.*, 2010).

L'intera struttura era sovrastata da un tetto in compensato nero opaco (diametro 266 cm). Due lampade da terra (284 cm high; AEF Lighting, Ferrara, Italia), ognuna provvista di 4 lampadine a luce fredda (32 W e 1920 lumen ognuna, Atlas Lighting Co., Brescia, Italia), protrudevano di 94 cm al di sopra della struttura, ed erano poste in posizione opposta l'una all'altra. Un filtro polarizzatore (diametro 50 cm, HN42, 3M, Norwood, MA, USA) era posto su di una apertura circolare (diametro 48 cm) (Fig. 2.7.) praticata al centro del tetto. Il filtro polarizzatore era racchiuso superiormente da un vetro sabbato di 5 mm di spessore (che fungeva da diffusore) e nel lato inferiore da un foglio di vetro sempre dello spessore di 5 mm: questo ha permesso di illuminare la vasca con luce diffusa linearmente polarizzata formata da un singolo E-vector (Fig. 2.8.). La sorgente luminosa prodotta dalle lampade formava un angolo di incidenza di 45° con il piano

orizzontale contenente il filtro polarizzatore, allo scopo di illuminare uniformemente tutta l'area del Morris water-maze.



Figure 2.7.\2.8. Struttura esterna al Morris water-maze e filtro polarizzatore fotografato dall'interno della vasca. Dalla foto si notano sia il telo di stoffa che il tetto di compensato forato centralmente. La freccia indica la posizione del filtro polarizzatore. ♣



L'intensità, il grado e la direzione di polarizzazione della luce sono stati misurati dai colleghi del Dipartimento di Fisica dell'Università di Ferrara (afferenti anche all'ENEA e all'INFN) per mezzo di un luxmetro (Fig. 2.9.A, B; Konica Minolta T-10, Konica Minolta Sensing Inc., Giappone) equipaggiato da un filtro polarizzatore (PL-C, Canon Inc., Giappone) e le misurazioni sono state effettuate sul piano orizzontale a livello delle piattaforme. Non sono state riscontrate asimmetrie del pattern di illuminazione a livello dell'acqua e sulle pareti verticali del Morris water-maze (Fig. 2.9.A, B). L'illuminanza varia da 9.3 lux al centro della vasca a 6.3 lux alla periferia (Fig. 2.9.B). La rotazione del filtro polarizzatore di 90° non ha cambiato il profilo e l'intensità dell'illuminanza all'interno del Morris water-maze a livello delle piattaforme (Fig. 2.9.A ; Student t-test: $t_{36}=1.4$, $P>0.16$). Il grado di polarizzazione della luce sotto il filtro era unitario in tutti i punti della vasca in cui è stato misurato (Fig. 2.9.A). Lo spettro della luce linearmente polarizzata emessa all'interno della struttura è stato misurato da uno spettrometro operante nel Vis-NIR (Fig. 2.8.C; Ocean Optics USB 2000, Dunedin, FL, USA). Lo spettro è risultato essere tipico di una lampadina a fluorescenza con una temperatura di colore di 5500-6000K, la stessa della luce naturale. La trasmittanza spettrale (Fig. 2.9.C) del filtro polarizzatore è stato invece misurata con uno spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 900, Waltham, MA, USA). Come si può notare, il filtro emetteva luce attiva nel pieno

spettro del visibile, dove la sua trasmittanza è intorno al 35%. E' stata infine misurata la riflettanza della luce linearmente polarizzata sulle pareti del Morris water-maze per verificare l'esistenza di possibili variazioni di luminosità sulle pareti verticali del Morris water-maze (Horvath & Varjú, 2003, p. 381). Le variazioni di luminosità riscontrate sono risultate, dal punto di vista funzionale, trascurabili (<0.3 lux).

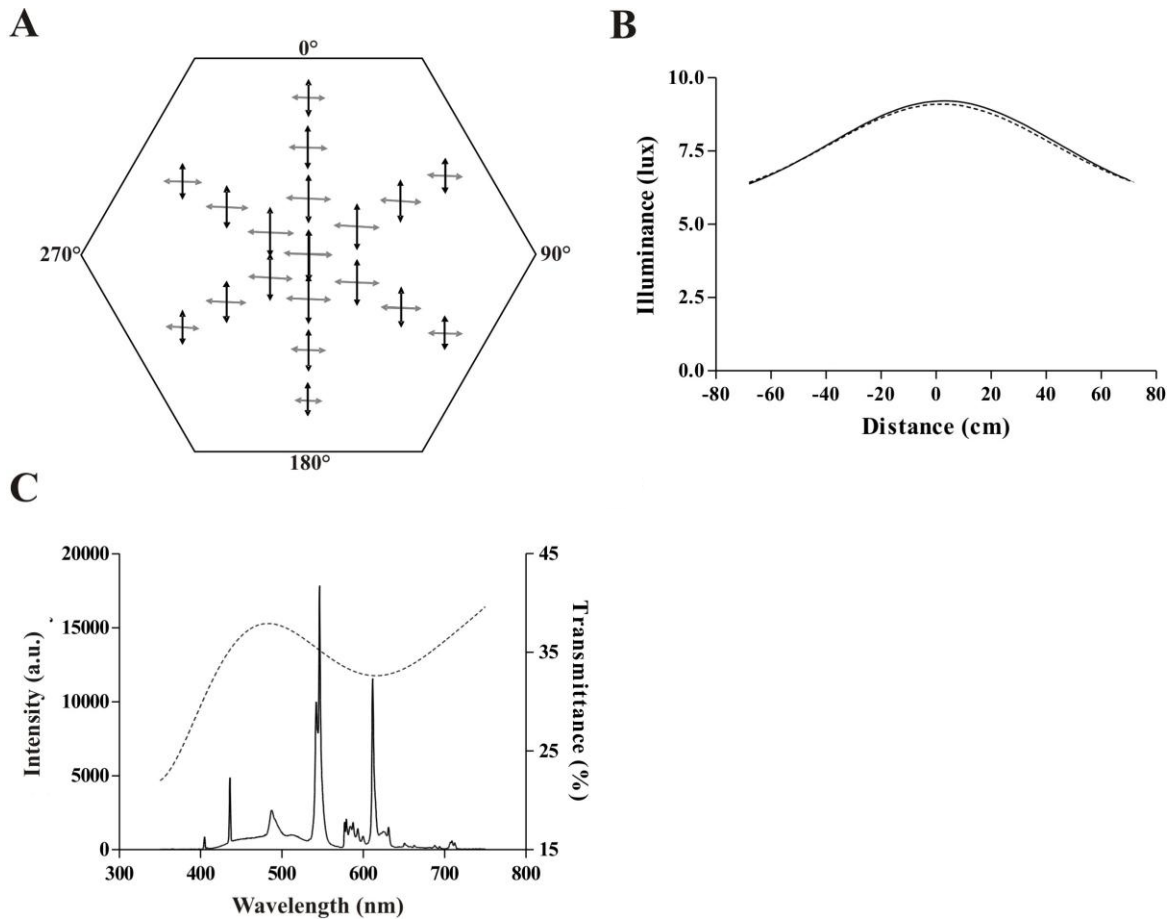


Figura 2.9.(A-C). **A.** Intensità e direzione di polarizzazione della luce, misurate lungo le tre direzioni che congiungono ogni lato della vasca esagonale al lato opposto. Ogni freccia indica la direzione della luce linearmente polarizzata (E-vector). La lunghezza di ogni freccia è proporzionale all'intensità di illuminamento (Scala: 1 mm=1.2 lux). Le frecce si riferiscono all'E-vector parallelo all'asse 0°-180° (nere) e all'E-vector perpendicolare all'asse 0°-180° (grigie). **B.** Il profilo di illuminamento come fattore dipendente dalla distanza dal centro della vasca, sia per quanto riguarda la direzione dell'E-vector parallela all'asse 0°-180° (linea continua), sia perpendicolare all'asse 0°-180° (linea tratteggiata). **C.** Intensità spettrale della luce messa dal filtro polarizzatore, misurata in entrambe le posizioni del filtro polarizzatore (linea continua) e trasmittanza spettrale del filtro polarizzatore (linea tratteggiata). (da Beltrami *et al.*, 2010).

Per altri dettagli sulla variante del Morris water-maze da noi utilizzata vedere Foà *et al.* (2009).

2.4. CONDIZIONI DI RILASCIO

Un ora prima dell'inizio degli esperimenti gli animali venivano prelevati dallo stabulario e mantenuti in due contenitori di vetro (60x24x36cm), posizionati nel laboratorio in cui si svolgeva l'attività sperimentale. Qui rimanevano per tutta la durata degli esperimenti giornalieri, allo scopo di limitare lo stress dovuto al repentino passaggio da un ambiente asciutto all'acqua, ottenendo così un miglioramento delle performance. I due contenitori sono riempiti di acqua per un quarto e all'interno di ognuna di essi, immersa di 2 ± 0.5 cm sotto il livello dell'acqua, viene collocata una griglia sostenuta da un telaio, sulla quale alloggiano gli animali in condizioni termiche costanti. L'acqua è mantenuta alla stessa temperatura di quella presente nell'arena ($29\pm 1^\circ\text{C}$).

Per effettuare il rilascio (chiamato anche "lancio") dell'animale all'interno del Morris water-maze, questo veniva prelevato dal contenitore di vetro e, dopo avergli misurato la temperatura corporea nella zona ventrale con un termometro ad infrarossi, veniva posizionato in una apposita scatola di rilascio (21x8x4 cm), dotata di coperchio. Il fondo della scatola era dotato di numerosi fori e due piccoli pesi d'ottone (125 gr) erano stati legati esternamente con un filo di nylon, in questo modo, una volta appoggiata sul pelo dell'acqua e tolto il coperchio, la scatola affondava gradualmente (circa 6-7 secondi prima che raggiungesse il fondo), permettendo così all'animale un graduale passaggio nell'acqua. La scatola con dentro l'animale veniva quindi posizionata sulla superficie dell'acqua e lo sperimentatore, dopo aver tolto il coperchio, si nascondeva velocemente sotto i bordi. Per ulteriori dettagli sulle condizioni di rilascio vedere Foà *et al.* (2009).

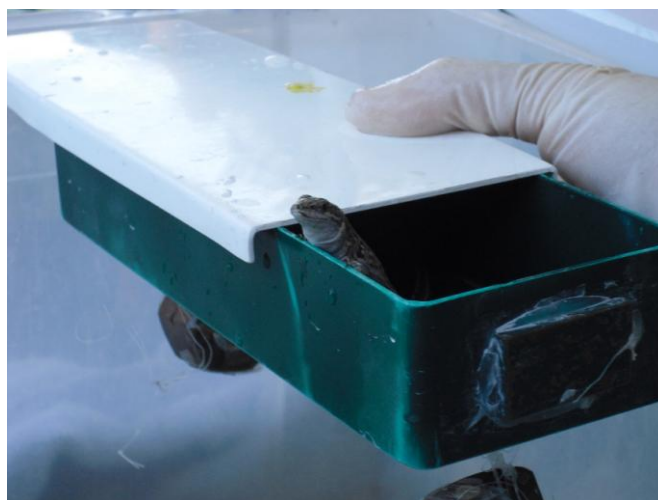


Figura 2.9. Lucertola dentro la scatola di rilascio. Quando il coperchio è chiuso l'animale è pronto per essere lanciato. ♣

2.4.1. Misurazione dell'orientamento bussolare delle lucertole

Dopo il recupero della lucertola, veniva misurata dal centro della vasca la direzione scelta dall'animale, che corrisponde al primo punto delle pareti della vasca toccato dalla lucertola stessa. La misurazione veniva effettuata utilizzando una bussola digitale (Wayfinder Outback ES, Sphere Innovative Technologies, Kingsford, NSW, Australia). Questa direzione bussolare veniva registrata come scelta direzionale della lucertola in quel preciso lancio.

2.5. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Gli esperimenti si sono svolti da giugno a ottobre tra le 9 e le 12 (ora legale).

Le lucertole sono state addestrate e testate sotto una sorgente artificiale che emetteva luce linearmente polarizzate con un singolo E-vector. Un singolo E-vector di luce polarizzata forniva alla lucertola un asse di orientamento, e non una direzione preferenziale (Freake, 1999). Il set-up di addestramento all'interno del Morris water-maze prevedeva quindi il posizionamento di due identiche piattaforme (goals) al centro di due lati opposti, direttamente a contatto con le pareti della vasca, poste lungo l'asse 0° - 180° (asse di addestramento). Se le lucertole fossero state in grado di utilizzare il singolo E-vector di luce polarizzata per orientarsi, le loro scelte direzionali sarebbero dovute risultare simmetricamente bimodalmente distribuite lungo l'asse di addestramento 0° - 180° .

Prima di iniziare la fase di Pre-training e la fase di Training gli animali sono stati divisi in due gruppi. Il gruppo PARALLELI in cui l'asse di addestramento era parallelo alla direzione dell'E-vector e il gruppo PERPENDICOLARI il cui asse di addestramento era perpendicolare alla direzione dell'E-vector, una condizione sperimentale che è stata ottenuta rotando il filtro polarizzatore di 90° .

Per ogni lucertola l'ordine di rilascio cambiava in sequenza random da una serie di lanci all'altra, sia durante la fase di Pre-training che durante la fase di Training. Ogni lucertola è stata sottoposta a 2 lanci al giorno.

2.5.1. Pre-training

Era la fase iniziale, in cui si consentiva all'animale di esplorare la vasca e di acquisire anche una chiara idea della posizione della meta e del tragitto più breve per raggiungerla. Le piattaforme erano visibili quindi emerse sopra la superficie dell'acqua.

Per ogni animale venivano effettuati 12 lanci con un crescente grado di difficoltà, indirizzandolo alternativamente ora verso l'una, ora verso l'altra piattaforma. Nello specifico: nei primi quattro lanci, la scatola di rilascio veniva posta a diretto contatto con la piattaforma; nei successivi quattro la si allontanava di circa 10 cm e, negli ultimi quattro, si posizionava la scatola al centro dell'arena. In tutti e tre i livelli di difficoltà, la scatola di rilascio era sempre rivolta verso una delle due mete.

Nel caso in cui la lucertola non riuscisse a raggiungere la piattaforma, lo sperimentatore prelevava l'animale e lo accompagnava manualmente dal centro della vasca alla piattaforma, a pelo d'acqua, con una traiettoria rettilinea. Questa procedura aveva lo scopo di evitare una maggiore causa di stress

2.5.2. Training

In questa fase il livello dell'acqua veniva innalzato in modo da sommergere le due piattaforme di qualche centimetro in modo da renderle invisibili all'animale.

Il lancio consisteva sempre nel posizionare la scatola al centro dell'arena, indirizzandola in una direzione ogni rilascio differente. Il percorso diretto dal centro della vasca al centro di uno dei lati meta (parete contenete una delle piattaforme) misurava 77 cm. Per evitare la presenza di irregolarità nel campo visivo delle lucertole che potessero condizionare il loro orientamento, dopo ogni lancio le pareti della vasca venivano accuratamente pulite e asciugate.

Per poter stabilire un criterio di apprendimento, superato il quale le lucertole potessero essere testate, ad ogni punto del perimetro della vasca è stato attribuito un punteggio (Fig. 2.1.1.). Le lucertole che raggiungevano uno dei due goals ($\pm 5^\circ$ dalle piattaforme) senza aver toccato altri punti della vasca, ottenevano 1.5 punti e venivano premiate con un immediato abbassamento del livello dell'acqua, che faceva emergere la piattaforma velocemente (5 - 6 secondi). Come rinforzo positivo per la corretta performance orientativa, l'animale veniva lasciato all'asciutto sulla piattaforma per circa 30 secondi, prima di essere recuperato con un retino.

Se la lucertola toccava uno dei due lati meta (lati in cui è presente la piattaforma) ma non la piattaforma stessa, otteneva 1 punto.

Nel caso in cui l'animale toccasse i lati adiacenti ai lati meta nei 15° più prossimi ad essi, otteneva 0.5 punti.

Le uniche performance orientative che venivano premiate erano quelle che conseguivano 1.5 punti.

Tutti gli altri possibili punti toccati lungo il perimetro della vasca corrispondevano ad un punteggio pari a 0. In questo caso la lucertola veniva lasciata libera di nuotare nella vasca per circa 20 secondi e successivamente portata sulla piattaforma dallo sperimentatore, una procedura già introdotta nella precedente fase di Pre-training. Durante il rilascio era possibile che la lucertola mostrasse comportamenti anomali, quali nuotare in cerchio, oppure affondare insieme alla scatola: in tutte queste situazioni la scelta direzionale dell'animale veniva scartata, e il lancio veniva ripetuto.

Per ulteriori dettagli sulla procedura della fase di Training vedere Foà *et al.* (2009).

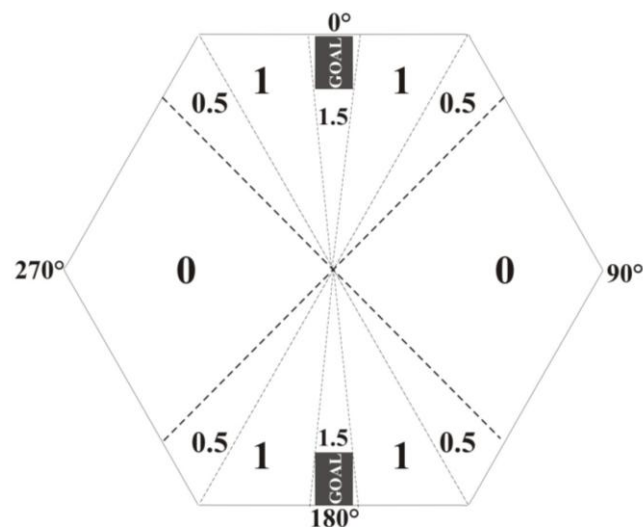


Figura 2.1.1. Rappresentazione del Morris water-maze con i punteggi relativi ad ogni porzione del perimetro (da Beltrami *et al.*, 2010).

2.5.3. Criterio di apprendimento

Veniva considerato meritevole chi raggiungeva un minimo di 6 punti in 6 lanci consecutivi, con al massimo 1 solo lancio dal punteggio $\leq 0,5$ e nell'ultimo rilascio un punteggio $\geq 0,5$. Il numero dei lanci di Training non era dunque fisso, ma dipendeva dalla capacità individuale di apprendimento. Le lucertole che non raggiungevano il criterio di apprendimento venivano escluse dagli esperimenti.

2.5.4. Test con E-vector ruotato

Gli animali che avevano raggiunto il criterio di apprendimento sono stati testati per capire se avessero imparato ad orientarsi lungo l'asse di addestramento utilizzando la

direzione dell'E-vector della luce polarizzata. A questo scopo sia le lucertole del gruppo dei PARALLELI che quelle del gruppo degli SPERIMENTALI sono state testate dopo aver ruotato il filtro polarizzatore, quindi la direzione dell'E-vector, di 90° rispetto alla direzione dell'E-vector in fase di Training.

Sia il gruppo dei PARALLELI che il gruppo dei PERPENDICOLARI erano attesi orientarsi lungo un asse perpendicolare rispetto all'asse di addestramento. Per ogni lucertola di entrambi i gruppi il test consisteva in un singolo rilascio eseguito in assenza di piattaforme.

2.5.5. Refreshing training

Successivamente al test con E-vector ruotato, le lucertole sono state sottoposte ad una seconda sessione di training che consisteva in due rilasci in presenza di piattaforme, posizionate sempre lungo l'asse 0°-180°. Come nella precedente fase di Training, il gruppo dei PARALLELI è stato addestrato con E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°) mentre il gruppo dei PERPENDICOLARI è stato addestrato con E-vector perpendicolare all'asse di addestramento (0°-180°). Solo le lucertole che ottenevano un punteggio ≥ 1.0 in entrambi i rilasci venivano ammesse al seguente test, che aveva l'obiettivo di verificare il ruolo dell'occhio parietale nel percepire l'E-vector della luce polarizzata.

2.5.6. Test con Occhio Parietale coperto (PAR-P)

Dodici lucertole appartenenti al gruppo dei PARALLELI e 17 lucertole appartenenti al gruppo dei PERPENDICOLARI sono state ammesse al test. Per ogni gruppo la direzione dell'E-vector era la stessa che durante il training. Un ora prima del test, agli animali veniva coperto l'occhio parietale da uno strato di lacca nera atossica (Craft color, Bologna, Italy) (Fig. 2.1.2.B), grazie all'ausilio di un sottile pennello. Per ogni lucertola il test consisteva in un unico rilascio in assenza di piattaforme.

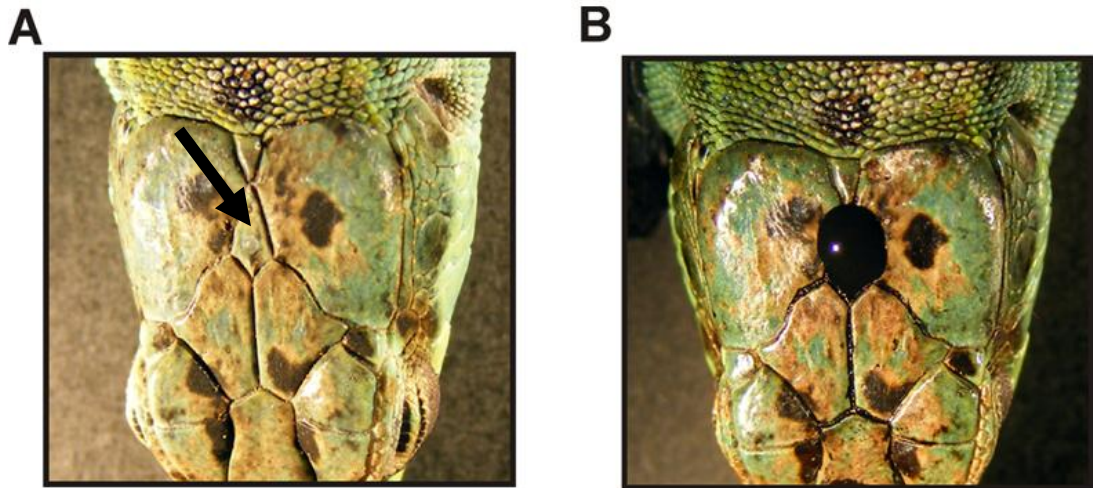


Fig. 2.1.2. Superficie dorsale della testa di una lucertola campestre. **A.** La freccia nera indica l'occhio parietale. **B.** Lucertola PAR-P con l'occhio parietale e la squama parietale coperti da vernice nera. ♣

2.5.7. Test di Controllo

Un ulteriore gruppo di lucertole è stato addestrato con E-vector parallelo all'asse di addestramento. Prima del test il filtro polarizzatore è stato rimosso dal tetto della struttura, ma si è provveduto a mantenere inalterate le condizioni di illuminamento all'interno dell'apparato sperimentale, producendo quindi luce diffusa ma non polarizzata. Per ogni animale il test consisteva in un unico rilascio in assenza di piattaforme.

2.6. ANALISI DATI E STATISTICA

Ogni distribuzione di scelte direzionali compiute dalle lucertole nella varie fasi sperimentali è stata valutata attraverso i metodi della statistica circolare (Batschelet, 1981; Zar, 1999).

I risultati mostrano che nella maggior parte dei test e durante il training l'orientamento degli animali mostra una distribuzione simmetricamente bimodale, questo perché, come già detto precedentemente, l'E-vector della luce polarizzata forniva un asse di orientamento e non una direzione preferenziale (Freake, 1999). In questi casi, quindi quando una distribuzione appare essere centralmente o diametralmente simmetrica, il raggio sarà zero o prossimo allo stesso: tale valore risulta ingannevole dato che, visivamente, esiste una direzionalità dei dati (Batschelet, 1981, p.17; Zar, 1999,

p. 607). L'unico modo per riuscire ad analizzare correttamente i dati di distribuzioni simmetriche bimodali è quello di duplicare ogni singola scelta direzionale (angolo), in modo da ottenere distribuzioni unimodali su cui è possibile finalmente applicare i test statistici (Batschelet, 1981). In studi precedenti la regola della duplicazione degli angoli era già stata applicata ogni qual volta si riscontrava che le distribuzioni delle scelte direzionali erano chiaramente bimodali, come per esempio in Adler e Phillips (1985), Freaque (1999), Wiltschko e Wiltschko (2001), Muheim *et al.* (2007). Nella procedura della duplicazione degli angoli, ogni angolo (direzione) scelto dall'animale è stato duplicato e riportato a modulo 360° . Di conseguenza, sono stati duplicati gli angoli (ovvero le direzioni scelte dagli animali) sia della fase di training (di cui è stato considerato l'ultimo lancio) sia nella fase di tests, per cui sono state impostate due diverse direzioni attese: 0° (per il training, per il test con occhio parietale coperto e per il test di controllo) e 90° (per il test con E-vector ruotato). Le nuove scelte direzionali ottenute sono state utilizzate poi per creare i vettori medi dei vari gruppi. I vettori medi sono così descritti da due parametri: r che rappresenta la lunghezza del vettore medio e α che invece rappresenta la direzione del vettore medio. Il valore r di ogni grafico rappresenta il raggio (r) ed indica la misura della concentrazione delle singole scelte direzionali, cioè il valore rappresentativo della proporzionalità inversa all'ammontare della dispersione dei dati. Questo valore infatti varia da 0 (gli angoli risultano talmente dispersi da non permettere il delinearsi di una direzionalità media) a 1 (tutti i dati appaiono visivamente concentrati in una sola direzione).

Sui dati delle varie distribuzioni unimodali sono stati eseguiti poi i seguenti test statistici (Batschelet, 1981):

➤ Il **Rayleigh Test (Z)**, analizza se la distribuzione delle scelte direzionali è significativamente diversa da una distribuzione casuale oppure se esiste una direzione media preferenziale di orientamento.

➤ Il **V- TEST (u)**, ha lo stesso obiettivo del Rayleigh Test con il valore aggiunto dell'inserimento a priori della direzione attesa.

➤ Il **Watson U² Two-Sample Test (per dati indipendenti)**, verifica se due distribuzioni (es. gruppo dei PARALLELI e gruppo dei PERPENDICOLARI) siano o meno significativamente diverse fra loro.

- Il **Paired Hotelling Test (per dati appaiati)**, confronta l'andamento di due distribuzioni di dati dipendenti tra loro e stabilisce la presenza di differenze tra distribuzioni.
- L' **Homeward component (HC)**, valore che indica quanto il vettore medio è orientato verso la direzione attesa.

3. RISULTATI

3.1. ULTIMO LANCIO DI TRAINING (FIG. 3.1.A, E)

Quindici di 26 lucertole appartenenti al gruppo dei PARALLELI, e 17 di 29 lucertole appartenenti al gruppo degli SPERIMENTALI hanno raggiunto il criterio di apprendimento. Non c'erano differenze statisticamente significative tra animali del gruppo dei PARALLELI e animali del gruppo dei PERPENDICOLARI nel numero di lanci necessari per raggiungere il criterio (PARALLELI: 19.04 ± 1.55 ; PERPENDICOLARI: 18.94 ± 1.50 (mean \pm SEM); Student t-test: $t_{39}=0.04$, $P>0.95$). Come ci attendevamo, ogni gruppo ha mostrato scelte direzionali simmetricamente distribuite lungo l'asse di addestramento (0° - 180°). Dopo la duplicazione degli angoli, le distribuzioni di entrambi i gruppi (PARALLELI e PERPENDICOLARI), formate dalle scelte direzionali nell'ultimo lancio di Training, sono risultate significativamente diverse da distribuzioni casuali (Rayleigh test: $Z=12.46$, $P<0.001$, e $Z=15.18$, $P<0.001$, rispettivamente).

Nell'ultimo lancio di Training le scelte direzionali del gruppo dei PARALLELI sono risultate significativamente differenti da quelle del gruppo dei PERPENDICOLARI (Watson U^2 test: $U^2_{15,17}=0.038$, $P>0.50$).

3.2. TEST CON E-VECTOR RUOTATO (FIG. 3.1.B, F)

Quando testate con E-vector ruotato di 90° rispetto alla fase di Training, le scelte direzionali delle lucertole si sono simmetricamente distribuite lungo l'asse 90° - 270° . Dopo la duplicazione degli angoli, la distribuzione di scelte direzionali del gruppo dei PARALLELI è risultata diversa da una distribuzione casuale ($N=15$; Rayleigh test: $Z=4.48$, $P<0.01$) e i limiti di confidenza al 95% (34° - 146°) includevano la direzione attesa (90°); lo stesso vale per il gruppo dei PERPENDICOLARI ($N=17$; Rayleigh test: $Z=7.16$, $P<0.001$) e anche in questo caso i limiti di confidenza al 95% (35° - 107°) includevano la direzione attesa (90°).

La distribuzione delle lucertole del gruppo dei PARALLELI è risultata poi statisticamente differente da quella degli stessi animali nell'ultimo lancio di training prima della rotazione dell'E-vector (Hotelling test for paired data: $F_{2,13}=15.93$, $P<0.0005$); lo stesso vale anche per il gruppo dei PERPENDICOLARI (Hotelling test for paired data: $F_{2,15}=17.66$, $P<0.0005$). Dopo la rotazione, le scelte direzionali delle

lucertole del gruppo dei PARALLELI non sono risultate statisticamente diverse da quelle delle lucertole del gruppo dei PERPENDICOLARI (Watson U^2 test: $U^2_{15,17}=0.029$, $P>0.50$).

3.3. REFRESHING TRAINING (FIG. 3.1.C, G)

Dodici di 15 lucertole del gruppo dei PARALLELI e tutte e 17 lucertole del gruppo dei PERPENDICOLARI hanno ottenuto un punteggio ≥ 1 in entrambi i lanci del refreshing training: le distribuzioni del secondo lancio del refreshing training sono risultate diverse da distribuzioni casuali (Rayleigh test: $Z=10.0$, $P<0.001$, and $Z=10.53$, $P<0.001$, rispettivamente). Per quanto riguarda il gruppo dei PARALLELI, confrontate con il lancio di test con E-vector ruotato, le scelte direzionali degli stessi animali nel secondo lancio del refreshing training sono risultate significativamente differenti (Hotelling test for paired data: $F_{2,10}=16.16$, $P<0.001$); lo stesso vale anche per gli animali del gruppo dei PERPENDICOLARI (Hotelling test for paired data: $F_{2,15}=13,25$, $P<0.0005$).

Nel refreshing training le scelte direzionali dei PARALLELI sono risultate statisticamente differenti da quelle dei PERPENDICOLARI (Watson U^2 test: $U^2_{12,17}=0.025$, $P>0.50$).

3.4. TEST CON OCCHIO PARIETALE COPERTO (PAR-P) (FIG. 3.1.D, H)

Le scelte direzionali nel test con occhio parietale coperto sia del gruppo dei PARALLELI (N=12) sia del gruppo dei PERPENDICOLARI (N=17) non differivano dall'essere uniformi (Rayleigh test: $Z=0.96$, $P>0.20$, and $Z=0.81$, $P>0.20$, rispettivamente).

3.5. TEST DI CONTROLLO (FIG. 3.2.A, B)

Un nuovo gruppo di 18 lucertole è stato attribuito al gruppo dei PARALLELI e sottoposto alla solita procedura di training. Nove lucertole hanno raggiunto il criterio di apprendimento, e le loro scelte direzionali sono apparse distribuite in modo simmetrico bimodale lungo l'asse di addestramento (0° - 180°). Dopo la duplicazione degli angoli la distribuzione delle scelte direzionali nell'ultimo lancio di training è risultata diversa da una distribuzione casuale (Rayleigh test: $Z=6.85$, $P<0.001$).

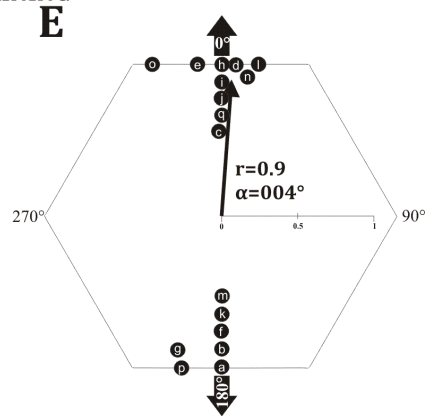
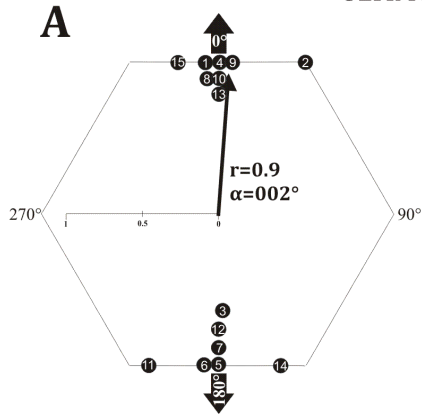
Dopo che il filtro polarizzatore è stato rimosso dal tetto dell'apparato sperimentale, la distribuzione delle scelte direzionali degli animali nel lancio del test di controllo è risultata sia del tutto simile ad una distribuzione casuale (Rayleigh test: $Z=0.69$, $P>0.50$), sia significativamente diversa dalla distribuzione delle scelte direzionali degli stessi animali nell'ultimo lancio di training (Watson U^2 test: $U^2_{9,9}=0.37$, $P<0.002$).

Figura 3.1.(A-H). Orientamento di lucertole con l'occhio parietale intatto e coperto, addestrate e testate sotto una sorgente artificiale di luce linearmente polarizzata con un singolo E-vector. Negli esagoni che richiamano la variante del Morris water-maze utilizzato sono riportati le scelte direzionali reali individuali di ogni animale, mentre il calcolo del vettore di I ordine è stato compiuto sui dati duplicati. Ogni simbolo indica la scelta direzionale di un singolo animale identificato dal suo numero (**GRUPPO PARALLELI**) o dalla sua lettera alfabetica (**GRUPPO PERPENDICOLARI**). In ogni esagono la freccia interna rappresenta il vettore medio del gruppo calcolato dopo la duplicazione degli angoli. La lunghezza (r) e la direzione (α) del vettore medio del gruppo sono riportati all'interno dell'esagono. I vettori medi rappresentati da una linea continua rappresentano una distribuzione non casuale, i vettori medi rappresentati da una linea tratteggiata indicano invece una distribuzione uniformemente distribuita. Per ogni esagono, sono rappresentate due frecce esterne: in **A**, **C**, **E** e **G** segnano l'asse di orientamento atteso in training (0° - 180°), e in **D** e in **H** l'asse di orientamento atteso delle lucertole PAR-P nel lancio di test (0° - 180°). Le due frecce esterne rappresentate negli esagoni **B** e **F** indicano invece l'asse di orientamento atteso nei lanci di test con E-vector ruotato di 90° (90° - 270°).

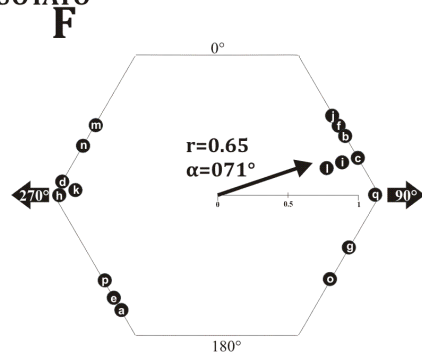
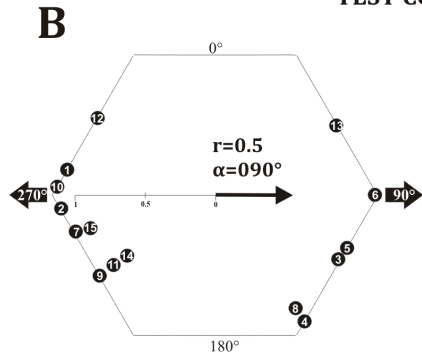
GRUPPO PARALLELI

GRUPPO PERPENDICOLARI

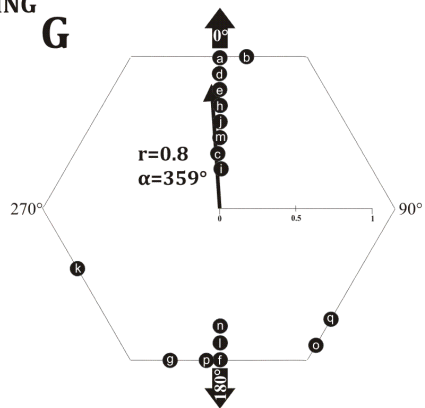
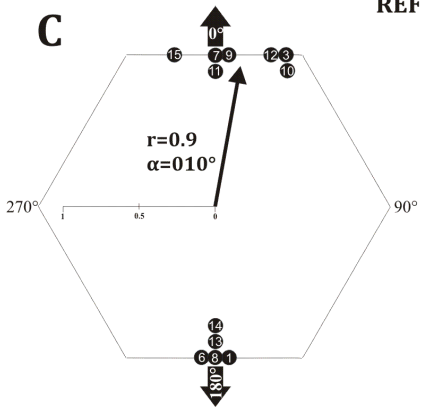
ULTIMO LANCIO DI TRAINING



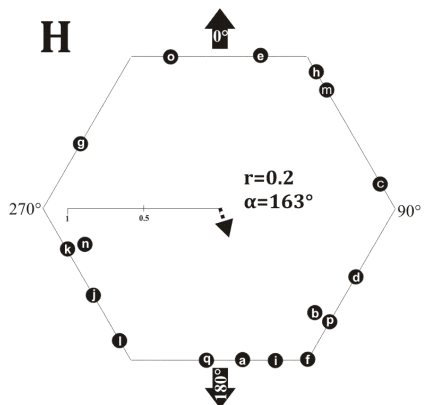
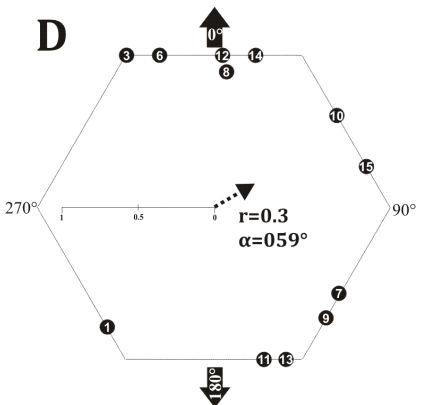
TEST CON E-VECTOR RUOTATO



REFRESHING TRAINING



TEST PAR-P



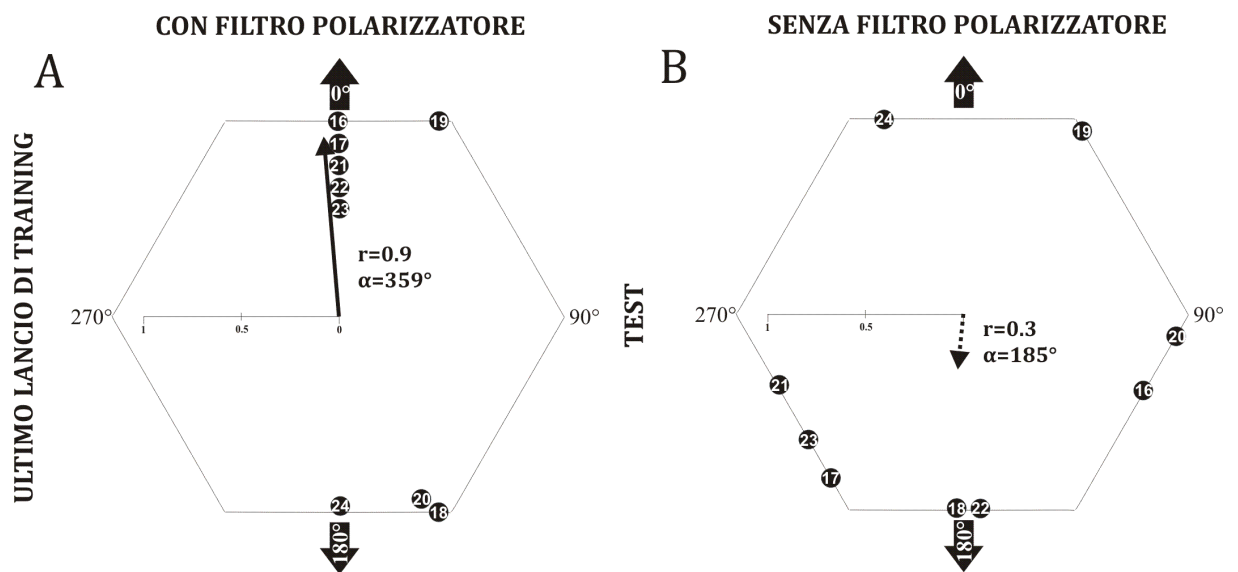


Figura 3.2.(A-B). (A) Orientamento di lucertole con l'occhio parietale intatto addestrate sotto una sorgente artificiale di luce linearmente polarizzata e con E-vector parallelo all'asse di addestramento (0° - 180°). (B) Orientamento delle stesse lucertole dopo aver rimosso il filtro polarizzatore. Esternamente ad ogni esagono sono rappresentate due frecce rappresentanti l'asse di orientamento atteso (0° - 180°) sia nell'ultimo lancio di Training che nel lancio di test. Per ulteriori informazioni vedere Fig. 3.1.

4. DISCUSSIONE

I presenti esperimenti hanno esaminato, per la prima volta nella storia degli studi sui meccanismi di orientamento, se la lucertola campestre *P. sicula* è in grado di orientarsi utilizzando l'E-vector della luce polarizzata. A questo scopo, l'orientamento degli animali è stato testato indoor, sotto una sorgente artificiale che produceva luce linearmente polarizzata con un singolo E-vector.

Gli esemplari di *P. sicula* sono stati addestrati a raggiungere due piattaforme, poste lungo l'asse di addestramento (0° - 180°), nascoste sotto il pelo dell'acqua e poste al centro di due lati opposti di una variante esagonale del Morris water-maze (Fig. 2.3.1.). Per quanto riguarda animali che hanno raggiunto il criterio di apprendimento, la distribuzione delle scelte direzionali del loro ultimo lancio di training era simmetricamente (bimodalmente) distribuita lungo l'asse di addestramento (0° - 180°), dimostrando quindi che le lucertole riuscivano ad apprendere l'asse di addestramento (Fig. 3.1.A, E).

Alcune prove supportano l'ipotesi che le lucertole abbiano utilizzato l'E-vector della luce polarizzata per l'orientamento: 1. Dopo una rotazione di 90° della direzione dell'E-vector l'orientamento degli animali è ruotato conseguentemente, generando così un orientamento bimodale perpendicolarmente all'asse di addestramento (Fig. 3.1.B, F); 2. Dopo che la direzione dell'E-vector è tornata parallela all'asse di addestramento per effettuare il refreshing training, l'orientamento degli animali ha seguito l'ulteriore rotazione del filtro polarizzatore, allineandosi ancora una volta con l'asse di addestramento (0° - 180°) (FIG. 3.1.C, G); 3. La deviazione di 90° dell'orientamento degli animali è dovuto alla rotazione di 90° dell'E-vector, e non a una modificazione del pattern o dell'intensità dell'illuminazione a seguito della rotazione del filtro polarizzatore, infatti le variazioni dell'intensità luminosa dovuti alla rotazione del filtro sono risultate insignificanti (Fig. 2.8.A); 4. L'eliminazione del filtro polarizzatore ha indotto il totale disorientamento delle lucertole: ciò dimostra inequivocabilmente che in assenza di luce polarizzata non vi erano segnali orientativi che potessero influenzare le scelte direzionali delle lucertole all'interno del Morris water-maze (Fig. 3.2.B)

Complessivamente i risultati dell'Esperimento 1 hanno confermato quanto scoperto in altre specie, come *U. notata* o *T. rugosa*, cioè che le lucertole sono in grado di utilizzare l'E-vector della luce polarizzata per l'orientamento direzionale (Adler & Phillips, 1985;

Freake, 1999). I risultati finora ottenuti però non sono in grado di provare direttamente che le lucertole utilizzino, in ambiente naturale, una bussola a polarizzazione regolata da un meccanismo cronometrico, ma dimostrano inequivocabilmente l'esistenza in diverse specie di rettili dei meccanismi sensoriali e cognitivi necessari per il funzionamento di una bussola a polarizzazione.

Il secondo step di questa parte sperimentale è stato pianificato allo scopo di rispondere alla domanda ancora aperta riguardo alla capacità di *P. sicula* di orientarsi grazie all'E-vector di luce polarizzata fosse mediata dall'occhio parietale. A questo scopo, le lucertole che hanno imparato ad orientarsi lungo l'asse di addestramento (0°-180°) sono state testate, sempre all'interno del Morris water-maze, e sotto la sorgente di luce polarizzata, con l'occhio parietale coperto da uno strato di lacca nera. Gli animali sono risultati disorientati (Fig. 3.1.D, H) e la loro prestazione è stata indistinguibile da quella delle lucertole testate in assenza di filtro polarizzatore ma con l'occhio parietale intatto (Fig. 3.2.B). In altre parole, rendere inattivo l'organo sensoriale (l'occhio parietale) ha gli stessi effetti comportamentali di eliminare lo stimolo orientante (luce polarizzata).

Dal momento che il disorientamento a seguito della copertura dell'occhio parietale è dovuto all'interruzione del meccanismo orientamento, l'implicazione di un effetto aspecifico, come una ridotta motivazione oppure un disequilibrio nella termoregolazione, sembra improbabile, al contrario di quanto asseriscono Ellis-Quinn e Simon (Ellis-Quinn & Simon, 1991) e Freake (Freake, 2001). Nei nostri esperimenti, le lucertole venivano tenute a una temperatura costante in ogni fase sperimentale, così da impedire loro di termoregolare. Considerando tutto questo, è importante sottolineare come i presenti esperimenti dimostrino per la prima volta che l'occhio parietale delle lucertole giochi un ruolo centrale nel mediare il funzionamento di una bussola a polarizzazione.

Studi precedenti hanno dimostrato, nelle lucertole, il ruolo centrale dell'occhio parietale in esperimenti di campo effettuati in presenza di disco solare (Ellis-Quinn & Simon, 1991; Freake, 2001). In entrambi gli esperimenti le lucertole, testate in giornate soleggiate, fuori dal loro home-range, sono apparse disorientate quando gli veniva coperto l'occhio parietale o con una benda (*T. rugosa*) o con una pittura nera (*S. jarrovi*). Studi precedenti, eseguiti dal Gruppo di Etologia dell'Università di Ferrara, in cui è stato utilizzato outdoor il Morris water-maze, hanno confermato il ruolo centrale dell'occhio

parietale nella lucertola campestre nell'orientamento in presenza di disco solare (Foà *et al.*, 2009).

Dal momento che coprire l'occhio parietale (con una lacca nera, nel caso dei nostri esperimenti) impedisce all'animale di percepire la luce non solo a livello dell'occhio parietale ma, almeno in parte, anche a livello della ghiandola pineale e dei fotorecettori cerebrali profondi (Pasqualetti *et al.*, 2003; Bertolucci & Foà, 2004), ulteriori esperimenti effettuati outdoor all'interno del Morris water-maze sono stati realizzati allo scopo di confrontare l'orientamento delle lucertole il cui occhio parietale era stato coperto da uno strato di lacca nera con lucertole il cui occhio parietale era stato ablato, ma pineale e fotorecettori cerebrali profondi erano chiaramente intatti e pervii. Entrambi i gruppi sperimentali sono risultati disorientati e incapaci di raggiungere la piattaforma sommersa, dimostrando per la prima volta che unicamente l'occhio parietale è coinvolto nell'orientamento di *P. sicula* (Foà *et al.*, 2009).

Alla luce dei presenti risultati è necessario attribuire il disorientamento delle lucertole testate in presenza di disco solare con l'occhio parietale coperto o ablato, alla conseguente perdita del funzionamento della loro bussola solare oppure della bussola a polarizzazione. Infatti ci sono diverse prove che l'occhio parietale possa anche mediare il funzionamento della bussola a solare, basata sulla percezione dell'azimut del sole.

Prima di tutto, in tutti gli esperimenti precedentemente citati in cui veniva coperto o ablato l'occhio parietale, le lucertole risultavano disorientate, nonostante che il sole fosse completamente visibile e i loro occhi laterali fossero pervii e funzionanti. Inoltre, nei nostri precedenti esperimenti outdoor, le lucertole venivano testate in estate, nella parte centrale della giornata, all'interno del Morris water-maze circondato da un'alta paratia (Foà *et al.*, 2009): in questa situazione agli animali era permesso vedere solo una piccola parte del cielo attorno allo zenit, e a quell'ora del giorno, quando la luce solare che colpiva direttamente l'occhio parietale era al minimo grado di polarizzazione (il massimo grado di polarizzazione è presente ad una distanza angolare di 90° dal sole, e quindi, nelle ore centrali della giornata, la BMP si trova vicino all'orizzonte).

Tutto questo è ampiamente a sostegno dell'ipotesi che l'occhio parietale svolga un ruolo centrale non solo nel mediare il funzionamento di una bussola a polarizzazione, ma anche nel mediare una bussola solare basata sulla individuazione dell'azimut solare.

Lo studio dei meccanismi di percezione della luce polarizzata comporta diverse difficoltà, una delle quali è sicuramente progettare un apparato sperimentale in cui sia possibile controllare le numerose variabili che comporta l'utilizzo di luce polarizzata, sia che questa sia prodotta da un filtro polarizzatore o che si stia invece utilizzando il pattern naturale di polarizzazione della luce. Grazie alla collaborazione con i colleghi del Dipartimento di Fisica dell'Università di Ferrara siamo riusciti ad ottenere un apparato ottimale per lo studio dei meccanismi di percezione della luce polarizzata in *P. sicula*. Il test di controllo dimostra proprio che l'unico stimolo orientante all'interno dell'apparato sperimentale era proprio il piano di luce polarizzata perché in assenza di questo gli animali erano completamente incapaci di orientarsi correttamente.

Esperimento 2

**“BUSSOLA A POLARIZZAZIONE IN
Podarcis sicula: SOLO ALCUNE
LUNGHEZZE D’ONDA SONO
COINVOLTE”**

1. INTRODUZIONE

L'utilizzo del piano di polarizzazione della luce nell'orientamento bussolare è già stato dimostrato in diverse specie, sia fra gli invertebrati sia fra i vertebrati (vedi Introduzione della Parte Sperimentale I) e in alcune di queste gli studi hanno raggiunto un livello di approfondimento notevole, andando a fornire le prove di una sensibilità maggiore nel percepire la luce polarizzata ad alcune lunghezze d'onda rispetto che ad altre.

I primi studi in merito sono stati condotti sull'ape europea (*Apis mellifera*) da von Frisch (1949, 1967), che ha scoperto sia che questa specie è in grado di utilizzare la luce polarizzata per orientarsi, sia che la percezione avviene principalmente nel range dell'Ultravioletto (UV - 400 nm) e marginalmente nel range del Blu (450 nm). Von Frisch decise di riprendere gli studi condotti da Santschi nel 1911 sulle formiche del genere *Messor* e di applicarli ad un suo progetto di ricerca sull'ape europea. Gli esperimenti, i cui risultati inizialmente non furono incoraggianti, subirono una svolta grazie alla collaborazione con il fisico Benndorf, che permise a von Frisch di introdurre nei propri esperimenti un filtro polarizzatore nel punto in cui l'ape compiva la danza di reclutamento. La modificazione della luce prodotta dal filtro polarizzatore provocò un cambiamento nella danza dell'insetto, dimostrando che le api sono sensibili alla polarizzazione e che probabilmente possiedono un meccanismo di percezione bussolare cronometrico che sfrutta sia il pattern naturale di luce polarizzata, sia l'azimut del sole.

La domanda rimasta in sospeso è: come fanno gli animali a rilevare la posizione del sole anche se hanno a disposizione solo un piccolo lembo di cielo azzurro? Fu logico pensare che ci fossero delle basi neurofisiologiche e comportamentali che spiegassero la percezione di proprietà fisiche ed elettromagnetiche della luce solare e della volta celeste.

E' infatti noto che le api sono totalmente insensibili a lunghezze d'onda superiori a 650 nm (cioè ai confini tra il range del rosso e il range dell'arancio), ma riescano a percepire molto bene la luce a 400 nm (UV) (von Frisch, 1967). Questo perché, nelle loro perlustrazioni alla ricerca del cibo, sono agevolate della percezione di raggi a bassa lunghezza d'onda: molti fiori che a noi appaiono uniformemente gialli infatti posseggono presso il nettare delle aree che riflettono l'ultravioletto che fungono da richiamo-guida alle api bottinatrici.

Circa a metà degli anni '50 del secolo scorso Stockhammer (1956) fu il primo ad ipotizzare che gli insetti fossero in grado di percepire una direzione di E-vector della luce polarizzata grazie a fotorecettori dicroici che si trovano in una particolare area dei loro occhi composti, la DRA (dorsal rim area).

In molte specie di insetti la percezione della polarizzazione della luce è infatti mediata da un gruppo di ommatidi anatomicamente e fisiologicamente specializzati, situati in una stretta area sul bordo dorsale (DRA) degli occhi composti (Horvath & Varjú, 2003, p. 53). Gli ommatidi contengono diversi sets di fotorecettori che a seconda della specie percepiscono la luce in particolari range dello spettro solare.

Da esperimenti effettuati da Duelli e Wehner (1973) è emerso che anche la formica del deserto *Cataglyphis bicolor* percepisce la luce polarizzata nel range dell'UV e la utilizza per l'orientamento. E' stato infatti dimostrato che questa specie è in grado di utilizzare la luce polarizzata solo se la lunghezza d'onda è compresa tra i 380 nm e i 410 nm, indipendentemente dal fatto che il disco solare sia visibile o meno.

Anche studi effettuati su uno scarabeo del genere *Lethrus* hanno dimostrato che questo insetto utilizza il range dell'UV per percepire la luce polarizzata (Frantsevich *et al.*, 1977).

Diversi esperimenti hanno inoltre accertato che diverse specie, grilli del genere *Acheta* e del genere *Gryllus* (Zufall *et al.*, 1989; Blum & Labhart, 2000), animali crepuscolari e notturni, percepiscono la luce polarizzata nel range del blu.

Scarabei dei generi *Melolontha* e *Parastizopus*, (Labhart *et al.*, 1992; Bisch, 1999) sono invece risultati sensibili alla lunghezza d'onda del verde (550 nm).

Come mai esistono animali che percepiscono esclusivamente un determinato range di lunghezze d'onda piuttosto che un altro? Esiste una spiegazione evoluzionistica?

Zufall (1989) spiegò che la combinazione della percezione della luce nel range del blu\verde e della luce polarizzata ad opera dei DRA potesse essere un adattamento adottato dagli insetti crepuscolari, attivi esclusivamente a bassissime intensità di luce (all'alba o al tramonto). All'opposto, gli insetti puramente diurni (api, formiche del deserto, ecc...) risultano essere sensibili ai raggi ultravioletti poiché usano prevalentemente i fotorecettori deputati alla percezione degli UV.

Nella classe dei Pesci, il pesce damigella *Chromis viridis* (Mussi *et al.*, 2005) percepisce la luce polarizzata nel range dell'UV. La funzione di questo meccanismo di

percezione non sembra essere solo quella dell'orientamento direzionale, infatti in ambiente acquatico la polarizzazione della luce viene utilizzata da alcune specie per sfuggire ai predatori e per cacciare il cibo. Entrano infatti in gioco dei meccanismi di riflessione a diverse profondità che impediscono all'animale, che sia preda o predatore, di essere individuato.

Per quanto riguarda gli Anfibi, importante è lo studio effettuato da Adler (1976) che dimostra che sia l'organo frontale che la ghiandola pineale possiedono fotorecettori sensibili al range dell'UV e a tutto lo spettro del visibile. Mentre il tritone *Notophthalmus viridescens* (Phillips *et al.*, 2001) risulta sensibile esclusivamente agli UV. Come ho già accennato prima però, gli esperimenti effettuati soffrono purtroppo di artefatti sperimentali e incorrono spesso in errori dovuti allo scorretto utilizzo della luce polarizzata, ed è quindi difficile interpretare i dati esistenti (Horvath & Varjú, 2003).

Per quanto riguarda gli Uccelli, un interessante esperimento è stato svolto sulla percezione della luce polarizzata nella capinera *Sylvia atricapilla* da Helbig e Wiltschko (1989), i cui dati dimostrano che questa specie è sensibile a tutto lo spettro del visibile.

Ad ogni modo molti degli animali, vertebrati e invertebrati, presi finora in considerazione dalla letteratura, risultano avere una forte sensibilità nel range degli UV.

Ad oggi, molte specie in cui è stata studiata l'orientamento tramite luce polarizzata con selezione di lunghezze d'onda, come l'ape europea *Apis mellifera*, la formica del deserto *Cataglyphis bicolor*, uno scarabeide del gen. *Lethrus* e il pesce damigella *Chromis viridis*, è stato dimostrato che non sono in grado di orientarsi utilizzando una bussola a polarizzazione in assenza di UV (von Frisch, 1967; Duelli & Wehner, 1973; Frantsevich *et al.*, 1977; Mussi *et al.*, 2005).

Brines e Gould (1982) capirono che questi risultati erano inadeguati per rispondere a una complessità di risposte biologiche messe in atto da animali diversissimi fra loro. Utilizzarono un polarimetro a scansione per misurare contemporaneamente l'intensità, l'angolo e la direzione della vibrazione (E-vector) della luce polarizzata a intervalli di 5°. Le risultanti sky-maps sono state costruite per la radiazione ultravioletta (300-400 nm) e per le lunghezze d'onda del visibile (500 e 650 nm), in diverse condizioni atmosferiche. Le loro osservazioni corrispondevano a ciò che sosteneva la teoria di Rayleigh: l'E-vector veniva riflesso maggiormente a 650 e 500 nm, piuttosto che a 350 nm. In altre parole venivano riflesse maggiormente le lunghezze d'onda maggiori (dal

rosso al blu dello spettro visibile) rispetto a quelle minori degli ultravioletti. A questo punto, la domanda che nasce spontanea per cercare di chiarire il paradosso (UV-sky Pol Paradox) è: perché la maggior parte degli animali rispondono solamente alla polarizzazione della luce a UV, seppure in natura le lunghezze d'onda maggiori sono le più presenti?

Brines e Gould argomentarono il problema dal punto di vista evuzionistico, dichiarando che nel caso in cui una grossa porzione di cielo risulti visibile, non esiste alcun vantaggio nella percezione selettiva di una particolare lunghezza d'onda, ma che in presenza di sfavorevoli condizioni, la sensibilità alla luce ultravioletta rispetto alle lunghezze d'onda maggiori, apporta maggiori vantaggi. Ad esempio, misurazioni effettuate in presenza di un cielo parzialmente nuvoloso, o sotto un pesante strato di vegetazione, mostrano che la luce, polarizzata e non, viene maggiormente dispersa nella frazione degli UV rispetto alla porzione delle lunghezze d'onda maggiori.

Perciò, sebbene sotto il cielo coperto da nubi, la componente UV della luce è più debole di quanto non la si trovi in una giornata serena, il grado di polarizzazione della luce è comunque più alto nel range dell' UV che nelle lunghezze d'onda maggiori (ad es: blu\verde): di conseguenza, in questi casi, risulterebbe più vantaggioso per gli animali percepire la parte di spettro degli UV.

In letteratura non ci sono finora studi sulla percezione di luce polarizzata a lunghezze d'onda selezionate nei Rettili.

L'obiettivo del mio secondo esperimento è stato quello di approfondire lo studio della bussola a polarizzazione in *P. sicula*, indagando se esiste una regione preferenziale dello spettro per la percezione della luce polarizzata.

2. MATERIALI E METODI

2.1. ANIMALI

Sono stati usati esemplari adulti, sia di genere maschile che femminile, di *Podarcis sicula* (Rafinesque- Schmaltz, 1810), catturati nel periodo marzo-settembre (sotto l'autorizzazione del Parco Delta Po dell'Emilia Romagna, nei pressi dei lidi ferraresi). Dopo la cattura, sono stati immediatamente trasportati nello stabulario di Etologia dell'Università di Ferrara (longitudine 12° 21' 44"E, latitudine 45° 03' 73"N).

La procedura di stabulazione e il protocollo sperimentale sono stati approvati dal Comitato Istituzionale per il Benessere Animale dell'Università di Ferrara e dal Ministero della Salute.

Per ulteriori dettagli sulle caratteristiche generali della lucertola campestre e sulla procedura di cattura e stabulazione vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1.

2.2. APPARATO SPERIMENTALE

Il Morris water-maze era lo stesso utilizzato nella Parte Sperimentale II e negli esperimenti precedenti (Foà *et al.*, 2009). La vasca è stata posizionata all'interno del laboratorio di Etologia dell'Università di Ferrara, le cui porte e finestre erano state precedentemente oscurate.

L'acqua all'interno della vasca era mantenuta a temperatura costante ($29 \pm 1^\circ\text{C}$) grazie a due resistenze da acquario (modello Tetrattec HT300, Milano, Italia). Al centro di due lati opposti, a diretto contatto con la parete, sono state collocate le mete che gli animali dovranno imparare a raggiungere, cioè due piattaforme di plexiglass trasparente (23.7 X 16 X 2.5 cm).

La vasca era poi circondata da uno spesso telo di stoffa nera (190 cm di altezza), questo per evitare che gli animali, dall'interno della vasca, avessero accesso ad altri stimoli orientativi all'infuori della luce polarizzata.

L'intera struttura era sovrastata da un tetto in compensato nero opaco (diametro 266 cm) su cui erano appoggiati uno schermo LCD (modello Daewoo Electronics 46" TFT-LCD-TV) e un PC, collegato allo schermo stesso. Lo schermo LCD è andato a sostituire il precedente set-up sperimentale composto da due lampade da terra e un filtro polarizzatore (vedi Parte Sperimentale I). Lo schermo LCD era rivolto verso il basso in

modo da emanare un singolo E-vector di luce polarizzata all'interno della vasca, attraverso un'apposita apertura circolare (48 cm di diametro). Grazie alle ricerche in collaborazione con i colleghi del Dipartimento di Fisica dell'Università di Ferrara (afferenti anche all'ENEA e all'INFN) è stato progettato un valido sistema di emissione di luce linearmente polarizzata (gli schermi a LCD infatti emettono di per se stessi luce linearmente polarizzata) in cui è stato possibile controllare con precisione sia l'intensità, che il colore della luce stessa: collegando infatti il display ad un computer, siamo stati in grado, attraverso semplici applicazioni (slides del programma Microsoft Office PowerPoint), di modificare la quantità di colore nel sistema RGB della slide stessa.

Le caratteristiche delle diapositive proiettate sullo schermo LCD erano:

- LUCE BIANCA → caratteristiche della diapositiva di Microsoft Office PowerPoint: R=95, G=95, B=95.
- LUCE BLU → caratteristiche della diapositiva di Microsoft Office PowerPoint: R=0, G=0, B=221.
- LUCE VERDE AD ALTA INTENSITA' → caratteristiche della slide di Microsoft Office PowerPoint: R=0, G=190, B=0.
- LUCE VERDE A BASSA INTENSITA' → caratteristiche della slide di Microsoft Office PowerPoint: R=0, G=119, B=0.
- LUCE ROSSA → caratteristiche della slide di Microsoft Office PowerPoint: R=221, G=0, B=0.
- LUCE TURCHESE → caratteristiche della slide di Microsoft Office PowerPoint: R=20, G=180, B=180.



Figura 2.1. Vista dello schermo LCD dall'interno della struttura. ♣



Figura 2.2. Posizione dello schermo LCD e del PC sopra il tetto della struttura. ♣

L'intensità, il grado e la direzione della polarizzazione della luce sono state misurate, sul piano orizzontale a livello delle piattaforme, da un luxmetro (Konica Minolta T-10, Konica Minolta Sensing Inc., Giappone) equipaggiato con un filtro polarizzatore (PL-C, Canon Inc., Giappone). Le misurazioni non hanno riscontrato asimmetrie del pattern di illuminazione a livello dell'acqua e sulle pareti verticali del Morris water-maze (Fig. 2.3. B). La rotazione dello schermo LCD di 90° non cambiava il profilo e l'intensità dell'illuminamento all'interno del Morris water-maze a livello delle piattaforme. Il grado di polarizzazione della luce all'interno della vasca era unitario in tutti i punti della vasca in cui sono state effettuate le misurazioni (Fig. 2.3. A). La radianza spettrale della luce emessa dallo schermo LCD sono state misurate, grazie ad uno spettroradiometro (Jeti 1211 UV, Photo Analytical, Milano, Italia), in tutte le varianti cromatiche utilizzate nei tests (Fig. 2.4. A-E):

- LUCE BIANCA = 0.17 Watt/m²*sr
- LUCE BLU = 0.45 Watt/m²*sr
- LUCE VERDE AD ALTA INTENSITA' = 0.49 Watt/m²*sr
- LUCE VERDE A BASSA INTENSITA' = 0.11 Watt/m²*sr
- LUCE ROSSA = 0.25 Watt/m²*sr
- TURCHESE = 0.48 Watt/m²*sr

Nel laboratorio di ottica del Dip. di Fisica dell'Università di Ferrara, grazie ad una accurata simulazione delle condizioni in cui venivano svolti gli esperimenti, è stato possibile misurare la luminanza della luce prodotta dallo schermo LCD. Ciò ha reso possibile una calibrazione dello schermo LCD stesso allo scopo di controllare perfettamente l'intensità luminosa emessa in ogni punto della vasca in ogni condizione cromatica (Fig. 2.3. C).

E' stata infine misurata la riflettanza della luce linearmente polarizzata sulle pareti del Morris water-maze per verificare l'esistenza di possibili variazioni di luminosità sulle pareti verticali del Morris water-maze (Horvath & Varjú, 2003, p. 381). Le variazioni di luminosità riscontrate sono risultate, dal punto di vista funzionale, trascurabili (<0.3 lux).

Per ulteriori dettagli sulla variante del Morris water-maze da noi utilizzata vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e di Foà *et al.* (2009).

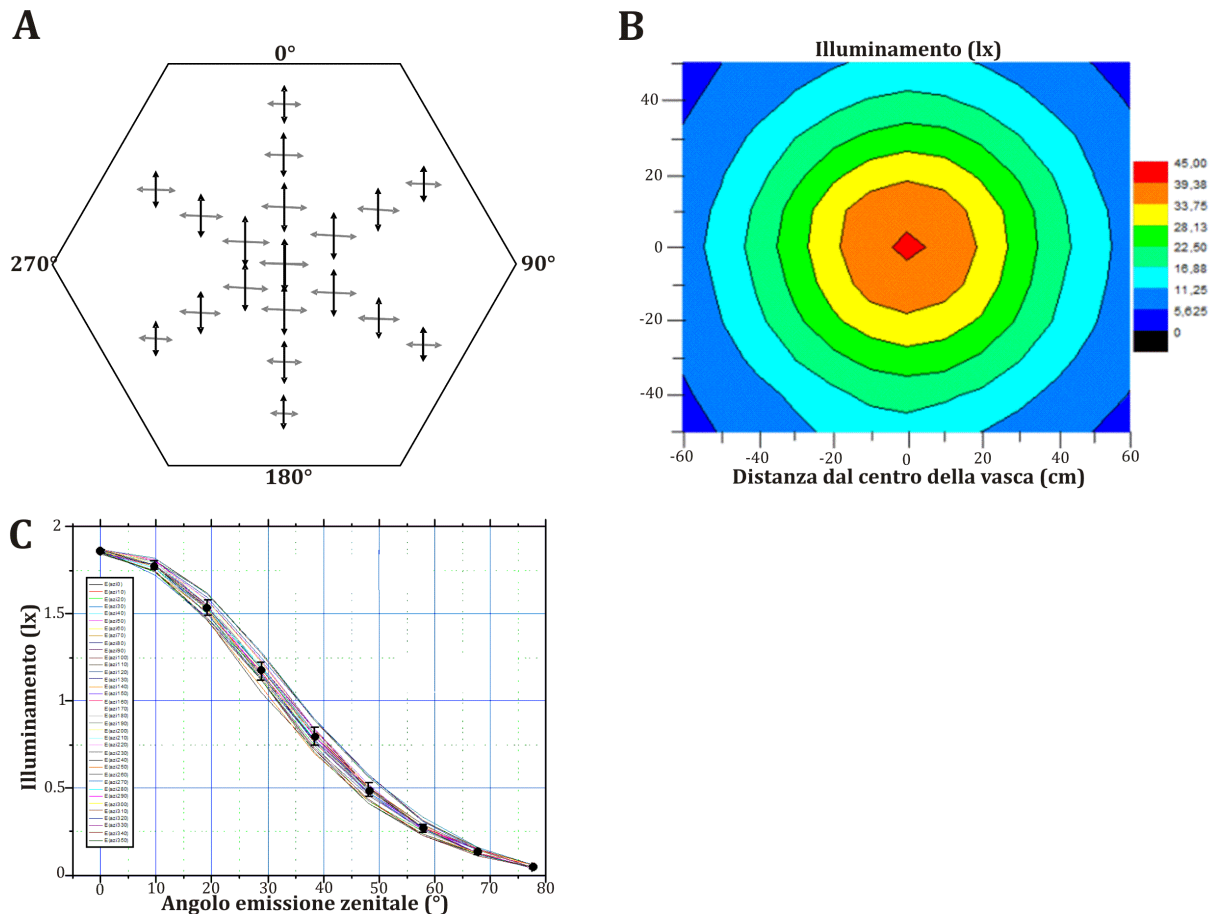


Figura 2.3.(A-C). **A.** Intensità e direzione di polarizzazione della luce, misurate lungo le tre direzioni che congiungono ogni lato della vasca esagonale al lato opposto. Ogni freccia indica la direzione della luce linearmente polarizzata (E-vector). La lunghezza di ogni freccia è proporzionale all'intensità di illuminamento (Scala: 1 mm=1.2 lux). Le frecce si riferiscono all'E-vector parallelo all'asse 0° - 180° (nere) e all'E-vector perpendicolare all'asse 0° - 180° (grigie). **B.** Il profilo di illuminamento come fattore dipendente dalla distanza dal centro della vasca. **C.** Profilo di luminanza misurato in ogni punto della vasca e con luce a varia intensità luminosa.

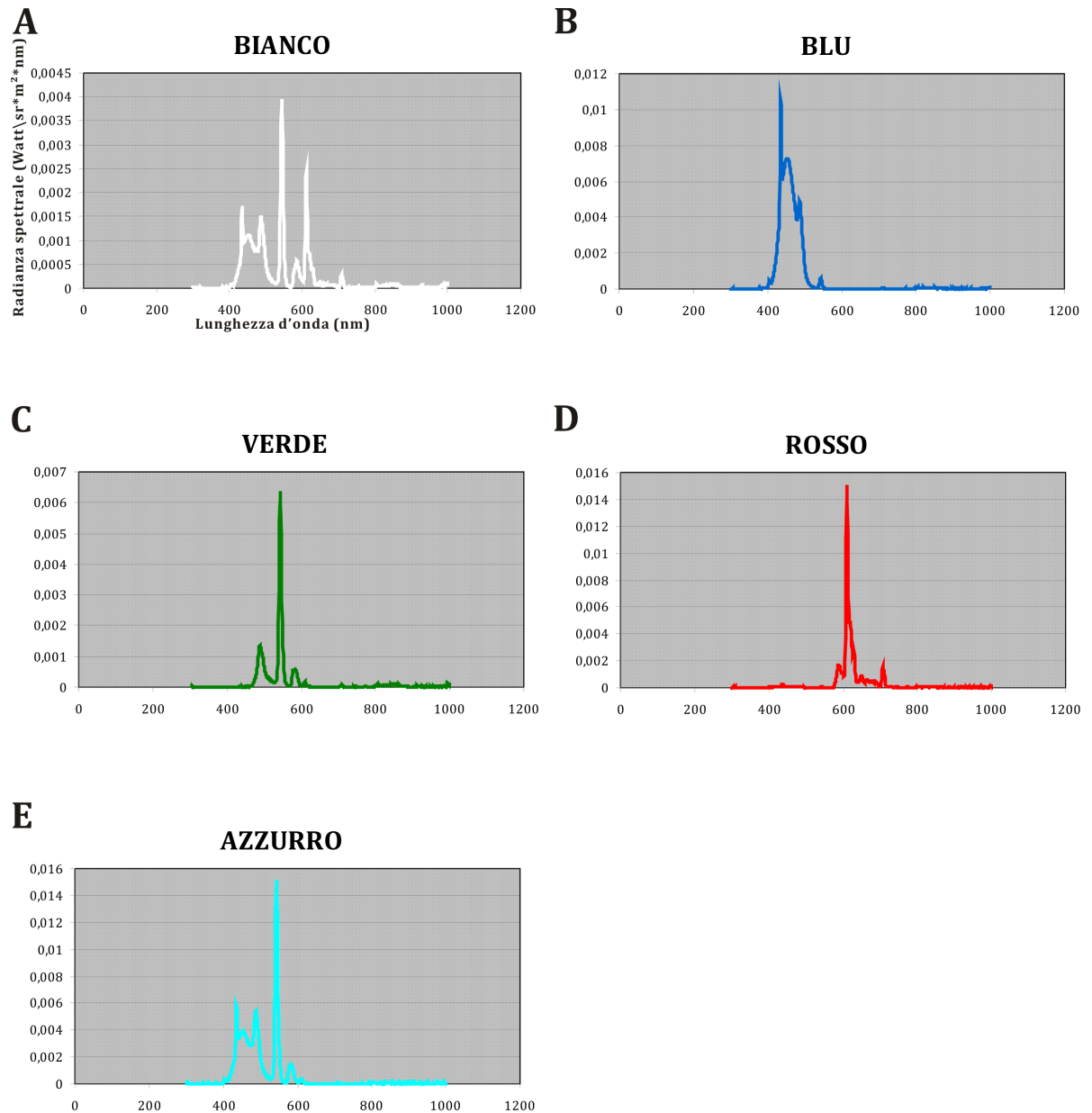


Figura 2.4.(A-E). A-E. Radianza spettrale della luce messa dal filtro polarizzatore, misurata ogni condizione cromatica.

2.3. CONDIZIONI DI RILASCIO

Un ora prima dell'inizio degli esperimenti gli animali venivano prelevati dallo stabulario e trasferiti nel laboratorio di Etologia, all'interno di due contenitori di vetro (60x24x36cm di altezza) riempiti per qualche cm con acqua a temperatura costante. Per effettuare il lancio dell'animale all'interno del Morris water-maze, questo veniva prelevato dal contenitore di vetro e posizionato in una apposita scatola di rilascio

(21x8x4 cm di altezza), dotata di coperchio. La scatola con dentro l'animale veniva poi posizionata sulla superficie dell'acqua.

La misurazione dell'orientamento bussolare assunto delle lucertole durante i lanci segue la stessa procedura descritta nella Parte Sperimentale I

Per altri dettagli vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e Foà *et al.* (2009).

2.4. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Gli esperimenti si sono svolti da giugno a dicembre tra le 8.30 e le 12 (ora solare).

Gli animali sono stati addestrati e testati sotto una sorgente artificiale (schermo LCD) che emetteva luce linearmente polarizzata ad un singolo E-vector.

Il set-up di addestramento all'interno del Morris water-maze prevedeva il posizionamento di due identiche piattaforme (goals) al centro di due lati opposti, direttamente a contatto con le pareti della vasca, poste lungo l'asse 0° - 180° (asse di addestramento).



Figura 2.5. Posizione delle piattaforme all'interno della vasca. ♣

Durante sia nella prima fase di Pre-training che nella successiva fase di Training, la luce polarizzata emessa dal display era Bianca e l'E-vector era parallelo all'asse di addestramento (0° - 180°).

Per ogni lucertola l'ordine di rilascio cambiava in sequenza random da una serie di lanci all'altra, sia durante la fase di Pre-training che durante la fase di Training. Ogni lucertola è stata sottoposta a 2 lanci al giorno.

2.4.1. Pre-training

Era la fase iniziale, in cui si consentiva all'animale di esplorare la vasca e di acquisire anche una chiara idea della posizione della meta e del tragitto più breve per raggiungerla. Le piattaforme erano visibili quindi emerse sopra la superficie dell'acqua. Per ogni animale venivano effettuati 12 lanci con un crescente grado di difficoltà, indirizzandolo alternativamente ora verso l'una, ora verso l'altra piattaforma. Per altri dettagli vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e Foà *et al.* (2009).

2.4.2. Training

In questa fase il livello dell'acqua veniva innalzato in modo da sommergere le due piattaforme di qualche centimetro, che risultavano così invisibili all'animale.

La procedura di Training era la medesima dell'Esperimento 1. L'animale veniva cioè lanciato dal centro della vasca e se raggiungeva una delle piattaforme con percorso diretto veniva premiato con l'abbassamento dell'acqua (Fig. 2.7.).

Per poter stabilire un criterio di apprendimento, superato il quale le lucertole potessero essere testate, ad ogni punto del perimetro della vasca è stato attribuito un punteggio (Fig. 2.6.).

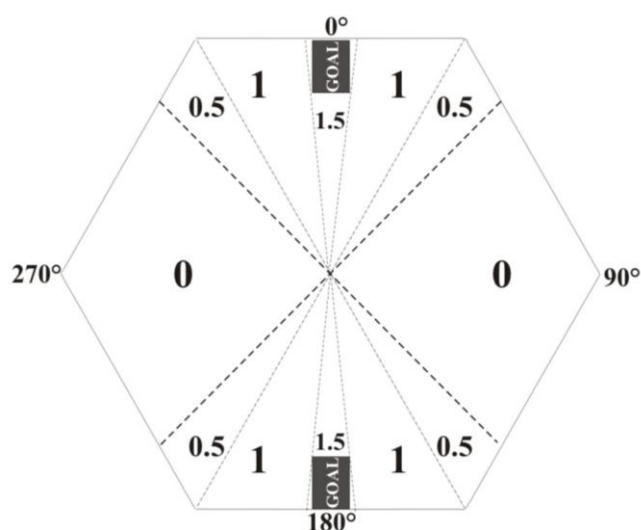


Figura 2.6. Rappresentazione del Morris water-maze con i punteggi relativi ad ogni porzione del perimetro.

Per altri dettagli vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e Foà *et al.* (2009).

2.4.3. Criterio di apprendimento

Veniva considerato meritevole chi raggiungevo un minimo di 6 punti in 6 lanci consecutivi, con al massimo 1 solo lancio dal punteggio $\leq 0,5$ e nell'ultimo lancio un punteggio $\geq 0,5$. Il numero dei lanci di training non era dunque fisso, ma dipendeva dalla capacità individuale di apprendimento. Le lucertole che non hanno raggiunto il criterio di apprendimento sono state escluse dagli esperimenti.



Figura 2.7. Lucertola sulla piattaforma emersa in attesa di essere recuperata. ♣

2.4.4 Tests

Una volta raggiunto il criterio di apprendimento le lucertole venivano testate in diverse condizioni sperimentali. Ogni test consisteva in un solo lancio.

2.4.4.1. Test in luce Bianca ed E-vector ruotato di 90°

Abbiamo testato tutti gli animali che avevano precedentemente raggiunto il criterio di apprendimento, allo scopo di capire se avessero imparato ad orientarsi lungo l'asse di addestramento utilizzando la direzione dell'E-vector. E' stato necessario ripetere questo genere di test (era già stato effettuato nella Parte Sperimentale I) perché l'apparato sperimentale è stato modificato. Infatti, come già specificato in precedenza, il filtro polarizzatore e le lampade sono stati sostituiti da uno schermo LCD. Le lucertole sono state testate dopo aver ruotato la direzione dell'E-vector di 90° rispetto alla direzione

dello stesso in fase di Training. Questa nuova condizione sperimentale è stata ottenuta ruotando lo schermo LCD.

La luce bianca emessa aveva le stesse caratteristiche della luce bianca fornita agli animali durante il Pre-training e il Training.

Gli animali erano attesi orientarsi lungo un asse perpendicolare rispetto all'asse di addestramento. Per ogni lucertola di entrambi i gruppi il test consisteva in un singolo rilascio eseguito in assenza di piattaforme.

2.4.4.2. Test in luce colorata: con E-vector parallelo e con E-vector ruotato di 90°

Gli animali sono stati sottoposti a tests con luce a lunghezza d'onda selezionata. Il test con E-vector ruotato di 90° è stato effettuato allo scopo di capire se le lucertole fossero in grado di utilizzare, per orientarsi, la luce polarizzata in un particolare range dello spettro.

I colori della luce polarizzata emessa erano:

- BLU
- VERDE AD ALTA RADIANZA SPETTRALE: nominato così per differenziarlo dal test successivo (Verde a Bassa radianza spettrale). L'intensità luminosa (o radianza spettrale) è livellata a quella della luce Blu, della luce Rossa e della luce Turchese.
- VERDE A BASSA RADIANZA SPETTRALE: a seguito dei risultati borderline dei tests in condizioni di luce Verde ad Alta radianza spettrale, un altro gruppo di animali è stato sottoposto a test in luce polarizzata Verde ma con radianza spettrale più bassa della precedente, in modo da chiarire l'eventuale coinvolgimento dell'intensità luminosa nell'orientamento con luce polarizzata di *P. sicula*.
- ROSSO
- TURCHESE: allo scopo di verificare il funzionamento di una bussola a polarizzazione con luce a lunghezza d'onda intermedia tra il blu e il verde.

2.5. ANALISI DATI E STATISTICA

Ogni distribuzione di scelte direzionali compiute dalle lucertole nella varie fasi sperimentali è stata valutata attraverso i metodi della statistica circolare (Batschelet, 1981; Zar, 1999).

Per ulteriori informazioni riguardo i tests statistici utilizzati per elaborare i dati del presente esperimento vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e di Foà *et al.* (2009).

3. RISULTATI

3.1. ULTIMO LANCIO DI TRAINING (FIG. 3.1.A)

Quarantadue di 81 lucertole hanno raggiunto il criterio di apprendimento. Come ci attendevamo, il gruppo di animali ha mostrato scelte direzionali simmetricamente distribuite lungo l'asse di addestramento (0°-180°). Dopo la duplicazione degli angoli, la distribuzione formata dalle scelte direzionali degli animali nell'ultimo lancio di training è risultata significativamente differente da una distribuzione casuale (V-test: $u=7.58$, $P<0.0005$).

Dopo aver raggiunto il criterio di apprendimento ogni lucertola è stata testata in una diversa condizione sperimentale, sia con E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°) che con E-vector perpendicolare.

Per ogni lucertola ogni test consisteva in un singolo lancio effettuato in assenza di piattaforme.

3.2. TEST IN LUCE BIANCA ED CON E-VECTOR RUOTATO (FIG. 3.1.B)

Quando testate con E-vector ruotato di 90° rispetto alla fase di Training, le scelte direzionali delle lucertole si sono simmetricamente distribuite lungo l'asse 90°-270°. Dopo la duplicazione degli angoli, la distribuzione delle scelte direzionali è risultata diversa da una distribuzione casuale (N=10; V-test: $u=1.91$, $P<0.05$). La distribuzione delle lucertole è risultata poi statisticamente differente da quella degli stessi animali nell'ultimo lancio di training, cioè prima della rotazione dell'E-vector (Hotelling test for paired data: $F_{2,6}=5.72$, $P<0.05$).

3.3. TEST IN LUCE BLU: CON E-VECTOR PARALLELO (FIG. 3.1.C) ED CON E-VECTOR RUOTATO (FIG. 3.1.D)

Tredici di 26 lucertole sono state testate in condizioni di luce Blu ed E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°). La distribuzione delle scelte direzionali degli animali testati è risultata differente da una distribuzione casuale (V-test: $u=2.00$, $P<0.025$).

Dieci delle stesse 13 lucertole sono poi state testate in condizioni di luce Blu ed E-vector perpendicolare all'asse di addestramento. Le scelte direzionali delle lucertole sono risultate simmetricamente distribuite lungo l'asse 90°-270° e dopo la duplicazione degli angoli, la distribuzione delle scelte direzionali è risultata diversa da una distribuzione casuale (V-test: $u=2.60$, $P<0.005$). Questa stessa distribuzione è risultata poi statisticamente differente da quella degli animali durante il Test in luce Blu ed E-vector parallelo (Watson U^2 test: $U^2_{13,10}=0.24$, $P<0.02$).

3.4. TEST IN LUCE VERDE AD ALTA RADIENZA SPETTRALE (FIG. 3.1.E, F) E A BASSA RADIENZA SPETTRALE (FIG. 3.1.G, H): CON E-VECTOR PARALLELO (FIG. 3.1.E, G) ED CON E-VECTOR RUOTATO (FIG.3.1.F, H)

Un gruppo di lucertole è stato testato in condizioni di luce Verde alla stessa radianza spettrale (Alta radianza spettrale) della luce Blu e della luce Rossa. Quindici di 25 lucertole sono state testate con E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°). La distribuzione delle scelte direzionali degli animali testati è risultata differente da una distribuzione casuale (V-test: $u=2.86$, $P<0.0025$).

Sette delle stesse 15 lucertole sono poi state in condizioni di luce Verde ad alta radianza spettrale ed E-vector perpendicolare all'asse di addestramento. Gli animali sono risultati completamente disorientati e la distribuzione delle scelte direzionali non è risultata diversa da una distribuzione casuale (V-test: $u=0.51$, $P>0.25$).

Un altro gruppo di animali è stato quindi testato in condizioni di luce Verde ma radianza spettrale più bassa, sia con E-vector parallelo che con E-vector ruotato di 90°. La distribuzione delle scelte direzionali degli animali testati in condizioni di E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°) è risultata differente da una distribuzione casuale (V-test: $u=1.84$, $P<0.05$).

Dieci delle stesse 13 lucertole sono poi state in condizioni di luce Verde (a bassa radianza spettrale) ed E-vector perpendicolare all'asse di addestramento. La distribuzione di scelte direzionali non differisce da una distribuzione casuale e le lucertole risultano quindi disorientate (V-test: $u=1.52$, $P>0.05$).

3.5. TEST IN LUCE ROSSA ED E-VECTOR PARALLELO (FIG. 3.2.A)

Sedici di 26 lucertole sono state testate in condizioni di luce Rossa ed E-vector parallelo all'asse di addestramento (0° - 180°). Le scelte direzionali degli animali testati sono risultate uniformemente distribuite (V-test: $u < 0$, $P > 0.25$)

Non abbiamo sottoposto gli stessi animali al test in luce Rossa ed E-vector perpendicolare proprio perché quando testati in condizioni di luce Rossa ed E-vector parallelo questi sono risultati completamente disorientati.

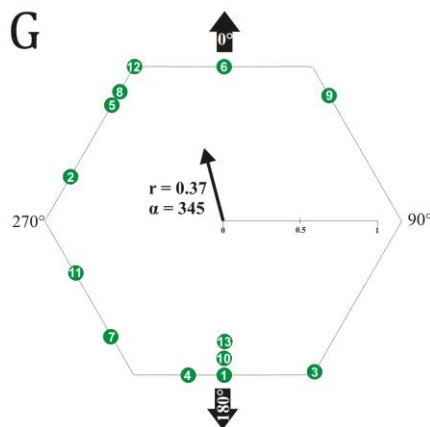
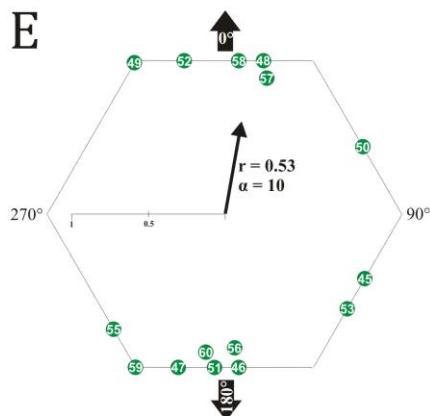
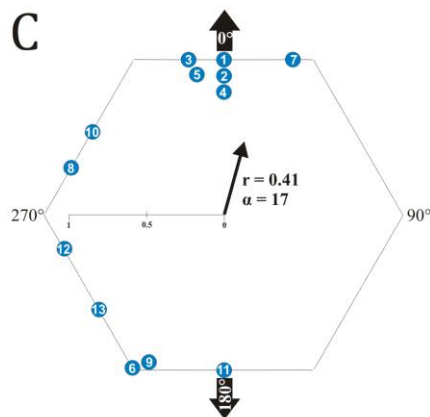
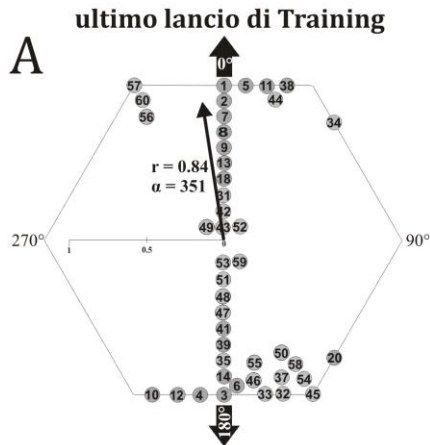
3.6. TEST IN LUCE TURCHESE: CON E-VECTOR PARALLELO (FIG. 3.2.B) ED CON E-VECTOR RUOTATO (FIG. 3.2.C)

Dieci di 30 lucertole sono state testate in condizioni di luce Turchese ed E-vector parallelo all'asse di addestramento (0° - 180°). La distribuzione delle scelte direzionali degli animali testati è risultata differente da una distribuzione casuale (V-test: $u = 1.87$, $P < 0.05$).

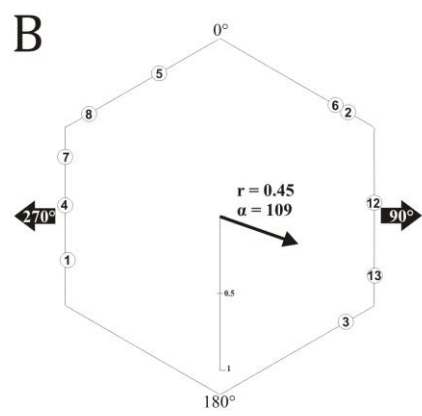
Nove delle stesse 10 lucertole testate precedentemente sono poi state testate in condizioni di luce Turchese ed E-vector perpendicolare all'asse di addestramento. Le scelte direzionali delle lucertole sono risultate simmetricamente distribuite lungo l'asse 90° - 270° e dopo la duplicazione degli angoli, la distribuzione delle scelte direzionali è risultata diversa da una distribuzione casuale (V-test: $u = 1.82$, $P < 0.05$). La stessa distribuzione è risultata poi statisticamente differente da quella degli animali durante il lancio di Test in luce Turchese ed E-vector parallelo (Watson U^2 test: $U^2_{9,10} = 0.19$, $P < 0.05$).

In condizioni di E-vector parallelo all'asse di addestramento (0° - 180°) le scelte direzionali degli animali testati in luce Blu sono risultate non differenti dalle scelte direzionali degli animali testati in luce Turchese (Watson U^2 test: $U^2_{10,13} = 0.096$, $P > 0.20$). Allo stesso modo, in condizioni di E-vector perpendicolare all'asse di addestramento, la distribuzione di scelte direzionali degli animali testati in luce Blu non è risultata diversa dalla distribuzione di scelte direzionali degli animali testati in luce Turchese (Watson U^2 test: $U^2_{9,10} = 0.037$, $P > 0.50$).

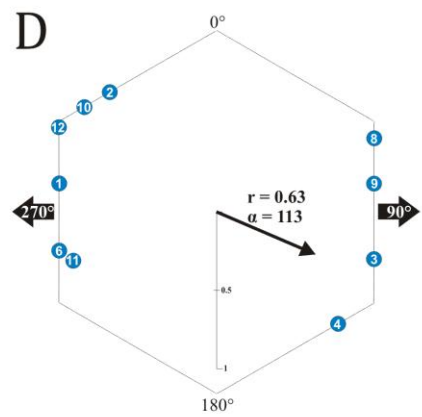
E-VECTOR PARALLELO



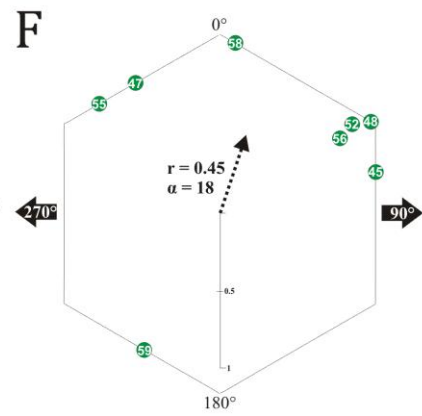
LUCE BIANCA



LUCE BLU

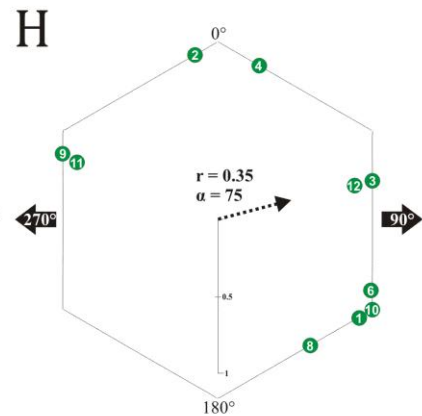


LUCE VERDE



alta radianza spettrale

bassa radianza spettrale



E-VECTOR PERPENDICOLARE

Figura 3.1.(A-H). Orientamento di lucertole addestrate e testate sotto una sorgente artificiale di luce linearmente polarizzata con un singolo E-vector a lunghezze d'onda selezionate. Negli esagoni sono riportate le scelte direzionali reali di ogni animale. Quando le distribuzioni risultano bimodali il vettore medio di I ordine invece è calcolato sui dati duplicati. **A.** Scelte direzionali nell'ultimo lancio di Training, effettuato in luce bianca. **B.** Test in luce Bianca con E-vector rotato di 90°. **C, D.** Test in luce Blu: con E-vector parallelo (C) e perpendicolare (D) all'asse addestramento 0°-180°. **E, F.** Test in luce Verde ad alta radianza spettrale: con E-vector parallelo (E) e perpendicolare (F) all'asse di addestramento 0°-180°. **G, H.** Test in luce Verde a bassa radianza spettrale: con E-vector parallelo (G) e perpendicolare (H) all'asse di addestramento. Per ulteriori dettagli vedere la figura 3.1.(A-H) dell'Esperimento 1.

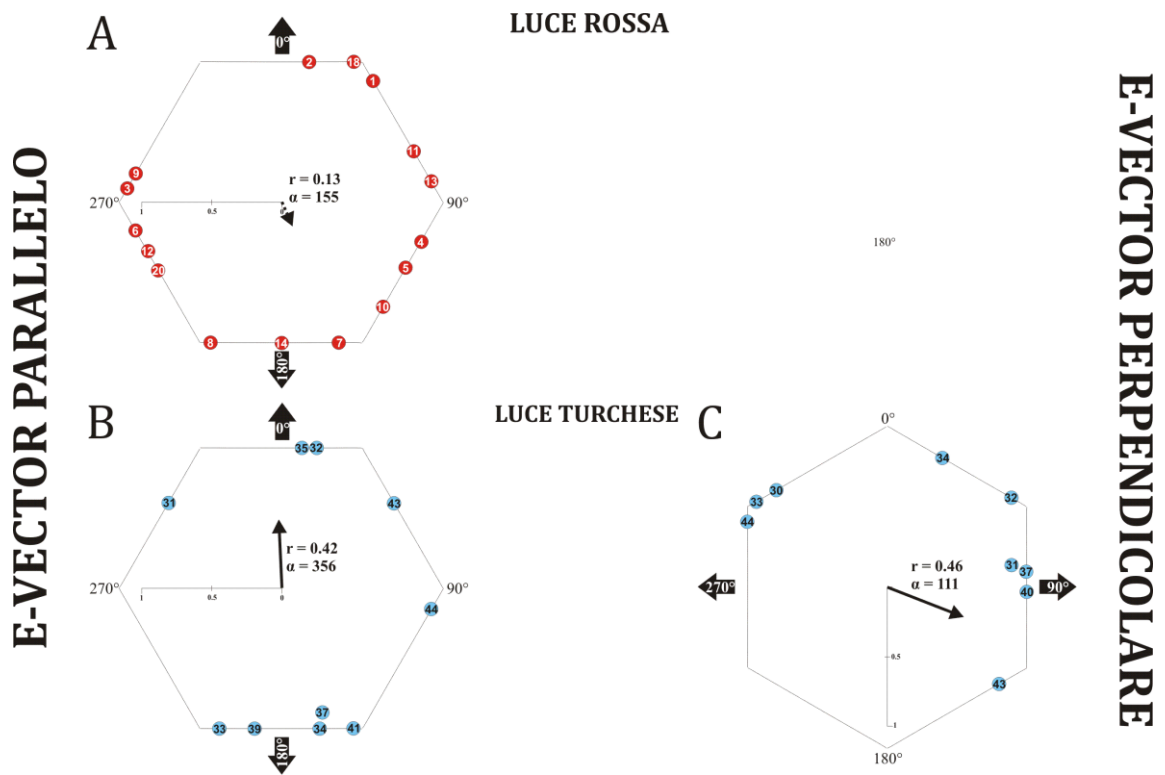


Figura 3.2.(A-C). **A.** Test in luce Rossa ed E-vector parallelo all'asse di addestramento 0°-180°. **B, C.** Test in luce Turchese: con E-vector parallelo (B) e perpendicolare (C) all'asse addestramento 0°-180°. Ulteriori dettagli vedere la figura 3.1.(A-H) dell'Esperimento 1.

4. DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente esperimento è stato quello di verificare se in *Podarcis sicula* esiste una regione preferenziale dello spettro luminoso per percepire l' E-vector della luce polarizzata da utilizzare per l'orientamento (bussola a polarizzazione).

L'interesse ad approfondire questa tematica è proprio nato dal fatto che la lucertola campestre si è rivelata in grado di orientarsi correttamente sotto una sorgente di luce linearmente polarizzata, all'interno di una variante del Morris water-maze (Vedi Parte Sperimentale I e Beltrami *et al.*, 2010).

I dati del presente esperimento confermano innanzitutto ciò che era stato dimostrato nell'esperimento precedente (Beltrami *et al.*, 2010): *P. sicula* è in grado di orientarsi con una bussola a polarizzazione in assenza di UV. Questo risultato continua ad essere sorprendente in quanto molte specie testate fino a quel momento, ad esempio l'ape europea *Apis mellifera*, la formica del deserto *Cataglyphis bicolor*, uno scarabeide del gen. *Lethrus* e il pesce damigella *Chromis viridis*, non sono in grado di orientarsi utilizzando una bussola a polarizzazione in assenza di UV (von Frisch, 1967; Duelli & Wehner, 1973; Frantsevich *et al.*, 1977; Mussi *et al.*, 2005).

Il primo step della presente ricerca aveva l'obiettivo di validare il nuovo apparato sperimentale. I risultati hanno effettivamente dimostrato che la lucertola campestre è in grado di apprendere una direzione di addestramento quando addestrata in luce Bianca prodotta da uno schermo LCD e con l'E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°) (Fig. 3.1. A). Alcuni animali che hanno raggiunto il criterio di apprendimento sono stati inizialmente testati in luce Bianca ed E-vector ruotato di 90° rispetto alla direzione in Training: come atteso, le lucertole hanno seguito la rotazione della direzione dell'E-vector (Fig. 3.1. B), confermando ancora una volta che sono in grado di utilizzare la luce polarizzata per orientarsi e validando del tutto il nuovo apparato di emissione degli UV.

Gli animali sono stati testati in luce colorata (blu, verde, rossa e turchese), prima con E-vector parallelo all'asse di addestramento (0°-180°) poi con E-vector ruotato di 90°, proprio allo scopo di capire se *P. sicula* fosse in grado di percepire la luce polarizzata in una particolare regione dello spettro luminoso ed utilizzarla per l'orientamento.

Le lucertole sono risultate in grado di percepire chiaramente le lunghezze d'onda più corte (450 nm): se sottoposte a flussi costanti di luce monocromatica blu, le scelte direzionali messe in atto dai singoli animali, certificano l'avvenuto orientamento sia nel caso in cui l'asse di polarizzazione della luce è parallelo a quello di addestramento (Fig. 3.1. C), sia quando è perpendicolare (Fig. 3.1. D). I risultati dimostrano, per la prima volta in una specie di Rettili, che la luce Blu è sufficiente per garantire il funzionamento di una bussola a polarizzazione.

Nel test in luce Verde ad Alta radianza spettrale con E-vector parallelo all'asse di addestramento (0° - 180°), le scelte direzionali delle lucertole hanno seguito una distribuzione simmetrica bimodale lungo l'asse 0° - 180° , risultando quindi significativamente orientati, seppure la distribuzione non sia altamente concentrata (Fig. 3.1. E). Una volta testate con E-vector ruotato di 90° rispetto all'asse di addestramento, le lucertole sono risultate disorientate (Fig. 3.1. F).

E' stato ripetuto il test in luce Verde su un altro gruppo di animali, abbassando però la radianza spettrale del fascio luminoso emesso. Lo scopo di questo nuovo test è stato quello di verificare l'eventuale coinvolgimento della potenza luminosa nella percezione della luce polarizzata, come è stato segnalato in (Wiltschko & Wiltschko, 2001). I risultati del test in luce Verde a Bassa radianza spettrale mostrano ancora una volta che le lucertole sono in grado di orientarsi lungo il corretto asse 0° - 180° quando l'E-vector della luce polarizzata era parallelo (Fig. 3.1. G) mentre a seguito della rotazione di 90° dell'E-vector stesso gli animali sono risultati di nuovo completamente disorientati (Fig. 3.1. H). Questi risultati chiaramente dimostrano che la potenza luminosa non è implicata nel disorientamento delle lucertole testate in luce Verde ed E-vector perpendicolare, evidenziando così il fatto che l'utilizzo della luce polarizzata per l'orientamento dipende dalle lunghezze d'onda e non dalla quantità di luce percepita dall'occhio parietale. Sembra non essere quindi un problema di soglia di percezione ma più probabilmente la causa è la natura intrinseca di un meccanismo di orientamento (bussolare) che viene attivato dalla percezione di luce polarizzata ad alcune lunghezze d'onda e non ad altre.

Dai risultati è emerso che *Podarcis sicula* è totalmente disorientata se chiamata a orientarsi sotto un flusso di luce Rossa (Fig. 3.2. A). Si può dedurre che lunghezze d'onda intorno al rosso non sono percepite dall'occhio parietale e non risultando quindi adatti alla funzionamento della bussola a polarizzazione.

Le lucertole testate sotto luce Turchese sono risultati significativamente orientati lungo l'asse atteso, sia nel caso in cui questo sia orientato parallelamente all'asse di addestramento (Fig. 3.2. B), sia a seguito della rotazione di 90° dell'E-vector (Fig. 3.2. C).

Riassumendo, i risultati del presente esperimento hanno dimostrato che la lucertola campestre riesce ad orientarsi nello spettro del visibile, manifestando un calo percettivo inversamente proporzionale all'aumentare della lunghezza d'onda. In altre parole, si orientano meglio se sottoposte a lunghezze d'onda minori (Blu-Turchese), piuttosto che a quelle maggiori (Verde-Rosso). In quest'ultimo caso, infatti, le lucertole appaiono visibilmente disorientate.

Ciò è in accordo con studi elettrofisiologici eseguiti su *Xantusia vigilis* e *Uta stansburiana* che mostrano una maggiore sensibilità dei fotorecettori parietali per le lunghezze d'onda intorno al Blu e al Verde (Solessio & Engbreston, 1993; Solessio & Engbreston, 1999; Su *et al.*, 2006).

Pomozi e colleghi (2001) hanno asserito inoltre che in condizioni di cielo nuvoloso l'estensione del pattern di E-vector nelle aree coperte da nuvole è meglio utilizzabile da una bussola a polarizzazione quando la luce solare è percepita nel range del Blu piuttosto che nel range del Verde e del Rosso. Nel cielo nuvoloso infatti il pattern di E-vector percepito nel Blu è molto simile al corrispondente pattern percepito quando il cielo è sereno.

Esperimento 3

**“LA BUSSOLA A POLARIZZAZIONE IN
Podarcis sicula È CRONOMETRICA?”**

1. INTRODUZIONE

In studi precedenti (Adler & Phillips, 1985; Ellis-Quinn & Simon, 1991; Freaque, 1999; Beltrami *et al.*, 2010) è stata supposta l'esistenza, nelle specie di lucertole studiate (rispettivamente *Uma notata*, *Tiliqua rugosa* e *Podarcis sicula*), di tutti meccanismi sensoriali e cognitivi richiesti per il funzionamento di una bussola a polarizzazione, ma non ci sono esperimenti, ad oggi, che abbiamo direttamente esaminato se il meccanismo bussolare basato sulla percezione della luce polarizzata sia o meno cronometrico. Per orientarsi utilizzando un sistema guida, l'animale si avvale di un riferimento astronomico come può essere l'azimut solare, il pattern stellare o il pattern di polarizzazione della luce. Dal momento che il pattern di polarizzazione varia durante la giornata in relazione al moto apparente di un reperi mobile (il sole), gli animali devono essere in grado, per orientarsi verso una determinata direzione, di compensare le variazioni del pattern di polarizzazione. Questo meccanismo di compensazione è basato su un orologio interno sincronizzato dall'alternarsi delle fasi luce\buio

Adler e Phillips (1985) dimostrarono, per la prima volta nei Rettili, che il sauro americano *Uma notata* riusciva a orientarsi correttamente mediante l'utilizzo di segnali astronomici. Nella prima fase sperimentale gli animali sono stati sottoposti ad uno sfasamento orario (*clock-shift*) dell'orologio biologico interno di circa 6 ore, ed quando testati sotto il sole hanno mostrato una deviazione di 90° nell'orientamento, confermando così l'utilizzo di una bussola solare cronometrica. Nella seconda fase sperimentale gli animali sono stati addestrati outdoor in presenza del solo pattern di luce polarizzata (in assenza cioè del disco solare), mentre il test è stato effettuato indoor, sotto una sorgente artificiale che emetteva luce linearmente polarizzata. Nel secondo test gli animali hanno mostrato un orientamento bimodale che, secondo gli autori, seguiva l'orientamento stesso dell'E-vector allo zenit presente in natura al momento del test stesso. In questo studio gli autori fornirono, per la prima volta nella letteratura, la prova dell'esistenza di una sensibilità alla luce polarizzata in un Rettile, rilevarono cioè che le informazioni provenienti dalla luce polarizzata possono essere utilizzate dagli animali stessi per orientarsi, riuscendo quindi a compensare la rotazione giornaliera del pattern di E-vectors.

Eguualmente Ellis-Quinn e Simon (1991) dimostrarono l'importanza della bussola solare nell'homing di *Sceloporus jarrovi*. Gli animali furono dislocati a 150 m di distanza dal confine del loro home-range individuale. Ad alcuni individui fu permesso di percepire informazioni di natura visiva durante il tragitto, ai rimanenti individui venne impedita la visuale. I dati confermarono l'ipotesi per cui i punti di riferimento visivi (landmarks) e l'utilizzo di una bussola solare cronometrica hanno concorso in eguale misura all'orientamento degli animali, nell'ultimo caso anche in presenza di cielo parzialmente nuvoloso, che nello specifico caso, potrebbe significare orientamento mediante luce polarizzata.

Un esperimento volto a verificare l'esistenza di una bussola a polarizzazione è quello effettuato da Freake (1999) sullo scincide australiano *Tiliqua rugosa*. Nella prima fase sperimentale, gli animali sono stati addestrati outdoor, permettendo loro l'accesso al pattern di luce polarizzata ma non alla visione diretta del disco solare. Nel secondo esperimento, per accertare la dipendenza dell'orientamento dalla percezione dell'E-vector, gli animali sono stati addestrati e testati in laboratorio, nello stesso apparato sperimentale utilizzato nell'esperimento outdoor e sotto una sorgente artificiale di luce linearmente polarizzata. I risultati evidenziano il tentativo delle lucertole di seguire il cambiamento d'inclinazione dell'asse di polarizzazione, dimostrando di sapere utilizzare la direzione dell'E-vector per orientarsi.

L'Esperimento 1 (Beltrami *et al.*, 2010) ha evidenziato, per la prima volta, che la lucertola campestre è in grado di orientarsi usando la direzione dell'E-vector della luce polarizzata. Gli animali sono stati saggiati in laboratorio, sotto una sorgente artificiale di luce linearmente polarizzata. I risultati hanno confermato la percezione dell'E-vector della luce polarizzata da parte di *P. sicula* e il suo utilizzo nell'orientamento.

Il fatto che *P. sicula* fosse in grado di orientarsi in presenza di disco solare visibile (Foà *et al.*, 2009), in aggiunta al fatto che la stessa lucertola campestre fosse in grado di percepire la luce polarizzata ed utilizzarla per l'orientamento (Esperimento 1 e Beltrami *et al.*, 2010) ha portato a chiedersi quale fosse il segnale celeste responsabile del funzionamento della bussola: l'azimuth solare o il pattern di luce polarizzata?

L'Esperimento 3 ha avuto come scopo quello tentare di investigare se *P. sicula* in natura fosse in grado di utilizzare il pattern di luce polarizzata per orientarsi e il meccanismo alla base della bussola a polarizzazione stessa fosse cronometrico. Gli

animali sono stati addestrati all'esterno, sempre utilizzando una variante del Morris water-maze. La struttura sperimentale che circondava la vasca negli esperimenti in laboratorio è stato così modificato e riprogettato secondo le esigenze del nuovo esperimento. L'Esperimento 3 è stato suddiviso in 2 fasi sperimentali: la prima fase sperimentale, titolata "Controllo dell'Apparato sperimentale", è consistita nel dividere gli animali in 3 gruppi, a cui era assegnata una diversa meta da raggiungere. Lo scopo di questa procedura è stato quello di verificare se nel nuovo apparato sperimentale fossero presenti landmarks che potessero favorire nelle lucertole alcune scelte direzionali piuttosto che altre. E' stato quindi necessario assicurarsi che tutti e 3 i gruppi apprendessero la direzione di addestramento circa nella stesso lasso temporale e che, per ogni gruppo, un numero simile di animali raggiungesse il criterio di apprendimento. Dal momento che non sono state riscontrate differenze tra l'addestramento di un gruppo ed un altro, si è proceduto con la seconda fase sperimentale, titolata "La Bussola a Polarizzazione è cronometrica?", che consisteva nell'addestrare un altro gruppo di lucertole in presenza del solo pattern di polarizzazione e una volta che avessero raggiunto il criterio, sottoporle ad un fast clock-shift di 6 ore (ciclo L:D anticipato).

2. MATERIALI E METODI

2.1. ANIMALI

Sono stati usati esemplari adulti, sia di genere maschile che femminile, di *Podarcis sicula* (Rafinesque- Schmaltz, 1810), catturati nel periodo marzo-settembre (sotto l'autorizzazione del Parco Delta Po dell'Emilia Romagna, nei pressi dei lidi ferraresi). Dopo la cattura, sono stati immediatamente trasportati nello stabulario di Etologia dell'Università di Ferrara (longitudine 12° 21' 44"E, latitudine 45° 03' 73"N).

La procedura di stabulazione e il protocollo sperimentale sono stati approvati dal Comitato Istituzionale per il Benessere Animale dell'Università di Ferrara e dal Ministero della Salute.

Per ulteriori dettagli sulle caratteristiche generali della lucertola campestre e sulla procedura di cattura e stabulazione vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1.

2.2. APPARATO SPERIMENTALE

Il Morris water-maze era lo stesso utilizzato nell'Esperimento 1 (Beltrami *et al.*, 2010), nell'Esperimento 2 e negli esperimenti precedenti (Foà *et al.*, 2009).

La vasca è stata posizionata all'esterno dell'area circostante il Dipartimento di Biologia ed Evoluzione dell'Università di Ferrara, in uno spazio verde, delimitato da mura, dell'estensione di circa 5000 m².



Figura 2.1. Fotografia aerea dell'area in cui venivano svolti gli esperimenti, situata all'interno del polo universitario. (fonte Google Earth)

L'acqua all'interno della vasca era mantenuta a temperatura costante ($29\pm 1^\circ\text{C}$) grazie a tre resistenze da acquario (modello Tetrattec HT300, Milano, Italia). Al centro di un lato, a diretto contatto con la parete, è stata collocata la meta che gli animali dovranno imparare a raggiungere, cioè una piattaforma di plexiglass trasparente ($23.7 \times 16 \times 2.5$ cm).



Figura 2.2. Morris water-maze fotografato da una delle postazioni di osservazione esterne alla paratia. All'interno della vasca si può intravedere la piattaforma, sommersa da acqua oscurata da farina fossile, e due resistenze che venivano rimosse dal Morris water-maze un attimo prima di iniziare gli esperimenti giornalieri. ♣

Per evitare la visione da parte degli animali di feature cues esterne alla vasca, che potessero condizionare le performance di orientamento degli animali stessi, è stata costruita una struttura circolare dell'altezza di 300 cm, distante dalle pareti dell'arena 50 cm circa. Questa recinzione era composta da 6 pali di PVC equidistanti tra loro, cui erano fissati 4 strati di telone frangivento di plastica nera opaca. La struttura era dotata inoltre di una apertura reversibile che, all'occorrenza, consentiva il passaggio degli sperimentatori durante le fasi di manutenzione dell'arena, ma durante le attività sperimentali era accuratamente fissata ad uno dei pali. La recinzione quindi permetteva agli animali la sola visione della parte di cielo sovrastante la struttura.



Figura 2.3. Struttura esterna al Morris water-maze. Dalla foto si nota la paratia sostenuta da tubi di PVC. ♣

In diversi lati del telo sono stati ricavati dei piccoli fori spia per facilitare gli sperimentatori nell'osservazione del comportamento animale durante i lanci, e un foro in corrispondenza del quale è stata posta una videocamera digitale (modello JVC Everio GZ-MG21E, Yokohama, Giappone), che ha permesso agli sperimentatori di documentare il comportamento di ogni singolo animale sia in fase di addestramento (Training) sia in fase di Test.

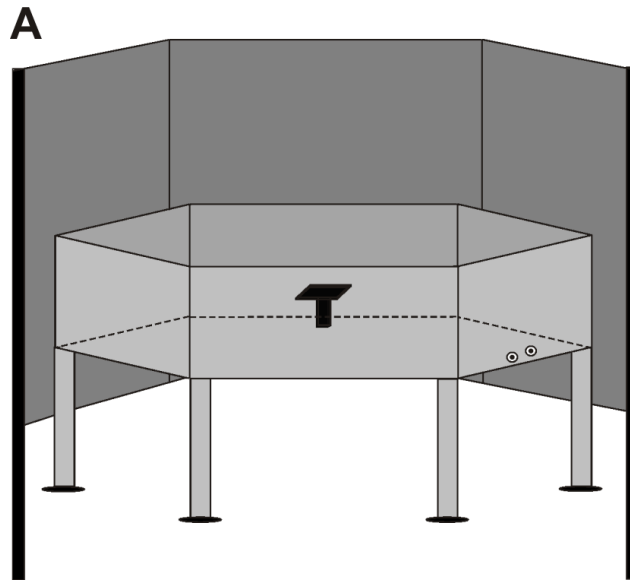


Figura 2.4. Schematizzazione della variante esagonale del Morris water-maze usato nell'esperimento. L'immagine mostra la piattaforma montata sopra il loro piedistallo e collocata a diretto contatto con il centro di un lato. La paratia oscurante è parzialmente rappresentata. Ulteriori dettagli sono riportati nella sezione dei Materiali e Metodi dell'Esperimento 1.

Per ulteriori dettagli sulla variante del Morris water-maze da noi utilizzata vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e di Foà *et al.* (2009).

2.3. CONDIZIONI DI RILASCIO

Un ora prima dell'inizio degli esperimenti gli animali venivano prelevati dallo stabulario e trasferiti in teche di plastica posizionate nell'area esterna in cui si svolgevano gli esperimenti. Il trasferimento delle lucertole avveniva in secchi di plastica coperti con dei pesanti teli neri al fine di impedire alle lucertole di vedere il disco solare durante il dislocamento stesso. I contenitori (60x40x25 cm di altezza) erano posizionati a circa 3 metri di distanza dalla struttura circondante il Morris water-maze e contenevano circa 10 cm di acqua, mantenuta a una temperatura di $30 \pm 1^\circ\text{C}$ grazie a resistenze da acquario (Tetrahat, Tetra, Milano). Una rete metallica costituita da maglie delle dimensioni di 2x2 mm era posta 0,5 cm sotto la superficie dell'acqua consentiva alle lucertole di rimanere a contatto con l'acqua senza però esserne sommerse. In questo modo gli animali avevano il tempo di ambientarsi nell'acqua delle teche, evitando uno shock termico al momento del lancio nella vasca.

Per effettuare il lancio all'interno della vasca, l'animale veniva inizialmente prelevato dal terrario da campo e, con un termometro ad infrarossi, gli veniva misurata la temperatura corporea. Successivamente veniva inserito nella scatola di rilascio (21x8x4 cm) provvista di coperchio. La scatola veniva poi posta sulla superficie dell'acqua in posizione centrale alla vasca e lo sperimentatore, dopo aver tolto il coperchio, si nascondeva velocemente sotto i bordi della vasca. Due piccoli pesi legati al fondo della scatola impedivano l'allontanamento della scatola dalla posizione iniziale e piccoli fori presenti alla base della scatola stessa le permettevano di affondare lentamente (circa 6-7 secondi).



Figura 2.5. Lucertole marcate che termoregolano nella teca. ♣

Per altri dettagli vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e Foà *et al.* (2009).

2.4. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Gli esperimenti si sono svolti nel periodo giugno-ottobre tra le ore 6.00 e le ore 11.00 (ora legale). L'Esperimento 3 è stato suddiviso in 2 fasi sperimentali: la prima fase ("Controllo dell'Apparato sperimentale") e la seconda fase ("La Bussola a Polarizzazione è cronometrica?").

Durante tutta la durata dell'esperimento agli animali è stata concessa la visione del disco solare per 1 ora 3 volte la settimana in differenti momenti della giornata compresi tra le ore 7 e le ore 18 (ora legale).

Gli animali, durante entrambe le fasi, sono stati addestrati e testati in condizioni di cielo sereno o parzialmente nuvoloso. Nella porzione di cielo sovrastante la struttura, a cui gli animali avevano accesso, non era presente il disco solare.

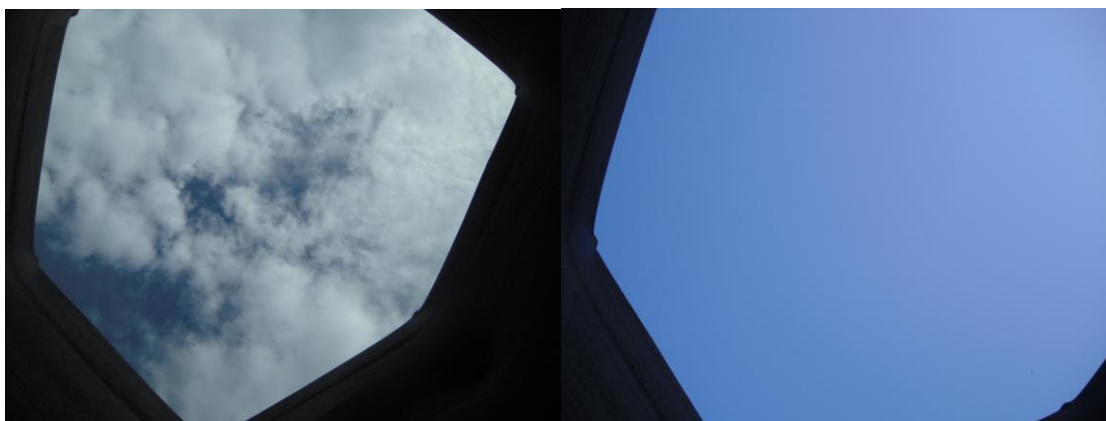


Figura 2.6.\2.7. Veduta della porzione di cielo osservabile dal centro della vasca. ♣

Per ogni lucertola l'ordine di rilascio cambiava in sequenza random da una serie di lanci all'altra, sia durante la fase di Pre-training che durante la fase di Training. Ogni lucertola è stata sottoposta a 2 lanci al giorno.

2.4.1. Procedura sperimentale "Controllo dell'Apparato sperimentale"

Trenta lucertole catturate sono state divise in 3 gruppi (Gruppo 3, Gruppo 6 e Gruppo 7) di 10 animali ciascuno e ogni gruppo è stato addestrato a raggiungere una meta, la piattaforma. Per ciascun gruppo di 10 lucertole la meta da raggiungere era posizionata al centro di un diverso lato della vasca.

Le lucertole sono state sottoposte alla sola procedura di addestramento, consistita in Pre-Training e Training, al termine della quale si è immediatamente proceduto ad analizzare i dati per verificare la sicurezza dell'apparato sperimentale. Le scelte direzionali di ogni lucertola negli ultimi 5 lanci di training (corrispondenti ai 5 lanci del criterio di apprendimento) sono state utilizzate per calcolare il vettore medio individuale. I vettori medi individuali sono stati poi utilizzati per calcolare il vettore medio di II ordine per ogni gruppo, con cui è stato quindi possibile analizzare le differenze di addestramento tra i 3 gruppi.

2.4.2. Procedura sperimentale “La Bussola a Polarizzazione è cronometrica?”

Gli animali sono stati addestrati a raggiungere una meta posizionata al centro di un lato della vasca e per tutte le lucertole la direzione bussolare della meta era sempre la stessa.

Le lucertole che hanno raggiunto il criterio di apprendimento sono state assegnate ad uno dei seguenti trattamenti:

1. stabulazione per 6 giorni in stanze in cui l'inizio e la fine del giorno artificiale coincidevano con il fotoperiodo naturale (“*Controlli*”);
2. stabulazione per 6 giorni in stanze in cui il giorno artificiale iniziava e terminava 6 ore prima del naturale fotoperiodo (“*Fast Clock-shifted*”).

Al termine dei 6 giorni di completamento del trattamento di clock-shift, le lucertole sono state sottoposte ad un lancio di Test.

2.4.3. Pre-training

Era la fase iniziale, in cui si consentiva all'animale di esplorare la vasca e di acquisire anche una chiara idea della posizione della meta e del tragitto più breve per raggiungerla. La piattaforma era visibile quindi emersa sopra la superficie dell'acqua. Per ogni animale venivano effettuati 12 lanci con un crescente grado di difficoltà.

Per altri dettagli vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e Foà *et al.* (2009).

2.4.4. Training

In questa fase il livello dell'acqua veniva innalzato in modo da sommergere la piattaforma di qualche centimetro, rendendola così invisibile all'animale.

Il lancio consisteva sempre nel posizionare la scatola al centro dell'arena, indirizzandola in una direzione ogni rilascio differente.

Per poter stabilire un criterio di apprendimento, superato il quale le lucertole potessero essere testate, ad ogni punto del perimetro della vasca è stato attribuito un punteggio (Fig. 2.8.).

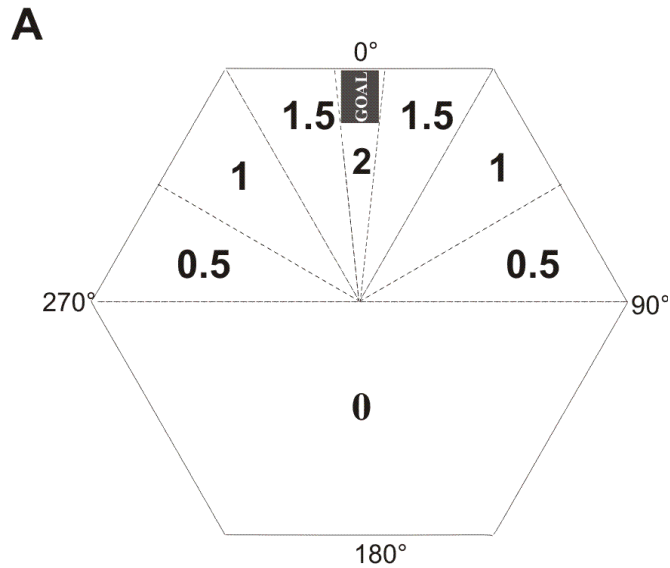


Figura 2.8. Rappresentazione del Morris water-maze con i punteggi relativi ad ogni porzione del perimetro.

Per altri dettagli sulla fase di Training vedere i Materiali e Metodi dell’Esperimento 1 e di Foà *et al.* (2009).

2.4.5. Criterio di apprendimento

Veniva considerato meritevole l’animale che raggiungeva un minimo di 4 lanci a punteggio in una serie di 5 lanci consecutivi, con minimo 1 lancio dal punteggio di 1,5 e nell’ultimo lancio un punteggio $\geq 0,5$. Il numero dei lanci di training non era dunque fisso, ma dipendeva dalla capacità individuale di apprendimento. Le lucertole che non raggiungevano il criterio di apprendimento sono state escluse dagli esperimenti.

2.4.6 Tests

Una volta raggiunto il criterio di apprendimento le lucertole venivano testate nelle prime ore della giornata. Ogni test consisteva in un solo lancio.

2.5. ANALISI DATI E STATISTICA

Ogni distribuzione di scelte direzionali compiute dalle lucertole nella varie fasi sperimentali è stata valutata attraverso i metodi della statistica circolare (Batschelet, 1981; Zar, 1999).

Per analizzare i dati della prima fase sperimentale (“Controllo dell’Apparato sperimentale”) è stato applicato il test non parametrico Moore Test per analizzare i vettori di II ordine e stabilire l’eventuale uniformità circolare della distribuzione.

Per ulteriori informazioni riguardo i tests statistici utilizzati per elaborare i dati del presente esperimento vedere i Materiali e Metodi dell'Esperimento 1 e di Foà *et al.* (2009).

3. RISULTATI

3.1. “CONTROLLO DELL’APPARATO SPERIMENTALE”

3.1.1. Analisi del criterio di apprendimento (FIG. 3.1.A-C\3.2.A-C)

17 di 29 lucertole hanno raggiunto il criterio di apprendimento. Le scelte direzionali di ogni lucertola negli ultimi 5 lanci di training (lanci del criterio di apprendimento) sono state utilizzate per calcolare il vettore medio individuale, cui valori sono riportati nella tabella (Tab. 3.1.). I vettori medi individuali sono stati poi utilizzati per calcolare il vettore medio di II ordine per ogni gruppo. Considerate per gruppi, le lucertole del Gruppo 3 (Fig. 3.1.A) sono correttamente orientate verso la direzione di addestramento a 65° (N=6, $\alpha = 73^\circ$, $r = 0.61$; $R=1.30$, $P<0.005$); anche le lucertole del Gruppo 6 (Fig. 3.1.B) hanno dimostrato di riuscire ad apprendere la corretta posizione (125°) della piattaforma (N=5, $\alpha = 131^\circ$, $r = 0.66$; $R=1.23$, $P<0.01$), così come le lucertole del Gruppo 7 (Fig. 3.1.C) sono risultate significativamente orientate verso la direzione attesa di 185° (N=6, $\alpha = 196^\circ$, $r = 0.65$; $R=1.38$, $P<0.001$). Tutte e 3 le distribuzioni quindi sono risultate significativamente differenti da una distribuzione casuale, e dopo la normalizzazione dei dati la similarità tra le distribuzioni stesse diventa ancora più evidente. Il vettore medio di II ordine del Gruppo 3 infatti è risultato ben orientato a 8°, così come il vettore medio di II ordine del Gruppo 6 orientato a 6° e quello del Gruppo 7 orientato a 11°. Nella figura 3.2.(A-C) sono mostrate le distribuzioni dei 3 gruppi con i dati riportati a 0°.

Il confronto statistico tra le 3 distribuzioni non evidenzia nessuna differenza (Gruppo 3 vs. Gruppo 6: Watson U^2 test: $U^2_{5,6}=0.048$, $P>0.50$; Gruppo 3 vs. Gruppo 7: Watson U^2 test: $U^2_{6,6}=0.048$, $P>0.50$; Gruppo 6 vs. Gruppo 7: Watson U^2 test: $U^2_{5,6}=0.055$, $P>0.50$).

Il numero di animali che ha raggiunto il criterio di apprendimento nelle tre differenti direzioni è risultato simile: 6 lucertole del gruppo 3, 5 lucertole del gruppo 6 e 6 lucertole del gruppo 7.

			r	α (°)	u	P	Hc	α (°) normalizzato
GRUPPO 3	1	BRG	0.63	77	1.94	<0.050	0.61	12
	2	WGW	0.46	53	1.44	> 0.050	0.45	348
	3	RWB	0.57	75	1.77	<0.050	0.56	10
	4	RBG	0.78	83	2.33	<0.010	0.74	18
	5	GBR	0.85	94	2.34	<0.010	0.74	29
	6	GGG	0.61	35	1.66	<0.05	0.53	330
GRUPPO 6	7	WRG	0.74	97	2.06	<0.025	0.65	332
	8	WRB	0.55	124	1.74	<0.050	0.55	359
	9	WBW	0.86	159	2.25	<0.025	0.71	34
	10	BWR	0.66	141	2.00	<0.025	0.63	16
	11	GWB	0.74	126	2.34	<0.010	0.74	1
GRUPPO 7	12	WBR	0.62	211	1.75	<0.050	0.55	26
	13	BWG	0.80	187	2.27	<0.025	0.80	2
	14	RRR	0.69	192	2.15	<0.025	0.68	7
	15	RGW	0.67	170	2.06	<0.025	0.65	345
	16	BWB	0.69	222	1.75	<0.050	0.55	37
	17	GWR	0.60	195	1.87	<0.050	0.59	10

Tabella 3.1. Dati relativi ai vettori medi individuali delle scelte direzionali di ogni singolo animale negli ultimi 5 lanci di Training. Per ogni lucertola sono indicati lunghezza (r) e angolo (α) del vettore, valore del V-test (u) con probabilità (P), Homeward component (Hc) e angolo del vettore riportato a 0° (α normalizzato).

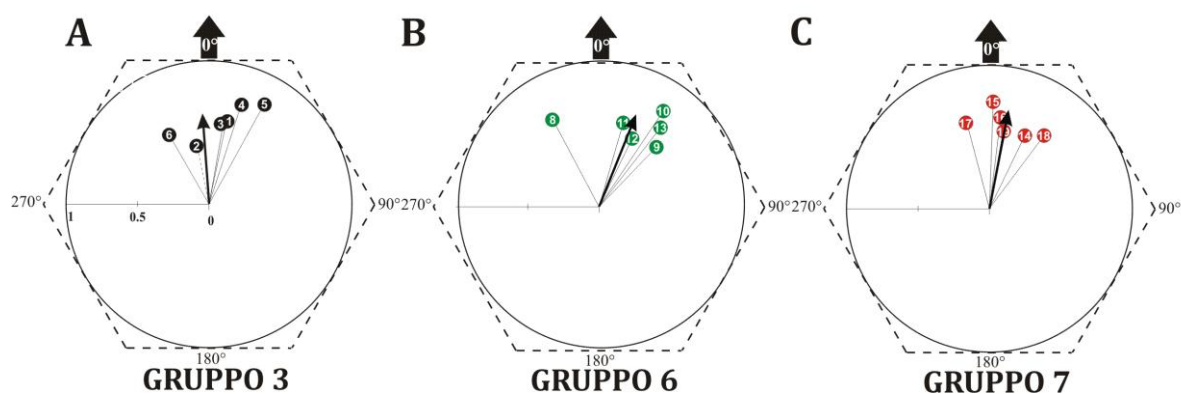


Figura 3.1.(A-C). A, B, C. Vettori medi individuali dei 5 lanci del criterio di apprendimento la cui direzione di addestramento è stata riportata a 0°. Le linee interne ad ogni esagono rappresentano i vettori medi individuali, calcolati dagli ultimi 5 lanci di training. I vettori di I ordine terminano con un numero che è identificativo della lucertola. E' inoltre rappresentato il vettore medio di II ordine per ogni gruppo che rappresenta la media dei singoli vettori di I grado. Le frecce esterne agli esagoni rappresentano la direzione di addestramento dei tre gruppi di animali riportata a 0°. La linea continua indica che il vettore risulta statisticamente significativo (V test). Ulteriori dettagli vedere la figura 3.1.(A-H) dell'Esperimento 1.

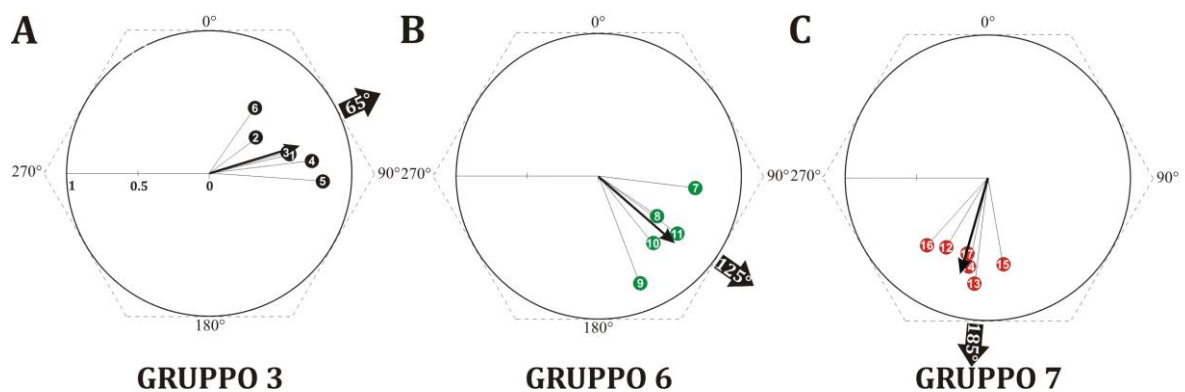


Figura 3.2.(A-C). Vettori medi individuali dei 5 lanci del criterio di apprendimento la cui è rappresentata la direzione reale di addestramento. A, B, C. Vettori medi di I ordine e di II ordine, ricavati con i metodi statistici della fig. 3.1. La direzione e il verso di ogni vettore sono correlati con la posizione della meta, che varia a seconda del gruppo e corrisponde a 65°, 125° e 185° rispettivamente per il gruppo 3 (A), 6 (B) e 7 (C). Ulteriori dettagli vedere la figura 3.1.(A-H) dell'Esperimento 1.

3.2. “LA BUSSOLA A POLARIZZAZIONE È CRONOMETRICA?”

3.2.1. Ultimo lancio di Training (Fig. 3.3.A)

Dodici di 17 lucertole hanno raggiunto il criterio di apprendimento. Nell'ultimo lancio di Training gli animali sono risultati correttamente orientati (V-test: $u=4.60$, $P<0.0005$), confermando così i dati del precedente fase sperimentale, in cui gli animali hanno dimostrato di riuscire ad apprendere una direzione di addestramento anche in assenza di disco solare od altri segnali orientati, se non il pattern naturale di luce polarizzata.

3.2.2. Test di Controllo (Fig. 3.3.B)

Sei di 12 animali sono stati testati dopo 6 giorni di permanenza nella stanza con ciclo L:D coincidente con il fotoperiodo naturale. Dopo 6 giorni senza training le lucertole sono apparse disorientate (V-test: $u=1.23$, $P>0.10$).

3.2.3. Fast Clock-shift Test (Fig. 3.3.C)

Sei di 12 animali sono stati testate dopo 6 giorni di permanenza nella stanza con ciclo L:D anticipato di 6 ore rispetto al fotoperiodo naturale. Dopo il trattamento di clock-shift gli animali sono risultati disorientati (direzione attesa: 270°, V-test: $u=0.24$, $P>0.25$).

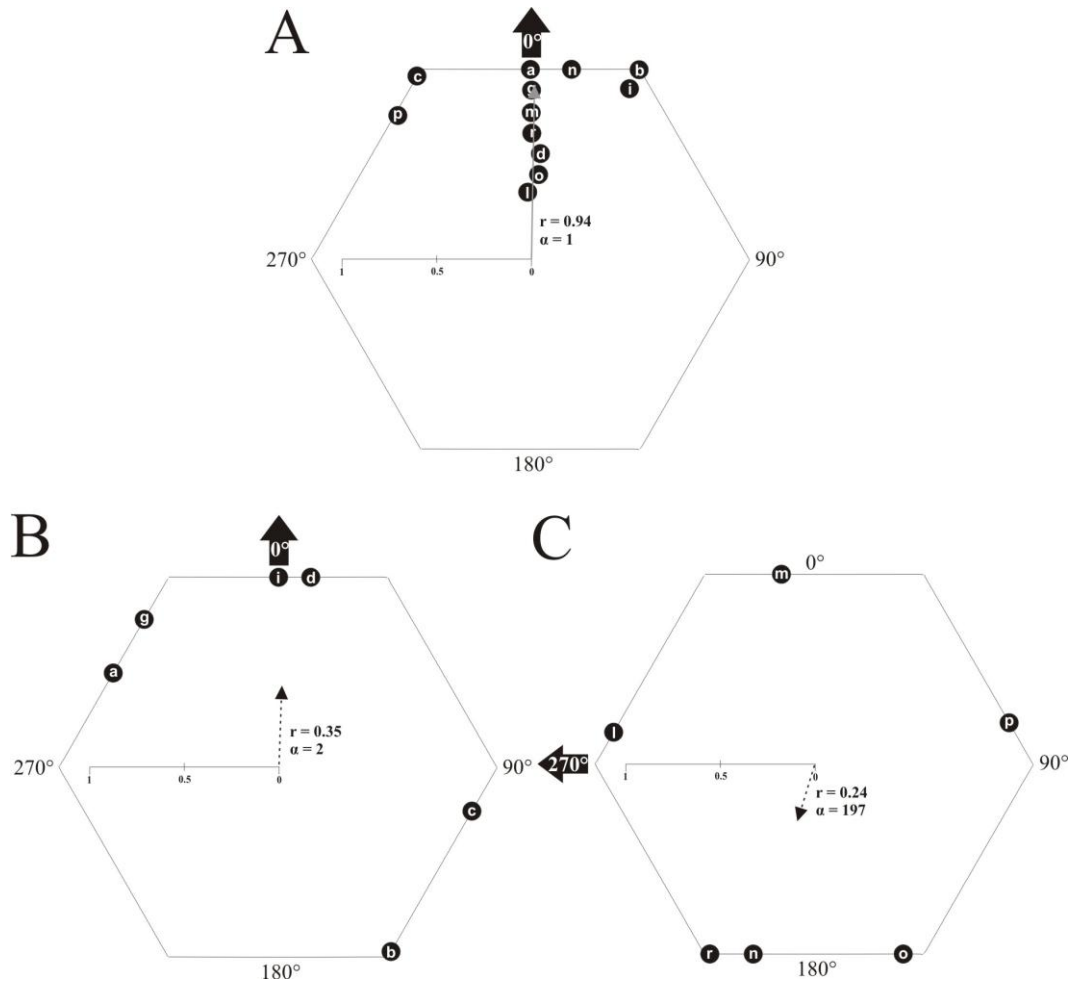


Figure 3.3.(A-C). **A. Ultimo lancio di Training:** scelte direzionali di ogni lucertola che ha raggiunto il criterio di apprendimento. **B. Controlli:** scelte direzionali delle lucertole testate 6 giorni dopo la fine del Training; **C. Fast clock-shift:** scelte direzionali delle lucertole testate dopo 6 giorni nelle stanze con ciclo L:D anticipato di 6h. Per ulteriori dettagli vedere la figura 3.1.(A-H) dell'Esperimento 1.

4. DISCUSSIONE

In letteratura non ci sono ad oggi dati sulla bussola a polarizzazione che sappiano se questo meccanismo di orientamento sia cronometrico. I pochi esperimenti che hanno indagato l'orientamento tramite pattern naturale di luce polarizzata nei Rettili sono spesso permeati da errori occorsi nella procedura sperimentale che rendono difficile l'interpretazione dei dati (Adler & Phillips, 1985; Freake, 1999).

Il presente esperimento ha avuto quindi un duplice obiettivo: *in primis* verificare che la nuova struttura progettata fosse idonea all'esecuzione dell'esperimento (addestrando 3 gruppi di lucertole ad apprendere la posizione della piattaforma posta a contatto di 3 differenti lati) e in seguito tentare di indagare la natura cronometrica della bussola a polarizzazione (sottoponendo le lucertole addestrate ad un trattamento di fast clock-shift di 6h).

I risultati della prima fase sperimentale ("Controllo dell'Apparato sperimentale") hanno dimostrato che l'apparato sperimentale non fornisce agli animali alcun tipo di landmark agli animali, che possa favorire alcune scelte direzionali piuttosto che altre. L'orientamento dei 3 gruppi infatti è significativamente focalizzato nella direzione di addestramento, il che significa che le lucertole sono in grado di apprendere una direzione di addestramento in assenza di disco solare. Non resta quindi che concludere che gli animali hanno utilizzato il pattern di luce polarizzata, proprio perché durante gli esperimenti, era l'unico fattore astronomico presente. Le analisi statistiche di confronto tra i 3 gruppi hanno successivamente evidenziato la mancanza di differenze nelle performance orientative degli animali, il che conferma ulteriormente che la procedura di addestramento ha ottenuto risultati simili in tutti i gruppi.

Poiché un fattore orientante molto cospicuo, come il disco solare, non era a disposizione delle lucertole durante il processo di orientamento, è stata particolarmente importante la dimostrazione ottenuta con questo esperimento dell' assenza di fattori orientanti di natura ottica riferibili all'apparato sperimentale utilizzato.

L'obiettivo della seconda fase sperimentale ("La Bussola a Polarizzazione è cronometrica?") è stato quello di indagare se il meccanismo alla base della bussola a polarizzazione fosse cronometrico, cioè se gli animali riuscissero ad utilizzare il pattern

di luce polarizzata compensandone le variazioni di posizione durante l'arco della giornata.

I risultati dell'addestramento hanno confermato ciò che era stato dimostrato nella fase sperimentale precedente, cioè che le lucertole sono in grado di apprendere una direzione di addestramento, in condizioni di cielo sereno (o parzialmente nuvoloso) e in assenza del disco solare (Fig. 3.1.A-C, Fig. 3.3.A).

Dopo la fase di Training le lucertole che hanno raggiunto il criterio di apprendimento, sono state sottoposte a 6 giorni di permanenza nelle rispettive stanze: con il ciclo L:D naturale (Controlli) o il ciclo L:D anticipato (Fast clock-shift).

Sorprendentemente, dopo la procedura di sfasamento, entrambi i gruppi sono risultati disorientati.

Interpretare questi risultati non è semplice e diverse ipotesi sono possibili.

L'esito della seconda fase sperimentale potrebbe venire inizialmente attribuito alla mancanza, al momento del test, di segnali astronomici appropriati. Mi sento di poter scartare questa possibilità, in quanto gli animali sono stati testati appositamente durante le prime ore della giornata, subito dopo l'alba, momento in cui la percentuale di polarizzazione allo zenit è massima (Brines & Gould, 1982). I tests inoltre sono stati effettuati in giornate serene o parzialmente nuvolose in cui, nella porzione di cielo a cui gli animali avevano accesso, sovrastante cioè il Morris water-maze, era presente una parte di cielo azzurro. Questo è stato un requisito fondamentale durante lo svolgimento di tutta la fase sperimentale, allo scopo di garantire la quantità massima possibile di luce polarizzata (Brines & Gould, 1982).

Un'altra possibile interpretazione dei risultati della seconda fase sperimentale è che le lucertole non fossero motivate ad orientarsi. In *P. sicula* il trattamento di clock-shift è una procedura ben consolidata dal gruppo di Etologia dell'Università di Ferrara, al termine del quale gli animali non hanno mai mostrato nessun comportamento anomalo attribuibile alla permanenza degli stessi in stanze o celle termostatate. I risultati di Foà e collaboratori (2009) riguardavano proprio esperimenti di sfasamento del fotoperiodo in *P. sicula*, nei quali gli animali si erano orientati correttamente verso la direzione attesa.

Avendo applicato quindi un protocollo sperimentale senza vizi (sia per quanto riguarda la struttura sperimentale, sia per quanto riguarda la procedura di clock-shift), una delle ipotesi più probabili è che, per motivi ad ora sconosciuti, le lucertole non siano

in grado di trattenere in memoria l'informazione utile per l'orientamento. A favore di questa ipotesi vi sono i risultati del Training, che chiaramente mostrano animali che sono in grado di apprendere una data direzione quando vengono addestrati in presenza del pattern di polarizzazione della luce come unico segnale astronomico. I risultati dell'Esperimento 1 (Beltrami *et al.*, 2010) inoltre hanno dimostrato che *P. sicula* riesce a percepire la luce polarizzata utilizzandola per l'orientamento, risultando quindi improbabile che un tale meccanismo di percezione non si sia evoluto parallelamente ad un sistema di compensazione cronometrica dello stimolo orientante. In alternativa (ma le due ipotesi non sono di fatto mutualmente esclusive), è possibile che la bussola a polarizzazione necessiti di essere ricalibrata quotidianamente da segnali esterni, come, per esempio, l'occasionale esposizione delle lucertole alla visione del disco solare. Per evitare la totale privazione della visione del sole alle lucertole durante le numerose settimane di attività sperimentale, gli animali sono stati esposti 2\3 volte a settimana per un'ora alla visione del disco solare, in diversi orari della giornata (eccetto durante lo svolgimento degli esperimenti). Durante il trattamento di clock-shift a entrambi i gruppi non era ovviamente concessa la visione del disco solare. Per le lucertole quindi, se l'ipotesi della ricalibrazione fosse corretta, sarebbe stato impossibile utilizzare il pattern di luce polarizzata durante i tests proprio perché non era stata loro fornita la possibilità di aggiornare quotidianamente il settaggio del segnale astronomico.

Una affascinante interpretazione può essere data considerando il campo magnetico terrestre come ulteriore segnale orientante presente al momento degli esperimenti. Negli animali, quali per esempio diverse specie di uccelli, l'esistenza di una bussola magnetica è stata dimostrata da diverso tempo (Merkel & Wiltschko, 1965; Wiltschko & Wiltschko, 1972). Durante la seconda fase del presente esperimento, l'eventuale coinvolgimento di una bussola magnetica nell'orientamento di *P. sicula* è da escludersi perché se le lucertole avessero utilizzato il campo magnetico si sarebbero orientate anche durante i test, cosa che di fatto non è avvenuta (Fig. 3.3.C). Per di più, nonostante sia ragionevole assumere la presenza in *P. sicula* di un meccanismo bussolare basato sulla percezione del Nord magnetico, non ci sono ad oggi dati in letteratura che trattino questo argomento, lasciando quindi aperta la porta alla pura congettura.

Chiaramente l'interpretazione di questi risultati è aperta ad altre supposizioni. Rimane in dubbio il fatto che ulteriori esperimenti in laboratorio sarebbero necessari

per chiarire questo interessante e cruciale interrogativo sulla compensazione temporale della bussola a polarizzazione.

CONCLUSIONI GENERALI

Non vi è economia nei processi evolutivi quando il risultato è d'importanza vitale, come lo è per un animale, ritornare nel proprio home-range. Già di per sé, l'orientamento mediante pattern di luce polarizzata (che ha un moto apparente solidale con quello solare) è considerato un ottimo adattamento evuzionistico in caso di cielo coperto, o nelle ore di alba e crepuscolo.

Il sistema orientativo basato sulla percezione del pattern naturale di polarizzazione presenta, rispetto alla bussola solare, dei vantaggi notevoli dal punto di vista evolutivo: infatti, mentre l'utilizzo della bussola solare può essere attuato solo se l'animale riesce a vedere il disco solare, la bussola a polarizzazione può essere utilizzata anche quando il sole è coperto dalla vegetazione o se il cielo è nuvoloso (Horváth & Varjú, 2003).

L'obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quello di verificare in *Podarcis sicula* l'esistenza di una bussola a polarizzazione e di dimostrare se l'occhio parietale abbia il ruolo di mediare questo sofisticato meccanismo di orientamento.

I primi esperimenti, effettuati in laboratorio, hanno confermato che la lucertola campestre riesce a percepire la luce linearmente polarizzata ed a utilizzarla per orientarsi. E' stato inoltre dimostrato per la prima volta che l'occhio parietale è l'organo deputato alla percezione dell'E-vector di luce polarizzata utilizzato nell'orientamento direzionale della lucertola campestre *Podarcis sicula*. Esperimenti precedenti avevano dimostrato che l'occhio parietale svolge un ruolo centrale anche per il funzionamento della bussola solare della lucertola campestre (Foà *et al.*, 2009).

I risultati di entrambi gli esperimenti (Foà *et al.*, 2009; Beltrami *et al.*, 2010) hanno permesso di concludere che gli occhi laterali della lucertola campestre non svolgono un ruolo apprezzabile nei meccanismi di orientamento che utilizzano il sole come punto di riferimento.

Dato che per molte specie animali (api, formiche del deserto, ecc..) la presenza di componenti UV è fondamentale per il funzionamento della bussola a polarizzazione, i miei risultati dell'esperimento indoor (Beltrami *et al.*, 2010) appaiono piuttosto sorprendenti, in quanto dimostrano che *P. sicula* è perfettamente in grado di utilizzare l'E-vector della luce polarizzata per orientarsi anche se la luce presentata non conteneva lunghezze d'onda nell'UV (cioè < di 400 nm).

Alla luce di tale evidenza, lo scopo del secondo esperimento è stato quindi quello di indagare quali lunghezze d'onda siano implicate nel funzionamento della bussola a polarizzazione.

I risultati dell'Esperimento 2 hanno dimostrato che le lucertole sono in grado di percepire le lunghezze d'onda corte (450-500 nm): se sottoposte a luce polarizzata blu o turchese, esse risultano infatti perfettamente orientate. Al contrario, la luce polarizzata nel range del verde sembra non essere fondamentale per il funzionamento della bussola a polarizzazione, così come la luce rossa. E' stato inoltre dimostrato la totale estraneità della potenza luminosa come possibile responsabile del mancato orientamento delle lucertole, evidenziando così il fatto che se gli animali sono disorientati non è un problema di soglia di percezione ma più probabilmente è a causa della natura intrinseca di un meccanismo di orientamento (bussolare) che viene attivato dalla percezione di luce polarizzata ad alcune lunghezze d'onda e non ad altre. Per un animale, percepire la luce polarizzata a lunghezze d'onda corte sembra avere un forte valore adattativo: Pomozi e colleghi (2001) hanno asserito infatti che in condizioni di cielo nuvoloso l'estensione del pattern di E-vector nelle aree coperte da nuvole è meglio utilizzabile da una bussola a polarizzazione quando la luce solare è percepita nel range del blu piuttosto che nel range del verde e del rosso. Nel cielo nuvoloso infatti il pattern di E-vector percepito nel blu è molto simile al corrispondente pattern percepito quando il cielo è sereno.

I risultati del secondo esperimento sono anche in accordo con studi elettrofisiologici eseguiti su *Xantusia vigilis* e *Uta stansburiana* che mostrano una maggiore sensibilità dei fotorecettori parietali per le lunghezze d'onda intorno al blu e al verde (Solessio & Engbreston, 1993; Solessio & Engbreston, 1999; Su *et al.*, 2006).

Per concludere il mio progetto di dottorato, è stato pianificato un esperimento che potesse risolvere l'interrogativo riguardante la natura cronometrica della bussola a polarizzazione. Due evidenze hanno maturato la pianificazione della terza fase sperimentale: la prima è che la bussola solare è stato dimostrato, da esperimenti outdoor, essere cronometrica (Foà *et al.*, 2009); la seconda è che sui Rettili non ci sono esperimenti, effettuati in natura, riguardanti la bussola a polarizzazione e la sua compensazione temporale.

Come era da attendersi dall'Esperimento 1 (Beltrami *et al.*, 2010) le lucertole sono state in grado di apprendere la direzione di addestramento anche nel nuovo set-up posizionato all'esterno. Questo è stato possibile grazie alla luce polarizzata, in quanto era l'unico segnale astronomico orientante presente al momento dell'addestramento e dei tests.

Dai risultati rimane comunque un punto di difficile soluzione: perché l'apprendimento dell'informazione non viene conservato nel tempo (6 giorni)? Le interpretazioni più probabili sono due: la prima è che ci sia a monte un problema di ricalibrazione del segnale astronomico, gli animali cioè necessiterebbero di calibrare quotidianamente la posizione del pattern di polarizzazione su un altro riferimento astronomico (es. il disco solare). La seconda ipotesi è che possa essere un problema di ritenzione dell'informazione appresa. Questo potrebbe essere dovuto ad una debolezza del segnale astronomico costituito dal pattern di polarizzazione, a differenza dell'azimut del disco solare, che si rivela essere un segnale orientante molto forte. Infatti gli esperimenti sulla bussola solare di Foà e colleghi (2009) hanno dimostrato esserci ritenzione dell'informazione anche dopo 7 giorni.

I risultati degli esperimenti da me effettuati durante i 3 anni di dottorato segnano in parte la storia dello studio dell'orientamento nei Rettili, in parte aprono la strada a nuovi interrogativi e quindi a nuovi potenziali progetti sperimentali che potrebbero finalmente chiarire il ruolo evolutivo della bussola a polarizzazione e delle sue eventuali interazioni con altri meccanismi di orientamento, come per esempio la bussola solare o la bussola magnetica. Sarebbe inoltre interessante approfondire la conoscenza dell'informazione data dal pattern di polarizzazione, per chiarire cioè la natura cronometrica dei meccanismi di apprendimento, che regola la ritenzione di una informazione.

BIBLIOGRAFIA

Able, K. (1993). Orientation cues used by migratory birds: A review of cue-conflict experiments. *Trends Ecol. Evol.*, **8**, 367-371.

Adler, K. (1976). Extraocular photoreception in amphibians. *Photochem Photobiol*, **23**, 275-298.

Adler, K., and Phillips, J. B. (1985). Orientation in a desert lizard (*Uma notata*): time-compensated compass movement and polarotaxis. *J. Comp. Physiol.*, **156**, 547-52.

Batschelet, E. (1981). Circular statistics in biology. London: Academic Press.

Beltrami, G., Bertolucci, C., Parretta, A., Petrucci, F., and Foà, A. (2010). A sky polarization compass in lizards: the central role of parietal eye. *J. Exp. Biol.*, **213**, 2048-2054.

Bertolucci, C., and Foà, A. (2004). Extraocular photoreception and circadian entrainment in nonmammalian vertebrates. *Cronobiology International*, **21**, 501-519.

Bisch, S. M. (1999). Orientierungsleistungen des nachtaktiven Wüstenkäfers *Parastizopus armaticeps Peringuey* (Coleoptera: Tenebrionidae). PhD thesis, Univ Bonn, Germany

Bissinger, B. E. (1980). Role of the parietal eye in the homing behaviour of lizards. *American Zoologist*, **20**, 842

Blum, M., and Labhart, T. (2000). Photoreceptor visual fields, ommatidial array, and receptor axon projections in the polarization-sensitive dorsal rim area of cricket compound eye. *J. Comp Physiol. A.*, **186**, 119-128.

Bohren, C. F. and Huffman, D. R. (1983). Absorption and Scattering of Light by Small Particles. New York.: John Wiley & Sons.

Brines, M. L., and Gould, J. (1982). Skylight polarization patterns and animal orientation. *J. Exp. Biol.*, **96**, 69-91.

Brownell, P., and Weber, T. (1995). Polarization vision in nocturnal sand scorpions. In: Nervous Systems and Behaviour. Burrows, M., Matheson, T., Newland, P.L. and Schuppe, H. Thieme Verlag, Stuttgart. [281]

Carr, A. F. (1965). The navigation of the green turtle. *Scient. Am.*, **212**, 79-86.

Chelazzi, G. (1992). Reptiles. In: Animal homing. Papi, F. London: Chapman and Hall. [235-255]

Crozier, W. J., and Mangelsdorf, A. F. (1924). A note on the relative photosensory effect of polarized light. *J. Gen. Physiol.*, **6**, 703-709.

De Rosa, C. T., and Taylor, D. H. (1980). Homeward orientation mechanisms in three species of turtles (*Trionyx spinifer*, *Chrysemys picta*, and *Terrapene carolina*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **7**, 15-23.

Duelli P., and Wehner, R. (1973). The spectral sensitivity of polarized light orientation in *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera). *J. Comp. Physiol.*, **86**, 37-53.

Eakin, R. M. (1973). The Third Eye. Berkeley, Los Angeles: University of California Press.

Ellis Quinn, B. A., and Simon, C. A. (1991). Lizard homing behaviour: the role of the parietal eye during displacement and radio-tracking, and time-compensated celestial orientation in the lizard *Sceloporus jarrovi*. *Behav Ecol Sociobiol*, **28**, 397-407.

Emlen, S. T. (1970). Celestial Rotation: Its importance in the development of migratory orientation. *Science*, **170**, 1198–1201.

Engbretson, A. (1992). Neurobiology of the lacertilian parietal eye system. *Ethol. Ecol. Evol.*, **4**, 89-107.

Firth, B. T., and Kennaway, D. J. (1980). Plasma melatonin in the scincid lizard *Trachydosaurus rugosus*: the effects of parietal eye and lateral eye impairment. *J. Exp. Biol.*, **85**, 311-321.

Fischer, C. (1961). Untersuchungen zur Sonnenkompaßorientierung und Laufaktivität von Smaragdeidechsen (*Lacerta viridis* Laur.). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **18**, 450–470.

Foà, A., Bearzi, M., and Baldacchini, N. E. (1990). A preliminary report on the size of the home range and on the orientational capabilities in the lacertid lizard *Podarcis sicula*. *Ethol. Ecol. Evol.*, **2**, 310.

Foà, A. (1991). The role of the pineal and the retina in the expression of circadian locomotor rhythmicity in the ruin lizard, *Podarcis sicula*. *J. Comp. Physiol. A*, **169**, 201-207.

Foà, A., Basaglia, F., Beltrami, G., Carnacina, M., Moretto, E., and Bertolucci, C. (2009). Orientation of lizards in a Morris water-maze: roles of the sun compass and the parietal eye. *J. Exp. Biol.*, **212**, 2918-2924.

Frantsevich, L. Govardovsky, V., Gribakin, F., Nikolajev, G., Pichka, V., Polanovsky, A., Shevchenko, V. and Zolotov, V. (1977). Astroorientation in *Lethrus* (*Coleoptera Scarabaeidae*). *J Comp. Physiol A*, **121**, 253-271.

Freake, M. J. (1999). Evidence for orientation using the e-vector direction of polarised light in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *J. Exp. Biol*, **22**, 1159-1166.

Freake, M. J. (2001). Homing behaviour in the sleepy lizard (*Tiliqua rugosa*): the role of visual cues and the parietal eye. *Behav Ecol Sociobiol*, **50**, 563-569.

Frisch, K. von. (1949). Die polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzen der Bienen. *Experientia*, **5**, 142-148.

Frisch, K. von (1967). The dance language and orientation of bees. Cambridge: Harvard Univ. Press.

Gourley, E. V. (1974). Orientation of the gopher tortoise *Gopherus polyphemus*. *Anim. Behav.*, **22**, 158-169.

Gregory, P. T., Macartney, J. M., and Larsen. K. (1987). Spatial patterns and movements. In: Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. Seigel, R. A., J. T. Collins, and S. S. Novak. New York: Macmillan Publishing Co. [366–395]

Gundy, G. C., Ralph, C. L., and Wurst, G. Z. (1975). Parietal eyes in lizards: zoogeographical correlates. *Science*, **190**, 671-673.

Hamasaki, D. I. and Eder, D. J. (1977). Adaptive radiation of the pineal system. In: Handbook of Sensory Physiology "The Visual System in Vertebrates", vol. **VII/5**. Berlin: Springer-Verlag: Crescittelli. [498-548]

Hawryshyn, C. W., Arnold, M. G., Bowering, E. and Cole, R. L. (1990). Spatial orientation of rainbow trout to plane-polarized light: The ontogeny of e-vector discrimination and spectral sensitivity characteristics. *J. Comp. Physiol.*, **166**, 565-574.

Helbig, A. J. (1990). Depolarization of natural skylight disrupts orientation of an avian nocturnal migrant. *Experientia*, **46**, 755-758.

Helbig, A.J., and Wiltschko, W. (1989). The skylight polarization patterns at dusk affect the orientation behaviour of blackcaps, *Sylvia atricapilla*. *Naturwissenschaften*, **76**, 227-229.

Horváth, G., and Varjú, D. (2003). Polarized light in animal vision: polarization patterns in nature. Berlin: Springer-Verlag.

Kent, G. C. (1997). *Anatomia comparata dei vertebrati*. Piccin.

Kramer, G. (1952). Experiments on bird orientation. *Ibis*, **94**, 265–285.

Kramer, G. (1957). Experiments on bird orientation and their interpretation. *Ibis*, **99**, 196-227.

Kramer, G. (1959). Recent experiments on bird orientation. *Ibis*, **101**, 399-416.

Labhart, T. (1980). Specialized photoreceptors at the dorsal rim of the honeybee's compound eye: polarizational and angular sensitivity. *J. Comp. Physiol.* **141**, 19-30.

Labhart, T., and Keller, K. (1992). Fine structure and growth of polarization-sensitive dorsal rim area in the compound eye of larval crickets. *Naturwissenschaften*, **79**, 527-529.

Landreth, H. F. (1973). Orientation behavior of the rattlesnake, *Crotalux atrox*. *Copeia* 1973, 26-31.

Lawson, M. A. (1985). Preliminary investigations into the roles of visual and pheromonal stimuli on aspects of the behaviour of the western plains garter snake, *Thamnophis radix haydeni*. MSc thesis, Univ. Regina, Saskatchewan, Canada.

Merkel F. H. and Wiltscho W. (1965). Magnetismus und Richtungsfinden zugunruhiger Rotkehlchen (*Erithacus rubecola*). *Vogelwarte*, **23**, 71-77.

Miller, W. H., and Wolbarsht, M. L. (1962). Neural activity in the parietal eye of the lizard. *Science*, **35**, 316-317.

Montgomery, K. C., and Heinemann, E. G. (1952). Concerning the ability of homing pigeon to discriminate patterns of polarized light. *Science*, **116**, 454-456.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, **11**, 47-60.

Muheim, R., Akesson, S. and Phillips, J. B. (2007). Magnetic compass of migratory Savannah sparrow is calibrated by skylight polarization at sunrise and sunset. *J. Ornithol.*, **148**, 485-494.

Murphy, P. A. (1981). Celestial compass orientation in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Copeia* 1981, **3**, 638-645.

Mussi, M., Haimberger, J. and Hawryshyn, C. W. (2005). Behavioural discrimination of polarized light in the damselfish *Chromis viridis* (family Pomacentridae). *J. Exp. Biol.*, **208**, 3037-3046.

Noble, G. K. (1934). Experimenting with the courtship of lizard. *Nat. Hist.*, **34**, 5-15.

Padoa, E. (1986). *Manuale di Anatomia comparata dei vertebrati*. Feltrinelli, Milano. A.S. Romer. [Sistema nervoso centrale, p. 381]

Papi, F., and Tongiorgi, P. (1963). Innate and learned components in the astronomical orientation of wolf spiders. *Ergeb. Biol.*, **26**, 259-280.

Papi F. (1976). The olfactory navigation system of the homing pigeon. *Verh. Dt. Zool. Ges.*, **69**, 84-205.

Pasqualetti, M., Bertolucci, C., Ori, M., Innocenti, A., Magnone, M.C., De Grip, W.J., Nardi, I., and Foà, A. (2003). Identification of circadian brain photoreceptors mediating photic entrainment of behavioural rhythms in lizards. *European Journal of Neuroscience*, **18**, 364-372.

Phillips, J. B., and Waldvogel, J. A. (1982). Reflected light cues generate the short-term deflector-loft effects. In: *Avian Navigation*. Papi, F. and Wallraff, H. G. Springer-Verlag. [190-202]

Phillips, J. B., and Waldvogel, J. A. (1988). Celestial polarized light patterns as a calibration reference for the sun compass of homing pigeons. *J. Theor. Biol.*, **131**, 55-67.

Phillips, J. B., Deutschlander, M. E., Freake, M. K., and Borland, S. C. (2001). The role of extraocular photoreceptors in newt magnetic compass orientation: parallels between light-dependent magnetoreception and polarized light detection in vertebrates. *J. Exp. Biol.*, **204**, 2543-2552.

Pomozi, I.; Horváth, G. and Wehner, R. (2001). How the clear-sky angle of polarization pattern continues underneath clouds: full-sky measurements and implications for animal orientation. *J. Exp. Biol.*, **204**, 2933-42.

Quay, W. B. (1979). The parietal eye-pineal complex. In: *Biology of the Reptilia*. Glans, C., Northcutt, R. G., and Ulinski, P. New York: Academic Press. [245-406]

Reppert, S. M., Zhun, H., and White, R. H. (2004). Polarized light helps monarch butterflies navigate. *Current Biology*, **14**, 155-158.

Santschi, F. (1911). Observations et remarques critiques sur le mécanisme de l'orientation chez les fourmis. *Rev. Suisse Zool.*, **19**, 305-38.

Santschi, F. (1923). L'orientation sidérale des fourmis, et quelques considérations sur leurs différentes possibilités d'orientation. I. Classification des diverses possibilités d'orientation chez les fourmis. *Mém. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, **4**, 137-175.

Solessio, E., and Engbretson, G. A. (1993). Antagonistic chromatic mechanisms in photoreceptors of the parietal eye of lizards. *Nature*, **364**, 442-445.

Solessio, E., and Engbretson, G. A. (1999). Electroretinogram of the parietal eye of lizards: photoreceptor, glial, and lens cell contributions. *Vis. Neurosci.*, **16(5)**, 895-907.

Stockhammer, K. (1956). Zur Wahrnehmung der Schwingungsrichtung linear polarisierten Lichtes bei Insekten. *Z. vergl. Physiol.*, **38**, 30-83.

Strijbosch, H., Rooy, P. Th. J., and Voeselek, L. A. C. (1983). Homing behaviour of *Lacerta agilis* and *Lacerta vivipara* (Sauria, Lacertidae). *Amphibia-Reptilia*, **4**, 43-7.

Su, C., Luo, D., Terakita, A., Shichida, Y., Liao, H., Kazmi, M. A., Sakmar, T. P. and Yau, K. (2006). Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science*, **311**, 1617-1621.

Taylor, D.H., and Auburn, J.S. (1978). Orientation in amphibians by linearly polarized light. In: Animal migration, navigation and homing. Schmidt-Koenig, K., and Keeton, W.T. Berlin Heidelberg, New York: Springer. [334-346]

Tosini, G., and Menaker, M. (1998). Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. *J. Neurosci.*, **18**, 1105-1114.

Underwood, H. (1983). Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: a multioscillator system. *J. Comp. Physiol.*, **152**, 265-274.

Verkhovskaya, I. N. (1940). The influence of polarized light upon the phototaxis of certain organisms. *Bull Moscow Nat. Hist. Soc. Biol. Sect.*, **49**, 101-113. (in Russian)

Wehner, R. (1992). Arthropods. In: Animal homing. Papi, F. London: Chapman and Hall. [45-144]

Wehner, R. (1994). The polarization vision project: championing organismic biology. In: Neural basis of behavioural adaptations. K. Schildberger and N. Elsner. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.. [103-143]

Wehner, R., and Russel, S. (1985). The bee's celestial compass – A case study in behavioural neurobiology. *Fortschr. Zool.*, **31**, 11-53.

Wiltschko, W. (1968). Über den Einfluß statischer Magnetfelder auf die Zugorientierung der Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*). *Z. Tierpsychol.*, **25**, 536-558.

Wiltschko, W. and Wiltschko, R. (1972). Magnetic compass of European robins. *Science*, **176**, 62-64.

Wiltschko, W., Wiltschko, R., Munro, U., and Ford, H. (1998). Magnetic versus celestial cues: cue-conflict experiments with migrating silvereyes at dusk. *J. Comp. Physiol. A*, **182**, 521-529.

Wiltschko, W. and Wiltschko, R. (2001). Light dependent magnetoreception in birds: the behaviour of European robins, *Erithacus rubecula*, under monochromatic light of various wavelengths and intensities. *J. Exp. Biol.*, **204**, 3295-3302.

Wolf R., Gebhardt, B., Gademann, R., and Heisenberg, M. (1980). Polarization sensitivity of course control in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A*, **139**, 177-191.

Zar, J. H. (1999) Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. [26, 592-615; 27, 616-662].

Zufall, F., Schmitt, M., and Menzel, R. (1989). Spectral and polarized light sensitivity of photoreceptors in compound eye of the cricket (*Gryllus bimaculatus*). *J. Comp. Physiol. A.*, **164**, 597-608.

♣ Le fotografie e le loro elaborazioni sono state realizzate dal Gruppo di Etologia dell'Università di Ferrara.

A sky polarization compass in lizards: the central role of the parietal eye

G. Beltrami¹, C. Bertolucci¹, A. Parretta^{2,3}, F. Petrucci^{2,4} and A. Foà^{1,*}

¹Dipartimento di Biologia ed Evoluzione, ²Dipartimento di Fisica, Università di Ferrara, Via Borsari 46, Ferrara, 44121, Italy, ³ENEA, Centro Ricerche 'E. Clementel', Bologna, 40129, Italy and ⁴INFN, sezione di Ferrara, Ferrara, 44122, Italy

*Author for correspondence (foa@unife.it)

Accepted 8 March 2010

SUMMARY

The present study first examined whether ruin lizards *Podarcis sicula* are able to orientate using the e-vector direction of polarized light. Ruin lizards were trained and tested indoors, inside a hexagonal Morris water maze, positioned under an artificial light source producing plane polarized light with a single e-vector, which provided an axial cue. Lizards were subjected to axial training by positioning two identical goals in contact with the centre of two opposite side walls of the Morris water maze. Goals were invisible because they were placed just beneath the water surface, and water was rendered opaque. The results showed that the directional choices of lizards meeting learning criteria were bimodally distributed along the training axis, and that after 90 deg rotation of the e-vector direction of polarized light the lizards directional choices rotated correspondingly, producing a bimodal distribution which was perpendicular to the training axis. The present results confirm in ruin lizards results previously obtained in other lizard species showing that these reptiles can use the e-vector direction of polarized light in the form of a sky polarization compass. The second step of the study aimed at answering the still open question of whether functioning of a sky polarization compass would be mediated by the lizard parietal eye. To test this, ruin lizards meeting learning criteria were tested inside the Morris water maze under polarized light after their parietal eyes were painted black. Lizards with black-painted parietal eyes were completely disoriented. Thus, the present data show for the first time that the parietal eye plays a central role in mediating the functioning of a putative sky polarization compass of lizards.

Key words: lizards, orientation, Morris water maze, sky polarization compass, parietal eye.

INTRODUCTION

A time-compensated celestial compass may function using two different daylight celestial cues. Compass bearings can be calculated using the sun's azimuth (the point where the solar meridian – a line dropped vertically from the sun's position – intersects with the horizon), and for this it is necessary to know the pattern of changes of the sun's azimuth over time. Alternatively, sky polarization patterns can be used, since these patterns also vary predictably with the sun's position (Wehner, 1992). As sunlight passes through the atmosphere it is partially polarized, as a function of the scattering angle. The e-vector of each scattered ray exhibits a prevailing vibration direction, which is perpendicular to the plane in which the ray was deflected [Rayleigh scattering (Brines and Gould, 1982)]. This results in a symmetrical e-vector pattern, which is fixed with respect to the solar and anti-solar meridians. One of these meridians can be used as a reference direction, and compass bearings can be determined by measuring the angle between this reference and the direction of interest. This compass was defined as a sky polarization compass (Frisch, 1949). Like the sun azimuth compass, the sky polarization compass requires time compensation to take into account changes in e-vector direction and pattern rotation as the sun changes elevation and moves horizontally across the sky (Brines and Gould, 1982).

In several lizard species a time-compensated celestial compass has been shown to exist (Freake, 2001), but is still unclear whether these reptiles are actually equipped with a sun azimuth compass, a sky polarization compass, or both. A sky polarization compass may provide an advantage over a sun azimuth compass, because it remains functional even when the sun's position is obscured by vegetation and clouds, as long as some blue sky is visible. Often,

small lizards face situations in which they have to hide themselves under vegetation and cover to avoid predation, and, at the same time, the necessity to orientate within or toward their territories or burrows, or toward known food sources, may render the use of a sky polarization compass adaptive.

Results of experiments carried out by Adler and Phillips (Adler and Phillips, 1985) in the fringe-toed lizard *Uma notata* and by Freake (Freake, 1999) in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa* demonstrated that lizards can use the e-vector direction of polarized light in the form of a sky polarization compass. Both groups proposed that such a sky polarization compass sense could be mediated by the lizard parietal eye (Adler and Phillips, 1985; Freake, 1999). This view is supported by anatomical data suggesting that the photoreceptors in the parietal eye are arranged in a pattern that would theoretically allow analysis of the e-vector of linearly polarized light (Hamasaki and Eder, 1977). Up to now, however, there has been no experimental evidence that the lizard parietal eye actually plays a role in the functioning of a sky polarization compass. Field studies, carried out in both the spiny lizard *Sceloporus jarrovi* and the sleepy lizard *T. rugosa*, showed that an intact parietal eye is required to perform goal orientation under the sun, but these data do not indicate whether the lizard's parietal eye mediates the functioning of a sun's azimuth compass or a sky polarization compass (Ellis-Quinn and Simon, 1991; Freake, 2001).

We previously used a Morris water maze to investigate compass orientation mechanisms in the ruin lizard *Podarcis sicula* (Morris, 1984; Foà et al., 2009). In the open field, during sunny days, lizards were individually trained to swim from the centre of the water maze onto a hidden platform (the goal), positioned at the periphery of the maze in a single compass direction. The results (Foà et al., 2009)

showed that: (1) lizards learn to swim directly towards the hidden goal under the sun in the absence of visual feature cues; (2) the learned orientation response is mediated by a time-compensated celestial compass; and (3) an intact parietal eye is required to perform goal orientation under the sun.

The present study was aimed at answering the still open question of whether the lizard parietal eye plays a role in the functioning of a sky polarization compass. The first step of the investigation consisted of testing whether ruin lizards can use a linearly polarized light source to orientate inside a Morris water maze positioned indoors. As ruin lizards actually demonstrated this ability, we further examined whether individual lizards whose parietal eyes were painted black could still use the e-vector direction of linearly polarized light for orientation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ruin lizards *P. sicula* (Rafinesque-Schmaltz 1810; adults only) were collected from the area of Ferrara (Italy; longitude: 12°21'44" E, latitude: 45°03'72" N) under the authority of the Parco Delta del Po-Emilia Romagna (Department of Wildlife and Fisheries). Details of

lizard maintenance have been published previously (see Foà et al., 2009). The captive maintenance procedures and research protocols were approved by the University of Ferrara Institutional Animal Care and Use Committee and by the Italian Ministry of Health.

Experimental apparatus

The Morris water maze was the same maze which was utilized previously (Foà et al., 2009). The maze was placed inside a laboratory with no access to natural light. Water was maintained at a constant temperature of $29 \pm 1.0^\circ\text{C}$ by means of aquarium thermostats (Tetrahat, Tetra, Milan, Italy), and rendered opaque by the addition of fossil flour (Clarcel, Ceca, Honfleur, France). The goals consisted of two identical transparent Plexiglas rectangular platforms ($23.7\text{ cm} \times 16\text{ cm}$, 2.5 cm thick), each mounted on a pedestal (11.5 cm from the maze bottom). The maze was surrounded by a thick black opaque cloth fence to a height of 190 cm (Fig. 1A). This prevented the lizards from seeing laboratory features. Peep holes were built through the cloth fence allowing observers to follow lizard behaviour during releases and for positioning of the lens of a movie camera (GZ-MG21E, JVC, Yokohama, Japan), which recorded all lizard trials. The top of the fence was closed with an

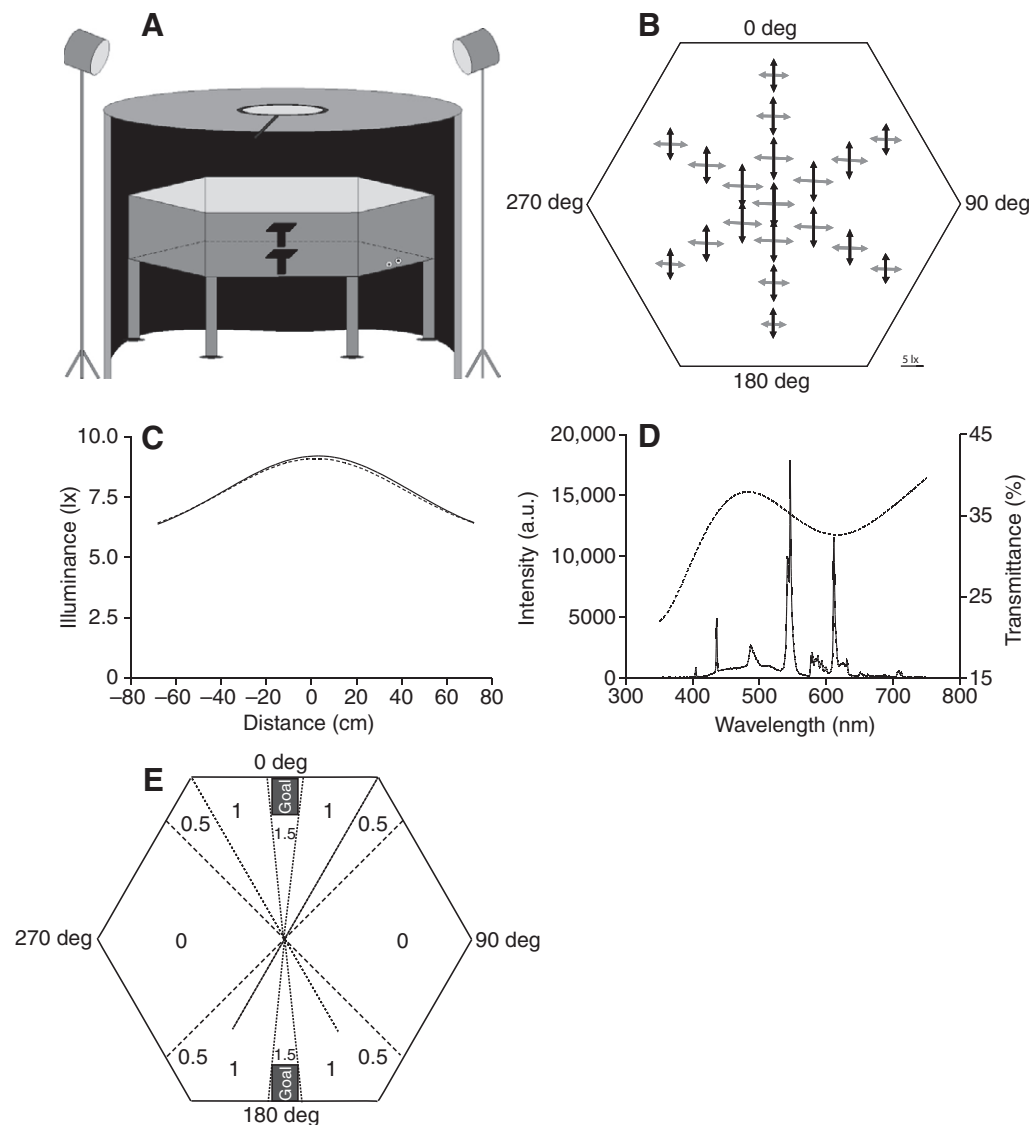


Fig. 1. (A) The hexagonal Morris water maze used in experiments. The figure shows the two goals mounted on their pedestals, located in direct contact with the centre of opposite side walls, and the black wood roof with the linear polarized filter. The black non-transparent fence completely surrounding the water maze is partially shown. Further details are reported in Materials and methods. (B) The intensity and direction of the polarization of light on the horizontal plane at the level of the goal platforms, measured along the three directions connecting opposite side walls of the hexagonal maze. Each arrow indicates the direction of the plane of polarization (e-vector). The length of the arrows is proportional to the intensity of illumination. Arrows were referred to a filter window with the polarization direction parallel (black) or perpendicular (grey) to the 0–180 deg axis. (C) Profile of the illuminance as a function of distance from the centre of the maze for the polarization direction parallel (solid line) or perpendicular (dotted line) to the 0–180 deg axis. (D) Spectral intensity of light transmitted by the polarized window, averaged with respect to both filter orientation (solid line) and spectral transmittance of the polarized filter (dotted line). (E) Schematic drawing of the water maze surface indicating the score system used to establish learning criteria. The top and the bottom of the hexagon identify goals (direction 0 and 180 deg).

opaque black wood roof (diameter 266 cm). Two floor lights (284 cm high; AEF Lighting, Ferrara, Italy), each equipped with four cool electronic energy saving lamps (32 W and 1920 lm each, Atlas Lighting Co., Brescia, Italy) protruded 94 cm above the fence, at opposite positions. A linear polarized filter (diameter 50 cm, HN42, 3M, Norwood, MA, USA) was placed in a hole (diameter 48 cm) cut around the centre of the roof, to illuminate the maze by a plane polarized light with a single e-vector. The polarized filter was sandwiched between a sandblasted glass sheet 5 mm thick on the top side and a planar glass sheet 5 mm thick on the bottom side. The sandblasted glass sheet operates as a light diffuser. Light beams produced by the lamps formed an incidence angle of 45 deg with the horizontal plane containing the polarized filter. The intensity, degree and direction of the polarization of light on the horizontal plane at the level of the goals were measured by an illuminance meter (Fig. 1B,C; Konica Minolta T-10, Konica Minolta Sensing Inc., Tokyo, Japan), equipped with a linear polarized filter (PL-C, Canon Inc., Tokyo, Japan). Because of the spatial arrangement of light beams, asymmetries of illuminance patterns at the level of the surface and vertical walls of the Morris water maze were negligible (Fig. 1B,C). Illuminance changed from 9.3 lx at the centre to 6.3 lx at the periphery of the maze (Fig. 1C). Rotation of the polarized filter by 90 deg did not change the profile and intensity of the illuminance inside the Morris water maze at the level of the goals (Fig. 1B; Student's *t*-test: $t_{36}=1.4$, $P>0.16$). The degree of polarization of light under the filter window was always unitary at all the tested points in the Morris water maze (Fig. 1B). The spectrum of the plane polarized light was measured by a spectrometer operating in the visual–near infrared (Vis-NIR) region (Fig. 1D; Ocean Optics USB 2000, Dunedin, FL, USA). The spectrum is that typical of a fluorescent lamp with colour temperature of 5500–6000 K, the same as that of natural light. The spectral transmittance (Fig. 1D) of the polarized filter was measured by a spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 900, Waltham, MA, USA). As can be seen, the filter operates well as a polarizer in the full visible spectrum, where its transmittance is around 35%. The reflectance of the linearly polarized light on the water maze walls was measured to verify the existence of variations in brightness on the vertical walls of the Morris water maze [see p381 of Horvath and Varjú (Horvath and Varjú, 2003)]. Variations in brightness were found to be functionally negligible (<0.3 lx).

Release conditions

One hour before starting the individual releases, lizards were transferred from the vivaria to glass containers in which they were kept wet, at the same temperature as the Morris water maze, as previously described (Foà et al., 2009).

Experimental protocols

Experiments were carried out from June to October between 11:00 and 14:00 h. Lizards were trained and tested under an artificial light source producing plane polarized light with a single e-vector that provided an axial cue. Lizards were subjected to axial training by positioning two identical goals in contact with the centre of two opposite side walls along the axis 0–180 deg (the training axis) of the maze. If lizards were able to use a single e-vector of plane polarized light as a reference for orientation, their directional choices should show a symmetrical, bimodal distribution along the training axis 0–180 deg. Before starting pre-training and training, lizards were subdivided in two groups. The Parallel group was trained along an axis which was parallel to the e-vector direction. The Perpendicular group was trained along an axis which was

perpendicular to the e-vector direction, an experimental condition which was achieved by rotating the polarized filter by 90 deg. For each lizard the release order changed in a random sequence from one trial series to another, during both pre-training and training. Each lizard was subjected to two trials per day.

Pre-training

Goal platforms were above the opaque water surface. Twelve trials per lizard were performed, for which the release box containing the lizard was faced alternately toward one or the other goal. In the first four trials the release box was placed in direct contact with the goal, in the subsequent four trials the box was moved 10 cm away from the goal, while in the remaining four trials the box was positioned in the centre of the water maze.

Training

For training, the surface of the goal platform was placed just beneath the opaque water surface, and was thus invisible to the lizards. Each lizard was released from the centre of the maze by orienting the release box each time in a different direction, randomly chosen. The straight course from the centre of the maze to the centre of each side wall containing the goal measures 77 cm. The first point of a side wall touched by a lizard was recorded as the directional choice in that trial. After each trial the side walls of the maze were cleaned to avoid the appearance of unevenness in the visual field of the lizards which might be used as orienting feature cues. Lizards reaching one of the two goals (± 5 deg from platforms) were rewarded, and their trials were given a score of 1.5 (Fig. 1E). The reward consisted of immediately lowering the water level in the maze, so that the goal and the lizard placed on it could emerge completely from the water within 5–6 s. The lizard was kept there for 30 s before recapture. Lizards reaching the correct side walls, but not the goal platforms, were not rewarded and their trials were given a score of 1 (Fig. 1E). Lizards reaching one of the two side walls contiguous with the goal side wall were not rewarded, and their trials were scored from 0.5 to 0, with the score decreasing with distance from the goal (Fig. 1E). In all cases, lizards that reached one of the four side walls not including the goal platforms were left in the water for 30 s before recapture. Sometimes lizards sank immediately at release, and after 30–65 s spent underwater re-emerged and swam around in circles or, more often, escaped towards the nearest wall of the maze. In all these situations the lizard's directional choice was discarded, and the trial of the unsuccessful lizard was repeated. Methods to measure the compass bearings of lizards have been reported previously (Foà et al., 2009).

Learning criteria

To meet the learning criteria each lizard had to obtain a score of 6 or higher within six consecutive trials, with a maximum of one trial scoring ≤ 0.5 , and with the last trial scoring ≥ 1 (Fig. 1E). Lizards failing to meet these learning criteria were excluded from experiments.

E-vector rotation test

Once they had met the learning criteria, we tested whether lizards had learned to orientate along the training axis by using the e-vector direction of plane polarized light. To do this, the orientation of either Parallel or Perpendicular lizards was tested after 90 deg rotation of the e-vector direction with respect to the e-vector direction during training. Either Parallel or Perpendicular lizards were expected to orientate along a parallel axis with respect to training axis. For each lizard of either group the orientation test consisted of a single trial carried out in the absence of goal platforms.

Refreshing training trials

At the end of the e-vector rotation test, lizards were subjected to a second training session consisting of two trials in the presence of both goal platforms, placed as previously along the 0–180 deg axis. Again, Parallel lizards were trained with the e-vector parallel to the training axis while Perpendicular lizards were trained with the e-vector perpendicular to the training axis. Only lizards scoring ≥ 1.0 in both trials were admitted to the subsequent orientation test, which was aimed at establishing the role of the parietal eye in perceiving the e-vector direction of polarized light.

Black painted parietal eye test (Par-P)

Twelve Parallel and 17 Perpendicular lizards were admitted to the test. For either group the e-vector direction was the same as during training. One hour prior to testing the parietal eye of all lizards was painted black (Par-P) with non-dangerous colour (Craft color, Bologna, Italy) by means of a fine paintbrush. For each Par-P lizard the orientation test consisted of a single trial in the absence of goal platforms.

Control test

Another group of Parallel lizards was subjected to pre-training and training until they met the learning criteria. Before testing, the plane polarized filter was taken off the roof. For each Parallel lizard the orientation test under diffused, not polarized, light consisted of a single trial in the absence of goal platforms.

Data analysis and statistics

Our results showed that in most training and orientation tests lizards' directional choices were distributed in an approximately bimodal fashion. In all these situations mean vector length would be zero (or would approach zero) and no mean angle (mean direction) could be determined [see p.17 of Batschelet (Batschelet, 1981) and p.607 of Zar (Zar, 1999)]. One can get meaningful results from such bimodal bearing distributions only by doubling the angles, so that unimodal distributions are obtained on which statistical tests can be finally applied (Batschelet, 1981). In previous studies the method of doubling the angles was invariably applied when bearings distributions were found to be bimodal (e.g. Adler and Phillips, 1985; Freake, 1999; Wiltshko and Wiltshko, 2001; Muheim et al., 2007). In the present study we doubled all angles (directions) chosen by lizards during the last training trial and used the data obtained to calculate the training mean vector. We also doubled all angles chosen by the same lizards during the single trial orientation test and used the data obtained to calculate the test mean vector. The Rayleigh test was used to test whether the directions chosen by the lizards deviated from uniform (Batschelet, 1981). When bearing distributions were not bimodal angles chosen by lizards were not doubled. This happened, for instance, when directions chosen by lizards did not deviate from uniform. For each treatment, the Hotelling test for paired data and the Watson U^2 -test were applied to test for differences between the directions chosen by lizards in the last training trial and the directions chosen by the same lizards in the respective single trial orientation test (Batschelet, 1981). The Watson U^2 -test was applied to test for differences in orientation between Parallel lizards and Perpendicular lizards.

RESULTS

Training trials

Fifteen of 26 lizards belonging to the Parallel group, and 17 of 29 lizards of the Perpendicular group met the learning criteria

(Fig. 2A,E). There were no significant differences between Parallel and Perpendicular lizards in the number of training trials necessary to reach the learning criteria (Parallel: 19.04 ± 1.55 ; Perpendicular: 18.94 ± 1.50 , means \pm s.e.m.; Student's t -test: $t_{39}=0.04$, $P>0.95$). As expected, the directional choices of both groups showed a symmetrical, bimodal distribution along the training axis (0–180 deg). After doubling the angles, the directional choices of either the Parallel group or the Perpendicular group in the last training trial were found to deviate from uniform (Rayleigh test: $Z=12.46$, $P<0.001$, and $Z=15.18$, $P<0.001$, respectively). In the last training trial the directional choices of Parallel lizards were not significantly different from those of Perpendicular lizards (Watson U^2 -test: $U^2_{15,17}=0.038$, $P>0.50$).

E-vector rotation tests

When tested after 90 deg rotation of the e-vector axis, the directional choices of lizards had a symmetrical, bimodal distribution along the rotated axis (90–270 deg) (Fig. 2B,F). After doubling the angles, the directional choices of the Parallel group in the e-vector rotation test were found to deviate from uniform ($N=15$; Rayleigh test: $Z=4.48$, $P<0.01$) and the 95% confidence limits (34–146 deg) included the expected direction (90 deg); the same was true for the Perpendicular group ($N=17$; Rayleigh test: $Z=7.16$, $P<0.001$) and the 95% confidence limits (35–107 deg) included the expected direction (90 deg). The directions chosen by the Parallel group in the e-vector rotation test were significantly different from those that the same lizards chose in the last training trial before rotation (Hotelling test for paired data: $F_{2,13}=15.93$, $P<0.0005$); the same was true for the Perpendicular group (Hotelling test for paired data: $F_{2,15}=17.66$, $P<0.0005$). After rotation, the directional choices of Parallel lizards were not significantly different from those of Perpendicular lizards (Watson U^2 -test: $U^2_{15,17}=0.029$, $P>0.50$).

Refreshing training trials

Twelve of 15 lizards of the Parallel group and all 17 Perpendicular lizards scored ≥ 1 in both refreshing training trials (Fig. 2C,G). Their directional choices in the second refreshing training trial were found to deviate from uniform (Rayleigh test: $Z=10.0$, $P<0.001$, and $Z=10.53$, $P<0.001$, respectively). The directions chosen by the Parallel group in the refreshing trials were significantly different from those the same group chose in the previous e-vector rotation test (Hotelling test for paired data: $F_{2,10}=16.16$, $P<0.001$) and the same was true for the Perpendicular group (Hotelling test for paired data: $F_{2,15}=13.25$, $P<0.0005$). In the refreshing trials the directional choices of Parallel lizards were not significantly different from those of Perpendicular lizards (Watson U^2 -test: $U^2_{12,17}=0.025$, $P>0.50$).

Par-P tests

The directional choices of Par-P lizards of either the Parallel ($N=12$) or the Perpendicular group ($N=17$) did not deviate from uniform (Rayleigh test: $Z=0.96$, $P>0.20$, and $Z=0.81$, $P>0.20$, respectively) (Fig. 2D,H).

Control test

A new group of 18 lizards was attributed to the Parallel group and subjected to the usual training procedure (Fig. 3). Nine lizards met the learning criteria, and their directional choices showed a symmetrical, bimodal distribution along the training axis (0–180 deg). After doubling the angles the directional choices in the last training trial deviated from uniform (Rayleigh test:

$Z=6.85$, $P<0.001$). After the plane polarized filter was taken off the roof, the directional choices of the group in the orientation test did not deviate from uniform (Rayleigh test: $Z=0.69$, $P>0.50$) and were significantly different from those expressed in the last trial of the last training session (Watson U^2 -test: $U^2_{9,9}=0.37$, $P<0.002$).

DISCUSSION

The present study first examined whether ruin lizards *P. sicula* are able to orientate using the e-vector direction of polarized light. For this purpose, lizard orientation was tested indoors, under an artificial light source producing plane polarized light with a single e-vector that provided an axial cue. Ruin lizards were therefore subjected to

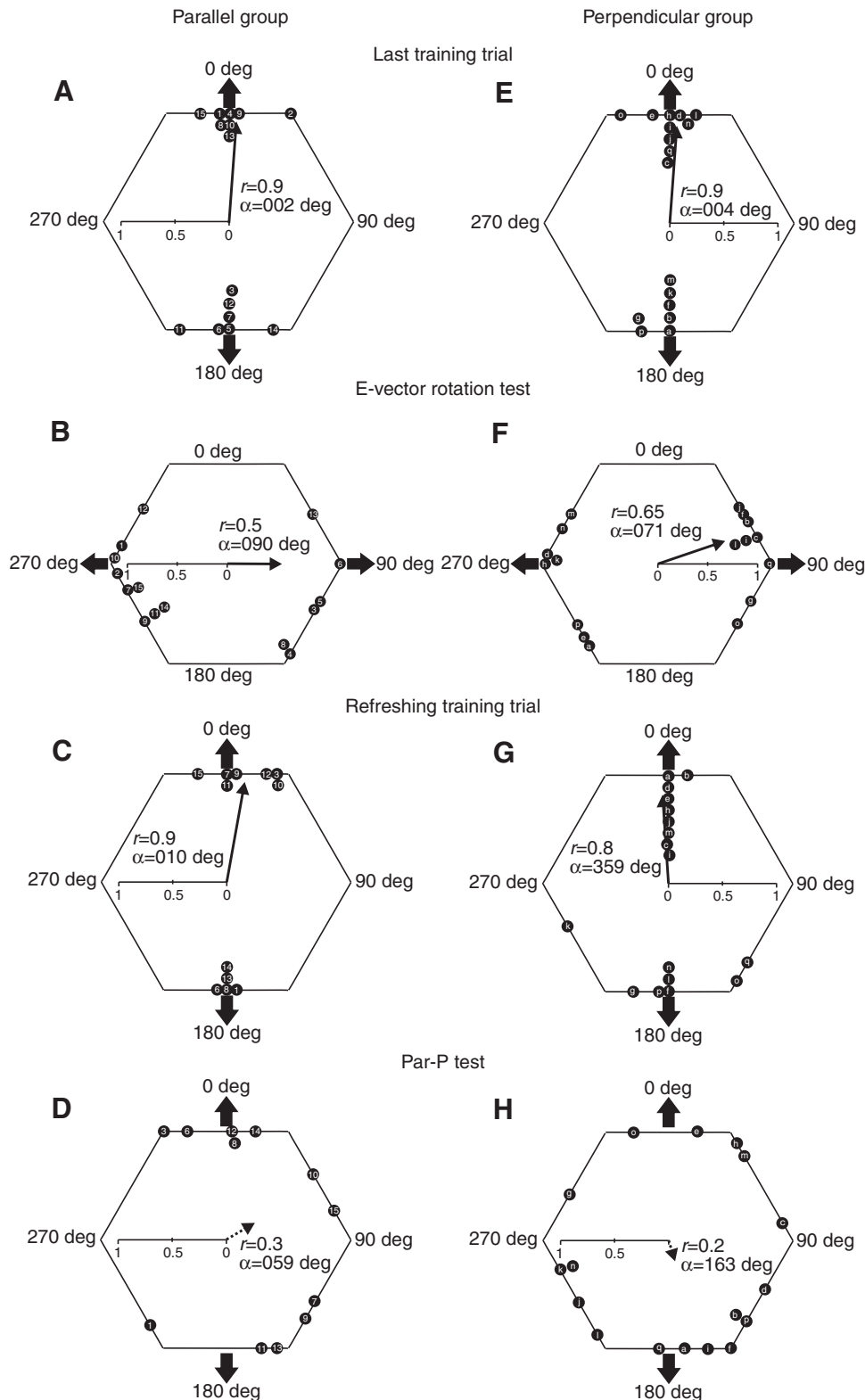


Fig. 2. Orientation behaviour of intact and Par-P lizards trained and tested under an artificial light source producing plane polarized light with a single e-vector. Each symbol indicates the directional choice of a single lizard identified by its number (Parallel) or letter (Perpendicular). In each hexagon the inner arrow represents the mean vector of the group calculated after doubling the angles. In each hexagon the mean vector length (r) and the mean direction (α) of the group are reported. Solid line mean vector: the bearings distribution deviated from uniform; dotted line mean vector: the bearings distribution did not deviate from uniform. For each hexagon, the two outer solid arrows in A, C, E and G mark the expected axis of orientation of intact lizards in training trials (0–180 deg), and in D and H the expected axis of orientation of Par-P lizards in test trials (0–180 deg). The two outer solid arrows in B and F mark the expected axis of orientation of intact lizards in test trials after 90 deg rotation of the e-vector (90–270 deg).

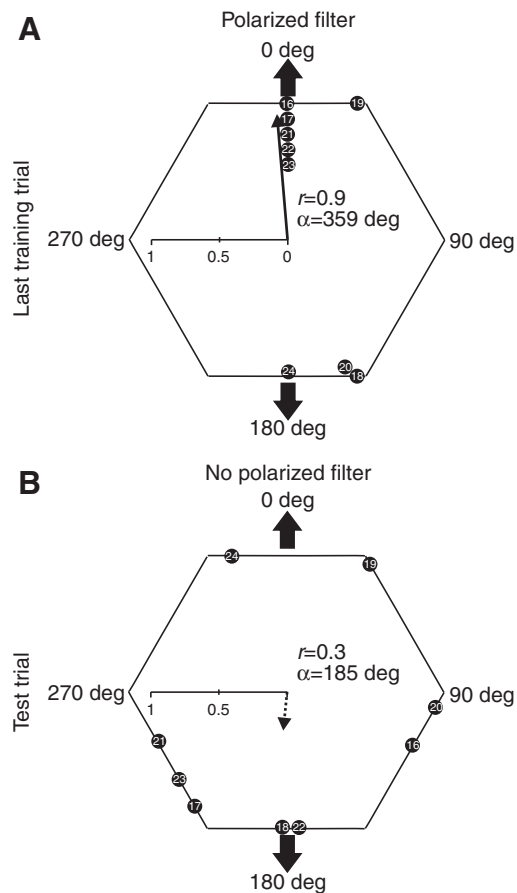


Fig. 3. Orientation behaviour of intact Parallel lizards trained under the plane polarized filter (A), and tested after removal of the filter (B). For each hexagon, the two outer black arrows mark the expected axis of orientation of lizards in training trials and the test trial (0–180 deg). Further details are given in Fig. 2.

axial training by positioning two identical goals in contact with the centre of two opposite side walls of our hexagonal Morris water maze (Fig. 1A,E). The directional choices of ruin lizards meeting the learning criteria showed a symmetrical, bimodal distribution along the 0–180 deg direction, thus indicating that lizards actually learned to orientate along the training axis (Fig. 2A,E). Several lines of evidence support the contention that lizards use the e-vector direction of polarized light for orientation: (1) following 90 deg rotation of the e-vector direction, lizard orientation rotated correspondingly, thus producing a symmetrical, bimodal distribution which was perpendicular to the training axis (Fig. 2B,F); (2) after the e-vector direction was rotated back 90 deg for the refreshing training, lizard orientation counter-rotated, thus lining up again with the training axis (Fig. 2C,G); (3) the 90 deg-rotated orientation was due to the 90 deg rotation of the e-vector, and not to changes in the pattern and intensity of illumination following filter rotation, since changes in illumination intensity with filter rotation were found to be negligible (Fig. 1B,C); (4) elimination of the polarizing filter produced complete disorientation in the lizards, showing that in the absence of plane polarized light no further cues remained available to them for orientation in the Morris water maze (Fig. 3B). Overall, the present results in *P. sicula* confirm those gathered in other species, such as *U. notata* and *T. rugosa*, showing that lizards are able to orientate using the e-vector direction of polarized light (Adler

and Phillips, 1985; Freake, 1999). Although these studies did not show specifically that lizards use a time-compensated sky polarization compass during natural orientation tasks, they do demonstrate unequivocally the existence in several lizard species of the sensory and cognitive mechanisms required for the functioning of a sky polarization compass. It is important to recall here that a celestial compass has been shown to be time compensated in several species of lizards, including *U. notata*, *S. jarrovi* and *P. sicula*, as their orientation under the sun was found to deviate as expected on the basis of the imposed (fast or slow) clock shift (Adler and Phillips, 1985; Ellis-Quinn and Simon, 1991; Foà et al., 2009).

The second step of the present investigation aimed at answering the still open question of whether the ability of lizards to orientate using the e-vector direction of polarized light is mediated by the parietal eye. For this purpose, ruin lizards which had learned to orientate along the training axis under polarized light were tested inside the Morris water maze under the same polarized light after their parietal eyes had been painted black. These experimental lizards were completely disoriented (Fig. 2D,H), and their behaviour was indistinguishable from the (disoriented) behaviour of lizards with their parietal eyes intact tested in the absence of plane polarized light (Fig. 3B). In other words, impairing the sensory organ (the parietal eye) had the same behavioural effects as eliminating the orientating cue (polarized light). The possibility that the disorientation observed after covering the parietal eye is due not to disruption of an orientation mechanism but to unspecific effects, such as reduced motivation or altered thermoregulation, seems unlikely, as has been pointed out previously (Ellis-Quinn and Simon, 1991; Freake, 2001). In our study, all lizards were kept at a constant temperature in each phase of the experiment, so that they could not thermoregulate at all. Taking all this into consideration, it is important to emphasize that the present results demonstrate for the first time that the parietal eye of lizards plays a central role in mediating functioning of a putative sky polarization compass.

Previous investigations showed a central role of the parietal eye in lizard orientation in the field under the sun (Ellis-Quinn and Simon, 1991; Freake, 2001). In both experiments lizards released on sunny days outside their home ranges were orientated at random when their parietal eyes were covered with a patch (*T. rugosa*) or painted black (*S. jarrovi*). A previous study in which we used the Morris water maze outdoors confirmed the central role of the parietal eye in lizard orientation under the sun (Foà et al., 2009). Since painting the parietal eye might prevent lizards from perceiving light not only by the parietal eye itself but also by the pineal and deep brain photoreceptors (Pasqualetti et al., 2003; Bertolucci and Foà, 2004), further experiments outdoors in the Morris water maze were done at that time to compare the orientation of ruin lizards whose parietal eyes were painted black with that of ruin lizards whose parietal eyes were completely ablated. As both experimental groups were randomly orientated in the Morris water maze, these results demonstrated for the first time that only the parietal eye, and not other brain photoreceptors, is involved in lizard orientation (Foà et al., 2009).

In the light of the present results, one is led to attribute disorientation of lizards tested under the sun with covered or ablated parietal eyes to the consequent loss of function of their sky polarization compass. However, this might not be the whole story. In fact there is some evidence that the lizard parietal eye might also mediate functioning of a sun azimuth compass. First of all, in all the experiments cited above lizards with covered or ablated parietal eyes were disoriented in spite of the fact that the sun disc was fully visible and their lateral eyes were completely

unobstructed. Furthermore, in our previous experiments outdoors, ruin lizards were tested at midday in summer in a Morris water maze surrounded by high fences (Foà et al., 2009). In such a situation ruin lizards were allowed to see a very limited patch of sky around the zenith, at a time of day (midday) when the sunlight directly above the parietal eye is mostly unpolarized (maximum polarization occurs at an angular distance of 90 deg from the sun, and thus near the horizon during midday). All this in our opinion strongly supports the contention that the parietal eye plays a central role in mediating not only a sky polarization compass but also an azimuth sun compass.

As stated by Wehner, there is no particular region of the spectrum predestined to be used preferentially by animals for detection of the e-vector of polarized light under all possible sky conditions [see p.110 of Wehner (Wehner, 1994)]. Several insects, such as the honeybee *Apis mellifera*, the desert ant *Cataglyphis bicolor* and scarab beetles *Lethrus* spp., perceive skylight polarization in the ultraviolet (UV) range, and the same is true in the damselfish *Chromis viridis* (Labhart, 1980; Duelli and Wehner, 1973; Frantsevich et al., 1977; Mussi et al., 2005). In the present experiments, ruin lizards were able to orientate by using the e-vector direction of polarized light, though such light did not include wavelengths in the UV range (Fig. 1D). Thus, the UV range is not necessary for perceiving polarized light in ruin lizards. This seems to be consistent with the results of electrophysiological studies carried out in the desert night lizard *Xantusia vigilis* and the common side-blotched lizard *Uta stansburiana*, showing maximal spectral sensitivity of their parietal eyes for green and blue lights (Solessio and Engbretson, 1993; Solessio and Engbretson, 1999; Su et al., 2006). The next step of the investigation in ruin lizards will be aimed at testing whether there is a preferential region of the spectrum for perception of the e-vector direction of polarized light used by the parietal eye of these lizards for compass orientation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by University of Ferrara research grants. We are grateful to Giovanni Fiorentini (Dipartimento di Fisica, Università di Ferrara and Istituto Nazionale di Fisica Nucleare—Sezione di Ferrara) for fruitful discussion of the data. We are also grateful to Federico Evangelisti and Stefano Squerzanti (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare—Sezione di Ferrara), Luca Landi (Dipartimento di Fisica, Università di Ferrara) and Giorgio Costa for technical assistance.

REFERENCES

- Adler, K. and Phillips, J. B. (1985). Orientation in a desert lizard (*Uma notata*): time-compensated compass movement and polarotaxis. *J. Comp. Physiol.* **156**, 547-552.
- Batschelet, E. (1981). *Circular Statistics in Biology*. London: Academic Press.
- Bertolucci, C. and Foà, A. (2004). Extraocular photoreception and circadian entrainment in non mammalian vertebrates. *Chronobiol. Int.* **21**, 501-519.
- Brines, M. L. and Gould, J. L. (1982). Skylight polarization patterns and animal orientation. *J. Exp. Biol.* **96**, 69-91.
- Duelli, P. and Wehner, R. (1973). The spectral sensitivity of polarized light orientation in *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera). *J. Comp. Physiol.* **86**, 37-53.
- Ellis-Quinn, B. A. and Simon, C. A. (1991). Lizard homing behaviour: the role of the parietal eye during displacement and radio-tracking, and time-compensated celestial orientation in the lizard *Sceloporus jarrovi*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **28**, 397-407.
- Foà, A., Basaglia, F., Beltrami, G., Carnacina, M., Moretto, E. and Bertolucci, C. (2009). Orientation of lizards in a Morris water-maze: roles of the sun compass and the parietal eye. *J. Exp. Biol.* **212**, 2918-2924.
- Frantsevich, L., Govardovsky, V., Gribakin, F., Nikolajev, G., Pichka, V., Polanovsky, A., Shevchenko, V. and Zolotov, V. (1977). Astroorientation in *Lethrus* (Coleoptera Scarabaeidae). *J. Comp. Physiol. A* **121**, 253-271.
- Freake, M. J. (1999). Evidence for orientation using the e-vector direction of polarised light in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *J. Exp. Biol.* **22**, 1159-1166.
- Freake, M. J. (2001). Homing behaviour in the sleepy lizard (*Tiliqua rugosa*): the role of visual cues and the parietal eye. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **50**, 563-569.
- Frisch von, K. (1949). Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzern der Bienen. *Experimentia* **5**, 142-148.
- Hamasaki, D. I. and Eder, D. J. (1977). Adaptive radiation of the pineal system. In *Handbook of Sensory Physiology: The Visual System in Vertebrates*, vol. 7/5 (ed. F. Crescitelli), pp. 498-548. Berlin: Springer-Verlag.
- Horváth, G. and Varjú, D. (2003). *Polarized Light in Animal Vision: Polarization Patterns in Nature*. Berlin: Springer-Verlag.
- Labhart, T. (1980). Specialized photoreceptors at the dorsal rim of the honeybee's compound eye: polarizational and angular sensitivity. *J. Comp. Physiol.* **141**, 19-30.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* **11**, 47-60.
- Muheim, R., Akesson, S. and Phillips, J. B. (2007). Magnetic compass of migratory Savannah sparrow is calibrated by skylight polarization at sunrise and sunset. *J. Ornithol.* **148**, 485-494.
- Mussi, M., Haimberger, J. and Hawryshyn, C. W. (2005). Behavioural discrimination of polarized light in the damselfish *Chromis viridis* (family Pomacentridae). *J. Exp. Biol.* **208**, 3037-3046.
- Pasqualetti, M., Bertolucci, C., Ori, M., Innocenti, A., Magnone, M. C., De Grip, W. J., Nardi, I. and Foà, A. (2003). Identification of circadian brain photoreceptors mediating photic entrainment of behavioural rhythms in lizards. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 364-372.
- Solessio, E. and Engbretson, G. A. (1993). Antagonistic chromatic mechanisms in photoreceptors of the parietal eye of lizards. *Nature* **364**, 442-445.
- Solessio, E. and Engbretson, G. A. (1999). Electroretinogram of the parietal eye of lizards: Photoreceptors, glial, and lens cell contributions. *Visual Neurosci.* **16**, 895-907.
- Su, C. Y., Luo, D. G., Terakita, A., Shichida, Y., Liao, H. W., Kazmi, M. A., Sakmar, T. P. and Yau, K. W. (2006). Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* **311**, 1617-1621.
- Wehner, R. (1992). Arthropods. In *Animal Homing* (ed. F. Papi), pp. 45-144. London: Chapman and Hall.
- Wehner, R. (1994). The polarization-vision project: championing organismic biology. In *Neural Basis of Behavioural Adaptations* (ed. K. Schildberger and N. Elsner), pp. 103-143. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Wiltshko, W. and Wiltshko, R. (2001). Light-dependent magnetoreception in birds: the behaviour of European robins, *Erithacus rubecula*, under monochromatic light of various wavelengths and intensities. *J. Exp. Biol.* **204**, 3295-3302.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.