
Stress hormone– mediated antipredator morphology improves escape performance in amphibian tadpoles

Michael E. Fraker, Stuart A. Ludsin, Barney Luttbeg &
Robert J. Denver



Individui di diversi taxa esprimono la plasticità fenotipica grazie a l'interazione preda-predatore



Vie di segnalazione dei glucorticoidi, regolatore chiave del fenotipo antipredatore
PERCORSO GENETICO E FISIOLOGICO



NELLO SPECIFICO



Produzione di segnali di rischio predazione

I girini ranidi esprimono diversi tratti antipredatori plastici mediati dal corticosterone (CORT), che è l'ormone dello stress



È stato studiato il cambiamento indotto dal predatore nella morfologia della coda dei girini della Rana del legno, in una sequenza temporale (0, 4 e 8 giorni) attaccati dalle larve di libellula, Anax junius





Perché il girino della rana viene scelto come modello?

1. Segnali chimici sia del predatore che della preda danno informazioni sul rischio
2. Corticosterone (CORT) regola le risposte antipredatorie sia comportamentali che morfologiche
3. Le risposte antipredatorie indotte sono comuni nei girini

REGOLATA DA CORT

A. Aumento della profondità del muscolo per il miglioramento della velocità
B. Aumento della superficie della coda per allontanare gli attacchi dalle parti più vitali

Sviluppo e morfologia della coda osservati nei girini esposti ad attacchi di invertebrati, su cui sono state fatte 2 ipotesi morfologiche

CHIARIRE COME LA SEQUENZA DI INDUZIONE PER LA RISPOSTA MORFOLOGICA DELLA CODA VARIA CON IL RISCHIO DI PREDAZIONE CONCENTRANDOSI SULLO SVILUPPO DELLA RELAZIONE TRA PROFONDITÀ DEL MUSCOLO DELLA CODA E PRESTAZIONI DI FUGA

Organismi di studio



11 masse di uova di **Rane del Legno (*Rana sylvatica*)**

Tenuti in acquario con ciclo luce: buio -> 16:8 e temperatura a 22°C

4 stagni dell'ES George Reserve prelevate nel 2018



Acquatic Ecology Laboratory dell'Università dell'Ohio in piscine con acqua di città invecchiata e dechlorata

Suddivisione in gruppi di 60 individui

GIORNI 0, 4 E 8



Libellule larvali (*Anax junius*)

Allevate individualmente in contenitori da 475 mL con acqua di stagno e nutrite con un girino 3 volte alla settimana

Rimossi 9 individui da ciascun acquario per le analisi

5 ESEMPLARI

4 ESEMPLARI

Prove di predazione

CORT e morfologia

Induzione morfologia della coda

ACQUARI CON UNA RETE DI NYLON PARZIALMENTE
SOMMERSA ALL'INTERNO IN CUI VENGONO POSTI 60
ESEMPLARI E SI EFFETTUANO 4 REPLICHE

3 trattamenti predatori

1. NO PREDATOR: aggiunti 100 mL di acqua di città invecchiata e dechlorata al giorno
2. INTERMITTENT PREDATOR: aggiunti 100 mL di acqua di acquari in cui è presente *Anax junius*
3. COSTANT PREDATOR: aggiunto un *Anax junius* nella gabbia sospesa

SI INCROCIANO

- NO MORTALITÀ ANAX
- NO MORTALITÀ GIRINI
- ANAX SI CIBA DEI GIRINI PREDA POSTI OGNI GIORNO

3 trattamenti con ormoni

1. NO ORMONE: controllo veicolo, aggiunto etanolo fino ad una concentrazione 0.001%
2. CORT: aggiunti 125 nM di CORT (ormone dello stress glucorticone)
3. MTP: aggiunti 110 μ M di MTP (inibitore della sintesi dei corticosteroidi)

TRATTAMENTI INIZIATI AL GIORNO
0 DELL'ESPERIMENTO E RIPETUTI
OGNI 4 GIORNI (0, 4 E 8) DOPO CHE
È STATO FATTO IL CAMBIO DI METÀ
DI ACQUA

Estrazione CORT



- Omogeneizzati di 4 girini in acetato di etile
- Aggiunta di 3000 cpm di [3H] CORT
- Essiccazione con Speedvac
- Risospensione in 100 μ L di diclorometano:metanolo (98:2)
- Estratti di girino frazionati con colonne Sephadex
- Aggiunta di 20 mL di diclorometano:metanolo (98:2)
- Campioni raccolti in 5 frazioni da 1 mL con CORT

4 GIRINI:

- Eutanizzati
- Pesati
- Fotografati
- Congelati con una sospensione di etanolo e ghiaccio

ANALISI
MORFOLOGICA

MISURAZIONE CORT

Frazioni ulteriormente essiccate in Speedvac e risospese in gelatina 1%

Prove di predazione



- Vengono posti i girini, a cui è stata condotta un'acclimatazione di un'ora, all'interno dell'acquario.
- Gli acquari sono stati registrati di continuo per tutta la durata della prova.
- Gli *Anax junius* sono stati posti in posizione intermedia.
- Ad ogni prova è stato utilizzato un *Anax junius* differente non alimentato per 24 ore.

Acquari di dimensioni 20x34x12 cm riempiti con 3.5 L di acqua



Concentrazione sul ruolo della risposta morfologica durante l'attacco di *Anax junius*

VENGONO EFFETTUATE LE MISURAZIONI DOPO 2 ORE PER CONTARE I GIRINI SOPRAVVISSUTI E VENGONO ISPEZIONATI I DANNI FISICI

NON VENGONO EFFETTUATE LE PROVE DI PREDAZIONE PER IL TRATTAMENTO INTERMITTENT PREDATOR

Raccolta dati e analisi

Attività del girino

- Viene misurata nei giorni 0, 4 e 8 a 55 minuti viene effettuato il fermo del video (5 minuti prima dell'aggiunta di *Anax*)
- MISURAZIONE ATTIVITÀ: viene misurata in secondi all'interno di un intervallo di 1 minuto, successivamente viene effettuata la media tra i valori registrati tra i 2 osservatori
- Confrontata l'attività media tra i trattamenti attraverso il tempo



USATO MODELLO LINEARE A EFFETTI MISTI

A. EFFETTO FISSO: TRATTAMENTO E GIORNO

B. EFFETTO CASUALE: REPLICATO

Due osservatori visionano i video della prova di predazione

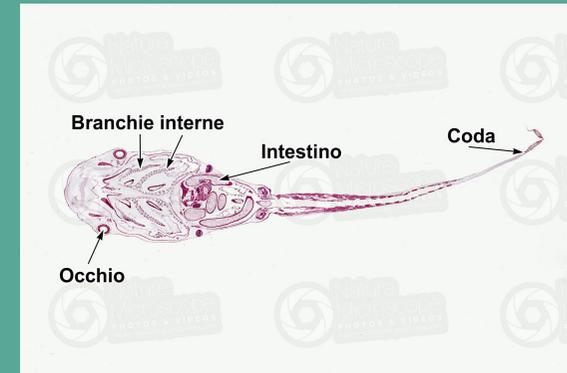
Performance del girino

- TASSO DI SUCCESSO DI ANAX: confrontati i conteggi delle fughe e delle catture tra le 6 combinazioni utilizzando modelli lineari
- MISURA DEL TEMPO PER LA PRIMA CATTURA: valutata utilizzando un modello di insuccesso accelerato a causa delle possibili risposte comportamentali che possono cambiare l'incontro tra predatori o i tassi di attacco
- DISTANZA NELLA REAZIONE DEI GIRINI ALL'ATTACCO DI ANAX: i girini occasionalmente nuotavano lontano *Anax* prima dell'attacco, è stata registrata una differenza minima tra attacchi riusciti e non riusciti

Raccolta dati e analisi

Analisi morfologica dei girini: muscolo della coda e profondità della pinna caudale

- Calcolata la media delle misurazioni morfologiche corrette per la dimensione dei girini alloggiati nello stesso acquario
- Utilizzata la media replicata risultante come unità di misura sperimentale
- Confrontato il peso corporeo e la profondità del muscolo della coda e della pinna caudale media corretta per il trattamento e il tempo utilizzando il modello lineare a effetti misti
- Confrontato il contenuto di CORT di tutto il corpo tra i trattamenti di manipolazione ormonale utilizzando l'analisi della varianza



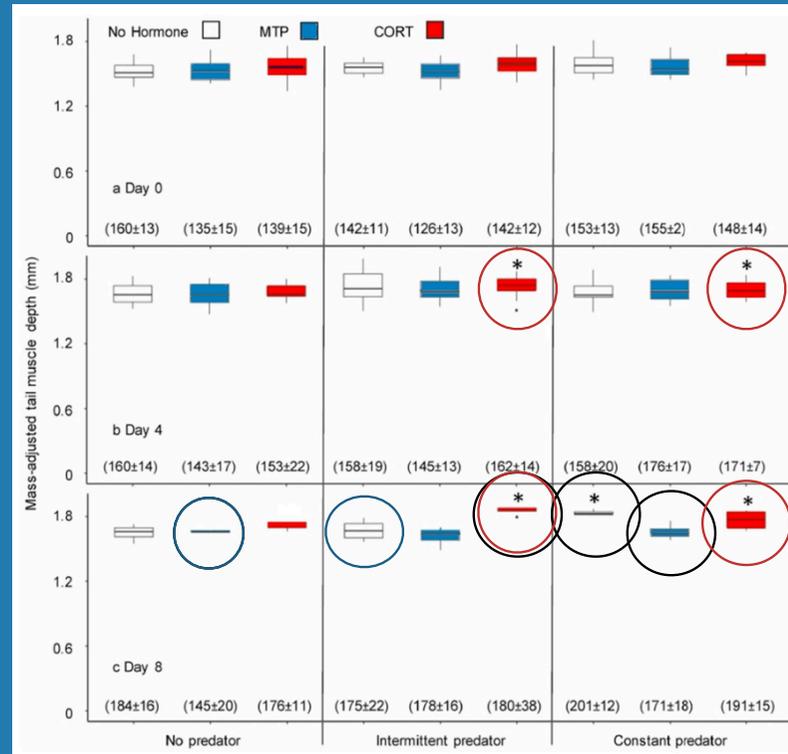
RISULTATI MORFOLOGICI

INTERMITTENT PREDATOR

Trattamento con SOLO MTP

NESSUNA INFLUENZA sulla
profondità del muscolo della coda

I girini a cui è stato somministrato
del CORT esogeno evidenziano una
[CORT] in tutto il corpo maggiore
rispetto al controllo e quelli trattati
con MTP per tutta la durata della
prova



NO DIFFERENZA DI [CORT] TRA
TRATTAMENTO DI CONTROLLO E
TRATTAMENTO CON MTP

- COSTANT PREDATOR/NO ORMONE
- INTERMITTENT PREDATOR/CORT
- NO PREDATOR/MTP
- COSTANT PREDATOR/MTP

Si evidenziano uno sviluppo delle pinne
caudali significativamente profonde
all'ottavo giorno

- Trattamento con CORT e COSTANT
PREDATOR o INTERMITTENT
PREDATOR

- COSTANT PREDATOR/NO ORMONE

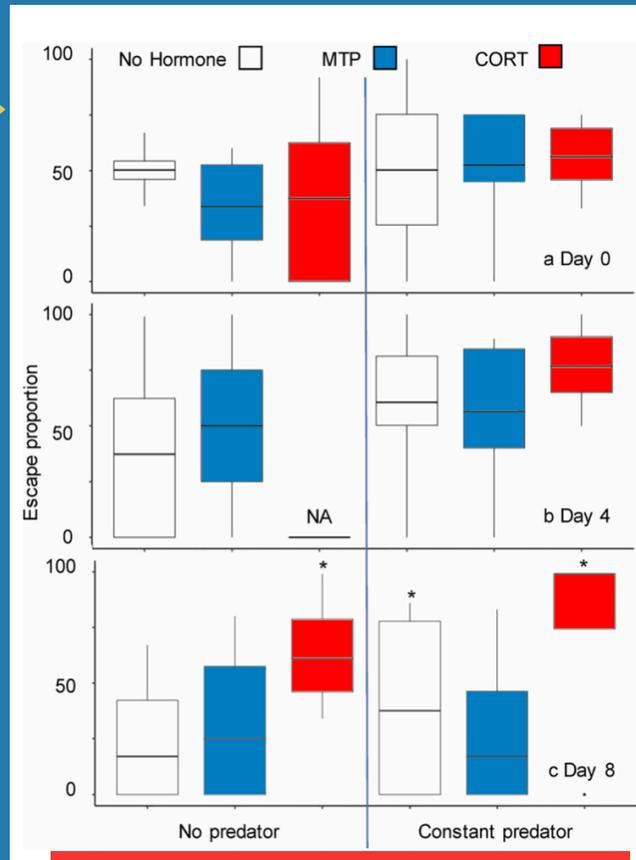
Si evidenzia uno sviluppo dei muscoli
della coda più in profondità

RISULTATI PREDAZIONE

- COSTANT PREDATOR/CORT
 - COSTANT PREDATOR/NO ORMONE
 - NO PREDATOR/CORT
- Durata maggiore di sopravvivenza

- COSTANT PREDATOR/NO ORMONE
 - NO PREDATOR/CORT
 - COSTANT PREDATOR/CORT
- Successo di fuga maggiore

RISPETTO AL TRATTAMENTO
NO PREDATOR/NO ORMONE



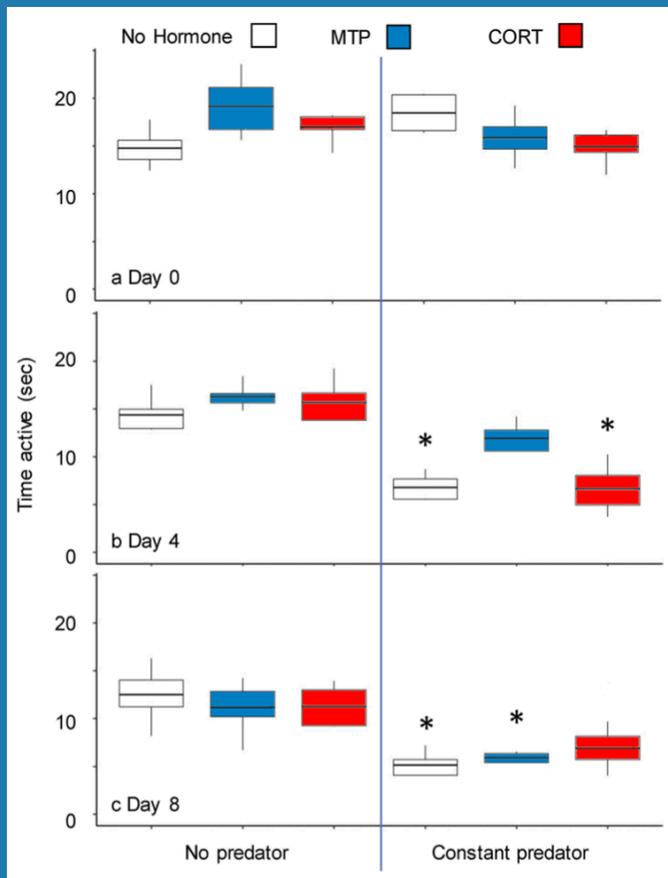
CAMBIAMENTI STATISTICAMENTE
EVIDENTI AL GIORNO 8

Trattamento con *Anax* o *Anax* +
CORT ⇒ aumentato tempo di
cattura e prestazioni di fuga

L'ormone MTP blocca
le risposte di fuga

NESSUN DANNO ALLA CODA DEI GIRINI
SOPRAVVISSUTI ALLA FINE DELLA
PROVE DELLA PREDAZIONE È STATO
EVIDENZIATO

RISULTATI ATTIVITÀ



• COSTANT PREDATOR/NO ORMONE

• COSTANT PREDATOR/CORT

Si evidenziano livelli di attività inferiori al giorno 4

• COSTANT PREDATOR/NO ORMONE

• COSTANT PREDATOR/MTP

Si evidenziano livelli di attività inferiori al giorno 8

Il livelli di attività dei girini diminuiscono in risposta all'esposizione ad *Anax junius* che rimanevano inferiori rispetto al trattamento NO PREDATOR fino al giorno 8

MA NON IN COSTANT PREDATOR/MTP

RISPETTO A NO PREDATOR/NO ORMONE

MA NON NEL COSTANT PREDATOR/CORT

DISCUSSIONE

MAGGIORE VELOCITÀ DI FUGA PUÒ AIUTARE A DEVIARE GLI ATTACCHI DIRETTI ALLA CODA

FAR SI CHE GLI ATTACCHI DEI PREDATORI SIANO COMPLETAMENTE ASSENTI

LA MORFOLOGIA DELLA CODA AGISCE NELLA PARTE DI ATTACCO DELLA SEQUENZA DI PREDAZIONE MENTRE ALTRE DIFESE, COME IL LIVELLO DI ATTIVITÀ, POSSONO AGIRE PRIMA PER RIDURRE I TASSI DI INCONTRO CON I PREDATORI

LE DIFESE MORFOLOGICHE CONTRIBUISCONO A RIDURRE LA VULNERABILITÀ ALLA PREDAZIONE MENTRE IL TEMPO NECESSARIO PER LO SVILUPPO E I POSSIBILI COSTI DI ALLOCAZIONE POSSONO COMPRENDERE ALTRI BENEFICI

MORFOLOGIA

LA MORFOLOGIA DELLA CODA PUÒ MIGLIORARE LA SOPRAVVIVENZA ATTRAVERSO DIVERSI MECCANISMI DI INTERAZIONE

QUESTI RISULTATI COLLEGANO LA RISPOSTA ALLO STRESS FISILOGICO INDOTTA NEI GIRINI DELLA RANA DEL LEGNO ALL'ESPRESSIONE DI UNA MORFOLOGIA ANTIPREDATRICE ED AD UN BENEFICIO ADATTATIVO NELLA PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA PER VIA DI MIGLIORI PRESTAZIONI DI FUGA

DISCUSSIONE

LA MANCANZA DI DANNI ALLA CODA NEI GIRINI SOPRAVVISSUTI SUGGERISCE CHE LE PRESTAZIONI DI FUGA MIGLIORATE ERANO PIÙ COERENTI CON IL NUOTO DI FUGA PIUTTOSTO CHE CON UN EFFETTO ESCA.

È POSSIBILE CHE I GIRINI ESPOSTI A PREDATORI E A CORT SIANO DIVENTATI PIÙ VIGILI O REATTIVI IN UN MODO CHE HA MIGLIORATO LE LORO PRESTAZIONI DI FUGA

LA VIA DI SEGNALAZIONE DEI GLUCORTICOIDI È COINVOLTA NELL'ESPRESSIONE DEL COMPORTAMENTO ANTIPREDATORE NEI GIRINI, TUTTAVIA I GIRINI CHE SONO STATI INIZIALMENTE ESPOSTI A STIMOLI CHIMICI HANNO MOSTRATO UNA RIDUZIONE A BREVE TERMINE DEL CORT SU TUTTO IL CORPO CHE CONSENTE UNA RIDUZIONE DELL'ATTIVITÀ

PRESTAZIONI DI FUGA E ATTIVITÀ

LE RISPOSTE ANTIPREDATORIE POSSONO CONSISTERE IN UNA SERIE DI TRATTI CHE AGISCONO IN DIVERSI PUNTI DELLA SEQUENZA DI PREDAZIONE QUINDI LA COMPrensIONE DELL'INTEGRAZIONE DEI TRATTI ANTIPREDATORI PORTA ALL'OBIETTIVO FINALE DI COMPRENDERE COME LA PLASTICITÀ FENOTIPICA INDOTTA DAI PREDATORI INFLUENZI GLI ECOSISTEMI