



UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FISICHE, DELLA TERRA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE AMBIENTALI E NATURALI

Reintroduzione dell'ululone appenninico
(*Bombina pachypus*) nel versante tirrenico del
Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi

Relatore:
Chiar.mo Prof. Giuseppe Manganelli

Tesi di laurea di
Andrea Chemello

Correlatori:
Dr. Sandro Piazzini

Dr. Leonardo Favilli

Anno accademico 2017-2018

Indice

Riassunto	1
Abstract	2
Introduzione	3
L'ululone appenninico, <i>Bombina pachypus</i> (Bonaparte, 1838)	4
Status dell'ululone appenninico nel Parco Nazionale Foreste Casentinesi	8
Materiali e metodi	9
<i>Scelta dei siti di prelievo</i>	9
<i>Siti di reintroduzione</i>	10
<i>Prelievo</i>	13
<i>Allevamento</i>	14
<i>Rilascio</i>	17
Risultati	18
<i>Prelievi di uova e larve e rilasci nei siti di reintroduzione</i>	18
<i>Allevamento delle larve</i>	19
<i>Rilascio di larve nei siti di reintroduzione</i>	19
<i>Monitoraggio nei siti di reintroduzione</i>	19
Discussione	21
<i>Prelievi di uova e larve</i>	21
<i>Allevamento delle larve</i>	21
<i>Monitoraggio nei siti di reintroduzione</i>	22
Conclusioni	23
Bibliografia	24

Riassunto

L'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838) è un anuro endemico italiano in pericolo di estinzione. Le cause del declino possono essere ricondotte all'alterazione e alla distruzione dell'habitat, ai cambiamenti climatici e ad una patologia fungina provocata da *Batrachochytrium dendrobatidis*. Il Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna ha avviato nell'ottobre 2015 il Progetto LIFE WetFlyAmphibia che ha come scopo il miglioramento dello stato di conservazione di tre specie di anfibi, tra cui anche *Bombina pachypus*, e due di lepidotteri all'interno del suo territorio. Le azioni di conservazione riguardanti l'ululone appenninico sono consistite nel ripristino e creazione di siti riproduttivi all'interno del Parco, una fase di prelievo di uova e larve, allevamento ex situ e il rilascio di larve in avanzato stadio di sviluppo in quattro siti nel versante tirrenico del Parco, dal quale la specie si è recentemente estinta. I siti di prelievo sul versante adriatico del Parco sono stati scelti in base alla consistenza numerica della specie e all'assenza di *Batrachochytrium dendrobatidis*. Le uova sono state prelevate alla fine del periodo di deposizione per non disturbare le femmine durante questa fase. È stato raccolto circa il 10 % delle uova o larve per sito prediligendo quelle situate in piccole pozze destinate all'essiccamento, evitando in questo modo la successiva morte delle larve o la mancata schiusa delle uova. Le larve sono state allevate in cinque acquari presso la stazione dei Carabinieri Forestali di Corniolo (Forlì-Cesena). Le fasi di prelievo, allevamento e rilascio sono state eseguite in modo da evitare il trasferimento di patogeni (uso di guanti monouso). In questo primo anno di attività sono state prelevate 300 tra uova e larve e sono state reintrodotte nei quattro siti del versante tirrenico 72 larve in avanzato stadio di sviluppo. Sono state effettuate indagini visive nelle aree di reintroduzione e sono stati rilevati un buon numero di individui giovani. I problemi riscontrati durante questo primo anno di lavoro sono stati analizzati e discussi in modo da modificare il protocollo di allevamento da applicare all'attività di reintroduzione dei prossimi anni.

Abstract

Apennine yellow-bellied toad, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838) is an Italian endemic endangered anuran. The causes of the decline can be attributed to the alteration and destruction of habitat, climate change and a fungal disease caused by *Batrachochytrium dendrobatidis*. The National Park of the Casentino Forests, Monte Falterona and Campigna started the LIFE WetFlyAmphibia project in October 2015 which aims to improve the conservation status of three amphibian species, including *Bombina pachypus*, and two species of Lepidoptera within its territory. Conservation action for Apennine yellow-bellied toad consisted in the restoration and creation of the reproductive habitat within the park, a harvesting phase of eggs and larvae, ex situ breeding and the release of larvae at an advanced stage of development at four sites in the Tyrrhenian side of the park, from which the species has recently died out. The harvesting sites on the Adriatic side of the park were selected according to the numerical consistency of *B. pachypus* and the absence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. The eggs were taken at the end of the laying period in order not to disturb the females during this phase. About 10% of the eggs or larvae present on the site were taken, preferring those located in small pools that were more likely to dry out, so as to avoid the subsequent death of the larvae or the absence of the hatching of the eggs. The larvae were bred in five aquariums at the Carabinieri Forestali station in Corniolo (Forlì-Cesena). The harvesting, breeding and release phases were carried out in order to avoid the transfer of pathogens (use of disposable gloves). In this first year of work 300 eggs and larvae were taken and 72 larvae at an advanced stage of development had been released in the sites of the Tyrrhenian side of the park. Visual surveys were carried out in the reintroduction areas and a good number of young individuals were detected. The problems encountered in this first year of work have been analyzed and discussed so as to modify the breeding protocol to be applied to the reintroduction activity in the coming years.

Introduzione

L'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838) è un anfibio anuro endemico italiano considerato “Endangered” dall’IUCN (Andreone et al., IUCN, 2018), diffuso dalla Liguria all'Aspromonte, che ha subito un drastico declino a partire dagli anni 90' del secolo scorso.

In Italia è stato oggetto di pochi progetti di conservazione quali il Progetto LIFE Arupa e LIFE WetFlyAmphibia, di cui si occupa questa tesi.

L'area di intervento del progetto LIFE WetFlyAmphibia è il Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna, istituito con il D.P.R. 12 luglio 1993. L'area protetta occupa una superficie di 36.843 ettari divisi equamente tra Emilia Romagna (provincia di Forlì Cesena) e Toscana (province di Arezzo e Firenze). Il territorio, prevalentemente forestato con una modesta percentuale di aree destinate al pascolo e all'agricoltura, si sviluppa da una quota minima di 450 metri a una massima di 1658 metri (Monte Falco).

Il progetto LIFE WetFlyAmphibia ha come specie target, oltre a *Bombina pachypus*, altre due specie di anfibi (*Salamandrina perspicillata*, *Triturus carnifex*) e due di lepidotteri (*Euplagia quadripunctaria*, *Eriogaster catax*).

Gli obiettivi principali per *Bombina pachypus* sono il miglioramento dello stato di conservazione della specie nel versante adriatico del Parco, dove è attualmente presente, e la creazione di alcune popolazioni in grado di automantenersi sul versante tirrenico del Parco, dal quale la specie è recentemente scomparsa. A questo scopo sono stati creati o ripristinati circa 150 siti riproduttivi distribuiti in modo uniforme su tutto il territorio dell'area protetta. Gli interventi sono consistiti nel ripristino e nella costruzione ex novo di opere in muratura (fontanili, vasche e abbeveratoi adeguatamente attrezzati alle esigenze della specie) e di pozze riproduttive.

Il lavoro riportato in questa tesi riguarda il primo anno di attività di reintroduzione dell'ululone appenninico, in particolare le fasi del prelievo di uova o larve da siti opportunamente selezionati, l'allevamento in acquario e il rilascio di larve in avanzato stadio di sviluppo nei siti di reintroduzione nel lato tirrenico del Parco.

L'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838)

L'ululone appenninico è un anuro della famiglia Bombinatoridae. L'inquadrimento tassonomico di questo anfibio è ancora oggetto di discussione: alcuni autori lo considerano una sottospecie dell'ululone dal ventre giallo, *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758), altri, a seguito di indagini genetiche e morfologiche (Vaccaneo, 1931; Nascetti et al., 1982; Lanza & Vanni, 1991; Lanza & Corti, 1993; Canestrelli et al., 2006; Pabijan et al., 2013) lo ritengono una specie distinta, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838). Tuttavia ulteriori indagini sono necessarie per confermare la distinzione a livello specifico tra le due entità (Pabijan et al., 2013).

L'ululone appenninico è un endemita italiano diffuso dalla Liguria all'Aspromonte soprattutto lungo la dorsale appenninica (Fig. 1).



Fig.1 - Distribuzione di *Bombina pachypus* (da: mol.org).

Il range altitudinale della specie è compreso tra pochi metri sopra il livello del mare (ad esempio in Emilia Romagna; Mazzotti et al., 1999) a oltre i 1900 metri (Parco Nazionale del Pollino; Sperone et al., 2006), anche se predilige la fascia collinare e montana. È una specie diurna che frequenta un'ampia varietà di ambienti acquatici esposti al sole, situati in aree aperte o boschive dai quali si allontana di poco e che utilizza anche per la riproduzione. I fattori importanti per la scelta del sito riproduttivo sono la buona esposizione ai raggi solari per diverse ore al giorno, scarsa profondità (generalmente sotto i 60 cm; Barbieri et al., 2004) ed acque ferme o a debole scorrimento, come pozze temporanee (Fig. 2), piccoli stagni, pozze

fangose, acquitrini, risorgive e pozze laterali di torrenti. Si adatta a vivere anche in ambienti creati dall'uomo come fontanili, abbeveratoi, pozze temporanee all'interno di pascoli, canali di scolo e solchi allagati ai margini di strade sterrate (Canestrelli et al., 2014).



Fig. 2 - Esempio di habitat di *Bombina pachypus* (Foto di A. Chemello).

L'ululone appenninico adulto (Fig. 3) misura in media 5 centimetri di lunghezza (muscolata) e solo raramente supera i 6 centimetri. La colorazione dorsale è marrone o grigia, il ventre è giallo con macchie blu. Se minacciato assume la posizione "Unkenreflex" inarcando il corpo e sollevando le zampe in modo da esibire la colorazione ventrale aposematica per avvertire i predatori della sua tossicità. Le ghiandole cutanee, responsabili della produzione di una tossina ad azione antimicrobica denominata Bv_v (*Bombina variegata* cutaneous venom), sono situate sul dorso conferendo all'animale un aspetto verrucoso. Gli arti posteriori sono relativamente corti e robusti ed il piede è fornito di una palmatura ben sviluppata. La pupilla è cuoriforme. Sono assenti la membrana timpanica e i sacchi vocali.



Fig. 3 - *Bombina pachypus* nel suo habitat naturale (a sinistra) (Foto di A. Chemello), colorazione ventrale aposematica (a destra) (Foto di S. Magrini).

Il pattern di distribuzione delle macchie sul ventre (Fig. 3) può essere utilizzato per il riconoscimento individuale.

I maschi si distinguono dalle femmine per le dimensioni inferiori e per la presenza sugli arti anteriori di escrescenze cornee chiamate cuscinetti nuziali. Nella stagione riproduttiva queste escrescenze si ingrandiscono permettendo al maschio di trattenere la femmina durante l'accoppiamento (Fig. 4) che è di tipo lombare (Lanza et al., 2007).



Fig. 4 - Ululone appenninico in accoppiamento (Foto di A. Chemello).

Il periodo di attività si estende da aprile a ottobre e varia a seconda della latitudine, altitudine e condizioni climatiche. Eccezionalmente può iniziare a fine febbraio e protrarsi fino a novembre (Sperone et al., 2006). L'ululone trascorre l'inverno a terra nelle fessure o sotto le rocce coperte da vegetazione, generalmente non lontano dai siti riproduttivi. In condizioni naturali l'età massima raggiunta è di 16 anni (Barbieri et al., 2004 in Guarino et al., 1995) e la maturità sessuale viene raggiunta intorno al secondo-terzo anno. La stagione riproduttiva è compresa tra la fine di aprile e gli inizi di settembre (Barbieri et al., 2004) e ogni femmina si riproduce da 2 a 3 volte. In questo periodo i maschi emettono un verso che ricorda un ululato (da qui deriva il nome italiano della specie). Le femmine depongono da 5 a 100 uova (40-100 uova secondo Vanni & Nistri, 2006; 5-30 uova secondo Mirabile et al., 2009) isolate o in piccoli gruppi fissate alla vegetazione acquatica, a rami sommersi o direttamente sul substrato (Barbieri et al., 2004; Mirabile et al. 2009). La metamorfosi avviene in 2-3 mesi. La larva (Fig. 5) è caratterizzata da una colorazione bruna sul dorso e biancastra sul ventre e dalla presenza dello spiracolo situato in posizione medio-ventrale. L'alimentazione nella fase adulta è

costituita da un'ampia varietà di invertebrati mentre la larva si ciba prevalentemente di microalghe, materiale organico in decomposizione e microinvertebrati (Lanza et al., 2007).



Fig. 5 - Larve di ululone appenninico fotografate in un acquario nel centro di allevamento di Corniolo (Foto di A. Chemello).

Fino alla fine degli anni 80' la specie godeva di un buono stato di conservazione con popolazioni ancora consistenti. Il declino inizia nei primi anni 90', dapprima interessando solo alcuni siti, successivamente coinvolgendo tutto l'areale con una diffusa e drastica riduzione numerica e la scomparsa da molti dei siti occupati. Secondo un resoconto dello stato di conservazione della specie nel Lazio, Abruzzo, Campania, Puglia, Basilicata e Calabria, la riduzione numerica e la scomparsa dai siti di presenza storica interessava tutte le regioni in esame ad eccezione della Calabria, dove l'ululone presentava ancora un buono stato di conservazione (Barbieri et al., 2004). Dati più recenti (Romano et al., 2010; Canestrelli et al., 2014) segnalano un'accentuata riduzione numerica e la scomparsa da molti dei siti del Cilento e della Calabria. Per queste ragioni, trattandosi di un'entità ad alto rischio di estinzione e per di più endemica, è stata inserita nell'Appendice II della Convenzione di Berna, negli Allegati II e IV della Direttiva Habitat (92/43/CEE), è classificata "In pericolo" (classificazione IUCN: A2ce) nella Lista Rossa dei Vertebrati italiani (Rondinini et al., 2013), con una stima del declino della specie stimata tra il 50 e l'80% ed è ritenuta "Endangered" dall'IUCN (Andreone et al., 2009 in IUCN, 2018). Le principali cause del declino possono essere ricondotte all'alterazione e distruzione dell'habitat (interramento di siti riproduttivi, abbandono delle pratiche agricole tradizionali, inquinamento, essiccamento dovuto a prelievo idrico), ai cambiamenti climatici (siccità prolungate nel periodo estivo), all'insorgenza di una patologia fungina, la chitridiomicosi, causata da *Batrachochytrium dendrobatidis* e la depressione genetica (interbreeding) nelle piccole popolazioni isolate, con possibile riduzione di fertilità o maggiore suscettibilità ai patogeni (Angelini et al., 2004; Fiacchini, 2007, Vanni e Nistri, 2006; Fiacchini, 2007; Canessa et al. 2013).

Status dell'ululone appenninico nel Parco Nazionale Foreste Casentinesi

La specie attualmente è presente solo nel versante adriatico del Parco (nel versante tirrenico è da ritenersi estinta con le ultime segnalazioni risalenti al 2007; Tedaldi & Scoccianti, 1998; Societas Herpetologica Italica in Ruffo & Stoch, 2007; Mazza et al., 2008; Piazzini S., dati inediti), dove è abbastanza diffusa, ma con popolazioni ridotte. Ad oggi è segnalato in 56 siti (Piazzini, 2016a), ma le popolazioni più numerose (numero di coppie riproduttive ≥ 5) si trovano principalmente nel bacino dei fiumi Montone, Bidente e Rabbi (massimo 15 coppie riproduttive stimate; Piazzini, 2016a). Nel Parco frequenta acquitrini, torrenti con substrati rocciosi e ben assolati, pozze all'interno dei pascoli e abbeveratoi posti in un range altitudinale tra i 400 e i 1000 metri di quota ed è attivo dalla fine di marzo alla fine di agosto (Piazzini, 2014).

Le cause della sua scomparsa nel versante tirrenico del Parco possono essere ricondotte all'abbandono di attività agro-silvo-pastorali tradizionali che hanno causato trasformazioni nel paesaggio agricolo. La mancata gestione e manutenzione periodica svolta su abbeveratoi e su pozze all'interno di pascoli ha prodotto l'interramento o l'ombreggiamento di questi siti rendendoli non più idonei per la riproduzione della specie. Zampiglia et al. (2013) segnalano in uno stagno presso Camaldoli la presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis*, possibile causa della scomparsa della specie.

Materiali e metodi

La reintroduzione dell'ululone appenninico si è sviluppata in tre fasi: 1) prelievo di uova e/o larve da siti opportunamente scelti; 2) allevamento in acquario; 3) rilascio delle larve in avanzato stadio di sviluppo nei siti di reintroduzione individuati sul versante toscano del Parco. Queste fasi del progetto sono state svolte seguendo il protocollo redatto da Piazzini (2016b).

Scelta dei siti di prelievo - La scelta dei siti di prelievo è stata basata preliminarmente sulla valutazione della consistenza numerica dell'ululone per ogni sito (numero di coppie riproduttive ≥ 5). In base a questo criterio sono stati individuati sette possibili siti sorgente per il prelievo delle uova (Tab.1).

Tab. 1 - Siti con popolazioni di *B. pachypus* nel PNFC più consistenti (* la stima è il numero medio di coppie riproduttive basata su osservazioni ripetute avvenute nel corso di un monitoraggio di anfibi nel periodo 2013-2016; Piazzini, 2016a).

N° sito	Coordinate UTM	Corpo idrico e quota (m)	N° coppie riproduttive stimate
1u	32TQP17	acquitrino (712)	6-7*
2u	32TQP17	ruscello (660-675)	6-7
3u	32TQP26	acquitrino (645)	11*
4u	32TQP26	acquitrino (575-655)	7
5u	32TQP26	ruscello (485)	10*
6u	32TQP16	ruscello (980-1005)	15*
7u	32TQP26	ruscello (625-750)	6-7

Su questi siti sono stati compiuti dei saggi di presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) per evitare eventuali contaminazioni a seguito della reintroduzione in altri siti dove *Bd* non è presente. I test effettuati su *Bombina pachypus*, *Salamandrina perspicillata*, *Salamandra salamandra*, *Rana dalmatina*, *Rana italica*, *Rana temporaria*, *Ichtyosaura alpestris* e *Triturus carnifex* hanno seguito il metodo standard che consiste nel passare il tampone nelle zone più soggette all'infezione (ventre, interno cosce, dita, zona pelvica e palmature) prelevando una porzione superficiale di muco. Successivamente i tamponi sono stati inviati al Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita dell'Università di Genova che ha eseguito le analisi secondo il protocollo di rilevamento di *Bd* basato su PCR riportato da Grasselli et al. (2013), Piazzini (s.d.).

I risultati delle analisi hanno segnalato la presenza di *Bd* solo nei tamponi provenienti dal sito **4u**, che di conseguenza è stato escluso dalle attività di prelievo di uova. I restanti siti (**1u-2u-3u-5u-6u-7u**), in quanto negativi al test, sono stati considerati idonei al prelievo di uova ai fini della reintroduzione (Fig. 8) (Piazzini, s.d.).

Come riportato precedentemente e confermato da Piazzini S. (dati inediti) per quanto riguarda il Parco Nazionale Foreste Casentinesi, ogni femmina si riproduce 2 o 3 volte all'anno deponendo dalle 5 alle 50 uova per evento riproduttivo. Partendo da questi dati e da quelli riportati in Tab. 1, è stato calcolato il numero di uova da poter prelevare senza impoverire la popolazione sorgente. Tale numero risulta sottostimato, poiché sono stati considerati solo due eventi riproduttivi all'anno su tre, una media di 15 uova deposte da ogni coppia per ogni evento riproduttivo e un prelievo massimo del 10% delle uova presenti nel sito. I dati sono riportati in Tab. 2.

Tab. 2 – Calcolo del numero massimo di uova da prelevare per la reintroduzione della specie.

N° sito	N° coppie riproduttive stimate	N° coppie utilizzate per la stima	Produzione annua stimata di uova per sito	Massimo prelievo di uova consentito
1u	6-7	6	180	18
2u	6-7	6	180	18
3u	11	11	330	33
5u	10	10	300	30
6u	15	15	450	45
7u	6-7	6	180	18
		Totale	1620	162

Siti di reintroduzione - I siti di reintroduzione nel versante tirrenico del Parco sono stati scelti in base alla presenza certa dell'ululone appenninico fino ad una decina di anni fa (Piazzini, s.d.), alla collocazione in aree demaniali, alla facilità di accesso per la realizzazione degli interventi di ripristino e alla presenza di sorgenti perenni.

Sono stati individuati quattro siti che rientrano in questi criteri: Vitareta (sito 1); Gavisserri (sito 2); Metaleto (sito 3); Stradelli (sito 4). Anche in questi quattro siti, come in quelli di prelievo, sono stati svolti dei saggi sulle specie di anfibi presenti per verificare la presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis*; tutti hanno dato un esito negativo. Dopo aver accertato le cause di estinzione locale, sono stati svolti gli interventi di ripristino necessari a rendere le aree nuovamente idonee alla sopravvivenza della specie. Segue una breve descrizione dei siti di rilascio utilizzati in questo anno (Miozzo, 2016).

Sito 1: Vitareta, 1030 m (Pratovecchio-Stia, AR; UTM WGS84: 32 T 716251 4858497)



Fig. 6 - Sito Vitareta. abbeveratoio a quattro vasche (a sinistra) (Foto tratta da: Piazzini, 2018) e pozza riproduttiva ripristinata (a destra) (Foto di A. Chemello).

Vitareta è una ampia zona aperta destinata al pascolo brado di bovini circondata da bosco misto. L'ululone appenninico era presente fino al 2007 (Piazzini, dati pers. ined.). Le cause della scomparsa sono molto probabilmente imputabili all'interramento di alcuni siti riproduttivi e all'essiccamento estivo di una zona acquitrinosa dovuto al mancato rifornimento di acqua da una sorgente che un tempo era perenne. Gli interventi hanno riguardato lo scavo di tre pozze lungo un fossetto, la costruzione di tre abbeveratoi e di tre pozze sparse su tutta l'area (Fig. 6). Sono stati svolti altri interventi nei pressi del vicino Rifugio "il Lago" che sono consistiti nella costruzione di due fontanili, taglio di alcuni alberi con la creazione di due aree aperte all'interno delle quali sono state ripristinate due pozze. Lungo le sponde di alcune delle pozze ripristinate sono state impiantate specie erbacee igrofile.

Sito 2: Gaviserri, 720 m (Pratovecchio-Stia, AR; UTM WGS84: 32 T 720805 4855672)



Fig. 7 - Pozza in località Gaviserri in fase di impianto di vegetazione (Foto tratta da: Piazzini, 2018).

Gaviserri (Fig. 7) è una zona aperta destinata al pascolo brado di ovini. All'interno dell'area è stata scavata una pozza alimentata da una risorgiva perenne, sulle sponde della quale sono

state impiantate alcune specie erbacee igrofile. Sopra la pozza è stata posizionata una grata in legno per evitare i danni dovuti al pascolo. Successivamente la protezione della zona umida è stata implementata con una recinzione con rete elettrosaldada a maglia metallica.

Sito 3: Metaleto, 890 m (Poppi, AR; UTM WGS84: 32 T 726620 4852475)



Fig. 8 - Pozze realizzate nel sito di Metaleto (Foto di A. Chemello).

Metaleto (Fig. 8) è un'area aperta acquitrinosa dominata da *Phragmites australis* e circondata da un bosco di conifere misto a prevalenza di *Pseudotsuga menziesii* e *Abies alba*. L'ululone appenninico, segnalato fino al 2007 (Mazza et al., 2008), è molto probabilmente scomparso a causa dell'interramento dell'acquitrino e all'ombreggiamento dovuto alla progressiva riforestazione dell'area.

Per garantire una buona esposizione ai raggi solari sono stati svolti dei tagli di alberi nelle vicinanze dell'area umida. Ai bordi di questo acquitrino sono state scavate varie pozze che sono attualmente utilizzate come siti riproduttivi dal tritone alpestre, *Ichthyosaura alpestris* (Laurenti, 1768), dal tritone punteggiato, *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758), dal tritone crestato italiano, *Triturus carnifex* Dubois & Breuil, 1983, dalla rana temporaria, *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 e occasionalmente anche dalla salamandra pezzata, *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) (Piazzini, s.d.). È stata inoltre realizzata l'impermeabilizzazione, con la posa di un telo in PVC, di una briglia di sbarramento in pietrame e in pali di legno ai fini di cercare di mantenere costante il livello dell'acqua della zona umida.

Gli interventi di ripristino non sono ancora conclusi in quanto è prevista la costruzione di fontanile a quattro vasche in un'area vicina.



Fig. 9 - Sito Stradelli durante lo svolgimento dei lavori (foto tratta da Piazzini, 2018).

L'area di intervento (Fig. 9) è situata all'interno di una zona aperta nelle vicinanze del Podere Stradelli. L'ululone appenninico, segnalato fino al 2005 (Zoccola A., com. pers.), è probabilmente scomparso a causa dell'interramento di un sito riproduttivo a seguito dell'abbandono del pascolo. Gli interventi hanno riguardato la costruzione di quattro pozze e di un fontanile a quattro vasche. Come per gli altri interventi, anche in questo caso sulle sponde delle pozze sono state impiantate le specie vegetali previste dal progetto LIFE WetFlyAmphibia. L'area è stata recintata per evitare il calpestio di ungulati selvatici.

Prelievo - Le uova sono state prelevate alla fine del periodo di deposizione per non disturbare le femmine durante questa fase. È stato raccolto circa il 10 % di uova o larve per sito, prediligendo quelle situate in piccole pozze destinate all'essiccamento. In caso di elevata densità di larve nel sito sono state prelevate quelle di dimensioni inferiori, svantaggiate nella competizione intraspecifica per le risorse alimentari. Le operazioni di prelievo sono state effettuate indossando guanti monouso in lattice (del tipo senza polvere), per evitare la possibile trasmissione di patogeni, cambiando i guanti ogni volta che si opera in un sito diverso. Sono state raccolte prevalentemente le uova deposte su rami secchi o altro materiale mobile riducendo al minor tempo possibile la manipolazione delle stesse e le operazioni di prelievo.

Le larve o le uova sono state trasportate al centro di allevamento all'interno di contenitori isotermici per liquidi (in modo da evitare sbalzi termici) precedentemente sterilizzati e

riempiti con acqua proveniente dal sito di prelievo. I tempi di trasporto sono stati minimizzati per ridurre al massimo lo stress sulle uova e sulle larve. Al centro di allevamento, uova e larve sono state trasferite insieme all'acqua del sito di prelievo in una fauna box (Fig. 10) posizionata all'interno dell'acquario per favorire il loro acclimatemento alle nuove condizioni. Le uova sono state spostate all'interno dell'acquario dopo un minimo di 6 ore.



Fig. 10 - Uova di ululone appenninico all'interno di una fauna box (Foto di A. Chemello).

Allevamento - Il centro di allevamento (Fig. 11) è situato all'interno della Stazione dei Carabinieri Forestali di Corniolo, frazione di Santa Sofia (FC).



Fig.11 - Centro di allevamento di ululone appenninico presso Corniolo (Forlì-Cesena) (Foto di A. Chemello).

La stanza è provvista di 5 acquari da 120 litri muniti di filtro riempito con spugne e canalicchi in ceramica, lampade al neon (del tipo per rettili) senza filtro UV regolate da un timer, termometro e termostato (Piazzini, 2016).

Gli acquari sono stati riempiti con acqua proveniente dall'acquedotto, precedentemente sterilizzata tramite un filtro a lampada UV per rimuovere eventuali virus, batteri e funghi presenti. Per eliminare l'eventuale cloro presente sono stati utilizzati filtri a carbone attivo per almeno 48 ore.

L'illuminazione naturale è stata integrata per quattro ore al giorno con lampade al neon regolate da un timer.

La temperatura degli acquari nel periodo di allevamento da maggio ad settembre è variata da un minimo di 23°C ad un massimo di 28°C; un termostato regolato a una temperatura di 24°C è entrato in funzione per non far scendere la temperatura al di sotto dei 23°C. Gli acquari erano privi di materiale di fondo per evitare il fermento delle larve durante le operazioni svolte all'interno di essi e per facilitare la pulizia.

Ogni acquario aveva una sua dotazione esclusiva di strumenti numerati: due retini, due pinze, un raschietto e un tubo aspirante per la pulizia. Ogni volta che uno strumento veniva utilizzato è stato sterilizzato con ipoclorito di sodio al 5% e sciacquato abbondantemente con acqua prima di essere riposto.

L'accesso alla struttura era permesso solo dopo aver indossato copri scarpe per impedire la contaminazione del pavimento con eventuali patogeni portati dall'esterno; in alternativa sono state utilizzate calzature uniche sterilizzate e rimaste sempre all'interno dell'edificio.

Gli acquari venivano controllati giornalmente riportando su schede predisposte il numero di larve o uova presenti in ogni acquario, il numero di larve morte, la temperatura, le operazioni svolte e eventuali problematiche riscontrate.

Le operazioni all'interno degli acquari sono state svolte indossando guanti monouso in lattice (del tipo senza polvere) e cambiati ogni volta che si operava in una vasca diversa.

Davanti alle bocchette di aspirazione di ogni filtro è stata posta una rete a maglie sottili per evitare il risucchio delle larve e il getto in uscita dal filtro è stato smorzato per diminuire al massimo le turbolenze che avrebbero potuto disturbare le larve di ululone nelle prime fasi di sviluppo.

Per evitare di apportare disturbo alle larve, la pulizia del filtro veniva eseguita solo quando veniva riscontrata una sensibile riduzione della portata in uscita rimuovendo dalle spugne solo il detrito grossolano e sciacquando i canalicchi, ma senza mai pulirli a fondo.

Gli acquari venivano puliti in media ogni 5 giorni, o quando necessario per eccessivo accumulo di sostanza organica, rimuovendo, tramite un tubo aspirante, feci e circa due terzi del materiale organico in decomposizione presente sul fondale. Contestualmente veniva sostituito un terzo dell'acqua dell'acquario, con acqua dell'acquedotto privata del cloro e lasciata decantare nelle 48 ore precedenti. L'operazione veniva svolta facendo attenzione a non creare turbolenze.

Ogni acquario accoglieva larve di ululone provenienti da un solo sito di prelievo. Il numero delle larve non doveva superare gli 80 individui per vasca per evitare il sovraffollamento.

L'alimentazione delle larve era basata principalmente da verdure (zucchine, carote, bietole, barbabietole, spinaci, insalata precedentemente sbollentate per renderle più morbide) e in quantità minori da larve di *Chironomus* congelate e *Spirulina* in pasticche. Il cibo veniva somministrato in media tutti i giorni.

Per ogni ciclo di allevamento, quando le dimensioni delle larve lo consentivano, sono stati effettuati diversi tamponi (Fig. 12) per verificare l'assenza di *Batrachochytrium dendrobatidis*.

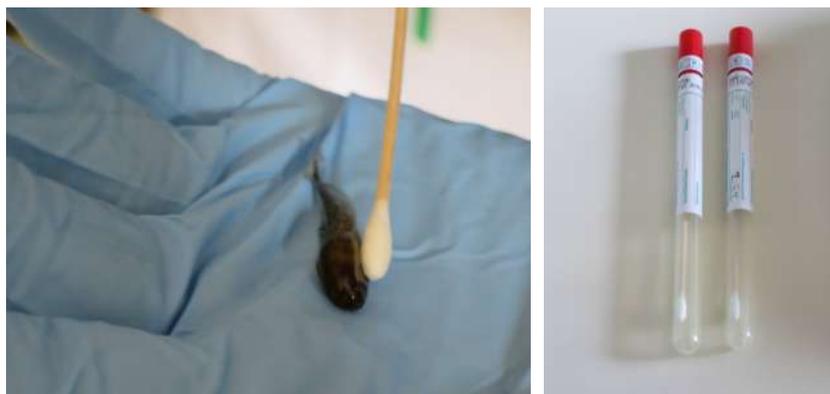


Fig. 12 - Esecuzione di un tampone per verificare l'assenza di *Batrachochytrium dendrobatidis* (Foto di A. Chemello).

Le operazioni sono state eseguite minimizzando lo stress recato all'animale. La larva è stata catturata tramite un retino, il tampone è stato passato sulla superficie ventrale prelevando una porzione di muco e successivamente l'individuo è stato rilasciato nello stesso acquario dal quale è stato catturato. I guanti sono stati cambiati dopo questa operazione, il retino è stato sterilizzato con ipoclorito di sodio al 5% e successivamente sciacquato abbondantemente con acqua. Sull'etichetta di ogni tampone è stata riportata la data e l'acquario dal quale è stata prelevata la larva. I tamponi sono stati conservati in frigorifero e successivamente spediti al laboratorio del Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita dell'Università di Genova, che ha svolto le analisi secondo il metodo riportato da Grasselli et al. (2013).

Le larve morte sono state prelevate con un retino, messe in una provetta Eppendorf con riportata la data e l'acquario di provenienza e conservate in congelatore per poi essere analizzate. Tutta la strumentazione utilizzata nell'operazione veniva sterilizzata come riportato in precedenza.

Dopo il rilascio delle larve, e prima della reimmissione di una nuova partita di uova, l'acquario veniva sterilizzato tramite filtro a lampada UV per almeno 24 ore.

Rilascio - Quando le larve raggiungevano uno stadio avanzato dello sviluppo (stadio vitale immediatamente precedente alla metamorfosi: larve con arti posteriori ben sviluppati, arti anteriori ben sviluppati o abbozzi di essi, coda ancora presente; Fig. 13) sono state prelevate dall'acquario per essere immerse in natura.



Fig. 13 - Larva di ululone appenninico in avanzato stadio di sviluppo rilasciata nel sito Metaleto (Foto di A. Chemello).

Questa operazione è stata svolta indossando guanti in lattice e catturando le larve con un retino. Per il trasporto delle larve sono stati utilizzati contenitori isotermici per liquidi (gli stessi utilizzati per il prelievo delle uova) precedentemente sterilizzati e riempiti con la stessa acqua dell'acquario. I tempi di trasporto sono stati minimizzati per ridurre lo stress sugli animali.

Al momento di ogni rilascio è stato annotato il numero di ululoni appenninici presenti nel sito rilasciati nelle reintroduzioni precedenti.

Risultati

Prelievi di uova e larve e rilasci nei siti di reintroduzione – Nelle Tab. 3-4 sono riportati i dati relativi ai prelievi, ai rilasci e le percentuali di sopravvivenza osservate.

Tab. 3 - Dati relativi ai prelievi di uova/larve

Sito di prelievo	Data prelievo	Numero Uova/larve	Acquario	Numero larve sopravvissute	Percentuale sopravvivenza
1u	16/05/2018	29 uova	A3	16	55,2
3u	16/05/2018	20 uova	A2	1	5,0
1u, 2u	19/06/2018	35 uova	A5	0	0
3u	19/06/2018	25 uova	A4	3	12,2
6u	20/06/2018	50 uova	A1	18	36,0
7u	20/06/2018	30 uova	A3	7	23,3
3u	17/07/2018	17 uova	A3	0	0
7u	18/07/2018	18 uova	A4	0	0
7u	18/07/2018	31 larve	A1	9	29,0
6u	30/07/2018	22 uova	A2	18	81,8
7u	31/07/2018	31 larve	A3	0	0
Totale uova/larve		300	Totale larve sopravvissute	72	24,0

Tab. 4 - Dati relativi alle larve in avanzato stadio di sviluppo rilasciate nei siti di reintroduzione.

Sito di reintroduzione	Data rilascio	Numero girini rilasciati	Siti di prelievo
Vitaretta	19/06/2018	8	1u, 3u
Stradelli	19/06/2018	9	1u, 3u, 7u
Metaletto	18/07/2018	9	3u, 6u, 7u
Vitaretta	18/07/2018	10	6u, 3u, 7u
Stradelli	18/07/2018	9	6u, 3u, 7u
Gavisserri	14/08/2018	9	7u
Metaletto	13/09/2018	9	6u
Vitaretta	13/09/2018	9	6u

Le sessioni di prelievo si sono svolte durante il periodo compreso tra la metà di maggio alla fine di luglio.

Il 16/05/2018 sono state prelevate 29 uova dal sito **1u** e 20 uova dal sito **3u**. La sopravvivenza è stata di 16 larve per il primo sito e 1 larva per il secondo. Le 17 larve sono state rilasciate il giorno 19/06/2018: 8 nel sito di Vitaretta e 9 nel sito di Stradelli.

Il 19/06/2018 sono state raccolte 35 uova dai siti **1u** e **2u** e 25 uova dal sito **3u**. Il giorno seguente sono state raccolte circa 50 uova dal sito **6u** e 30 uova dal sito **7u**. Nessuna larva è sopravvissuta per le uova prelevate nei siti **1u** e **2u**. Sono sopravvissute 3 larve dalle uova prelevate dal sito **3u**, 18 larve da quelle provenienti dal sito **6u** e 7 larve per quelle raccolte nel sito **7u**. Le 28 larve sono state rilasciate il giorno 18/07/2018: 9 larve nel sito di Metaletto, 10 larve nel sito di Vitareta e 9 larve nel sito di Stradelli.

Il 17/07/2018 sono state raccolte 17 uova dal sito **3u**. Il giorno seguente dal sito **7u** sono state prelevate 18 uova e 31 larve. Dei prelievi compiuti in questa sessione sono sopravvissute solo 9 delle 31 larve prelevate, che sono state rilasciate nel sito di Gavisserri il giorno 14/08/2018.

Il giorno 30/07/2018 sono state prelevate 22 uova dal sito **6u**, con sopravvivenza di 18 larve. Il giorno seguente sono state prelevate 31 larve dal sito **7u**, ma nessuna di esse è sopravvissuta. Le 18 larve sono state rilasciate il giorno 13/09/2018: 9 nel sito di Metaletto e altre 9 nel sito di Vitareta.

In totale sono state prelevate 240 uova e 62 larve. Nei siti di reintroduzione sono state rilasciate 72 larve, in particolare sono state immesse 27 larve nel sito di Vitareta, 18 larve nel sito di Stradelli, 18 larve nel sito di Metaletto e 9 larve nel sito di Gavisserri.

Allevamento delle larve - Durante il periodo di allevamento la temperatura degli acquari è stata compresa in un range tra 23°C e 28°C, con una media di 25°C.

Le larve provenienti dai siti **1u** e **3u**, prelevate nel giorno 16/05/2018, sono state nutrite principalmente con verdure e la dieta è stata integrata con una compressa di Spirulina, e con *Chironomus* solo nei giorni prossimi al rilascio. Nelle successive partite di larve, l'uso di *Chironomus* è stato costante in tutte le fasi di crescita. Solo per l'allevamento delle larve prelevate il 30 e il 31 luglio 2018 tale integratore, insieme con la Spirulina, sono stati completamente eliminati dalla dieta.

Talvolta si è reso necessario il cambio dell'acqua degli acquari in presenza di eccesso di materiale organico in sospensione o per comportamento anomalo dei girini.

Il successo di questo primo anno di allevamento si è attestato intorno al 24% delle uova/larve prelevate.

Monitoraggio nei siti di reintroduzione - Nel periodo compreso tra fine giugno e metà settembre sono stati compiuti vari monitoraggi nei siti di rilascio.

Nel sito di Vitareta sono stati effettuati 4 monitoraggi, il 28/06/2018, il 4/08/2018, il 16/08/2018 e il 17/09/2018. Sono state rinvenute 5 larve il primo giorno e 3 ululoni giovani sia nel secondo che nel terzo e quarto monitoraggio.

Nel sito di Stradelli sono state compiute 4 sessioni di monitoraggio: il 18/07/2018 con 2 individui rilevati, il 4/08/2018 con 3 individui, il 16/08/2018 con 3 individui e il 17/09/2018 con 4 individui.

Nel sito di Metaletto sono state svolte 3 sessioni di monitoraggio: il giorno 4/08/2018, il 16/08/2018 e il 17/09/2018. Solo il 17/09/2018 è stato possibile rilevare un solo ululone giovane.

Nel sito di Gaviserri sono stati effettuati tre monitoraggi, il 29/08/2018, l'11/09/2018 e il 17/09/2018. In queste date non è stato rilevato alcun individuo di ululone.

Discussione

Prelievo di uova e larve - Il primo semestre del 2018 è stato particolarmente favorevole dal punto di vista climatico in quanto le precipitazioni, nel settore appenninico, sono state superiori alla media. Ciò ha permesso la permanenza dell'acqua per tutta l'estate in siti che, di norma, si sarebbero essiccati entro la metà luglio. Queste condizioni hanno consentito all'ululone appenninico, nei siti **3u** e **7u**, di riprodursi anche tre volte.

Nella sessione di prelievo del 18/07/2018, poiché nel sito **7u** era presente un'elevata densità di larve, è stato deciso di prelevarne 31 scegliendo quelle di dimensioni minori in quanto svantaggiate nella competizione con le larve di dimensioni maggiori.

Nella sessione del 31/07/2018 nel sito **7u**, poiché la pozza era in essiccamento, è stato deciso di prelevare 31 larve che probabilmente non sarebbero riuscite a metamorfosare in tempo, evitando in questo modo la probabile morte.

Per i motivi sopra elencati, il numero totale di uova/larve prelevate è stato superiore al numero prefissato di circa 160 uova/anno (tale valore era stato volutamente e prudenzialmente sottostimato).

Allevamento delle larve - Nell'allevamento sperimentale dell'ululone appenninico, nel periodo compreso tra il 16/05/2018 e il 13/09/2018, è stata riscontrata un'elevata mortalità, in media tra il 50 e l'80%.

Le cause possono essere ricondotte ad una dieta dimostratasi non particolarmente adatta ai primi stadi vitali delle larve, in quanto principalmente basata su proteine animali (larve di *Chironomus*) e uso di integratori (*Spirulina*). Questo problema è stato risolto con l'ultima partita di uova, le cui larve sono state alimentate solo con verdure eliminando dalla dieta le larve di *Chironomus* e le compresse di *Spirulina*, raggiungendo così un tasso di sopravvivenza dell'81%.

Un altro problema che può aver influito negativamente sul tasso di sopravvivenza è stato il trasporto delle uova che, per quelle prelevate in uno stadio prossimo alla schiusa, ne ha accelerato il processo di metamorfosi, creando anomalie nello sviluppo delle larve.

Durante il periodo di allevamento si sono verificati due eventi di anossia, favoriti anche dalle temperature estive elevate, che hanno provocato la morte di tutte le larve prelevate dal sito **7u** nei giorni 18/07/2018 e 31/07/2018. Dopo questi eventi è stato deciso di rimuovere dagli acquari il cibo galleggiante per evitare il consumo di ossigeno dovuto ai processi di decomposizione.

Monitoraggio nei siti di reintroduzione - Il monitoraggio del primo anno di reintroduzione si è basato solo sull'osservazione diretta degli individui. Non è stato possibile censire gli individui tramite il metodo di marcatura e ricattura, che prevede la possibilità di identificare gli individui con il riconoscimento attraverso il pattern di distribuzione delle macchie ventrali, in quanto l'ISPRA ha raccomandato di rilasciare le larve nei momenti antecedenti alla metamorfosi, periodo nel quale il pattern ventrale non è ancora visibile. Il monitoraggio tramite il metodo marcatura e ricattura verrà svolto a partire dal 2020 in modo da censire un numero maggiore di individui.

Il numero di individui rilevati nelle sessioni di monitoraggio possono sembrare pochi, ma c'è da considerare che la mancata rilevazione o il relativo basso numero di individui contati possono essere spiegati con la fase di dispersione che i neometamorfosati compiono una volta usciti dall'acqua, e alla relativamente elevata mortalità.

Conclusioni

Il numero di individui rilasciati nel versante tirrenico è stato superiore al numero minimo di individui prefissato. Tale numero è stato calcolato utilizzando, in fase di stesura del progetto, il software Vortex 10 che, attraverso l'introduzione di vari parametri biologici ed ecologici della specie, indica il valore minimo di individui che permette a una popolazione di automantenersi nel tempo. In questo caso, il numero minimo di larve da rilasciare in ogni sito è risultato di 15 individui all'anno per i quattro anni di attività di reintroduzione previsti nel progetto.

I monitoraggi hanno dato un esito senz'altro positivo in quanto è stato ritrovato un buon numero di individui, rispetto a quelli rilasciati, che appaiono già fidelizzati ai siti di reintroduzione.

I problemi riscontrati in questo primo anno di attività sono stati analizzati e discussi per modificare il protocollo di allevamento, in modo tale da avere un maggiore successo nelle attività di reintroduzione dei prossimi anni.

Probabilmente nel 2021, a termine del progetto Life WetFlyAmphibia, in alcuni siti saranno presenti popolazioni abbastanza numerose e in grado di riprodursi. Per far sì che queste siano autosufficienti nel lungo periodo, sarebbe auspicabile continuare le operazioni di prelievo, allevamento e rilascio oltre la fine del progetto.

Nonostante i seri problemi di conservazione, l'ululone appenninico fino a oggi è stato oggetto di pochissimi interventi di reintroduzione. Nel 2010 in Basilicata (Gravina di Matera) è stato avviato il Progetto Life Arupa, conclusosi nel 2015, che tra le azioni previste aveva anche l'allevamento e il rilascio di neometamorfosati di ululone appenninico, ma i cui risultati non sono ancora stati resi noti. Dal 2000, inoltre, è attivo il Centro Anfibi di Pianoro (Bologna) che si occupa della conservazione e dell'allevamento in cattività di specie di anfibi, compreso l'ululone.

Progetti come il Life WetFlyAmphibia sono di importanza vitale per la sopravvivenza di specie a rischio; per questo motivo, sull'esempio di quanto fatto dal Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, è auspicabile che anche altre aree protette (Riserve Naturali, Parchi Regionali e Nazionali, ecc.) attivino progetti di reintroduzione dell'ululone appenninico. Solo in questo modo sarà possibile cercare di evitare l'estinzione di questa specie in drammatico declino in tutta Italia.

Bibliografia

- Angelini C., Cari B., Mattoccia M., Romano A. (2004). Distribuzione di *Bombina variegata pachypus* (Bonaparte 1838) sui Monti Lepini (Lazio) (Amphibia: Anura) Atti Società italiana di Scienze Naturali e del Museo civico di Storia Naturale. Milano.
- Andreone F., Corti C., Sindaco R., Romano A., Giachi F., Vanni S., Delfino G. (2009). *Bombina pachypus* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T54450A86629977. dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T54450A11147957.en. (ultimo accesso: 29/11/2018).
- Barbieri F., Bernini F., Guarino F.M. & Venchi A. (2004). Distribution and status of *Bombina variegata* in Italy. *Italian Journal of Zoology*, 71 (Supplement 1): 83-90.
- Canessa S., Oneto F., Ottonello D., Arillo A. & Salvidio S. (2013). Land abandonment may reduce disturbance and affect the breeding sites of an Endangered amphibian in northern Italy. *Oryx*, 47: 280-287.
- Canestrelli D., Cimmaruta R., Constantini V., Nascetti G. (2006). Genetic diversity and phylogeography of the Apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus*, with implications for conservation. *Molecular Ecology*, 15: 3741-3754.
- Canestrelli D., Zampiglia M., Bisconti R. & Nascetti G. (2014). Proposta di intervento per la conservazione ed il recupero delle popolazioni di ululone appenninico *Bombina pachypus* in Italia peninsulare. Dipartimento DEB Università degli Studi della Tuscia e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma
- Fiacchini D. (2007). *Bombina pachypus* (Amphibia, Bombinatoridae) nelle Marche: aspetti corologici, ecologici e conservazionistici. *Biogeographia*, 28: 603-610.
- Grasselli E., Vecchione G., Di Piazza S., Zotti M., Salvidio S. (2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* detection in amphibian samples using real-time PCR with SYBR GREEN chemistry. XVII SHE European Congress of Herpetology. Vezprém, Hungary. Programme and Abstracts: 228.
- Guarino F. M., Angelini F, Cammarota M. (1995). A skeletochronological analysis in three syntopic species of southern Italy. *Amphibia-Reptilia*, 16: 197-203.
- Lanza B., Vanni S. (1991). Notes on the biogeography of the Mediterranean island amphibians. *Accademia Nazionale dei Lincei Atti Convegni Lincei* (Roma), 85: 335-344.
- Lanza B., Corti C. (1993). Erpetofauna italiana: acquisizioni ed estinzioni nel corso del novecento. *Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina*, 21: 5-49.

- Lanza B., Andreone F., Bologna M.A., Corti C., Razzetti E. (2007). Fauna d'Italia, vol. XLII, Amphibia. Calderini, Bologna.
- Mazza G., Terzani F., Rocchi S. (2008). Ricerche floro-faunistiche in alcune zone umide del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna (Toscana, Emilia-Romagna). Quaderni della Stazione di Ecologia del Civico Museo di Storia Naturale di Ferrara, 18: 37-88.
- Mazzotti S., Caramori G., Barbieri C. (1999). Atlante degli Anfibi e dei Rettili dell'Emilia Romagna. Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara.
- Miozzo M. (a cura di) (2016). Documento tecnico per l'implementazione dell'azione concreta C1. LIFE WetFlyAmphibia (LIFE14 NAT/IT/000759). drive.google.com/file/d/0B51SNa3UMcDWNU80WklIMEQycEk/view (ultimo accesso:29/11/2018).
- Mirabile M., Melletti M., Venchi A., Bologna M.A. (2009). The reproduction of the Apennine yellow-bellied toad (*Bombina pachypus*) in central Italy. Amphibia-Reptilia, 30: 303-312.
- Nascetti G., Vanni S., Bullini L., Lanza B. (1982). Variabilità e divergenza genetica in popolazioni italiane del genere *Bombina* (Amphibia, Discoglossidae). Bollettino di Zoologia, 49 (Supplemento): 134–135.
- Pabijan M., Wandycz A., Hofman S., Węcek K., Piwczyński M., Szymura J.M. (2013). Complete mitochondrial genomes resolve phylogenetic relationships within *Bombina* (Anura: Bombinatoridae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 69: 63-74.
- Piazzini S. (2014). La fauna minore (Crostacei Decapodi, Lepidotteri Ropaloceri, Pesci Anfibi, Rettili) delle valli del Bidente di Campigna, delle Celle e di Ridracoli (Parco Nazionale Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna). Parco Nazionale Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna. Relazione inedita.
- Piazzini S. (2016a). Azione A1: Integrazione delle conoscenze sulla distribuzione delle popolazioni delle specie anfibi e farfalle e messa a punto delle procedure per l'allevamento ex-situ e trasloco degli anfibi di progetto. LIFE WetFlyAmphibia (LIFE14 NAT/IT/000759). www.lifewetflyamphibia.eu/images/pdf/Life-Wetflyamphibia-DELIVERABLE-Azione_A1_cartografia.pdf. (ultimo accesso: 29/11/2018).
- Piazzini S. (2016b). Procedure per l'allevamento ex-situ e trasloco di ululone appenninico *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838) e salamandrina di Savi *Salamandrina perspicillata* (Savi, 1821). LIFE WetFlyAmphibia (LIFE14 NAT/IT/000759). www.lifewetflyamphibia.eu/images/pdf/Life_Wetflyamphibia_DELIVERABLE_Azione_A1_protocollo_di_allevamento.pdf (ultimo accesso: 29/11/2018).

- Piazzini S. (2018). Azione D.2: monitoraggio sull'efficacia della reimmissione di *Bombina variegata*. LIFE 14 NAT/IT/000759 WetFlyAmphibia. Relazione inedita.
- Piazzini S. (s.d.) Studio di fattibilità per la reintroduzione dell'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838) in alcuni siti del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna. Relazione inedita.
- Romano A., Ventre N, De Riso L., Pignataro C., Spilinga C. (2010). Amphibians of the "Cilento e Vallo di Diano" National Park (Campania, Southern Italy): updated check list, distribution and conservation notes. *Acta Herpetologica*, 5: 233-244.
- Rondinini C., Battistoni A., Peronace V., Teofili C. (2013). Lista Rossa IUCN dei Vertebrati Italiani. Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma.
- Ruffo S., Stoch F. (a cura di) (2007). Checklist and distribution of the italian fauna. Ministero dell'Ambiente. Memorie del Museo civico di Storia naturale di Verona, 2. Serie, Sezione Scienze della Vita, 17: 303 pp +CD ROM.
- Sperone E., Bonacci A., Corapi B., Tripepi S. (2006). Notes on the distribution and ecology of the apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus* in Calabria and Lucania. In: Bologna M.A., Capula M., Carpaneto G.M., Luiselli L., Marangoni C., Venchi A. (a cura di), 2006. Riassunti del 6° Congresso nazionale della Societas Herpetologica Italica (27 settembre - 1 ottobre 2006). Stilgrafica, Roma.
- Tedaldi G., Scoccianti G. (1998). Indagine su alcune specie di anfibi in pericolo di estinzione del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi. Relazione inedita.
- Vaccaneo R. (1931). Ricerche sui caratteri morfologici dei *Bombinator* italiani. Bollettino dei Musei di Zoologia e di Anatomia Comparata della R. Università di Torino Serie III, 4: 1-48.
- Zampiglia M., Canestrelli D., Chiochio A., Nascetti G. (2013). Geographic distribution of the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among mountain amphibians along the Italian peninsula. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107: 61-68.