



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in
Scienze Naturali

**Reintroduzione di *Bombina
pachypus* nel versante
tirrenico del Parco
Nazionale delle Foreste
Casentinesi**

**Reintroduction of *Bombina
pachypus* in the tyrrenian
side of Casentinesi Forest
National Park**

Relatore
Laura Beani

Correlatore
Leonardo Dapporto

Candidato
Edoardo Batistini

A mio nonno Raffaello

Indice

Riassunto _____ pag 4

Abstract _____ pag 5

Capitolo 1 Introduzione: l'ululone appenninico _____ pag 6

- 1a. Note tassonomiche**
- 1b. Areale geografico**
- 1c. Popolazione**
- 1d. Diversità genetica delle popolazioni**
- 1e. Descrizione, riproduzione e habitat**
- 1f. Principali minacce**
- 1g. Misure di conservazione**

Capitolo 2 Materiale e metodi _____ pag 12

- 2a. Scelta dei siti di prelievo**
- 2b. Siti di reintroduzione**
- 2c. Metodo di prelievo**
- 2d. Metodo di allevamento**
- 2e. Metodo di rilascio**

Capitolo 3 Risultati _____ pag 23

- 3a. Prelievi di uova e larve e rilasci nei siti di reintroduzione**
- 3b. Allevamento delle larve**
- 3c. Rilascio delle larve nei siti di reintroduzione**
- 3d. Monitoraggio nei siti di reintroduzione**

Capitolo 4 Discussione, Conclusioni e prospettive _____ pag 26

Bibliografia _____ pag 29

RIASSUNTO

L'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838) è un anfibio anuro endemico italiano in pericolo di estinzione. Le cause del suo declino le possiamo ricondurre all'alterazione e alla distruzione del suo habitat, ai cambiamenti climatici e a una patologia fungina causata da *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Il Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna ha avviato nel 2015 il Progetto LIFE WetflyAmphibia che ha come scopo il miglioramento dello stato di conservazione di tre specie di anfibi, tra cui *B. pachypus*, e due specie di lepidotteri all'interno del suo territorio. Le azioni di conservazione riguardanti l'ululone appenninico consistono nel ripristino e la creazione di nuovi siti di riproduzione all'interno del Parco, nel prelievo di uova e larve, nell'allevamento ex situ e nel rilascio di larve in avanzato stadio di sviluppo in 5 siti del versante tirrenico del Parco, dove la specie si è recentemente estinta.

I 5 siti dei prelievo del versante adriatico del Parco, dove la specie non si è estinta, sono stati scelti in base alla consistenza numerica della specie e all'assenza di *B. dendrobatidis*. Le uova sono state prelevate alla fine del periodo di deposizione per non disturbare le femmine durante questa fase. E' stato raccolto circa il 10% delle uova o larve per il sito prediligendo quelle che si trovano in piccole pozze destinate all'essiccamento, evitando in questo modo la morte delle larve o la mancata schiusa delle uova. Le larve sono state allevate in 5 acquari presso la stazione dei Carabinieri Forestali di Corniolo (Forlì-Cesena). Le fasi di prelievo, allevamento e rilascio sono state eseguite con guanti monouso in modo da evitare il contatto diretto con le larve.

Nel 2018 in totale sono state prese 240 uova e 62 girini e 72 larve sono state rilasciate in avanzato stadio di sviluppo nei 5 siti del versante tirrenico. Nel solito anno sono state compiute indagini visive nelle aree di reintroduzione e sono stati rilevati un buon numero d'individui giovani. Nel 2019 invece sono state prelevate all'incirca 300 uova e 293 larve che sono state rilasciate nei siti.

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 Casentinesi 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 five sites in the Tyrrhenian side of the park, from which the species has recently died out.

The 5 harvesting sites on the Adriatic side of the park were selected according to the numerical consistency of *B. pachypus* and the absence of *B. 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 was 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 2018 in total about 240 eggs and 62 tadpoles were taken and 72 larvae released at an advanced stage of development had been released in the 5 sites of the Tyrrhenian side of the park.

During the 2018 visual surveys were carried out in the reintroduction areas and a good number of young individuals were detected.

In 2019 in total about 300 eggs were taken and overall 293 larvae released.

Capitolo 1. Introduzione: l'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte 1838)

L'ululone dal ventre giallo, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838), è un anfibio anuro endemico dell'Italia, presente dalla Liguria centrale fino all'Aspromonte. La specie è considerata "Endangered" dallo IUCN (Andreone et al IUCN, 2018) ed ha subito un drastico declino a partire dagli anni 90' del secolo scorso. In Italia questa specie è oggetto di alcuni progetti di conservazione, tra cui il Progetto LIFE Arupa, per la sopravvivenza e l'incremento di alcune specie di anfibi e rettili nella Gravina di Matera (dal 1995 è inclusa nel SIC/ZPS IT9220135 "Gravine di Matera") e il Progetto LIFE WetflyAmphibia, in cui rientra il mio studio. Questo progetto ha come specie target, oltre a *B.pachypus*, altre due specie di anfibi, (*Salamandrina perspicillata*, *Tritus carnifex*) e due specie di lepidotteri (*Euplagia quadripunctaria*, *Eriogaster catax*).

L'area d'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 del Parco occupa una superficie di 36.843 ettari divisi in maniera uguale tra Emilia Romagna (provincia di Forlì-Cesena) e Toscana (provincie di Arezzo e Firenze). Il territorio è prevalentemente forestato, con modeste aree destinate al pascolo e all'agricoltura, e si estende da una quota minima di 450 m a una massima di 1658 m (Monte Falco).

Gli obiettivi principali per quanto riguarda *B.pachypus* sono il miglioramento dello stato di conservazione della specie nel lato adriatico del Parco e la creazione di alcune popolazioni in grado di sopravvivere senza ulteriori rilasci nel versante tirrenico del Parco.

A questo scopo sono stati allestiti circa 150 siti riproduttivi distribuiti su tutto il territorio dell'area protetta. In modo particolare sono stati ripristinati e costruiti ex novo fontanili, vasche, abbeveratoi e pozze riproduttive, siti adeguatamente attrezzati alle esigenze della specie.

In questa tesi descrivo l'attività di reintroduzione dell'ululone appenninico, in particolare le fasi di prelievo di uova o larve da siti opportunamente selezionati del versante adriatico, l'allevamento in acquario e il rilascio di larve in avanzato stadio di sviluppo nei siti di reintroduzione nel versante tirrenico del Parco.

Fig. 1: Il logo del progetto LIFE WetFlyAmphibia



1a. Note tassonomiche - L'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1838), è un anfibio endemico dell'Italia peninsulare, appartenente all'ordine degli anuri, famiglia *Bombinatoridae*. Lo status tassonomico dell'ululone è tuttora controverso. Infatti, fino a poco tempo fa *B.pachypus* era considerata una sottospecie dell'ululone dal ventre giallo, *B.variegata* (Linnaeus, 1758), specie politipica centro-europea presente anche in Italia settentrionale. Studi morfometrici hanno messo in luce differenze tra gli ululoni dell'Italia settentrionale e quelli dell'Appennino (Vandoni, 1914; Vaccaneo, 1931); L'analisi genetica ha confermato il differenziamento di *B.pachypus* (Nascetti et al. 1982), che potrebbe essere considerato una specie monotipica e non una sottospecie (Lanza e Vanni, 1991; Lanza e Corti, 1993). L'elevazione al rango di specie richiederebbe un ampliamento dei dati sulla natura e l'entità di barriere d'isolamento riproduttivo tra le due forme. A oggi non è ancora chiaro se trattasi effettivamente di unità distinte a livello specifico, in letteratura vi si fa riferimento sia come sottospecie *B.v.pachypus* che come specie *B.pachypus*. In questo scritto continueremo a riferirci ad essa come specie distinta.

1b. Areale geografico - *B.pachypus* è una specie endemica dell'Italia, nell' Appennino diffusa dalle province di Genova e Parma fino alla Calabria (Fig.2). Presenta un intervallo altitudinale preferenziale compreso tra 300 e 700 m (Appennino centro-settentrionale), 600-1000 m (Appennino centro-meridionale) (Sindaco et al.2006) mentre supera di poco i 1900 metri sul versante lucano del massiccio del Pollino (Talarico et al.2004). Non è presente nelle isole (Corti et al In Sindaco et al. 2006).



Fig.2: Distribuzione di *Bombina pachypus* in Italia.

1c. Popolazione - Un tempo questa specie era comune trovarla in habitat idonei. Nel corso degli ultimi 10 anni la specie è declinata in quasi tutto il suo areale (ad eccezione della Calabria, dove la popolazione rimane stabile). Da un'indagine su siti rappresentativi è emerso che tra il 1996 e il 2004 la specie è scomparsa in più del 50% dei siti esaminati (56 occupati nel 1996 contro 23 occupati nel 2004; Barbieri et al. 2004). Declini significativi sono stati registrati in Provincia di Siena (Piazzini et al. 2004), Abruzzo (Ferri et al. 2007), Provincia di Ancona (Fiacchini 2003), Lazio (Bologna et al. 2000, Bologna et al. 2007) ed Emilia Romagna (Stagni et al. 2005).

1d. Diversità genetica delle popolazioni - La capacità di popolazioni e specie di adattarsi ad un ambiente in continuo mutamento è strettamente legata alla diversità genetica all'interno di esse. La diversità genetica costituisce una risorsa essenziale per la loro persistenza a lungo termine. Da un punto di vista conservazionistico è quindi di fondamentale importanza conoscere l'entità, la struttura e la distribuzione geografica.

La distribuzione geografica della diversità genetica di *B.pachypus* lungo l'areale è stata oggetto di recente studio (Canestrelli et al., 2006). Le popolazioni con livelli maggiori di diversità genetica sono state quelle presenti in Calabria, l'area cioè in cui la specie si sarebbe rifugiata dalle condizioni climatiche a essa avverse che vigevano durante i periodi glaciali. In particolare, il maggiore serbatoio di diversità genetica (*hotspot*), e dunque l'area di maggior interesse conservazionistico, è stata riscontrata nella parte centrale della Calabria. Al contrario, tutte le popolazioni studiate a nord della Calabria presentano ridotti valori di variabilità genetica e scarso differenziamento, in accordo con uno scenario di recente ricollozzazione della parte centrale e settentrionale della penisola (presumibilmente dopo la fine dell'ultima glaciazione, c.a. 18000 anni fa) dal rifugio calabrese.

Pertanto, dal momento che i dati genetici indicano che le popolazioni settentrionali sono derivate da quelle meridionali e che la loro diversità genetica è limitata, tutte le popolazioni possono considerarsi ascrivibili alla medesima unità evolutivamente significativa (ESU sensu Ryder, 1986; v.d. anche IUCN/SSC, 2008). Questa specie risulta "not threatened" in Calabria, ma "vulnerable" nelle popolazioni settentrionali (Canestrelli et al. 2006). Da qui la necessità di un intervento di reintroduzione tramite traslocazione.

1e. Descrizione, riproduzione e habitat - La specie supera raramente i 5 cm di lunghezza, in media misura 4 cm. Il dorso è di colore grigio o marrone mentre il ventre è vivacemente colorato a chiazze giallo-arancione brillante con macchie blu. Presenta un corpo piatto, verrucoso e una pupilla a forma di cuore.

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* (*Bombina variegata cutaneos venom*), si trovano sul dorso (ciò conferisce all'animale un aspetto verrucoso).

Gli arti posteriori sono relativamente corti e robusti e il piede è fornito di una palmatura ben sviluppata. Sono assenti la membrana timpanica e i sacchi vocali.

Il pattern di distribuzione delle macchie sul ventre 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 s'ingrandiscono e permettono al maschio di bloccare la femmina durante l'accoppiamento.

L'ululone passa l'inverno a terra nelle fessure o sotto le rocce coperte da vegetazione, di solito non lontano dai siti di riproduzione. In condizioni naturali l'età massima arriva a 16 anni (Barbieri et al. 2004 in Guarino et al. 1995) e la maturità sessuale viene raggiunta intorno al secondo/terzo anno. La femmina si riproduce da 2 a 3 volte, deponendo da 5 a 100 uova isolate o in piccoli gruppi fissate alla vegetazione acquatica, a rami sommersi o direttamente sul substrato.

La metamorfosi avviene in 2/3 mesi.

Le larve sono caratterizzate da una colorazione bruna sul dorso e biancastra sul ventre e dalla presenza dello spiracolo, situato in posizione medio - ventrale.

Le larve di ululone appenninico si cibano prevalentemente di microalghe, materiale organico in decomposizione e microinvertebrati. Larve e uova sono a loro volta prede di pesci, uccelli, bisce d'acqua, tritoni e larve di alcuni insetti. Gli adulti di *B.pachypus* si cibano prevalentemente di piccoli invertebrati, tra cui soprattutto insetti, crostacei e anellidi. Il suo nome deriva, oltre che dal colore del ventre, dal tipico canto che emette durante il periodo riproduttivo, costituito da un "uuh...uuh...uuh...", ripetuto anche più di 40 volte al minuto.

Nel Parco Nazionale Foreste Casentinesi si trova da 400 a 1000 m, in ambienti collinari e medio montani. *B.pachypus* è attivo a partire dalla fine di Marzo e si riproduce dalla fine di Aprile fino a tutto Agosto.

Si rinviene in ambienti collinari e medio montani. Frequenta raccolte di acqua di modeste dimensioni, come pozze temporanee, anse morte o stagni di fiumi e torrenti, soleggiate e poco profonde in boschi e aree aperte (F.M. Guarino, O. Picarello, A. Venchi in Lanza et al. 2007).

E' presente anche in habitat modificati incluse aree ad agricoltura non intensiva, pascoli e canali d'irrigazione.

1f. Principali minacce - Si presume che la perdita di habitat delle zone umide dovuta alla captazione dell'acqua per scopi agricoli sia una potenziale minaccia per la specie. Alcune popolazioni sono molto piccole (10-12 individui [Matoccia et al. 2005]) e a predominanza maschile: queste popolazioni sono soggette a estinzione locale per fattori stocastici. Ulteriore fattore di rischio è dovuto allo scarso successo riproduttivo degli ululoni appenninici in pozze di modeste dimensioni soggette a rapido disseccamento e ad eccessiva predazione sulle uova e sulle larve (Mirabile et al.2004).

Un'altra minaccia è rappresentata dalla chitridiomocosi, un'infezione sostenuta da miceti appartenenti al phylum *Chytridiomycota*, ordine *Chytridiales*, che colpisce gli anfibi a livello del sistema tegumentario e provocano una muta anomala. I sintomi più evidenti sono a carico dell'epidermide: ulcere, iperemia e piccole emorragie (Bologna e La Posta 2004, F.M. Guarino, O. Picarello & M. Pellegrini in Sindaco et al. 2006). Un'altra minaccia è la depressione genetica (interbreeding) nelle piccole popolazioni isolate, con possibili riduzioni di fertilità o maggiore suscettibilità ai patogeni.

1g. Misure di conservazione - Per quanto riguarda il Progetto LIFE WetflyAmphibia nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna, le misure di conservazione di *B.pachypus* consistono nel miglioramento dello stato di conservazione della specie nel lato adriatico del Parco, dove è attualmente presente, e nella reintroduzione nel lato toscano del Parco, dove la specie è recentemente scomparsa. Sono stati fatti ad oggi 120 interventi (2 o più sono realizzati per ogni sito) in circa 84 siti. Questi interventi, che continueranno per tutto il 2019/2020, sono consistiti nel ripristino e nella costruzione ex novo di opere di muratura (fontanili, vasche, abbeveratoi e pozze riproduttive). Nel 2018 in totale sono state raccolte circa 240 uova, 62 girini e sono state rilasciate 72 larve. Nel 2019 in totale sono state raccolte circa 300 uova e complessivamente rilasciate 293 larve.

Bombina pachypus comunque è elencata in appendice II della Convenzione di Berna e in appendice II e IV della Direttiva Habitat (92/43/CEE). E' protetta dalla legislazione italiana e presente in aree protette. Nella provincia di Trieste e in alcune aree protette prealpine in Lombardia e in Toscana, nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, sono state messe in atto misure di ripristino ambientale per ricreare siti riproduttivi idonei (N. Bressi & F. Barbieri in Sindaco et al. 2006).



Fig.3: *Uluone appenninico*, *Bombina pachypus*.

Capitolo 2. Materiale e metodi

La reintroduzione dell'ululone appenninico si è svolta 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 nel versante toscano del Parco. Tutte queste fasi del progetto sono state svolte seguendo il protocollo redatto dal Dott. Sandro Piazzini erpetologo del progetto LIFE incaricato dall'Ente Parco.

2.a Scelta dei siti di prelievo - La scelta dei siti di prelievo si è basata preliminarmente sulla valutazione della consistenza numerica dell'ululone per ogni sito (numero di coppie riproduttive maggiori di 5). Secondo questo criterio sono stati individuati 7 possibili siti di intervento per il prelievo delle uova (*Tab. 1*).

Tab. 1 – Siti con popolazioni consistenti di *B.pachypus* nel PNFC.

(* La stima è il numero medio di coppie riproduttive, basata su osservazioni ripetute avvenute nel corso di un monitoraggio di anfibii nel periodo 2013-2016; Piazzini,2016).

Numero sito	Coordinate UTM	Corpo idrico e Quota (m)	Numero coppie riproduttive stimate
1u	32TPQ17	Acquitrinio (712)	6-7
2u	32TPQ17	Ruscello (660-675)	6-7
3u	32TPQ26	Acquitrinio (645)	11
4u	32TPQ26	Acquitrinio (575-655)	7
5u	32TPQ26	Ruscello (485)	10*
6u	32TPQ16	Ruscello (980-1005)	15*
7u	32TPQ26	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 reintroduzioni in altri siti dove *Bd* non è presente. I test effettuati su *Bombina pachypus*, *Salamandrina perspicillata*, *Salamandra salamandra*, *Rana dalmatina*, *Rana temporaria*, *Ichthyosaura alpestris*, *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.

In seguito 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).

Le analisi hanno segnalato la presenza di *Bd* solo nei tamponi presenti dal sito 4u, che di conseguenza è stato escluso dalle attività di prelievo delle uova. I restanti siti, poiché negativi al test, sono stati considerati idonei al fine della reintroduzione. Come confermato dal Dott. Sandro Piazzini, per quanto riguarda il PNFC, 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 nella *Tabella 1*, è stato calcolato il numero di uova da poter prelevare senza impoverire la popolazione sorgente (*Tab.2*). Tale numero è sottostimato, poiché sono stati considerati solo due eventi riproduttivi all'anno su tre, e una media di 15 uova deposte da ogni coppia per ogni evento riproduttivo e un prelievo massimo del 10 per cento delle uova presenti nel sito.

Tab.2: Calcolo del numero massimo di uova da prelevare per la reintroduzione della specie, senza impoverire la popolazione sorgente.

Numero sito	Numero coppie riproduttive stimate	Numero coppie utilizzate per la stima	Produzione annua di uova stimata 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

2.b 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, alla collocazione di aree demaniali, alla facilità di accesso per la realizzazione degli interventi di ripristino e alla presenza di sorgenti perenni.

La distanza tra i siti di prelievo e quelli di reintroduzione va da un massimo di 30 km a un minimo di 4 km.

Sono stati individuati 5 siti di reintroduzione di *B.pachypus* (Fig.4).

Il quinto nel 2018 non è stato utilizzato perché non preparato ad accogliere esemplari di *B.variegata*. 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.

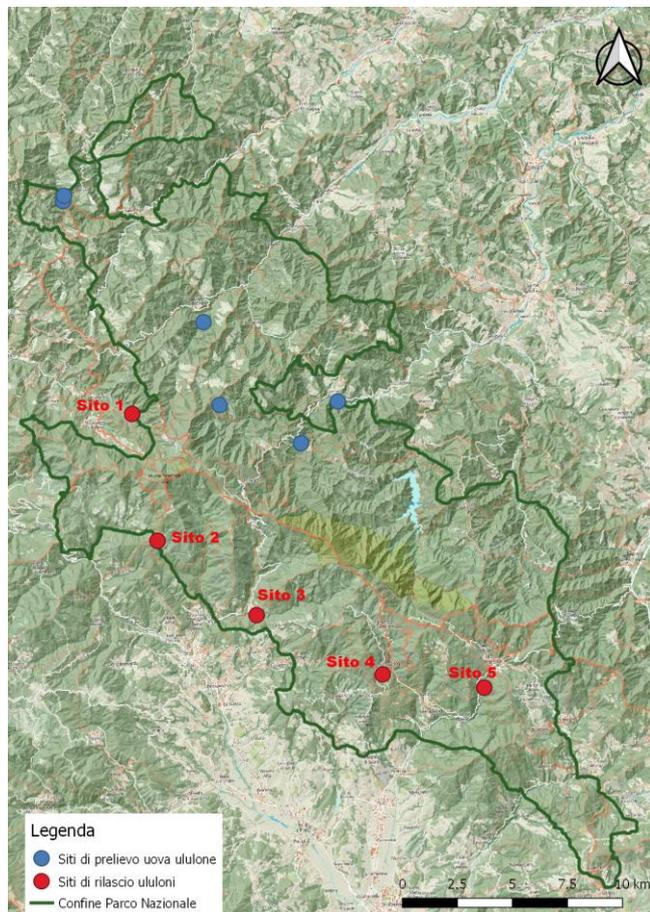


Fig.4: Siti di prelievo e rilascio di ululone appenninico nel Parco Nazionale Foreste Casentinesi.

Sito 1 : quota 780 m

Si tratta di un piccolo ruscello, alimentato da una sorgente perenne, che crea una zona acquitrinosa in un'area aperta, adibita fino a qualche anno fa al pascolo brado. Attualmente è gestita come prato da sfalcio; non è presente alcuna specie di anfibi (Piazzini, 2016).

Sito 2: quota 1030 m

L'area del sito 2 è costituita da varie zone umide potenzialmente utilizzabili da *B.variegata*; il fulcro dell'area è un abbeveratoio, realizzato ex novo nel 2018, alimentato da una sorgente perenne, affiancato però da un ruscello perenne che crea piccoli acquitrini e da un acquitrino naturale, temporaneo che tuttavia va in secca verso la metà di luglio. La zona è un grande pascolo brado ancora utilizzato da una piccola mandria di vacche di razza chianina; nell'area non erano presenti anfibi (Piazzini, 2016) prima della realizzazione degli interventi attuati dal progetto LIFE WetflyAmphibia; oggi è presente una piccola popolazione di *rana temporaria* (*Rana temporaria*) che si riproduce in un altro abbeveratoio poco distante.



Fig.5: Abbeveratoio, Sito 2

Sito 3: quota 720 m

Il sito 3 è costituito da una risorgiva perenne che, dopo i lavori effettuati con il progetto LIFE WetflyAmphibia, alimenta una pozza idonea per la riproduzione di *B.variegata*; la pozza è inserita in una zona aperta utilizzata dal pascolo brado di ovini. Nell'area era presente solo una piccola popolazione di *rana temporaria* (Piazzini, 2016), che si riproduce, tuttavia, in un'altra pozza temporanea poco distante.



Fig.6: il Sito 3

Sito 4: quota 890 m

Il sito 4 è costituito principalmente da un acquitrinio perenne e da uno stagno perenne affiancato da un nuovo abbeveratoio; il sito si trova in un'area aperta al margine con un bosco di conifere che in parte è stato tagliato grazie al progetto LIFE per consentire il ripristino di condizioni idonee ad ospitare *B.variegata*. Nell'area si riproducono varie specie di anfibi, tra cui il tritone alpestre (*Ichtyosaura alpestris*), il tritone punteggiato (*Lissotriton vulgaris*), il tritone crestato (*Triturus carnifex*), la rana temporaria (*Rana temporaria*) e occasionalmente anche la salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*) (Piazzini, 2017).



Fig.7: il Sito 4

Sito 5: quota 750 m

Il sito 5 è stato ripristinato grazie al progetto LIFE.

E' stato realizzato ex novo un abbeveratoio, alimentato da una sorgente, affiancato da quattro pozze; il sito si trova su un'area aperta, attualmente gestita solo da uno sfalcio annuale della vegetazione erbacea; nell'area non erano presenti anfibi (Piazzini, 2017), tranne qualche sporadico individuo di rana appenninica (*Rana italica*).



Fig.8: il Sito 5

2.c Metodo di prelievo - Le uova sono state prelevate alla fine del periodo di deposizione per non disturbare le femmine durante questa fase. E' stato raccolto circa il 10 per cento 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 fatte indossando guanti monouso in lattice (del tipo senza polvere), per evitare la possibile trasmissione di patogeni, cambiando i guanti ogni volta si opera in un sito diverso. Sono state raccolte prevalentemente le uova deposte sui rami secchi o altro materiale mobile riducendo al minor tempo possibile la manipolazione delle stesse e delle operazioni di prelievo.

Le larve e/o uova sono state trasportate al centro di allevamento all'interno di contenitori isotermeici per liquidi (in modo da evitare sbalzi termici) in precedenza sterilizzati e riempiti con l'acqua proveniente dai siti di prelievo. I tempi di trasporto sono stati minimizzati per ridurre al minimo 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.9) posta all'interno dell'acquario per favorire il loro acclimatamento alle nuove condizioni.



Fig.9: Uova di ululone appenninico all'interno di una fauna box.

2.d Metodo di allevamento - Il centro di allevamento (Fig.10) si trova all'interno della Stazione dei Carabinieri Forestali di Corniolo, frazione di Santa Sofia (FC). 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 i rettili) senza filtro UV regolate da un timer, termometro e termostato. Gli acquari sono stati riempiti con acqua proveniente dall'acquedotto, precedentemente sterilizzata tramite un filtro a lampada UV per rimuovere eventuali batteri, virus 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 durante il periodo di allevamento, da Maggio a Settembre, è variata da un minimo di 20°C a un massimo di 28°C; un termostato regolato alla temperatura di 24°C è entrato in funzione per non far scendere la temperatura sotto i 20°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 facilitarne la pulizia.

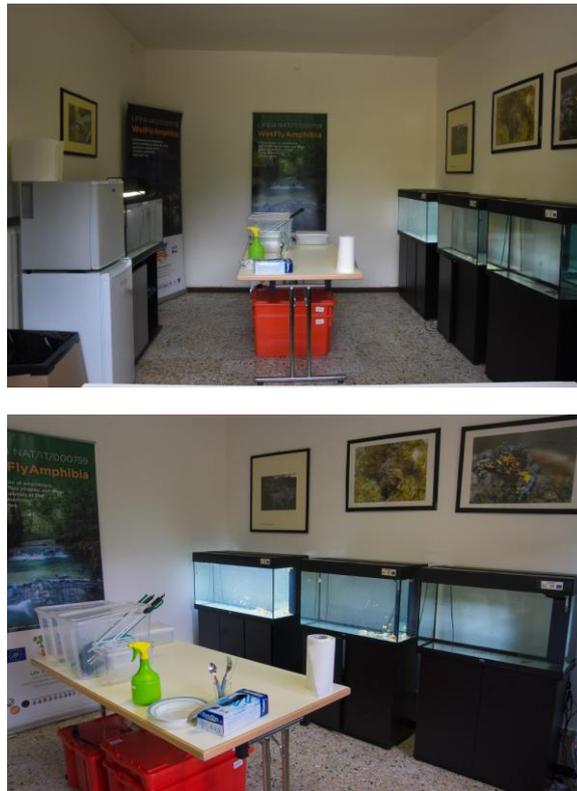


Fig.10: Centro di allevamento di B.pachypus presso la stazione dei Carabinieri Forestali di Corniolo (FC).

Ogni acquario aveva una sua dotazione numerata di strumenti: due retini, due pinze, un raschietto e un tubo aspirante per la pulizia.

Ogni volta che uno strumento era 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 erano controllati giornalmente riportando su schede predisposte il numero di larve o di uova presenti in ogni acquario, il numero di larve morte, la temperatura, le operazioni svolte ed eventuali problematiche riscontrate.

Le operazioni all'interno degli acquari sono state svolte indossando guanti in lattice monouso (del tipo senza polvere) e cambiati ogni volta si operava in un altro acquario. 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 era 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 erano puliti in media ogni 5 giorni, o quando era necessario per eccessiva presenza di materiale organico rimuovendo, tramite un tubo aspirante, feci e circa due terzi del materiale organico presente in decomposizione sul fondale. Contestualmente veniva sostituita un terzo dell'acqua dell'acquario, con acqua dell'acquedotto privata del cloro e lasciata decantare nelle 48 ore precedenti.

Tutte le operazioni erano svolte facendo attenzione a non creare turbolenze o piccoli vortici. 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 e insalata prima sbollentate per renderle più morbide). Il cibo era conservato in freezer. Per ogni ciclo di allevamento, quando le dimensioni delle larve lo consentivano, sono stati effettuati diversi tamponi (Fig. 11) per rilevare la presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis*.

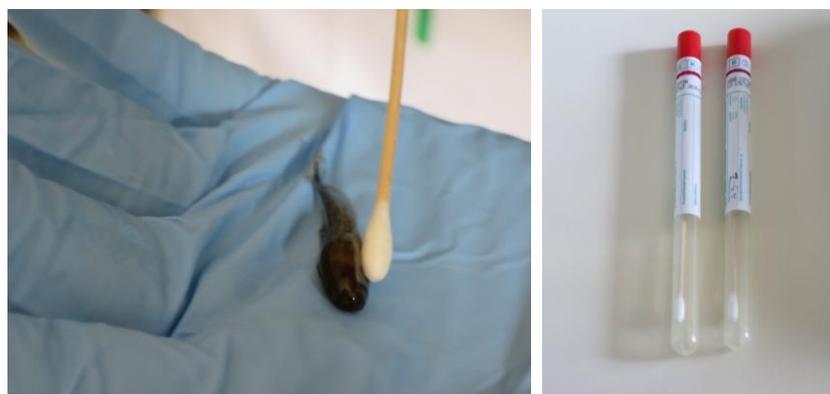


Fig. 11: Esecuzione di un tampone per verificare l'assenza di *B. dendrobatidis*.

Le operazioni sono state eseguite indossando guanti monouso in lattice e sono state svolte 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 era stato prelevato. I guanti sono stati cambiati dopo quest'operazione, il retino è stato sterilizzato con ipoclorito di sodio al 5% e in seguito sciacquato abbondantemente con acqua.

Su ogni etichetta di ogni tampone è stata riportata la data e il numero dell'acquario dal quale è stata prelevata la larva. I tamponi sono stati conservati in frigorifero e successivamente spediti al 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 successiva analisi.

Tutta la strumentalizzazione utilizzata è stata sterilizzata come detto in precedenza. Dopo il rilascio delle larve, e prima di una nuova reimmissione di larve di ululone, l'acquario in questione veniva sterilizzato tramite filtro a lampade UV per almeno 24 ore.

2.e Metodo di 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.12*) sono state prelevate dall'acquario per essere immesse in natura.



Fig.12: Una larva di B.pachypus in avanzato stadio di sviluppo.

Quest'operazione è stata svolta utilizzando 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) in precedenza sterilizzati e riempiti con la stessa acqua dell'acquario. I tempi del 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.

Capitolo 3. Risultati

3.a Prelievo di uova e larve e rilascio nei siti di reintroduzione:

Acquario numero 3 - Le sessioni di prelievo di uova e larve si sono svolte durante il periodo che va dalla metà di Maggio fino a fine di Luglio. Il giorno 30/04/19 sono state prelevate all'incirca 70 uova dal sito 1 ed inserite all'interno dell'acquario numero 3.

Dal giorno 05/05/19 le uova hanno iniziato a schiudersi.

Il giorno 06/06/19 un numero di 37 girini sono stati liberati nel sito 1 .

Il giorno 18/06/19 all'interno dell'acquario numero 3 sono state rilasciate nuovamente all'incirca 50 uova di *B.pachypus* provenienti dal sito 5. Le uova hanno iniziato a schiudersi intorno al 20/06/19.

Il giorno 18/07/19 alle ore 10:30 sono stati prelevati 15 girini e successivamente altri 35 girini per un totale di 50 girini, che sono stati successivamente e tempestivamente reintrodotti nel sito 1.

Acquario numero 4 - Il giorno 30/04/19 sono state prelevate da sito 2 all'incirca 40 uova di ululone appenninico e inserite all'interno dell'acquario numero 4. Dal giorno 04/04/19 alcune uova hanno iniziato a schiudersi. Il giorno 06/06/19 è stato liberato un totale di 34 girini all'interno del sito 3. Il giorno 18/06/19 sono stati nuovamente rilasciati all'interno dell'acquario numero 4, 50 uova provenienti dal sito 5 Il giorno 18/07/19 sono stati prelevati 20 girini e successivamente 25 girini per un totale di 45 individui che sono stati rilasciati nel sito 1.

Acquario numero 2 - Il giorno 17/06/19 sono state prelevate all'incirca 50 uova di ululone appenninico dal sito 3 e successivamente portate alla Foresteria di Corniolo ed inserite all'interno dell'acquario numero 2. Intorno al 20/06/19 alcuni uovi di *B.pachypus* hanno iniziato a schiudersi. Il giorno 18/07/19 dall'acquario 2 sono stati prelevati 50 girini che sono stati portati nel sito 1.

Acquario numero 1 - Il giorno 19/07/19 sono state prelevate, dal sito 5, all'incirca 50 uova di ululone appenninico e successivamente introdotte all'interno dell'acquario numero 1 presso la Foresteria di Corniolo. Il 20/08/19 sono stati prelevati dall'acquario 1, un totale di 15 girini in avanzato stadio di sviluppo per essere reintrodotti in un nuovo sito, il sito 4. Successivamente altri 19 girini sono stati prelevati dall'acquario 5 e reintrodotti nel sito 2. Infine altri 15 girini sono stati reintrodotti nel sito 3.

3.b Allevamento delle larve - Durante il periodo di allevamento la temperatura degli acquari è stata compresa in un range tra i 23°C e 27°C, con una media di 24°C. Tutte le larve di ululone appenninico degli acquari 1,2,3,4 sono state nutrite principalmente con verdure precedentemente sbollentate e conservate in freezer. Talvolta si è reso necessario il cambio dell'acqua degli acquari in presenza di eccesso di materiale organico in sospensione o per comportamento anomale dei girini. Inoltre quando era necessario, sono stati cambiati anche i filtri bianchi presenti all'interno di tutti gli acquari. Eventuali girini morti erano presi tramite un piccolo retino e successivamente inseriti in un provetta riposta in congelatore per successiva analisi.

3.c Rilascio delle larve nei siti di reintroduzione -

Il giorno 6/06/2019 sono state rilasciate 37 larve di ululone appenninico nel Sito 1; altre 34 larve sono state rilasciate nel Sito 3 e infine altre 35 larve di ululone sono state rilasciate nel Sito 4. Tutte queste larve di ululone provenivano dai siti, selezionati in precedenza, della parte adriatica del parco, rispettivamente dai Siti 1 e 2. Il giorno 18/07/2019 sono state rilasciate 50 larve di ululone nel Sito 1, provenienti dal Sito 3 del versante adriatico. Il giorno 19/07/2019, 43 larve sono state rilasciate nel Sito 3 ed altre 43 larve sono state rilasciate nel Sito 4. Il giorno 20/08/2019, 15 larve sono state rilasciate nel Sito 4 ed altre 19 larve sono state rilasciate nel Sito 2.

3.d Monitoraggio nei siti di reintroduzione -

Il monitoraggio di *B.pachypus* viene effettuato con alcuni sopralluoghi, solitamente tra la fine di Giugno e la metà di Settembre (metodo VES secondo Rodel & Ernst, 2004); ogni sito viene attentamente perlustrato per circa 30 minuti. Il progetto prevedeva il monitoraggio, negli anni 2018, 2020 e 2021, applicando il metodo marcatura e ricattura.

Poiché il Ministero dell'Ambiente, tramite ISPRA, ha caldeggiato la reintroduzione di "larve in avanzato stadio di sviluppo" al posto di neometamorfosati e considerato il relativamente basso numero di individui rilasciati nel 2018, un primo monitoraggio si è svolto nel 2018. Quest'anno (2019) è stato effettuato un secondo monitoraggio (diversi sopralluoghi in cui sono state effettuate accurate indagini visive).

Nel 2020 e nel 2021 invece saranno effettuati monitoraggi attraverso cattura, marcatura fotografica del pattern ventrale e ricattura.

Il monitoraggio del 2019 si è basato solo sull'osservazione diretta degli individui reintrodotti. Non è stato possibile censire gli individui tramite il metodo di marcatura e ricattura, che prevede la possibilità di identificare gli individui già catturati con il riconoscimento attraverso il pattern di distribuzione delle macchie ventrali, poiché l'ISPRA ha raccomandato di rilasciare le larve nei momenti antecedenti alla metamorfosi, periodo nel quale il pattern ventrale non è ancora visibile. Il giorno 18/06/2019 presso il Sito 1 sono stati individuati 2 giovani nell'abbeveratoio della reintroduzione di Giugno. Il giorno 19/07/2019 presso il Sito 3 sono stati censiti 3 giovani della reintroduzione di Giugno: 2 nell'abbeveratoio, 1 nell'acquitrinio. Lo stesso giorno presso il Sito 4 sono stati censiti 2 giovani in una pozza. Il giorno 20/08/2019 presso il Sito 1 sono stati censiti 3 giovani nell'abbeveratoio della reintroduzione di Luglio; presso il Sito 3 sono stati censiti 4 giovani nell'abbeveratoio della reintroduzione di Luglio; infine nel Sito 4 sono stati individuati 3 giovani della reintroduzione di Luglio nell'abbeveratoio, 1 ululone della reintroduzione di Giugno nella pozza e 1 sub-adulto dell'anno precedente nella pozza. Il giorno 4/09/2019 presso il Sito 1 sono stati individuati 2 giovani della reintroduzione di Agosto e 1 giovane della reintroduzione di Giugno nel fosso; successivamente presso il Sito 3 sono stati censiti 1 giovane della reintroduzione di Luglio e 7 giovani della reintroduzione di Agosto tutti nell'abbeveratoio; presso il Sito 4 sono stati individuati 1 sub-adulto della reintroduzione del 2018 nella pozza, 1 giovane della reintroduzione di Luglio nell'abbeveratoio e 3 giovani della reintroduzione di Agosto nella pozza.

Il numero d'individui rilevati nelle sessioni di monitoraggio per il 2019 è basso: in alcuni casi non sono stati rilevati individui di *B.pachypus* (come nel caso del Sito 5). La mancata rilevazione o il relativo basso numero d'individui contati può essere spiegato con la fase di dispersione che i neometamorfosati compiono una volta usciti dall'acqua, e alla relativamente elevata mortalità.

Capitolo 4. Discussione, conclusioni e prospettive

Il primo semestre del 2019 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 di Luglio.

Queste condizioni hanno permesso all'ululone appenninico di riprodursi molte volte. Durante le sessioni di prelievo di uova in alcuni siti era presente un'elevata quantità di uova, perciò è stato deciso di scegliere quelle di dimensioni minori in quanto svantaggiate nella competizione con le larve di dimensioni maggiori.

Nell'allevamento sperimentale dell'ululone appenninico, presso la stazione dei Carabinieri Forestali di Corniolo, da Giugno a metà Settembre, è stata riscontrata una bassa mortalità delle larve, in media tra il 10% e 20%. Può aver influito sulla sopravvivenza delle larve 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. Inoltre durante il periodo di allevamento si sono verificati fenomeni di anossia, favoriti anche dalle temperature estive elevate, che hanno provocato la morte di alcune larve. E' stato quindi deciso di rimuovere dagli acquari il cibo galleggiante per evitare il consumo di ossigeno dovuto ai processi di decomposizione. Il fatto di una bassa mortalità delle larve può essere spiegato con la sola dieta a base di verdure in precedenza sbollentate, visto che negli allevamenti precedenti (anno 2018) era stata registrata un'elevata mortalità (tra il 50% e 80%) causata probabilmente da una dieta, non particolarmente adatta ai primi stadi vitali delle larve, in quanto principalmente basata su proteine animali (larve di *Chironomus*) e uso di integratori (*Spirulina*).

Il monitoraggio del 2019 si è basato solo sull'osservazione diretta degli individui nei siti di reintroduzione. Non è stato possibile censire gli individui tramite il metodo marcatura e ricattura 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 marcatura e ricattura sarà effettuato dal 2020 in modo da censire un numero maggiore di individui.

Il progetto LIFE WetFlyAmphibia sostiene il rafforzamento della popolazione di *B.pachypus* nel versante adriatico del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi e la reintroduzione di popolazioni riproduttive nel versante tirrenico del Parco, dove la specie è stata segnalata fino a 10 anni fa, con il rilascio di 72 larve nel 2018 e 293 larve nel 2019. Nel versante adriatico molti dei siti d'intervento sono già stati colonizzati dalle specie target del progetto.

Il monitoraggio previsto nell'ultimo anno consentirà di ottenere una distribuzione finale della specie. Anche i risultati della reintroduzione sono ancora parziali dopo due anni di reintroduzione (di cui il secondo è più consistente dal punto di vista numerico) e saranno osservati risultati più evidenti dal 2020. Il monitoraggio condotto finora si è basato sull'osservazione d'individui nei siti di reintroduzione.

Per *B.pachypus* abbiamo osservato alcuni individui nei siti di reintroduzione a seguito della metamorfosi e nel 2019, in uno dei siti di reintroduzione, è stato osservato un individuo rilasciato l'anno precedente, che sembra confermare la possibile creazione di una popolazione riproduttiva. Solo dal prossimo anno *B.pachypus* sarà riproduttivo e strettamente collegato ai siti di riproduzione e rilascio.

Il progetto è ancora in corso e i risultati finali saranno evidenti non prima del 2022. Al momento i dati raccolti dimostrano che la strada intrapresa è appropriata e che gli interventi di reintroduzione stanno chiaramente migliorando con l'esperienza.

L'implementazione degli interventi volti a preservare e consolidare le popolazioni di anfibi d'interesse comunitario, in un ambiente umido, sta avendo anche effetti positivi visibili. Le azioni successive saranno focalizzate sul miglioramento e il consolidamento degli interventi fatti per renderli più duraturi ed efficaci. I problemi riscontrati in quest'anno di attività (2019) 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 2022, 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 ad 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 ed il rilascio di neometamorfosati di ululone appenninico. 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 (Riserva Naturali, Parchi Regionale 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 Italia.

Bibliografia

- Angelini C., Cari B., Matocchia 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.RL.TS.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., Onesto 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., Costantini V., Nascetti G. (2006). Genetic diversity and phylogeography of the Apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus*, with implications for conservation. Molecular Ecology, 15: 3741 – 3744.
- 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.
- Graselli 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 Ecologica del Civico Museo di Storia Naturale di Ferrara, 18: 37 – 88.
- Mazzotti S., Caramori G., Barbieri G. (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 (LIFE 14 NAT/IT/000759).
- 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., Wecek K., Piwczynski 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 delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna. Relazione inedita.
- Piazzini S. (2016a). Azione A1: Integrazione delle conoscenze sulla distribuzione delle popolazioni delle specie di 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. (2016a). 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 S. (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., Triepi 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.

Vaccaneo R. (1931). Ricerche sui caratteri morfologici dei *Bombinator* italiani. Bollettino dei Musei di Zoologia e Anatomia Comparata della R. Università di Torino Serie III, 4: 1 – 48.

Rodel, M - O., & R. Ernst, 2004. Measuring and monitoring amphibian diversity in tropical forests.

An evaluation of methods with recommendations for

standardization. *Ecotropica* 10: 1 - 14.

PNFC, 2017. Studio di fattibilità per la reintroduzione dell'ululone appenninico, *Bombina pachypus* (Bonaparte 1838) in alcuni siti del Parco Nazionale e delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna.