UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE E DELLA VITA

DISTAV

Relazione finale gennaio 2016

Monitoraggio degli anfibi del Parco Nazionale delle Cinque Terre

Monitoraggio dei siti e stato sanitario delle popolazioni

Redazione a cura di

Sebastiano Salvidio, Federico Crovetto, Marco Maggesi & Elena Grasselli

DISTAV – UNIVERSITÀ DI GENOVA

Sintesi dei risultati

Le attività di campo svolte nel periodo marzo-luglio 2015 hanno previsto la ricerca di nuovi siti riproduttivi di anfibi, il monitoraggio ripetuto di una trentina di siti riproduttivi e ricerche mirate alla verifica della presenza dell'Ululone appenninico Bombina pachypus all'interno del territorio del Parco Nazionale delle Cinque Terre.
Per quanto riguarda il monitoraggio sul campo svolto nel 2015, sono stati ricercati nuovi possibili siti riproduttivi di anfibi, mentre sono stati campionati per 4 volte nell'arco di 4 mesi 33 siti. L'elaborazione dei dati è stata effettuata con modelli di site occupancy, che consistono nel stimare la probabilità di reale presenza nei siti anche se la specie non viene rilevata dall'osservatore. I siti scelti erano sia di natura artificiale, come vasche usate per l'irrigazione e lavatoi, sia naturale come pozze e torrenti.

Le specie rinvenute durante il monitoraggio sono state le seguenti: tritone alpestre (*Ichthyosaua alpestris*), raganella mediterranea (*Hyla meridionalis*), rana appenninica (*Rana italica*), rospo comune (Bufo bufo), e rana verde (*Pelophylax sp*.).
La specie più frequente e facile da osservare sul territorio è I. alpestris, che presente una elevatissima probabilità di osservazione (0,97) e colonizza il 70% delle vasche artificiali e il 13% dei torrenti. Pertanto, sembra che la diffusione osservata per questa specie risulti simile a quella stimata, con un ruolo essenziale dei siti artificiali nel mantenere la presenza della specie all'interno dei territori del Parco.

Sono stati svolti anche dei sopralluoghi in ulteriori siti per la ricerca di eventuali segni di presenza dell'ululone appenninico (*Bombina pachypus*), con risultati però negativi.

Per quanto riguarda le analisi molecolari effettuate su tamponi di anfibi per determinare la presenza e il tasso di infestazione individuale del fungo parassita *Batrchochytrium dendrobatidis* tramite *real-time PCR*, in totale sono state effettuate 258 analisi (253 di anfibi e 5 del gambero alloctono della Louisiana, possibile vettore del fungo): 123 analisi di anfibi nel Parco nazionale delle Cinque Terre sono state e 135 analisi nel parco nazionale del Circeo. Di queste solo quattro individui tutti apparteneti alla rana verde (*Pelophylax sp*.) sono state trovate pisotive. Si tratta di un individuo nel Parco delle Cinque Terre e tre nel Parco del Circeo. In totale dunque il tasso di infestazione è basso (1% nel PNCT e 2% nel PNC). Inoltre, il basso tasso di parassitosi individuale è un risultato confortante, anche se ulteriori analisi, in particolare su altre specie che convivono con le rane verdi potrebbero essere utili per meglio chiarie lo stato sanitario delle popolazioni di anfibi nelle due aree protette.

INDICE **p**

1. Introduzione **5**

2. Monitoraggio degli anfibi: risultati 2015 **6**

2.1. Metodi **12**

2.2. Risultati del monitoraggio **12**

3. Analisi dell'infestazione di chitridio in popolazioni di anfibi **23**

3.1. Prelievo dei tamponi **23**

3.2. Analisi molecolari **24**

3.3. Risultati della analisi molecolari **27**

4. Discussione **37**

5. Proposte per ulteriori ricerche e per attività di conservazione **38**

5.1. Monitoraggio degli anfibi **38**

5.2. Analisi molecolari delle patologie fungine **38**

5.3. Recupero e ripristino delle vasche abbandonate **38**

5.4. Attività di divulgazione **39**

5.5. Studio di fattibilità della reintroduzione dell'ululone appenninico **39**

6. Ringraziamenti **40**

40

7. Bibliografia

1. Introduzione

Questa relazione finale riassume i risultati dei monitoraggi di campo effettuati durante il 2015 e riporta anche i risultati delle analisi molecolari realizzate sui campioni di anfibi raccolti sia nel Parco Nazionale delle Cinque Terre, sia nel Parco Nazionale del Circeo, al fine di rilevare le potenziali patologie fungine dovute al fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Nel territorio del Parco Nazionale delle Cinque Terre sono segnalate nove specie di anfibi: due sono inserite negli allegati II e IV della Direttiva "Habitat" *(Speleomantes ambrosii* e *Bombina variegata pachypus*), tre nell'allegato IV (*Hyla meridionalis, Rana italica* e *Rana dalmatina*), una nell'allegato V (*Pelophylax* sinkl. *esculentus*) e tre sono protette a livello regionale (*Salamandra salamandra*, *Ichthyosaura alpestris* e *Bufo bufo*). La presenza di tutte le specie è stata confermata in anni recenti (Bussolini e Salvidio 2001; Salvidio e Crovetto, 2014), ad eccezione di quella dell'ululone appenninico (*Bombina variegata pachypus*), specie non più osservata dal 1992. L' ululone appenninico è un anfibio in declino in tutta Italia e anche in Liguria (Canessa et al., 2013) dove necessita di urgenti ricerche. Nella vicina Val di Vara l' ululone appenninico è stato recentemente oggetto di interventi di gestione dell'habitat e anche di ripopolamento (Arillo et al., 2013; Salvidio et al., 2014).

Per quanto riguarda gli habitat acquatici presenti nel Parco, i torrenti e le vasche artificiali, ancora oggi utilizzate nell'agricoltura tradizionale, sono i principali siti di riproduzione degli anfibi (Olivari et al., 2013; Romano et al., 2014).

Nella **tabella 1** sono riportate le specie di anfibi segnalate nel Parco delle Cinque Terre e il loro stato normativo di protezione.

Tabella 1. Specie di Anfibi segnalati all'interno del Parco Nazionale delle Cinque Terre.

Specie Nome comune	**Specie (Nome scientifico)**	**Situazione nel parco**	**Direttiva Habitat**
Tritone alpestre	*Ichtyosaura alpestris*	Molto abbondante, soprattutto in siti artificiali	-
Raganella mediterranea	*Hyla meridionalis*	Presente, soprattutto in zone agricole, e lungo la fascia costiera	All. IV
Rospo comune	*Bufo bufo*	Abbondante, sia in torrenti che in siti artificiali	-
Rana agile	*Rana dalmatina*	Presente, ma abbastanza rara	All. IV
Rana appenninica	*Rana italica*	Presente, soprattutto nei torrenti che scorrono in habitat boscosi	All. IV
Rana verde	*Pelophylax sp.*	Presente, sia in habitat naturali che in vasche artificiali	All. V
Salamandra pezzata	*Salamandra salamandra*	Presente, ma localizzata, predilige zone boschive	-
Geotritone Ambrosii	*Speleomantes ambrosii*	Presente, sia in habitat di grotta che in altri siti epigei con umidità elevata e poca insolazione.	All. II e IV
Ululone appenninico	*Bombina pachypus*	Segnalata fino al 1992; attualmente non più ritrovata	All. II e IV

É interessante notare che nei pressi dei confini del parco, in Val di Vara, è stata segnalata anche la raganella italiana (*Hyla intermedia*) (Doria & Salvidio, 1994; Doria et al., 2001), non ancora rinvenuta però all'interno del territorio protetto dove invece è frequente la raganella mediterranea *Hyla meridionalis*.

Il geotritone di Ambrosi *Speleomantes ambrosii* è l'unica specie, delle sopraindicate, a non riprodursi in ambiente acquatico, ed è proprio per questo che non

è stata considerata in questo monitoraggio. Tutte le altre invece fanno uso abituale di invasi d'acqua per la riproduzione, alcune tra queste preferiscono invasi con acqua più o meno ferma, come il tritone e l'ululone appenninico, i quali possono essere osservati in stagni, vasche artificiali e nelle "pozze" che si vanno a creare lungo il corso dei torrenti appenninici. Altre, come il rospo comune e la rana appenninica di solito scelgono acque un po' più movimentate, ciò non toglie però, che possano riprodursi anche in acque ferme, come è già stato osservato all'interno del parco (Olivari et al., 2013).

2. Monitoraggio degli anfibi

2.1. Metodi

Per il monitoraggio del 2015 è stato scelto il sistema *site occupancy*, che permette di avere una stima della presenza (occupancy) della specie indagata, anche nei siti dove essa non viene osservata (MacKenzie et al., 2006). In questa ottica sono essenziali i seguenti presupposti:

a) la popolazione oggetto di studio deve essere chiusa, ossia la possibilità di trovare la specie non cambia nel corso dello studio (se presente nella prima sessione, vi resta per tutto durante tutto il periodo di campionamento).

b) I siti sono indipendenti, ossia non vi è uno spostamento dello stesso individuo da un sito ad un altro durante il campionamento.

I parametri di interesse sono ψ (psi) che è la probabilità di un sito di essere "occupato" dalla specie target e ρ che è la probabilità di rilevare la specie target durante le indagini. L'interazione tra queste due variabili ci fornirà le informazioni di cui abbiamo bisogno. Per pianificare un monitoraggio di questo tipo, innanzitutto bisogna conoscere la biologia e l'ecologia delle specie. Dopodiché vengono scelti i siti da campionare e il numero di sessioni di campo da svolgere, ossia il numero di visite che saranno effettuate su ogni sito. Per far si che le stime calcolate siano le più precise possibili, conviene svolgere almeno 4 sessioni ed avere un numero minimo di circa 30 siti (MacKenzie et al., 2006).

In ogni sessione vengono registrati solo dei dati di presenza/assanza, e non di abbondanza, che vengono registrati come 0 = assenza e 1 = presenza (**Tabella 2**).

Tabella 2. Esempio di tabella presenza/assenza

Sito	Sessione 1	Sessione 2	Sessione 3	Sessione 4
1	0	0	1	1
2	0	1	0	0
3	1	1	0	1
n	…	…	…	…

Di solito però vengono osservate più specie contemporaneamente anche mello stesso sito, per cui alla fine dei sopralluoghi si ottiene una situazione come riportato nella **Tabella 3**. Questo permette di confrontare i risultati ottenuto su più specie che possono avere stime di presenza molto diverse a seconda delle differenti caratteristiche ecologiche e delle diverse risposte comportamentali agli stessi parametri ambientali.

Tabella 3. Esempio di tabella presenza/assenza di una singola sessione per più specie.

Sito	Specie 1	Specie 2	Specie 3	Specie 4	Specie 5
1	0	0	1	1	0
2	0	0	1	1	1
3	1	0	0	1	0
n	…	…	…	…	…

Durante il campionamento è utile registrare non solo la presenza delle singole specie ma anche altre possibili variabili, scelte prima di iniziare il campionamento sulla base della conoscenza della biologia ed ecologia delle specie. Queste variabili vengono selezionate sulla base della loro possibile importanza per l'osservazione delle specie oggetto di studio. In particolare, sono spesso importanti le eventuali condizioni meteo che possono influire sull'osservabilità e sull'attività della species. In questo modo è possibile valutare se c'è una correlazione tra la diffusione della specie ed una o più di queste variabili.

Le variabili (dette anche covariate) possono essere di due tipologie: le covariate tipiche del sito (che non variano da un campionamento all'altro) e quelle della sessione di campionamento (che possono variare nel tempo). Le prime sono quelle che non variano da una sessione all'altra, quindi sono proprietà intrinseche del sito, come può essere appunto la tipologia di habitat. Le seconde, invece, possono variare in ogni sessione, come il meteo, la pioggia e le temperature.

I siti selezionati per il monitoraggio del 2015 si trovano tutti all'interno dei confini del Parco Nazionale delle Cinque Terre (Tabella 4). Sono stati scelti sia siti in cui era preventivamente conosciuta la presenza di determinate specie di anfibi sia siti in cui la loro presenza non era ancora ignota.

In generale i siti possono essere classificati in tre tipologie: vasche artificiali (manufatti realizzati dall'uomo con acque stagnanti), stagni o pozze naturali (siti naturali ad acqua stagnante) e torrenti (ad acqua corrente).

Tabella 4. Elenco dei potenziali siti riproduttivi di anfibi soggeti al monitoraggio nel 2015. In rosso e con * sono indicati nuovi i siti scoperti e campionati per la prima volta nel 2015.

Toponimo sito	Tipologia	Toponimo sito	Tipologia
Case Martello 1	Stagno/Pozza naturale	Fornace 2	Vasca artificiale
Case Martello 2	Stagno/Pozza naturale	Fornace 3	Vasca artificiale
Ca di Gandi	Vasca artificiale	Polazzo di Sopra 1	Vasca artificiale
Calunga	Vasca artificiale	Polazzo di Sopra 2	Vasca artificiale
Case Serro 2	Vasca artificiale	Polazzo di Sopra 3	Vasca artificiale
Case Serro 4	Vasca artificiale	Polazzo di Sopra 4	Vasca artificiale
Case Serro 5	Vasca artificiale	Polla Franceschini	Stagno/Pozza naturale
Case Patellano	Vasca artificiale	Pozza Case Lovara	Stagno/Pozza naturale
Suia 1	Vasca artificiale	Rio dei Laghi	Torrente
Suia 2	Vasca artificiale	Rio Pavi	Torrente
Varella piccola	Vasca artificiale	Rio della Gatta	Torrente
Varella grande	Vasca artificiale	Canale Albareto	Torrente
Vasca strada Monterosso*	Vasca artificiale	Canale Pignone	Torrente
Serbatoio Case Lovara*	Vasca artificiale	Affluente basso Albareto	Torrente
Case Campasso	Vasca artificiale	Affluente medio Albareto	Torrente
Fontanella 1	Vasca artificiale	Affluente alto Albareto	Torrente
Fontanella 2*	Vasca artificiale		

Il territorio all'interno del Parco Nazionale delle Cinque Terre è molto scosceso e presenta un reticolo idrografico poco sviluppato, soprattutto nella parte orientale, dove lo spartiacque è molto prossimo al mare (Olivari et al., 2013). La mancanza di zone umide naturali, soprattutto ad acque stagnanti, ha fatto si che gli anfibi siano molto frequenti in altre tipologie di siti riproduttivi, come ad esempio le vasche artificiali (**Figura 1**). Si tratta di solito di strutture in cemento e utilizzate per l'irrigazione delle fasce coltivate o, più raramente, come lavatoi. Si tratta di siti di dimensioni piuttosto limitate, poco profondi e facili da campionare e proprio per questo motivo, sono state inserite nel piano di monitoraggio in così alto numero.

Figura 1. Tipiche vasche per l'irrigazione nel Parco Nazionale delle Cinque Terre.

La localizzazione dei siti monitorati, che si trovano tutti nella parte settentrionale del Parco e in particolare nei Comuni di Pignone e Monterosso viene mostrata nella **Figura 2.**

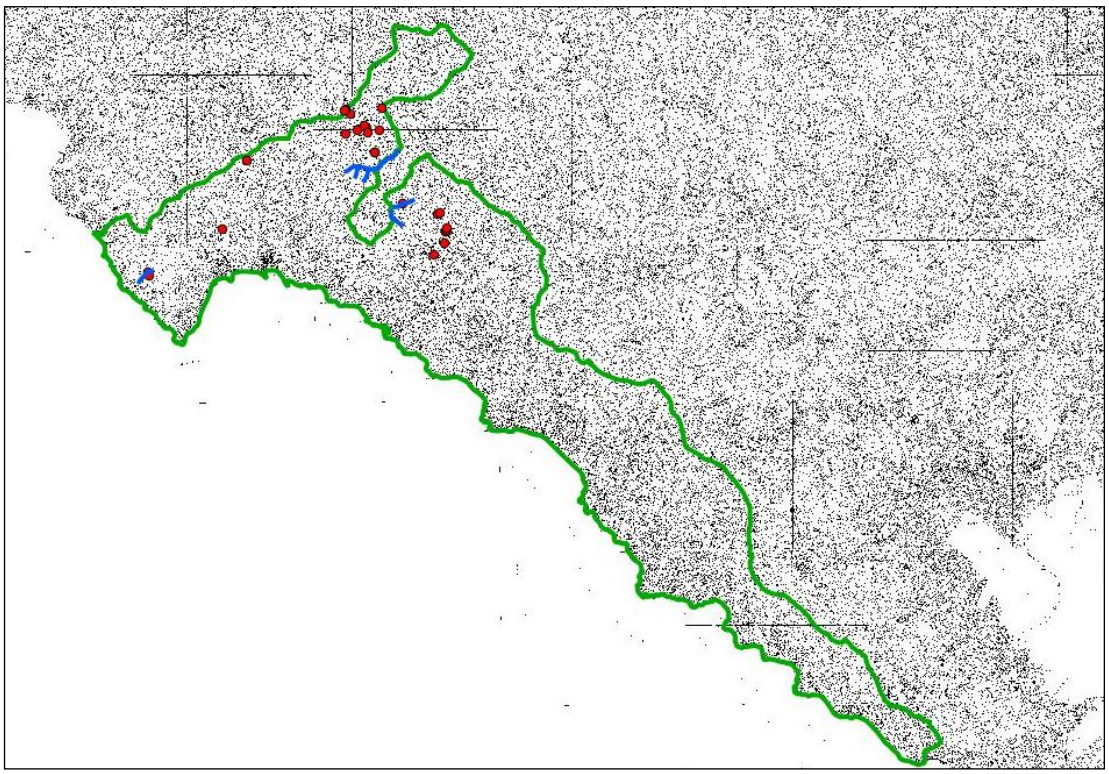

Figura 2. Siti campionati nel 2015: i tratti azzurri indicano i torrenti, mentre i cerchi rossi indicano le vasche artificiali e le pozza ad acqua stagnante.

Il fatto che i campionanti si trovino nella parte settentrionale del Parco nei Comuni di Pignone e Monterosso (**Figura 3**) per due motivi: 1) per praticità di campionamento, in quanto la visita di tutti i siti deve essere svolta in condizioni ambientali simile e quindi nel più breve tempo possibile e 2) perché in quest'area era segnalato l'Ululone appenninico fino alla fine del secolo scorso. Questa è una specie di notevole interesse conservazionistico, le cui ricerche nel territorio del Parco sono in corso (Salvidio e Crovetto, 2014).

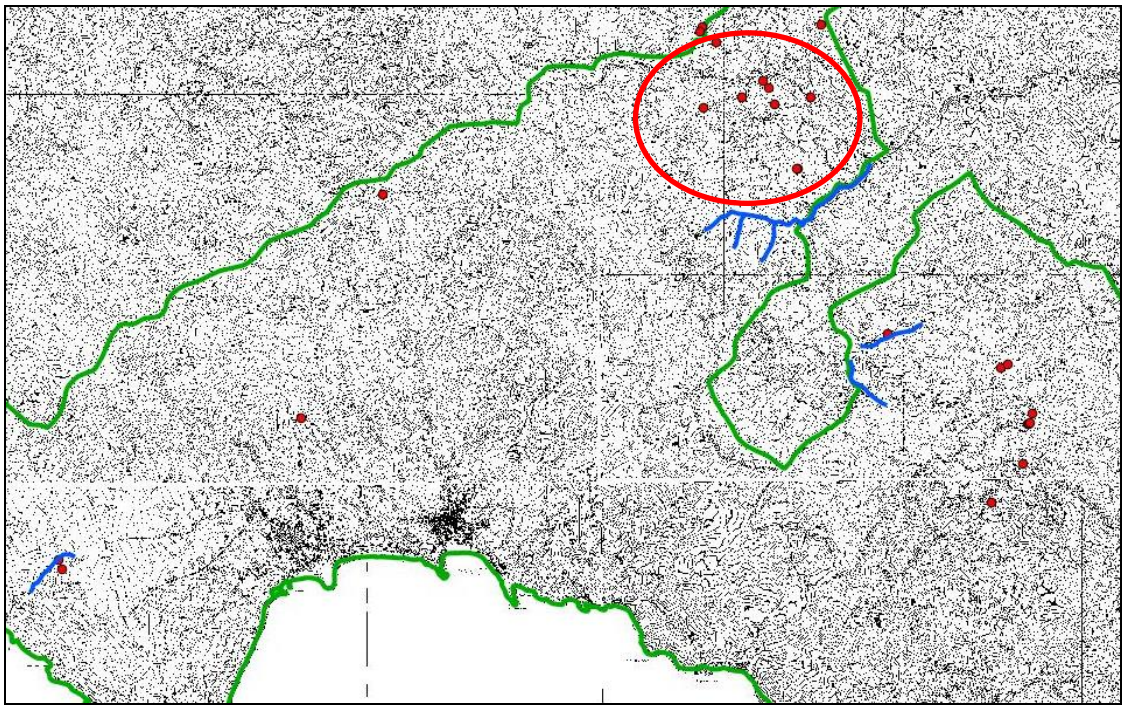

Figura 3. Dettaglio dei siti campionati nel 2015: i tratti azzurri indicano i torrenti, mentre i cerchi rossi indicano le vasche artificiali e le pozze ad acqua stagnante. Il cerchio rosso indica la zona di presenza storica dell'Ululone appenninico.

In totale, sono state svolte quattro sessioni di rilevamento di campo, comprese tra marzo e giugno, periodo che corrisponde alla stagione riproduttiva degli anfibi. Ogni sessione è stata divisa in almeno due giorni consecutivi di campionamento, per l'impossibilità di visitare tutti i siti in una sola giornata.

Ogni sito è stato indagato a vista e col retino al fine di osservare o catturare tutte le specie di anfibi presenti. In molti casi sono anche stati effettuati prelievi di tamponi cutanei delle specie più frequenti al fine di effettuare lo screening molecolare che possa rilevare la presenza del fungo parassita *Batrachochytrium dendrobatidis* (Boyle et al., 2004). Le covariate misurate e inserite nell'l'elaborazione dei dati sono state le seguenti: tipologia del sito (artificiale/naturale), quantità di pioggia in mm e temperatura dell'aria misurata durante il rilevamento.

Per quanto riguarda le analisi statistiche l'*occupancy* è stata stimata per mezzo del software gratuito PRESENCE (Mackenzie et al., 2006).

2.2. Risultati del monitoraggio

Ritrovamento di nuovi siti. Tre nuove vasche artificiali sono state trovate e inserite nel database dei siti riproduttivi degli anfibi nel Parco, ma solo in una vi è stato ritrovata una specie di anfibio. La caratteristiche di queste vasche e delle specie che vi sono state osservate durante i sopralluoghi del 2015 sono riportate nella **tabella 5**.

Tabella 5. Nuove vasche artificiali ritrovate nel 2015.

Nome	Tipologia	Specie
Vasca strada Monterosso	Vasca artificiale in cemento	-
Serbatoio Case Lovara	Vasca artificiale in cemento	Tritone alpestre
Fontanella 2	Vasca artificiale in cemento	-

Monitoraggio dei siti. Le specie individuate durante i sopralluoghi sono 5 e precisamente le seguenti: tritone alpestre (*Ichthyosaura alpestris)*, rospo comune (*Bufo bufo*), rana appenninica (*Rana italica*), rana verde (*Pelophylax* sp.) e raganella meridionale (*Hyla meridionalis*).

Il tritone alpestre è risultato la specie più comune ed è stato trovato in 19 siti (18 vasche artificiali, 1 torrente), il rospo comune in 7 (2 vasche, 5 torrenti), la rana verde in 3 (vasche artificiali), la rana italica in 2 (torrenti) e infine la raganella meridionale in 1 (torrente). La situazione è riassunta nella **tabella 6**.

Tabella 6. Elenco delle specie rinvenute e tipologia del sito.

Specie	Vasche artificiali	Torrenti	Totale
Ichthyosaura alpestris	18	1	19
Bufo bufo	2	5	7
Pelophylax sp.	3	-	3
Rana italica	-	2	2
Hyla meridionalis	-	1	1

Sui 36 siti monitorati ripetutamente, 3 di essi sono risultati costantemente a secco e pertanto non idonei alla riproduzione degli anfibi. Nei restanti 33 siti, in 9 casi non è mai stata registrata la presenza di anfibi, mente in 24 almeno un individuo è stato osservato (**tabella 7**).

Tabella 7. Elenco dei siti monitorati e presenza/assenza di anfibi rilevata nel 2015.

Sito	01-03/04/2015	25-28/04/2015	18-19/05/2015	08-10/06/2015
1_Case Martello 1	1	1	1	1
2_Case Martello 2	1	1	1	1
3_Ca di Gandi	0	0	0	0
4_Calunga	1	1	1	1
5_Case Serro 2	1	1	1	1
6_Case Serro 4	1	1	1	1
7_Case Serro 5	1	1	1	1
8_Case Patellano	1	1	1	1
9_Suia 1	1	1	1	1
10_Suia 2	1	1	1	1
11_Varella piccola	1	1	1	1
12_Varella grande	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	1	1	1	1
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0
17_Case Campasso	1	1	1	1
18_Fontanella 1	1	1	1	0
19_Fontanella 2	1	1	1	0
20_Fornace 2	1	1	1	1
21_Fornace 3	1	1	1	1
22_Polazzo di Sopra 1	1	1	1	1
23_Polazzo di Sopra 2	1	1	1	1
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	1	1	1	1
29_Canale Albareto	1	1	1	1
30_Canale Pignone	1	1	1	1
31_Affluente basso Albareto	1	0	0	1
32_Affluente medio Albareto	1	0	1	0
33_Affluente alto Albareto	1	0	0	0
34_Vasca Case Lovara	*Secco*	*secco*	*secco*	*secco*
35_ Fornace 1	*Secco*	*secco*	*secco*	*secco*
36_Garola I Laghi	*Secco*	*secco*	*secco*	*secco*

Nelle **tabelle 8, 9, 10, 11** e **12** sono riportati i dati di rpesenza assenza per tutte le specie osservate durante i campionamenti.

Tabella 8. Elenco dei risultati per il tritone alpestre *Ichthyosaura alpestris*.

Sito	01-03/04/2015	25-28/04/2015	18-19/05/2015	08-10/06/2015
1_Case Martello 1	1	1	1	1
2_Case Martello 2	1	1	1	1
3_Ca di Gandi	0	0	0	0
4_Calunga	1	1	1	1
5_Case Serro 2	1	1	1	1
6_Case Serro 4	1	1	1	1
7_Case Serro 5	1	1	1	1
8_Case Patellano	1	1	1	1
9_Suia 1	1	1	1	1
10_Suia 2	1	1	1	1
11_Varella piccola	1	1	1	1
12_Varella grande	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	1	1	1	1
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0
17_Case Campasso	1	1	1	1
18_Fontanella 1	1	1	1	0
19_Fontanella 2	1	1	1	0
20_Fornace 2	1	1	1	1
21_Fornace 3	1	1	1	1
22_Polazzo di Sopra 1	1	1	1	1
23_Polazzo di Sopra 2	1	1	1	1
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	1	1	1	1
29_Canale Albareto	0	0	0	0
30_Canale Pignone	0	0	0	0
31_Affluente basso Albareto	0	0	0	0
32_Affluente medio Albareto	0	0	0	0
33_Affluente alto Albareto	0	0	0	0

Tabella 9. Elenco dei risultati per il rospo comune *Bufo bufo*.

sito	01-03/04/2015	25-28/04/2015	18-19/05/2015	08-10/06/2015
1_Case Martello 1	0	0	0	0
2_Case Martello 2	0	0	0	0
3_Ca di Gandi	0	0	0	0
4_Calunga	0	0	0	0
5_Case Serro 2	1	1	1	1
6_Case Serro 4	0	0	0	0
7_Case Serro 5	0	0	0	0
8_Case Patellano	0	0	0	0
9_Suia 1	0	0	0	0
10_Suia 2	1	1	1	1
11_Varella piccola	0	0	0	0
12_Varella grande	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	0	0	0	0
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0
17_Case Campasso	0	0	0	0
18_Fontanella 1	0	0	0	0
19_Fontanella 2	0	0	0	0
20_Fornace 2	0	0	0	0
21_Fornace 3	0	0	0	0
22_Polazzo di Sopra 1	0	0	0	0
23_Polazzo di Sopra 2	0	0	0	0
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	0	0	0	0
29_Canale Albareto	1	1	1	1
30_Canale Pignone	1	1	1	1
31_Affluente basso Albareto	1	0	0	1
32_Affluente medio Albareto	1	0	1	0
33_Affluente alto Albareto	1	0	0	0

Tabella 10. Elenco dei risultati per la rana verde *Pelophylax* sp.

sito	01-03/04/2015	25-28/04/2015	18-19/05/2015	08-10/06/2015
1_Case Martello 1	0	0	0	0
2_Case Martello 2	0	0	0	0
3_Ca di Gandi	0	0	0	0
4_Calunga	0	0	0	0
5_Case Serro 2	0	0	0	0
6_Case Serro 4	0	0	0	0
7_Case Serro 5	0	0	0	0
8_Case Patellano	0	0	0	0
9_Suia 1	1	1	1	1
10_Suia 2	1	1	1	1
11_Varella piccola	0	0	0	0
12_Varella grande	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	0	0	0	0
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0
17_Case Campasso	0	0	0	0
18_Fontanella 1	0	0	0	0
19_Fontanella 2	0	0	0	0
20_Fornace 2	0	0	0	0
21_Fornace 3	1	1	0	1
22_Polazzo di Sopra 1	0	0	0	0
23_Polazzo di Sopra 2	0	0	0	0
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	0	0	0	0
29_Canale Albareto	0	0	0	0
30_Canale Pignone	0	0	0	0
31_Affluente basso Albareto	0	0	0	0
32_Affluente medio Albareto	0	0	0	0
33_Affluente alto Albareto	0	0	0	0

Tabella 11. Elenco dei risultati per la rana appenninica *Rana italica*.

sito	01-03/04/2015	25-28/04/2015	18-19/05/2015	08-10/06/2015
1_Case Martello 1	0	0	0	0
2_Case Martello 2	0	0	0	0
3_Ca di Gandi	0	0	0	0
4_Calunga	0	0	0	0
5_Case Serro 2	0	0	0	0
6_Case Serro 4	0	0	0	0
7_Case Serro 5	0	0	0	0
8_Case Patellano	0	0	0	0
9_Suia 1	0	0	0	0
10_Suia 2	0	0	0	0
11_Varella piccola	0	0	0	0
12_Varella grande	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	0	0	0	0
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0
17_Case Campasso	0	0	0	0
18_Fontanella 1	0	0	0	0
19_Fontanella 2	0	0	0	0
20_Fornace 2	0	0	0	0
21_Fornace 3	0	0	0	0
22_Polazzo di Sopra 1	0	0	0	0
23_Polazzo di Sopra 2	0	0	0	0
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	0	0	0	0
29_Canale Albareto	0	0	1	1
30_Canale Pignone	0	0	1	1
31_Affluente basso Albareto	0	0	0	0
32_Affluente medio Albareto	0	0	0	0
33_Affluente alto Albareto	0	0	0	0

Tabella 12. Elenco dei risultati per la raganella mediterranea *Hyla meridionalis.*

sito	01-03/04/2015	25-28/04/2015	18-19/05/2015	08-10/06/2015
1_Case Martello 1	0	0	0	0
2_Case Martello 2	0	0	0	0
3_Ca di Gandi	0	0	0	0
4_Calunga	0	0	0	0
5_Case Serro 2	0	0	0	0
6_Case Serro 4	0	0	0	0
7_Case Serro 5	0	0	0	0
8_Case Patellano	0	0	0	0
9_Suia 1	0	0	0	0
10_Suia 2	0	0	0	0
11_Varella piccola	0	0	0	0
12_Varella grande	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	0	0	0	0
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0
17_Case Campasso	0	0	0	0
18_Fontanella 1	0	0	0	0
19_Fontanella 2	0	0	0	0
20_Fornace 2	0	0	0	0
21_Fornace 3	0	0	0	0
22_Polazzo di Sopra 1	0	0	0	0
23_Polazzo di Sopra 2	0	0	0	0
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	1	0	0	0
29_Canale Albareto	0	0	0	0
30_Canale Pignone	0	0	0	0
31_Affluente basso Albareto	0	0	0	0
32_Affluente medio Albareto	0	0	0	0
33_Affluente alto Albareto	0	0	0	0

Nella **tabella 13** sono riassunti i risultati di presenza/assenza delle cinque specie di anfibi nei 33 siti monitorati nel 2015.

Tabella 13. Sintesi della presenza/assenza delle cinque specie di anfibi nei 33 siti monitorati.

Sito	Tritone alpestre	Rospo comune	Rana verde	Rana appenjnica	Raganella mediterranea
1_Case Martello 1	1	0	0	0	0
2_Case Martello 2	1	0	0	0	0
3_Ca di Gandi	0	0	0	0	0
4_Calunga	1	0	0	0	0
5_Case Serro 2	1	5	0	0	0
6_Case Serro 4	1	0	0	0	0
7_Case Serro 5	1	0	0	0	0
8_Case Patellano	1	0	0	0	0
9_Suia 1	1	0	1	0	0
10_Suia 2	1	1	1	0	0
11_Varella piccola	1	0	0	0	0
12_Varella grande	0	0	0	0	0
13_Polla Franceschini	1	0	0	0	0
14_Vasca strada Monterosso	0	0	0	0	0
15_Pozza Case Lovara	0	0	0	0	0
16_Serbatoio Case Lovara	0	0	0	0	0
17_Case Campasso	1	0	0	0	0
18_Fontanella 1	1	0	0	0	0
19_Fontanella 2	1	0	0	0	0
20_Fornace 2	1	0	0	0	0
21_Fornace 3	1	0	1	0	0
22_Polazzo di Sopra 1	1	0	0	0	0
23_Polazzo di Sopra 2	1	0	0	0	0
24_Polazzo di Sopra 3	0	0	0	0	0
25_Polazzo di Sopra 4	0	0	0	0	0
26_Rio dei Laghi	0	0	0	0	0
27_Rio Pavi	0	0	0	0	0
28_Rio della Gatta	1	0	0	0	1
29_Canale Albareto	0	1	0	1	0
30_Canale Pignone	0	1	0	1	0
31_Affluente basso Albareto	0	1	0	0	0
32_Affluente medio Albareto	0	1	0	0	0
33_Affluente alto Albareto	0	1	0	0	0

L'unica specie di cui è stato possibile calcolare l'*occupancy* è il tritone alpestre che è una specie molto diffusa. Per quanto riguarda gli altri anfibi i dati di presenza sono purtroppo così scarsi che il software non è stato in grado di calcolarla in modo corretto.

Risultati Tritone alpestre. Le analisi della modellizzazione dell'*occupancy* sono mostrati nella **tabella 14**, in cui sono mostrati solo i 6 modelli statistici più parsimoniosi. Ogni modello è descritto da diversi valori:

- AIC:*Akaike's Information Criterium* indica quale è il modello più parsimonioso, l'AIC migliore è quello con il valore assoluto più basso
- ΔAIC: è la differenza tra il modello migliore ed secondo modello; quando questo valore è superiore a 2, allora il secondo modello considerato è significativamente diverso dal primo essendo meno parsimonioso; quindi può essere scartato in quanto poco vero simile.
- Model Likelihood: indica la verosimiglianza del modello, si tratta di un valore che va da 0 a 1 (valore massimo).
- Numero di parametri: sono il numero di variabili incluse nel modello compreso il valore dell'intercetta.

Tabella 14. Risultati dell'occupancy per il tritone alpestre. Tipo = tipologia del sito (artificiale o naturale), temp. = temperatura durante il campionamento.

Modello	AIC	ΔAIC	AICweight	Model Likelihood Verosimiglianza modello	N. Parametri
Ψ(tipo),ρ(.)	60,17	0,00	0,6329	1,0000	3
Ψ(tipo),ρ(pioggia)	62,30	2,13	0,2182	0,3447	5
Ψ(tipo),ρ(t + pioggia)	64,32	4,15	0,0795	0,1256	6
Ψ(tipo),ρ(temp.)	65,35	5,18	0,0475	0,0750	4
Ψ(.),ρ(.)	67,48	7,31	0,0164	0,0259	2
Ψ(.),ρ(meteo)	69,61	9,44	0,0056	0,0089	4

Il confronto tra i diversi modelli mostra che quello migliore è il primo in cui le variabili che influenzano l'*occupancy* sono la tipologia del sito mentre la probabilità di osservazione della specie resta costante nei diversi campionamenti: ψ(tip),ρ(.). Gli altri modelli non sono supportati e pertanto, le condizioni meteo (temperatura e piovosità) non sembrano influire sulle probabilità di osservazione del tritone alpestre.

La **tabella 15** riporta le principali caratteristiche del modello più parsimonioso. La probabilità di osservare valori dei test di verifica maggiori di

quello osservato (P = 0,12) e il valore di sovradispersione (c-hat = 1,82) indicano che l'analisi è valida.

Tabella 15. Risultati sintetici del miglior modello per il tritone alpestre. Evidenziati i giallo i parametri di maggior interesse.

Number of sites		= 33			
Number of sampling occasions		= 4			
Number of missing observations = 0					
Naive occupancy estimate		= 0.5758			
Number of parameters			= 3		
-2log(likelihood)		= 54.1732			
AIC		= 60.1732			
Untransformed Estimates of coefficients for covariates (Beta's)					
		estimate	std.error		
A1 psi	:	-1.945910	1.068533		
A2 psi.tip	:	2.890373	1.157578		
B1 p1	:	3.610900	0.716618		
Individual Site estimates of <psi>					
	Site	estimate	Std.err	95% conf. interval	
psi	1 site 1	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	2 site 2	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	3 site 3	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	4 site 4	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	5 site 5	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	6 site 6	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	7 site 7	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	8 site 8	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	9 site 9	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	10 site 10	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	11 site 11	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	12 site 12	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	13 site 13	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	14 site 14	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	15 site 15	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	16 site 16	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	17 site 17	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	18 site 18	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	19 site 19	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	20 site 20	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	21 site 21	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	22 site 22	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	23 site 23	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	24 site 24	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	25 site 25	: 0.7200	0.0898	0.5178 -	0.8603
psi	26 site 26	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	27 site 27	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	28 site 28	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	29 site 29	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	30 site 30	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	31 site 31	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	32 site 32	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
psi	33 site 33	: 0.1250	0.1169	0.0173 -	0.5370
Individual Site estimates of <p1>					
	Site	estimate	Std.err	95% conf. interval	
p1	1 site 1	: 0.9737	0.0184	0.9008 -	0.9934
p2	1 site 1	: 0.9737	0.0184	0.9008 -	0.9934
p3	1 site 1	: 0.9737	0.0184	0.9008 -	0.9934
p4	1 site 1	: 0.9737	0.0184	0.9008 -	0.9934

Test Statistic (data) = 6.5890
>From 100 parametric bootstraps...
Probability of test statistic >= observed = 0.1287
Average simulated Test Stat = 3.6584
Estimate of c-hat = 1.8010 (=TestStat/AvgTestStat)

La probabilità di osservare i tritoni nei siti indagati è elevatissima (ρ = 0,97) e questo indica che la specie viene praticamente sempre osservata se presente.

3. Analisi dell'infestazione di chitridio in popolazioni di anfibi

3.1 Prelievo dei tamponi

Gli esemplari di anfibio da cui è stato prelevato il campione di muco per le analisi relative alla presenza del fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) sono stati campionati in varie zone del Parco Nazionale delle Cinque Terre e del Parco Nazionale del Circeo, nel corso dei monitoraggi effettuati nel 2015. Il prelievo di muco cutaneo è stato effettuato con la stessa metodologia nelle due aree e in analogia con precedenti studi realizzati ad esempio su *Bombina pachypus* (**Canessa et al., 2013b**). Il tampone sterile viene sfregato per circa 30 volte sul ventre, sull'inguine e all'ascella delle zampe dell'animale. Questa procedura viene effettuata indossando guanti sterili che sono sostituiti ad ogni prelievo per evitare la contaminazione tra i diversi campioni (**Fig. 4 e Fig. 5**). Il tampone viene quindi conservato in una provetta identificata con un codice corrispondente in modo univoco all'animale campionato.

Figura 4. Prelievo di muco da un individuo di *Bombina pachypus*.

Figura 5. Foto ventrale di un tritone alpino durante il prelievo del tampone di muco.

3.2 Analisi molecolari

I tamponi, sono stati mantenuti in frigorifero a circa 4°C fino al momento dell'estrazione del DNA, che dopo amplificazione con tecnica *real time*-PCR, viene confrontato con un sistema di controllo costituto da una quantità nota del DNA del fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (**Boyle et al. 2004; Kriger et al., 2006**).

Il metodo di rilevamento del DNA utilizzato in questo studio è originale ed è stato ottenuto presso i laboratori del DISTAV modificando il metodo "standard" di **Boyle et al.** (**2004**). Al fine di poter confrontare i risultati ottenuti con i due metodi, la nuova tecnica è stato comunque validata comparando direttamente le curve di taratura ottenute utilizzando diverse concentrazioni note di DNA. I risultati dell'esperimento di validazione mostrano che le due tecniche sono del tutto confrontabili e hanno anche la stessa efficacia (**Grasselli et al., 2013, Figura 6**).

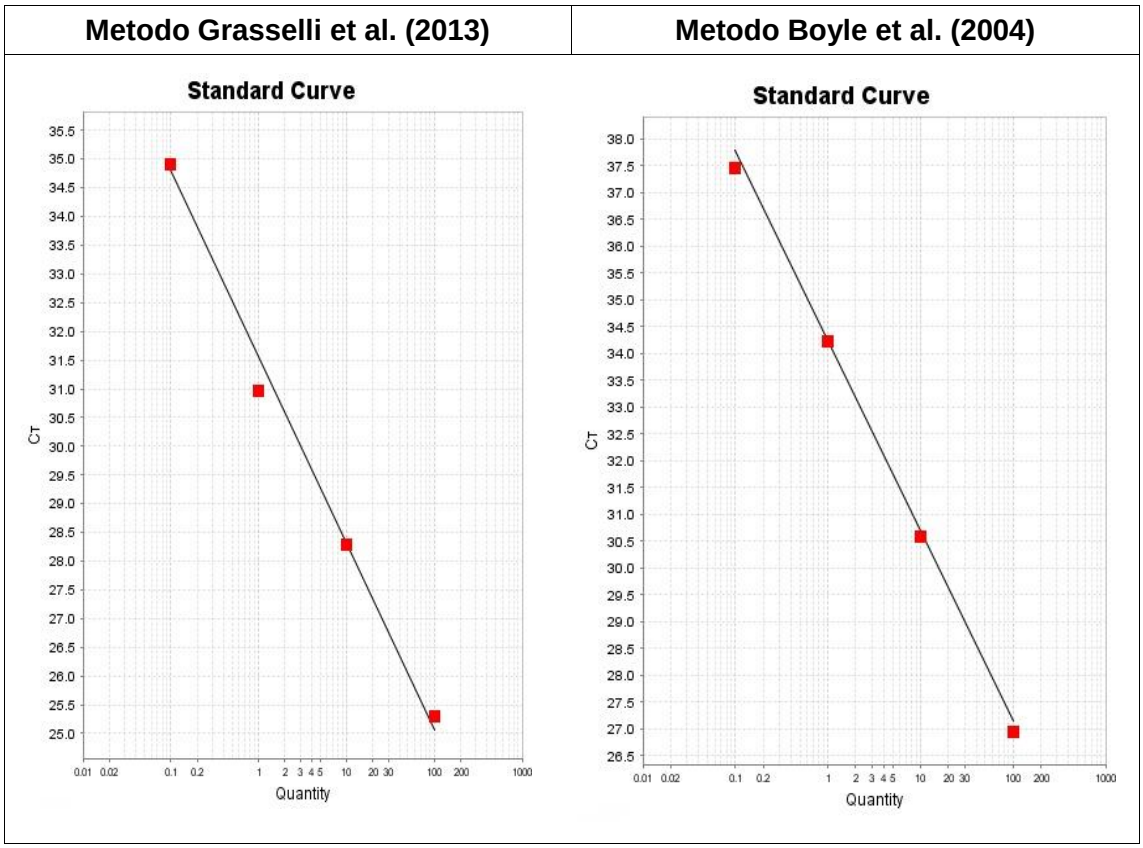

Figura 6. Confronto tra le curve di taratura della PCR quantitativa secondo Grasselli et al. (2013) e Boyle et al. (2004).

Nella **Figura 7** viene mostrato il risultato ottenuto tramite PCR quantitativa in tempo reale (*q-real time PCR*) sulle diverse concentrazioni standard di DNA fungino (100, 10,1 e 0.1 equivalenti genomici di chitridio) gentilmente fornito dal Prof. Trent Garner della Zoological Society di Londra).

Sull'asse Y è riportata l'intensità di fluorescenza rilevata, mentre sull'asse X il numero di cicli di amplificazione e si tratta quindi di una misura temporale. Le curve di colore giallo, verde e azzurro corrispondono alle diverse concentrazioni di DNA, mentre la linea viola rappresenta il controllo negativo (tampone in cui non è presente il DNA del fungo). La linea rossa rappresenta il valore soglia per cui il campione analizzato diventa positivo e quindi la fluorescenza rilevata non è più rumore di fondo, ma corrisponde alla presenza del fungo. Si nota che tutte le curve, tranne quella viola,

diventano positive a partire da un certo numero di cicli di amplificazione evidenziando così la presenza delle diverse concentrazioni di DNA di *Bd*. Lo stesso andamento delle curve si osserverebbe in tamponi di muco con presenza di infestazione del fungo parassita Bd. Il controllo negativo (linea viola) invece non mostra nessun segno di amplificazione.

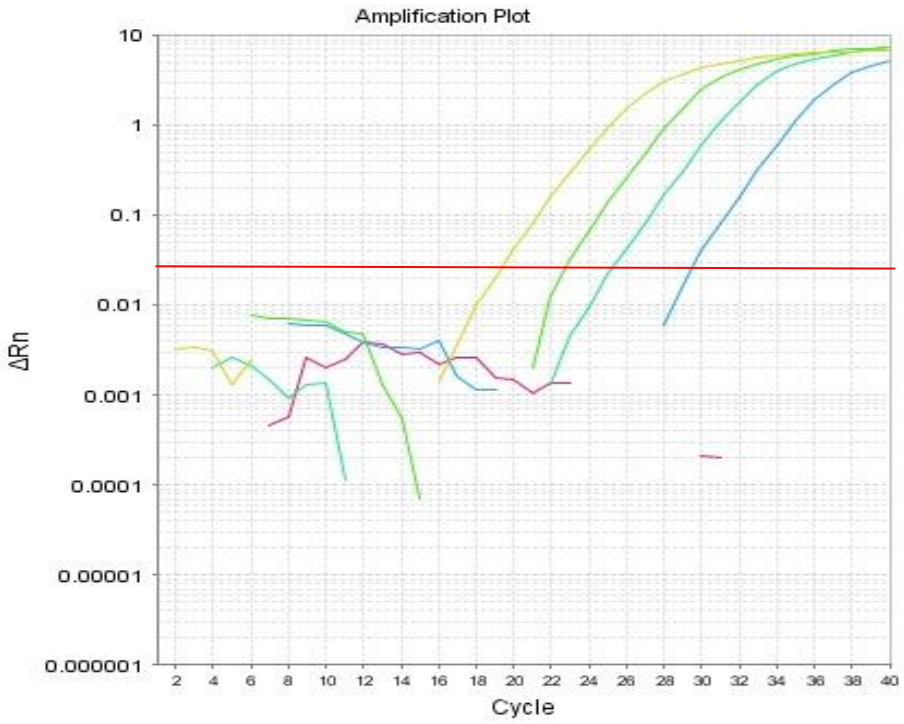

Figura 7. Risultati della *q-real time PCR* su concentrazioni note di DNA di *Batrachochytrium dendrobatidis.* In viola il controllo sprovvisto di DNA fungino.

Il vantaggio del nuovo metodo è quello di utilizzare reagenti chimici meno costosi del precedente. In questo modo è possibile effettuare l'analisi di un maggior numero di campioni di muco a parità di spesa.

Nella **Tabella 16** sono elencati le specie, i siti di campionamento e il numero di individui analizzati. Oltre ai campioni di anfibi raccolti all'interno dei due Parchi Nazionali, sono stati campionati ed analizzati anche una ventina di ululoni appenninici (*Bombina pachypus*) provenienti dalla Val di Vara (SP), zona prossima al Parco Nazionale delle Cinque Terre. Infine, alcuni tamponi prelevati dal gambero alloctono *Procambarus clarkii*, specie invasiva e presente in alcuni siti all'interno del Parco del Circeo, sono stati analizzati. Questa specie, oltre ad essere invasiva e predatrice di anfibi, può essere un vettore del fungo Bd e trasmetterlo alle specie acquatiche di anfibi che si trovano nello stesso habitat (**McMahon et al., 2013**).

Nel Parco Nazionale delle Cinque Terre e nelle zone limitrofe sono stati campionati 123 individui di anfibi, mentre in quello del Circeo 134 oltre a 5 individui di gambero della Louisiana, per un totale di 258 individui esaminati per la presenza di DNA fungino (**Tabella 16**).

Tabella 16. Lista delle specie e degli individui campionati nei due parchi nazionali per l'analisi del fungo chitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Specie	**PN Cinque Terre**	**PN Circeo**	***Totale***
Bombina pachypus Ululone appenninico	25	0	25
Bufo bufo Rospo comune	5	30	35
Bufotes balearicus Rospo smeraldino	0	45	45
Rana dalmatina Rana agile	0	3	3
Pelophylax sinkl. esculentus *Rana verde italiana*	17	52	69
Icthyosaura alpestris Tritone alpino	76	0	76
Procambarus clarkii Gambero della Louisiana	0	5	5
Totale	***123***	***135***	***258***

3.3 Risultati delle analisi molecolari

La **figura 8** mostra il risultato su due campioni di anfibi risultati negativi (assenza di DNA fungino). Come si può evincere dalla figura, il valore di fluorescenza di entrambi i campioni non supera mai la linea soglia (in azzurro) e pertanto i campioni sono negativi.

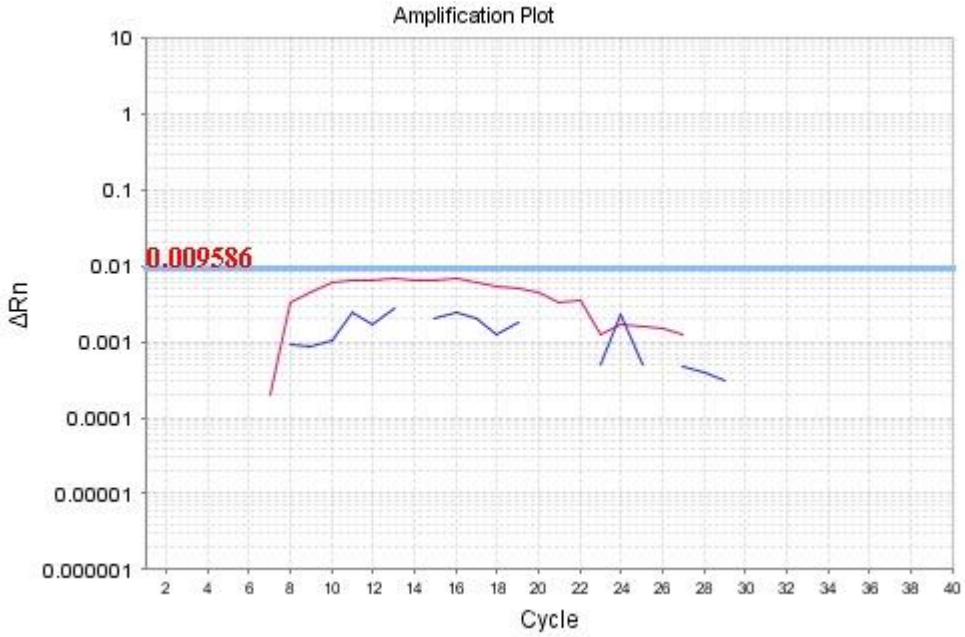

Figura 8. Risultati della *q-real time PCR* su due campioni di anfibi (in viola e blu). La linea orizzontale azzurra rappresenta il valore soglia al disopra del quale i campioni sarebbero positivi (presenza di DNA fungino nel tampone).

La **figura 9** illustra invece il risultato di un campione positivo (presenza e quantificazione di DNA fungino). Il campione N 281 (linea viola) mostra un'amplificazione del DNA rilevato dalla *real-time PCR* quantitativa. La quantificazione del DNA fungino nel tampone viene effettuata tramite confronto con le rette di regressione di DNA del fungo a concentrazione nota. In particolare, il valore osservato è 0,159 * 100 (fattore di diluizione del tampone) quantità equivalenti di DNA contenuto in una spora di fungo. Questa quantità viene anche definita come *genome equivalent* (GE). Il risultato dell'analisi del campione N 281 è pertanto = 15,9 GE (*genome equivalents*): l'anfibio è infettato da una quantità di circa 16 spore di fungo per ogni tampone prelevato. Questa quantità dà importanti informazioni sul tasso di infestazione individuale dell'anfibio e permette anche di comparare individui diversi.

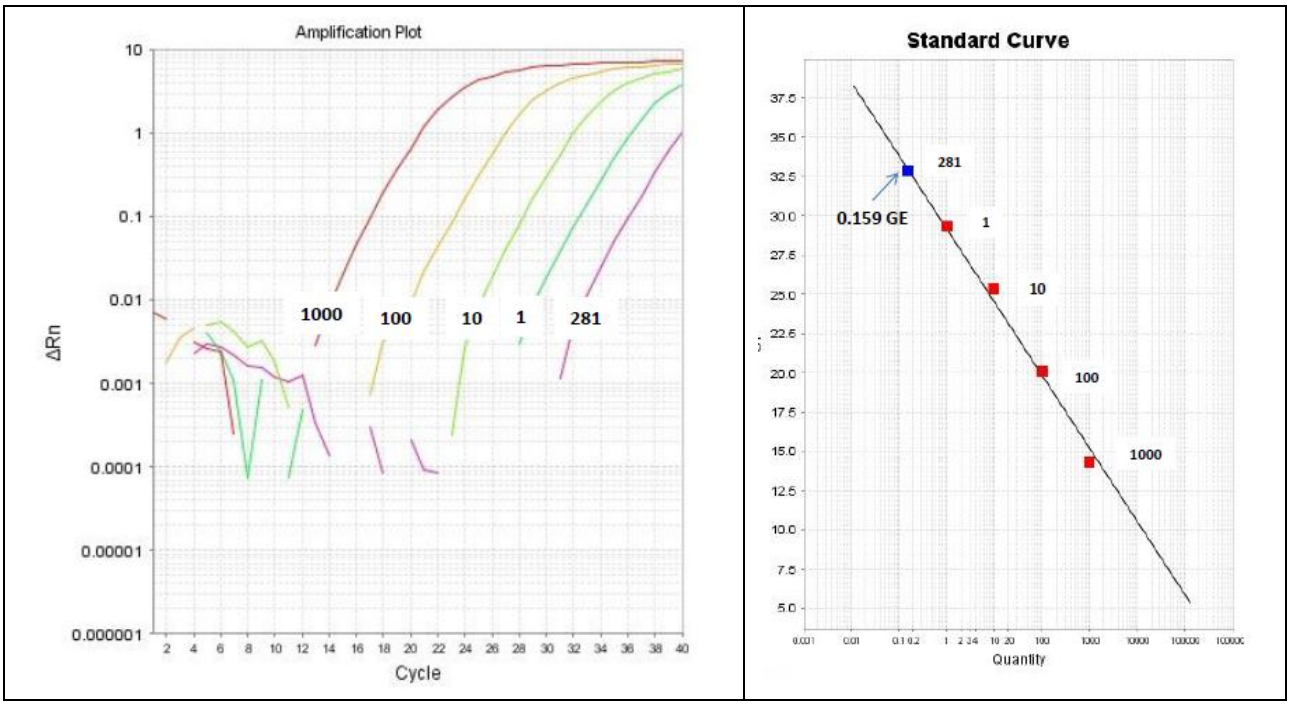

Figura 9. Risultati della *q-real time PCR* per il campione N 281. A sinistra l'aumento di fluorescenza (viola chiaro) indica presenza di DNA fungino; a destra la retta di regressione con quantità note di DNA ne permette la quantificazione esatta (0,159 * 100 fattore di diluizione).

Nella **tabella 17** sono riportati i risultati delle analisi molecolari sui campioni raccolti all'interno del parco Nazionale delle Cinque Terre e nelle aree limitrofe. Sui 123 tamponi esaminati solo uno appartenente ad una rana verde (*Pelophylax sp*.), campionata presso Case Suia, è risultato positivo con un carico di infestazione fungina di 8,1 GE. In totale, pertanto il tasso di infestazione sul totale degli anfibi campionati risulta essere 0,8% con intervallo stimato da 0,1 a 3,7% tramite inferenza bayesiana (Canessa et al., 2013).

Tabella 17. Campioni raccolti nel PNCT e analizzati per il *B. dendrobatidis* tramite *real-time* PCR. In rosso i campioni positivi. GE = genome equivalent.

Specie	Località	Bd rt-PCR	Bd GE	Data
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Lorsica	0	0,00	04/06/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pavareto	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Agnola	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Agnola	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Pera	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	Chiappa	0	0,00	08/08/2015
Bombina pachypus	S.Pietro	0	0,00	17/07/2015
Bombina pachypus	S.Pietro	0	0,00	17/07/2015
Bufo bufo	Pignone (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Bufo bufo	Pignone (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Bufo bufo	Pignone (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Bufo bufo	Pignone (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Bufo bufo	Grotta della Fornace (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 1 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015

Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	10/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 1 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Martello 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Patellano (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 5 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 5 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 2 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 2 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 2 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 2 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Serro 2 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015

Ichtyosaura alpestris	Case Serro 2 (PN5T)	0	0,00	08/09/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 1 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Ichtyosaura alpestris	Case Polazzo sopra 6 (PN5T)	0	0,00	20/10/2015
Pelophylax sp.	Suia 2 (PN5T)	**1**	**8,10**	10/04/2015
Pelophylax sp.	Suia 2 (PN5T)	0	0,00	25/04/2015
Pelophylax sp.	Grotta della Fornace (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Grotta della Fornace (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015
Pelophylax sp.	Torrente Pignone (PN5T)	0	0,00	19/09/2015

Nella **tabella 18** sono riportati i risultati delle analisi molecolari sui campioni raccolti all'interno del parco Nazionale del Circeo. Sui 130 tamponi di anfibi esaminati solo tre, tutti appartenenti a rane verdi (*Pelophylax sp*.) sono risultati positivi con un carico di infestazione fungina variante da 0,16 a 20,50 GE. In media, pertanto il tasso di infestazione sul totale degli anfibi campionati nel parco del Circeo risulta essere in media 2,3% con intervallo stimato tramite ricampionamento (0.7 – 6,0%).

Per quanto riguarda i 5 tamponi prelevati sui gamberi alloctoni *Procambarus clarkii*, nessuno di essi risulta infestato dal fungo (tasso medio 0.0% con intervallo stimato che varia da 0.0 a 37,9%).

Tabella 18. Campioni raccolti nel PNCT e analizzati per il *B. dendrobatidis* tramite *real-time* PCR. In rosso i campioni positivi. GE = *genome equivalent*.

Specie	Località	Bd rt-PCR	Bd GE	Data
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Dintorni sede del Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Bufalara (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	Bufalara (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufo bufo	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015

Bufo bufo	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, Via Carlo Alberto (PNC)		0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Dormitorio, Fogliano (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Dormitorio, Fogliano (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Dormitorio, Fogliano (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Dormitorio, Fogliano (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Dormitorio, Fogliano (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	10/10/2015	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Bufalara (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015

Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	c/o Fogliano (UTB) (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Bufotes balearicus	Info Point, V. Carlo Alberto (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	1	15,90	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	1	0,16	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015

Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	**1**	**20,50**	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Pelophylax sinkl. esculentus	Stagno Ente Parco (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Rana dalmatina	Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Rana dalmatina	Piscina Bagnature 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Rana dalmatina	Piscina Carpino 1 (PNC)	0	0,00	10/10/2015
Procambarus clarkii	PNC	0	0,00	10/10/2015
Procambarus clarkii	PNC	0	0,00	10/10/2015
Procambarus clarkii	PNC	0	0,00	10/10/2015
Procambarus clarkii	PNC	0	0,00	10/10/2015
Procambarus clarkii	PNC	0	0,00	10/10/2015

Questa non è la prima ricerca che riguarda la diffusione del fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* in popolazioni italiane di anfibi (Tessa et al., 2013; Canestrelli et al., 2013; Zampiglia et al., 2015). Esso comunque è il primo studio che prende in considerazione in modo specifico le popolazioni che vivono nei territori dei due parchi Nazionali, i quali ospitano importanti specie di anfibi protetti e che sono responsabili della loro conservazione.

Nella **tabella 19** sono riassunti i risultati delle analisi per singola specie e per Area Protetta. E' interessante notare che l'unica specie che risulta infestata nelle due arre è la rana verde in ugual percentuale (6%), anche se con intervallo della stima diverso a causa della diversa numerosità del campione.

Tabella 19. Tasso percentuale di infestazione (in rosso) per specie e per Area Protetta. In parentesi è riportato l'intervallo del tasso stimato di infestazione.

Specie	**PN Cinque Terre**	**PN Circeo**
Bombina pachypus Ululone appenninico	25/0 (0%,0-9)	-
Bufo bufo Rospo comune	5/0 (0%,0-38)	30/0 (0%,0-8)
Bufotes balearicus Rospo smeraldino	-	45/0 (0%,0-5)
Rana dalmatina Rana agile	-	3/0 (0%, 0-54)
Pelophylax sinkl. esculentus *Rana verde italiana*	17/1 (6%, 1-24)	52/3 (6%, 2-15)
Icthyosaura alpestris Tritone alpino	76/0 (0%, 0-3)	-
Procambarus clarkii Gambero della Louisiana	-	5/0 (0%,0-38)
Totale	***123/1 (1%, 0-3)***	***130/3 (2%, 1-6)**** *gamberi esclusi*

La solo specie che risulta infestata in entrambe le aree con lo stesso tasso del 6% è la rana verde appartenente al gruppo *Pelophylax sp*. la cui posizione sistematica risulta non ancora completamente risolta.

Il tasso medio di infestazione comunque rilevato nel presente studio risulta relativamente basso in comparazione con i tassi osservati in altre zone dell'Appennino italiano. Ad esempio, Zampiglia et al. (2015) riportano i seguenti dati: tasso di infestazione medio in *Salamandra salamandra* 12%, in *Ichtyosaura alpestris* 6% e in *Rana italica* 19%. Anche il tasso di infestazione rilevato in *Bombina variegata* in varie parti d'Italia risulta molto maggiore di quello rilevato negli anfibi analizzati nel presente studio (Canestrelli et al., 2013).

4. Discussione

Durante le ricerche svolte nel 2015, tre nuove vasche contenenti acqua e pertanto idonee alla riproduzione degli anfibi sono state rinvenute. In solo una però è stato osservato il tritone alpestre (*Ichthyosaura alpestris*) che risulta essere la specie più frequente del Parco.

Per quanti riguarda il monitoraggio, è stato applicato l'approccio *site occupancy* su 33 siti riproduttivi, che sono stati visitati regolarmente per quattro volte e in cui sono state osservate cinque specie: il tritone alpestre (*Ichthyosaua alpestris*), la raganella mediterranea (*Hyla meridionalis*), la rana appenninica (Rana italica), il rospo comune (*Bufo bufo*) e la rana verde (*Pelophylax sp*.). le analisi sono state effettuate solo sul tritone alpestre e hanno mostrato che, nel Parco Nazionale delle Cinque Terre, questa specie ha una elevata probabilità di essere rilavata (ρ = 0,97) già al primo sopralluogo, per cui la distribuzione stimata corrisponde a quella realmente osservata nel corso degli ultimi anni. Nelle vasche artificiali la specie colonizza oltre il 70% dei siti, mentre solo il 12% dei torrenti sembra idoneao alla vita della specie.

Le ricerche intensive realizzate nelle aree in cui è stato storicamente segnalato l'ululone appenninico, *Bombina variegata pachypus* non hanno purtroppo apportato nuove segnalzioni, per cui la specie sembra effettivamente estinta all'interno del territorio del Parco, anche se ancora presente in zone vicine, come in Val di vara e nella provincia di Genova (Canessa et al., 2013).

Nel corso del monitoraggio sei siti sono stati prelavati 123 tamponi cutanei delle tre specie più comuni (tritone alpestre, rospo comune e rana verde).

Le analisi molecolari effettuate tramite real-time PCR al fine di mettere in evidenza l'eventuale presenza di anfibi parassitati dal fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* hanno mostrato per quanto riguarda le popolazioni del Parco Nazionale delle Cinque Terre un tasso di infestazione molto basso (1 su 123 = 1%). Questo dato sembra essere inferiore a quello riportato per altre zone e popolazioni italiane di anfibi, anche se un approfondimento in particolare sulle rane verdi del genere *Pelophylax* e sugli anfibi che convivono con questa specie sono opportuni.

5. Proposte per ulteriori ricerche e progetti di conservazione

5.1. Monitoraggio degli anfibi

Il sistema di monitoraggio utilizzato nel 2015 detto "*site occupancy"* si è dimostrato efficace solo per il tritone alpino *Icthyosaura alpestris*, specie ampiamente diffusa nel territorio del Parco e che non appare bisognoso di urgenti misure di conservazione. Per quanto riguarda le altre specie di anfibi questo tipo di approccio non sembra apportare informazioni in quanto i siti con presenza di altre specie sono pochi.

Per questo motivo eventuali future rricerche verteranno sui siti naturali, quali rii e torrenti al fine di stimare l'entità delle popolazioni che vi si riproducono. I principali torrenti oggetto delle indagini saranno i torrenti Pignone, Albareto e Rio della Gatta oltre ad eventuali altri piccoli rii. I metodo di stima utilizzati saranno il conteggio delle ovature e eventuali esperimenti di cattura-marcatura e ricattura. Le principali specie indagate in questi ambienti sono la rana appenninica *Rana italica*, il rospo comune *Bufo bufo* e la rana verde *Pelphylax sp*.. Per quanto riguarda gli ambienti artificiali la stima delle popolazioni di raganella mediterranea *Hyla meridionalis* potranne essere effettuate tramite la stima dei maschi in canto.

5.2. Analisi molecolari della patologie fungine

Nonostante il tasso di infestazione, dovute al fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, rilevato in questo studio preliminare sia stato basso e ristretto ad una sola specie (*Pelophylax sp*.), ulteriori analisi potranno essere utili a confermare una situazione di basso rischio. In particolare, l'analisi delle specie che coabitano con le rane verdi potrà meglio chiarire se la diffusione del fungo chitridio è limitata ad una sola specie o se essa è presente anche in altre popolazioni.

Si suggerisce inoltre di mantenere e possibilmente incentivare la collaborazione già avviata con gli altri Parchi Nazionali. Sarebbe quindi opportuno incentivare gli scambi di esperienze di campo sul prelievo, sulla conservazione e sull'invio al DISTAV dei tamponi cutanei prelevati nelle diverse aree.

5.3. Recupero o ripristino di vasche abbandonate

Nel mese di dicembre 2015 sono stati effettuati sopralluoghi presso alcune aziende operanti nel territorio del Parco al fine di identificare alcune vasche artificiali che potrebbero essere oggetto di attività di ripristino e/o completa riattivazione. In particolare sono stati presi contatti con il proprietario di una vasca coperta in località Garola e sono state visitate alcune vasche in disuso presso la località Case Suia al fine di programmare le suddette attività di ripristino.

In entrambi i casi i lavori pratici necessari al ripristino delle vasche potrebbero essere portate a termine anche con l'aiuto di volontari opportunamente formati da un corso di aggiornamento sul significato ecologico dei siti artificiali e sulle modalità tecniche per realizzare il recupero di tali strutture.

5.4. Attività di comunicazione e realizzazione di materiale divulgativo

Per quanto riguarda le attività di comunicazione e divulgazione, possono essere previste sia attività pubbliche come mostre e/o conferenze sia la realizzazione di opuscoli che forniscano ai proprietari do vasche e invasi le modalità di gestione degli stessi al fine di mantenerli/renderli idonei per le popolazioni di anfibi. E' possibile anche ipotizzare la realizzazione e la stampa di materiale divulgativo sugli anfibi da distribuire ai turisti e fruitori del parco in italiano e inglese.

5.5. Studio di fattibilità per la reintroduzione dell'ululone appenninico

Da ormai oltre 20 anni (dal 1992) mancano osservazioni certe dell'ululone appenninico nel territorio del Parco. L'ultima segnalazione riguarda una vasca artificiale in località Albareto presso un'azienda agricola. I proprietari ricordano la presenza della specie nel passato, ma testimoniano la sua assenza nella loro proprietà. Ricerche condotte nelle vasche e nel vicino torrente Albareto non hanno prodotto alcun risultato positivo.

Pertanto dopo aver redatto uno studio di fattibilità sulla base delle linne guida per le immissioni faunistiche dell'INFS (ora SPRA) pubblicate nel 2007, delle linee guida della IUCN (2012) e sulla base della normativa vigente in materia (DPR 397/97 modificato dal DPR 120/2003) potrebbe essere realizzabile un progetto dettagliato di reintroduzione della specie all'interno di uno o più siti del parco nazionale.

La presenza di un piccolo centro di allevamento e riproduzione in Val di Vara gestito da una struttura pubblica come il Parco Naturale Regionale di Montemarcello-Magra-Vara (Arillo et al., 2013) costituisce una struttura da cui potrebbero essere prelevati i girini che saranno immessi in un sito idoneo opportunamente realizzato. La reintroduzione dei girini dovrebbe essere prolungata per almeno tre anni in modo da assicurare il raggiungimento dello stato riproduttivo dei primi individui immessi. La reintroduzione potrà essere considerata come realizzata con successo alla prima riproduzione naturale degli animali immessi nel nuovo ambiente.

6. Ringraziamenti

Si ringraziano l'Ente Parco Nazionale delle Cinque Terre per aver coordinato questa ricerca e in particolare Matteo Perrone e il personale del Corpo Forestale dello Stato in servizio presso il Coordinamento Territoriale dell'Ambiente (CTA) di Monterosso al Mare (SP), per aver fornito osservazioni inedite e per le costanti ricerche di campo svolte nel corso degli anni. Antonio Romano ha fornito i tamponi di anfibi provenienti dal Parco Nazionale del Circeo.

7. Bibliografia

Arillo A., Braida L., Canessa S., Cresta P., Ferravante C., Martel A., Oneto F., Ottonello D., Pasmans F., Salvidio S., Sciutti M., Scarpellini P. (2013). Paesaggio rurale e conservazione: il Progetto Ululone in Liguria. In: Atti IX Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica, (Bari - Conversano, 26-30 settembre 2012), pp. 285-286. Scillitani G., Liuzzi C., Lorusso L., Mastropasqua F., Ventrella P. Eds, Tipografia Pineta, Conversano (BA).

Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D. (2004): Diseases of Aquatic Organisms 60: 141-148.

Bussolini V., Salvidio S. (2000). Rettili e anfibi del Parco Nazionale delle Cinque Terre: aspetti gestionali e di conservazione. Pp. 24-29. In: Fauna 2000: indagini sulla fauna del comprensorio provinciale dello spezzino. Provincia della Spezia, La Spezia.

Canessa S., A. Martel, and F. Pasmans. (2013). No detection of chytrid in first systematic screening of *Bombina variegata pachypus* (Anura: Bombinatoridae) in Liguria, northern Italy. Acta Herpetologica 8:59-63.

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., Zampiglia M., Nascetti G. (2013). Widespread occurrence of Batrachochytrium dendrobatidis in contemporary and historical samples of the endangered Bombina pachypus along the Italian peninsula. PLoS ONE 8: e63349

Doria G., Salvidio S. (1994). Atlante degli Anfibi e Rettili della Liguria. Cataloghi dei beni naturali n°2, Regione Liguria, NuovaLitoeffe, Castelvetro Piacentino, 151 pp.

Doria G., Salvidio S., Tavano M. (2001). Catalogo degli anfibi del Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria" di Genova. Annali del Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria", Genova, 94: 21-247.

INFS (2007). Linee guida per l'immissione di specie faunistiche. Quaderni di Conservazione della Natura 27, 55 pp.

IUCN (2012). IUCN Guidelines for reintroductions and other conservation translocations. Amphibian reintroduction guidelines. 14pp.

MacKenzie D.I., Nichols J.D., Royle J.A., Pollock K.H., Bailey L.L., Hines J.E. (2006). Occupancy estimation and Modelling. Inferring patterns and dynamics of species occurrence. Academic Press, Burlington, USA.

McMahon T.A., Brannelly L.A., Chatfield M.W.H., Johnson P.T.H., Joseph M.B., McKenzie V.J., Richards-Zavasky C.L., Venesky M.D., Rohr J.R. (2013). Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. Proc, Nat. Acad, USA, 110: 210-215.

Olivari S., Romano A., Salvidio S. (2013). Anfibi e habitat acquatici nel Parco Nazionale delle Cinque Terre – Censimento e indirizzi per la conservazione. Edizioni Belvedere, Latina, 160 pp. ISBN 978-88-89504-36-9.

Romano A., Salvidio S., Mongillo D., Olivari S. (2014). Importance of a traditional irrigation system in amphibian conservation in the Cinque Terre National Park (NW Italy). Journal for Nature Conservation, 22: 445-452.

Salvidio S., Crovetto F. (2014). Monitoraggio delle specie di ambiente umido/acquatico del Parco Nazionale delle Cinque Terre. Relazione non pubblicata al CIRBFEP, 26 pp.

Salvidio S., Oneto F., Ottonello D., Braida L., Ferravante C., Grasselli E., Vecchione G., Canessa S., Arillo A., Cardelli M. (2014). Conservation of the yellow bellied toad *Bombina variegata pachypus* in Liguria (NW Italy). Herpetological Facts Journal. 2014, 1. ISSN 2256-0327. Supplement 1: Proceedings of the 2nd international Scientific Conference – Workshop “Research and conservation of European herpetofauna and its environment: *Bombina bombina, Emys orbicularis, and Coronella austriaca*”: 97-104.

Tessa G., Angelini C., Bielby J., Bovero S. , Giacoma C. Sotgiu G. Garner T.W.J. (2013). The pandemic pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Phylum Chytridiomycota), in Italy. Italian Journal of Zoology, 80: 1-11.

Zampiglia M., Canestrelli D., Chiocchio A., Nascetti G. (2015). Geographic distribution of the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among mountain amphibians along the Italian peninsula. Diseases of Aquatic Organisms, 107: 61-68.