

- 2) Interventi di mitigazione e ripristino ambientale di siti target.
In almeno 15 siti, l'habitat ottimale di *B. pachypus* verrà ricostituito (i) assicurando un'adduzione idrica supplementare (parziale captazione di sorgenti o abbeveratoi) che determini un idroperiodo sufficientemente esteso affinché gli ambienti acquatici permangano idonei per supportare le diverse fasi riproduttive (accoppiamento/deposizione delle uova, sviluppo embrionale e larvale, metamorfosi), o (ii) attraverso la creazione ex novo di un'unità di habitat acquatico modulare composta da un fontanile, un sistema di pozze sottostante, ed un prato allagato adiacente, che rappresentano le caratteristiche fisiche e idrologiche ottimali alla costituzione di un sito riproduttivo di Ululone. Questo approccio modulare favorisce la ripetibilità e la generazione di buone pratiche da adottare anche in altri progetti focalizzati su specie simili.
- 3) Prelievo di uova e girini di *B. pachypus* dai siti riproduttivi sorgente e traslocazione nei siti restaurati.
Allo scopo di iniziare attività di restocking già nel breve periodo, nell'anno 2024 verranno prelevati girini e uova da allevare in cattività. Le popolazioni sorgenti saranno individuate nelle aree di indagine secondo i seguenti criteri: (i) numerosità degli individui (dando priorità alle popolazioni più numerose per minimizzare l'impatto del prelievo) e (ii) massimizzazione dei parametri di diversità genetica e potenziale evolutivo nelle popolazioni di intervento. Durante la campagna di campionamento nel 2025 sarà possibile modificare la selezione proposta in base alle osservazioni effettuate sul campo e alle analisi genetiche. Verranno prelevati un numero di 40 girini/uova per sito, al fine di assicurare il rilascio di almeno 20 individui allo stadio di subadulto per sito ripristinato.
- 4) Costituzione di uno stock di riproduttori ottimale per azioni di captive breeding e restocking nel medio-lungo periodo.
Questa linea d'intervento sarà costituita di una fase sperimentale preliminare, costituita dalla caratterizzazione delle performance riproduttive di individui potenziali riproduttori, ed una fase operativa caratterizzata dalla riproduzione dei riproduttori individuati e delle generazioni nate in cattività. In particolare:
- (i) verranno prelevati adulti riproduttivi dalle popolazioni del Navegna e Cervia, dei Lucretili e del PNALM. Se presenti, saranno prelevati gli individui riproduttori individuati nel primo monitoraggio (riconoscibili grazie alle fotografie del pattern ventrale raccolte durante lo studio); alternativamente verranno prelevati altri individui dalle stesse popolazioni. Gli individui verranno trasferiti alla Fondazione Bioparco di Roma (o in alternativa al Centro Iltiogenico Sperimentale delle Saline di Tarquinia (CISMAR)), dove verranno caratterizzati vari parametri biologici e fisiologici legati alle performance riproduttive. Il Bioparco e il CISMAR presentano già le infrastrutture idonee all'allevamento e alla caratterizzazione delle performance individuali di anfibi (si consultino a tal proposito de Rysky et al., 2021, Vignoli et al., 2021, Spadavecchia et al., 2022, e Chiocchio et al., 2022). I dati fenotipici verranno associati al genotipo dell'individuo, caratterizzato mediante *sequencing* genomico ad alta resa, al fine di individuare le caratteristiche genetiche associate alla variazione inter-individuale in tratti di performance.
 - (ii) In Italia sono state allestite diverse strutture idonee al *captive breeding* dell'Ululone. In virtù di pregresse esperienze nell'allevamento della specie target per fini sia di ricerca sia di conservazione e della loro collocazione all'interno della Regione Lazio, la Fondazione Bioparco di Roma e il centro CISMAR dell'Università della Tuscia rappresentano le infrastrutture d'elezione per questa fase di captive breeding. In particolare, la Fondazione Bioparco di Roma ha già predisposto una struttura dove sono state attuate le diverse fasi ex-situ di progetti di restocking (ad es. per la Riserva Naturale Regionale Monti Navegna e Cervia; Vignoli et al., 2021).
- 5) Output di progetto
Le azioni già citate prevedono la creazione di tre database georeferenziati contenenti i dati collezionati in campo, ovvero: un database contenente tutti i siti di presenza a seguito del restocking; un database di tutti i siti ripristinati e delle loro caratteristiche ecologico-conservazionistiche; uno *studbook* individuale del genotipo e del fenotipo di tutti gli individui campionati.
A questi si aggiunge un Protocollo d'azione dettagliato inerente sia agli interventi di ripristino ambientale sia alle operazioni di *captive breeding*; esso rappresenterà il documento di riferimento per le attività gestionali che si possono condurre per la conservazione di *B. pachypus*.
- 6) Informazione, sensibilizzazione e coinvolgimento
Verranno realizzati specifici incontri con diversi *stakeholders*, in particolare guide ambientaliste e allevatori. Le attività di informazione e sensibilizzazione verranno realizzate con depliant,

pannelli informativi, uso delle pagine social, escursioni con i ricercatori; il tutto per sensibilizzare la cittadinanza ai temi legati agli anfibi, al loro ecosistema ed alle minacce che li coinvolgono. Sarà infine realizzato un convegno finale.

Il progetto risulta coerente con le priorità del Bando in oggetto, primariamente perché ambisce ad invertire il trend demografico negativo di una specie endemica minacciata e inserita in Allegato II della Direttiva Habitat intervenendo sulla diversità genetica, monitorando, preservando e riqualificandone l'habitat, e dunque l'ecosistema. Inoltre, tali azioni sono perfettamente congruenti con alcune linee di ricerca del NBFC (vedi sotto).

Contemporaneamente apporta elementi di innovatività (per entrambe le accezioni date nel Bando): la costituzione dello stock di riproduttori ottimale sulla base di un database genetico rappresenta un patrimonio unico nello scenario della conservazione dell'Ululone appenninico; l'applicazione di micro sistemi di radiotracking con rilevamento dei dati telemetrici (accelerometria e magnetometria) non ha precedenti (vedi Laciak et al., 2023 per telemetria sulla specie affine *Bombina variegata*) su questa specie; la costituzione di una piattaforma on-line che permetta la condivisione dei dati tra i partner del progetto in tempo reale con informazioni circa gli interventi svolti e lo *studbook* di ciascun individuo rappresentano elementi di conservazione unici per *B. pachypus*; l'estensione delle buone pratiche già sperimentate dalla Riserva Naturale Regionale Monte Navegna e Monte Cervia alle altre Aree protette del partenariato rappresenta un ulteriore elemento innovativo per queste ultime.

Il progetto mostra sinergia con gli obiettivi di "sviluppo della conoscenza di base della biodiversità terrestre italiana tramite la creazione di banche dati e azioni di divulgazione scientifica" (Spoke 3, attività 1, micro attività 1.1: creazione di database e biobanche); e con l'obiettivo di "monitoraggio e valutazione di specie e habitat a rischio di estinzione come conseguenza del cambiamento climatico e degli interventi antropici e sviluppo di piani di gestione e protezione della biodiversità delle aree più a rischio" (Spoke 3, attività 2, micro attività 2.1: identificazione di specie native a rischio di estinzione e micro attività 2.3: implementazione di modelli predittivi e piani di gestione per la biodiversità). Inoltre, la presente proposta risponde anche a quanto previsto dallo Spoke 4 ed in particolare con l'attività 1: Sistemi avanzati per l'analisi, il monitoraggio e la gestione della biodiversità, la sua organizzazione strutturale, le funzioni e i servizi ecosistemici ad essa collegati e le minacce di origine naturale e antropica. L'attività prevede sia l'acquisizione di informazioni all'interno di una rete di siti di osservazione dislocati tra più Aree protette, sia attività di ricerca sperimentale (svolte in natura ed in laboratorio). Le analisi di questi dati e la loro consultazione avverranno in ambito di un set di modelli e funzionalità sviluppate all'interno di una piattaforma digitale.

Il coinvolgimento dei diversi portatori di interesse avverrà con incontri periodici, di natura informativa e didattica. In particolare, verranno interessati gli allevatori esercitanti nelle vicinanze dei siti riproduttivi – con i quali si cercherà di meglio comprendere la dinamica dell'abbeverata per trovare punti d'incontro che permettano di ridurre l'impatto su pozze e fontanili– e tutte le guide ambientali locali –con le quali si intendono costruire progetti didattici ed escursioni tematiche da destinare a scolaresche e turisti in generale–. Contestualmente verranno utilizzati format di comunicazione più comuni, quali post da pubblicare sulle pagine di ciascuna area protetta, depliant, pannelli informativi e la realizzazione di un convegno finale.

La sostenibilità delle attività del progetto in seguito alla fine del finanziamento sarà permessa principalmente da: (i) la formazione del personale per tutta la durata del progetto stesso, che consentirà di proseguire un monitoraggio classico negli anni successivi e di mettere in atto le misure gestionali sperimentate e (ii) la redazione di un Protocollo di lavoro che consentirà di definire le migliori pratiche di gestione e conservazione emerse durante la realizzazione progettuale.

Bando Aree Protette NBFC
 “Modulistica e relative istruzioni”

Cronoprogramma (indicare la successione dello svolgimento delle attività dalla concessione del finanziamento alla fine della completa esecuzione di ciascuna attività)	MESI
WP 1: Attività preparatoria. L'attività prevede varie fasi: - Individuazione di tutti i siti riproduttivi noti (utilizzati e/o abbandonati) suddivisi per tipologia (fontanili, ruscelli, pozze) e la loro distribuzione sul territorio. - Il plottaggio su mappa dei siti permetterà di individuare quelle aree mai indagate e sulle quali i occorrerà procedere con nuove attività di monitoraggio. - Valutazione dei dati raccolti (pregressi e nuovi) per stabilire le priorità di intervento. - Messa a punto di protocolli di monitoraggio condivisi e standardizzati tra le Aree protette. - Creazione di una piattaforma on line per l'inserimento e la condivisione dei dati.	Marzo-giugno 2024 4 mesi
WP 2: Monitoraggio di tutti i siti storici di presenza (utilizzati e non) ed acquisizione dei principali parametri ecologici e delle comunità di anfibi presenti in ciascun sito; monitoraggio genetico e sanitario delle popolazioni di ululoni.	Aprile -settembre 2024 e 2025 6 mesi 2024 6 mesi 2025
WP 3: attività di ripristino e miglioramento ambientale dei siti che necessitano di interventi.	Aprile -settembre 2024 e 2025 6 mesi 2024 6 mesi 2025
WP 4: cattura e marcaggio di almeno 30 individui per la valutazione della capacità di dispersione degli animali attraverso attività radio tracking.	Aprile -settembre 2024 e 2025 6 mesi 2024 6 mesi 2025
WP 5: prelievo di uova, girini e di almeno 20 neometamorfosati di <i>B. pachypus</i> dai siti riproduttivi sorgente e traslocazione nei siti restaurati.	Aprile -settembre 2024 e 2025 6 mesi 2024 6 mesi 2025
WP 6: creazione di uno <i>studbook</i> individuale del genotipo e del fenotipo di tutti gli individui campionati. I dati saranno inseriti nella piattaforma creata nel WP1 e accessibile ai partner del progetto.	Aprile 2024-novembre 2025 19 mesi
WP 7: protocollo d'azione dettagliato sia sugli interventi di ripristino ambientale che delle operazioni di captive breeding. Il protocollo rappresenterà il documento di riferimento per le attività gestionali che si possono condurre per la conservazione di <i>B. pachypus</i> .	Luglio-novembre 2025 4 mesi
WP 8: Attività di sensibilizzazione e di educazione, coinvolgimento dei portatori di interesse. Verranno realizzati: - Specifici incontri con diversi portatori di interesse, in particolare guide ambientaliste e allevatori. - Attività di informazione e sensibilizzazione tramite depliant, pannelli informativi, post, escursioni con i ricercatori. - Convegno finale.	Aprile 2024-novembre 2025 19 mesi

4. SOGGETTO PROPONENTE

Nome legale	Ente Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise
Tipologia	Parco Nazionale

Indirizzo	Viale Santa Lucia, 2
Città	Pescasseroli (AQ)
Regione	Abruzzo
CAP	67032
Telefono	0863-91113
Sito web	www.parcoabruzzo.it

5. ORGANIZZAZIONI/ENTI PARTNER (se previsti)

PARTNER 1	
Nome legale	Riserva Naturale Monte Navegna e Monte Cervia
Tipologia	Ente di gestione Riserva Naturale Regionale
Indirizzo	Via Roma, 33
Città	Varco Sabino (RI)
Regione	Lazio
CAP	02020
Telefono	0765 790002
Sito web	www.navegnacervia.it

PARTNER 2	
Nome legale	Parco Naturale Regionale dei Monti Lucretili
Tipologia	Ente di gestione Parco Regionale
Indirizzo	V.le Petrocchi, 11
Città	Palombara Sabina
Regione	Lazio
CAP	00018
Telefono	0774 637027
Sito web	www.parcolucretili.it

6. DESCRIZIONE DEL PROGETTO

a. Descrivere il contesto e gli obiettivi del Progetto e come questi soddisfano i fabbisogni del territorio di riferimento. (max 2000 parole)

I cambiamenti globali innescati dalle attività antropiche stanno minacciando le popolazioni naturali in tutte le aree del globo. La frammentazione degli habitat e la loro degradazione, l'introduzione di inquinanti, il riscaldamento climatico e l'introduzione di specie aliene hanno innescato un rapido declino delle popolazioni in migliaia di specie animali e vegetali che, in molti casi, sta portando all'estinzione definitiva delle specie.

Gli anfibi rappresentano ad oggi la Classe vertebrata più minacciata a livello globale, per via di un'intrinseca vulnerabilità dei suoi esponenti, aggravata dalle continue trasformazioni che le attività antropiche impongono agli ecosistemi acquatici, cui la maggior parte delle specie anfibie risultano indissolubilmente legate, almeno per una parte del ciclo vitale.

Conservare gli anfibi è certamente importante per via del ruolo che assumono all'interno dell'ecosistema; occupano infatti una posizione intermedia nella rete trofica, fungendo sia da regolatori delle popolazioni di invertebrati di cui si nutrono, che, allo stesso tempo, da importanti specie-preda per svariati predatori apicali e sub-apicali. Inoltre, la conservazione delle singole specie implica indirettamente la tutela e la riqualificazione degli habitat, ovvero del sistema di piccole aree umide (stagni, pozze, ruscelli e paludi) che, per quanto di limitata estensione, supportano intere biocenosi.

Nel contesto italiano, l'Ululone appenninico (*Bombina pachypus* Bonaparte, 1838) rappresenta una delle specie di anfibi a maggior rischio di estinzione (classificata "Endangered" nell'aggiornamento 2022 della Lista Rossa italiana IUCN ed inserita in Allegato II della Direttiva Habitat). È inoltre un'endemita peninsulare. Occupa un'areale relativamente esteso (dalla Liguria alla Calabria) ma con popolazioni frammentate. A partire dagli anni '90, infatti, si è assistito ad un diffuso fenomeno di rarefazione (Barbieri et al., 2004) che riguarda sia il numero di popolazioni, sia la loro consistenza numerica, ridottasi di oltre l'80% in un ventennio (Rondinini et al., 2013). Il fenomeno starebbe coinvolgendo l'intero areale, con l'unica eccezione delle popolazioni calabresi più meridionali (Zampiglia et al., 2019). A questo crollo demografico sono state imputate varie cause, fra cui: perdita dell'habitat, in particolare per disseccamento dovuto a captazioni agricole (Di Nicola, 2020); basso livello di diversità genetica delle popolazioni (Canestrelli et al., 2006); elevata incidenza di individui infettati da *Batrachochytrium dendrobatidis*, agente eziologico della chitridiomicosi, una malattia della cute considerata fra le principali cause del declino degli anfibi a scala globale (Canestrelli et al., 2013). Inoltre, i cambiamenti climatici in atto sembrerebbero avere un ruolo nel mutare le condizioni bioclimatiche favorevoli per la specie, soprattutto nelle porzioni centrali e settentrionali dell'areale (Zampiglia et al., 2019).

Lo status deficitario della specie e la responsabilità di conservare un endemismo impongono urgenti azioni mirate e scelte gestionali basate su solide basi conoscitive.

Il presente progetto mira a rivitalizzare le popolazioni di *B. pachypus* ricadenti entro una rete di Aree protette composta da: (i) il Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise, (ii) il Parco Regionale dei Monti Lucretili, (iii) la Riserva Naturale Regionale Monte Navegna e Monte Cervia e (iv) le altre aree protette da essi gestite, per un'area d'intervento complessiva di 109.000 ha circa. Più in dettaglio:

- Il Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise (50.729 ha) è anche l'ente gestore di cinque Siti RN2000 (IT6050018, IT6050020, IT7110205, IT7212121, IT7120132) che nel complesso coprono 81.237 ha, di cui 34.932 (43%) esterni ai confini del Parco.
- La Riserva Naturale Regionale Monte Navegna e Monte Cervia (3.600 ettari) è anche l'ente gestore di un Sito RN2000 (IT6020015, di superficie 1.800 ha) e di un Monumento Naturale ("Zone umide le Rosce – Mola tra le Vene", di superficie 67 ha), entrambi posti interamente all'esterno dei confini della Riserva.
- Il Parco Naturale Regionale dei Monti Lucretili ha un'estensione pari a 18.000 ha e ricomprende interamente quattro Siti RN2000 (IT6030029, IT6030030, IT6030031, IT6030032).

La sfida della conservazione di *B. pachypus* accomuna le tre Aree protette, sebbene la Riserva Naturale Regionale Monte Navegna e Monte Cervia possa già vantare la messa in pratica di virtuosi interventi diretti alla conservazione della specie, grazie alla partnership con il Dipartimento di Scienze di Roma Tre e con la Fondazione Bioparco di Roma.

Infatti, nella Riserva Naturale Regionale Monte Navegna e Monte Cervia a partire dal 2012 sono stati effettuati una serie di miglioramenti ambientali volti a garantire la permanenza dell'acqua nei siti riproduttivi, al fine di allungare la stagione riproduttiva della specie e scongiurare il più possibile la perdita di habitat idoneo. Nei due anni seguenti,

tuttavia, non sono stati osservati significativi incrementi demografici; pertanto, a partire dal 2014, è stato autorizzato un intervento di restocking, gestito dalla Fondazione Bioparco di Roma. Sono stati inizialmente rilasciati 67 giovani (20 nel 2014, 19 nel 2015, 16 nel 2016 e 12 nel 2017), ed al 2018 l'intervento aveva già permesso di raddoppiare la popolazione preesistente. I dati di monitoraggio evidenziano la presenza della specie in almeno 5 siti, sebbene di questi solo 3 si riferiscano a popolazioni riproduttive. Nel 2021 si è proceduto al rilascio di ulteriori 43 individui, di cui buona parte rilasciati in siti realizzati appositamente nelle vicinanze di uno dei siti riproduttivi già noti, con l'intento di favorire la connessione degli habitat ed incrementare le popolazioni; nello stesso anno è stata anche accertata la riproduzione in un nuovo sito umido appositamente creato durante il 2020.

Nel Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise sono noti 64 siti storici di presenza di *B. pachypus* distribuiti, seppur non uniformemente, in 18 Comuni. Negli ultimi 3 anni la presenza è stata riconfermata in soli 24 Siti (37% del totale) afferenti a 13 Comuni. Il fenomeno di rarefazione ha coinvolto tutte e tre le tipologie di habitat maggiormente colonizzate, ovvero pozze naturali, sorgenti e ruscelli (19 siti storici, di cui 13 riconfermati), fontanili (19 siti storici, di cui 7 riconfermati) ed aree paludose (13 siti storici, di cui 3 riconfermati). Pur non conoscendo le dinamiche genetiche in atto nel Parco, per popolazioni piccole ed isolate (Madsen et al., 1996; Hedrick e Kalinowski, 2000) è noto come gli effetti negativi da inbreeding tendano ad accumularsi naturalmente nel tempo (Ewing et al., 2008), provocando conseguenze rilevanti anche quando non vi è riproduzione fra parenti stretti. Allo stato attuale delle conoscenze è ipotizzabile, almeno per una parte delle popolazioni presenti, una fitness individuale ridotta da scarsa varietà allelica e/o da bassa eterozigosi.

Nel Parco Naturale Regionale dei Monti Lucretili sono noti appena 4 siti storici. In alcuni anni è stata accertata l'avvenuta riproduzione di queste piccole popolazioni, caratterizzate da un numero ridotto di individui adulti (meno di 10). Uno di questi siti è stato oggetto di introduzione (non autorizzata) di individui di origine alloctona appartenenti alla specie affine *Bombina variegata* (probabilmente provenienti dall'Albania). Questa popolazione risulta pertanto costituita per lo più da individui ibridi fra la forma nativa *B. pachypus* e l'esotica *B. variegata*.

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di migliorare lo status delle popolazioni di *B. pachypus* interne all'area di progetto, dando vita ad una strategia di conservazione di medio-lungo periodo che risulti efficace ed esportabile. Collateralmente si prevedono numerose ricadute positive, quali la sperimentazione di pratiche gestionali e di ricerca innovative, il networking fra diverse Aree protette, la creazione di protocolli di lavoro, la comunicazione con gli stakeholders, la nascita di nuovi percorsi didattici.

Gli obiettivi specifici del progetto sono riassunti di seguito:

- Aggiornare le conoscenze distributive sulla specie, sia effettuando un monitoraggio standardizzato di tutti i siti noti che ricercando nuovi siti sulla base dei risultati del monitoraggio e della mappatura su sistemi informativi geografici.
- Implementare le conoscenze della specie, caratterizzandone i tratti eco-etologici, genetici, fenotipici e sanitari. Si andranno anzitutto a definire i parametri ecologici che determinano la presenza o meno di individui riproduttivi in siti storici. Saranno inoltre applicate tecniche radiotelemetriche (per misurare la capacità di dispersione individuale) e valutata la fitness delle popolazioni con indagini di variabilità genetica e dello stato sanitario (con particolare riferimento all'incidenza di *B. dendrobatidis*). Sarà infine effettuata una caratterizzazione morfologica per comparare i tratti del fenotipo tra individui provenienti da siti diversi, al fine di evidenziare possibili interazioni tra condizioni ambientali, livelli di stress e stato di salute delle popolazioni.
- Uso delle conoscenze acquisite per individuare le popolazioni più idonee da cui attingere per effettuare azioni di ripopolamento e di captive breeding e restocking (secondo criteri che consentano il massimo utilizzo della diversità genetica ancora presente nelle popolazioni, limitando al contempo i processi demografici negativi associati a depressione da inincrocio).
- Incrementare l'areale di diffusione della specie, sia tramite ripristini ecologici che mediante interventi mirati di ripopolamento e restocking.
- Creare le basi per un networking fra i partner di progetto, producendo una specifica piattaforma digitale per la messa in rete dei dati di campo.
- Produrre un protocollo quale documento di riferimento per le attività gestionali mirate alla conservazione di *B. pachypus*, incentivando così la replicabilità delle migliori pratiche sperimentate nel corso del progetto.
- Formare personale interno, così da garantire la prosecuzione del monitoraggio classico e l'attuazione di misure gestionali anche a seguito della conclusione del progetto.
- Aumentare il livello di consapevolezza degli stakeholders (allevatori, agricoltori, associazioni, guide escursionistiche, scolaresche, turisti) effettuando incontri e producendo materiale divulgativo.

Produrre valore per il territorio, creando opportunità di lavoro per un numero congruo di operatori turistici che intendano svolgere attività didattiche e di sensibilizzazione sulle tematiche generali della biodiversità delle piccole