

SAVE THE TORTOISE

Indagine per la caratterizzazione morfologica, ecologica, clinica e genetica della popolazione di testuggine terrestre (Testudo hermanni) della Riserva Naturale Orientata Dune Fossili di Massenzatica (Ferrara).

Stefano Mazzotti,¹ Daniele Maccapani,¹
Emanuele Lubian,² Roberto Biello,³ Silvia Fuselli,³
Annalaura Mancia,³ Giorgio Bertorelle.³

1. Museo Civico di Storia Naturale, Ferrara

2. Ospedale Veterinario Universitario Piccoli Animali, Università degli Studi di Milano

3. Dipartimento di Scienze della Vita e Biotechnologie, Università degli Studi di Ferrara



Sommario

1	Proposta di ricerca	3
1.1	Titolo	3
1.2	Personale coinvolto	3
1.3	Riassunto	3
1.4	Contesto scientifico	3
1.5	Descrizione e Metodologie della Ricerca	4
1.6	Descrizione degli Interventi per la Conservazione	5
1.7	Obiettivi	7
1.8	Strumenti disponibili e/o da acquisire	7
1.9	Prodotti attesi e tempistica	8
1.10	Programma di raccolta, conservazione e gestione di dati e reperti	8
1.11	Programma di formazione e divulgazione	8
1.12	Bibliografia essenziale	9
2	Attività	11
3	Budget	13

1 Proposta di Ricerca

1.1 Titolo:

SAVE THE TORTOISE:

Indagine per la caratterizzazione morfologica, ecologica, clinica e genetica della popolazione di testuggine terrestre (*Testudo hermanni*) della Riserva Naturale Orientata Dune Fossili di Massenzatica (Ferrara).

1.2 Personale coinvolto

Dr Stefano Mazzotti, Direttore, Museo di Storia Naturale, Slargo Florestano Vancini 2, 44100 Ferrara, Italia, Coordinatore.

Lo studio verrà effettuato da ricercatori dell'Università di Ferrara (Responsabile: Dr Mancia Annalaura; Prof. Giorgio Bertorelle; Dr Roberto Biello), del Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara (Responsabile: Dr Mazzotti Stefano) e dell'Ospedale Veterinario Universitario di Lodi (Dr Emanuele Lubian), con la collaborazione della guida naturalistica della R.N.O. Dune Fossili di Massenzatica (Dr Maccapani Daniele).

1.3 Riassunto

Il progetto prevede lo sviluppo di un quadro di conoscenze sulla distribuzione e lo stato di salute delle popolazioni di testuggini che abitano le Dune Fossili di Massenzatica, di cui, ad oggi, non si ha informazione alcuna. Le testuggini verranno ricercate nelle ore di maggiore attività, catturate manualmente, misurate, sessate e fotografate in modo da evidenziare le caratteristiche individuali e l'identificazione a livello di sottospecie. Inoltre, verrà effettuato uno screening sullo stato di salute generale della popolazione attraverso esami ematologici, virologici, parassitologici e microbiologici. Infine tutti gli individui campionati verranno tipizzati a livello genetico per ricostruire l'origine di questa piccola popolazione, stimare il grado di somiglianza con popolazioni vicine già studiate (per esempio, Bosco Mesola), e identificare la possibile presenza di animali alloctoni e di recente introduzione.

1.4 Contesto Scientifico

La testuggine terrestre comune o testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*) è un'entità mediterranea centro settentrionale-balcanica, diffusa lungo i territori costieri dell'Europa mediterranea (Penisola Iberica settentrionale, Francia meridionale, Italia), in varie isole mediterranee, nei Balcani a sud-est del Danubio fino alla Turchia europea (Bour, 1997). Le popolazioni italiane rappresentano il 5-24 % del totale della specie nell'intero areale (Calvario & Sarocco, 1997). Si riconoscono due sottospecie a livello genetico (Perez et al. 2014; Biello et al. 2018): *T. h. boettgeri* Mojsisovics, 1889 diffusa nella parte orientale dell'areale, dai Balcani all'Italia nord orientale; *T. h. hermanni* forma occidentale presente anche nel resto dell'Italia continentale e nelle isole maggiori.

La distribuzione italiana di questa specie è stata indagata a livello locale nell'ambito di vari progetti di mappatura o di ricerche ecologiche riguardanti l'erpetofauna (Pozio & Frisenda, 1980; Bellavere et al. 1984; Caputo et al., 1985; Caputo & Guarino, 1992; Caputo & Guarino, 1993; Tripepi et al., 1993; Aprea, 1996; Turrise & Vaccaro, 1997; Jesu, 1994;

Lapini et al., 1999; Mazzotti et al., 1999; Mazzotti, 2004; Mazzotti et al., 2007; Mazzotti et al., 2002).

L'areale di distribuzione si sviluppa nella porzione peninsulare soprattutto lungo il versante tirrenico, in particolare nella Toscana centro meridionale e nel Lazio dove rimangono le popolazioni vitali più consistenti. Nel nord-est la testuggine comune è ormai scomparsa essendo presente esclusivamente nel delta del Po nel Bosco della Mesola e a Santa Giustina. In alcune località rimangono solo sporadici ritrovamenti come nel ravennate, nelle zone costiere del Veneto e del Friuli Venezia Giulia.

L'opera di monitoraggio della specie sarebbe una importante aggiunta alla conoscenza della biodiversità in questa area protetta e offrirebbe possibilità di maggiore controllo sulla specie per la conservazione delle eventuali popolazioni presenti.

La testuggine di Hermann ha risentito pesantemente della manipolazione da parte dell'uomo delle caratteristiche degli ambienti in cui vive. In particolare le coste settentrionali del Mediterraneo sono state ampiamente rimaneggiate e gli habitat naturali elettivi di questa specie quali boschi litoranei, le macchie mediterranee, le dune costiere ecc., sono stati distrutti e sostituiti da una urbanizzazione in ampie porzioni di territorio. Oltre a questo, un ruolo assai pesante fra le cause di depauperamento delle popolazioni sono gli incendi, le moderne tecniche agricole che comprendono lavorazioni intensive e uso massiccio di biocidi e il prelievo in natura per il commercio di esemplari per l'allevamento domestico. Impatto negativo è svolto anche dal cinghiale, introdotto per scopi venatori in varie zone della penisola italiana, che preda uova e giovani. Infine, le massicce introduzioni illegali di animali di origine balcanica avvenute negli anni '70, venduti come animali da compagnia e spesso (ancora oggi) rilasciati in natura, minacciano l'integrità genetica delle rare popolazioni naturali della costa italiana del Mar Adriatico.

La specie è protetta da leggi nazionali in Bulgaria, Francia, Spagna; in Italia da leggi regionali fra le quali la Legge regionale n.15/2006 "Disposizioni per la tutela della fauna minore in Emilia-Romagna". Il Commercio internazionale è regolamentato dalla Convenzione di Washington (App. II., C1) recepita dall'Italia con Legge n. 874 del 9/12/1975. La Convenzione di Berna recepita dall'Italia con legge n. 503 del 5/8/1981 la include fra le specie rigorosamente protette. La Direttiva CEE 92/43 inserisce questa specie tra quelle di interesse comunitario (Allegato II Direttiva Habitat). A livello globale, *T. hermanni* è inserita nella lista rossa delle specie prossime alla minaccia (Near Threatened, IUCN Red List of Threatened Species) e nella categoria "In Pericolo" (Endangered) nella Lista Rossa italiana, con numero di individui in declino (www.iucn.it/scheda.php?id=549909916). È dunque necessaria l'istituzione di aree protette, riserve naturali e parchi ove possano essere attuati piani di salvaguardia delle popolazioni autoctone con interventi di incremento numerico ove esistano situazioni di degrado o depauperamento.

1.5 Descrizione e Metodologie della Ricerca

Le testuggini verranno ricercate nelle ore di maggiore attività, catturate manualmente, misurate, sessate e fotografate in modo da evidenziare le caratteristiche individuali e l'identificazione a livello di sottospecie. L'identificazione avverrà grazie al riconoscimento di determinate caratteristiche:

- i) dimensione (*T. h. boettgeri* presenta mediamente dimensioni maggiori, nelle femmine la lunghezza massima del carapace può superare i 200 mm, nei maschi fino a 150 mm; *T. h. hermanni* la lunghezza massima è di 171 mm per le femmine e di 148 mm per i maschi);
- ii) forma del carapace (silhouette trapezoidale) in *T. h. boettgeri* ed ovoidale in *T. h. hermanni*. Quest'ultima presenta una colorazione più vivace e il piastrone è ornato da bande nere longitudinali simmetriche, molto nette ed evidenti al contrario della forma orientale che ha striature generalmente frammentate e sfumate, la sutura pettorale è più corta della sutura femorale (Cheylan, 1981; 1984);
- iii) analisi genetica. Quest'ultima verrà effettuata da campioni di sangue che verranno prelevati da personale veterinario esperto dal seno venoso post-occipitale.

Gli animali verranno marcati con impianto di microchip per marcatura individuale. Inoltre, verrà effettuato uno screening sullo stato di salute generale della popolazione attraverso esami ematologici, virologici, parassitologici e microbiologici.

L'esame ematologico consisterà nella stima del valore di globuli rossi e di globuli bianchi nel sangue di ogni soggetto, indicatori base dello stato di salute, e nel valutare l'eventuale presenza di emoparassiti. Col siero, ottenuto dal medesimo prelievo, verrà effettuata la ricerca di anticorpi nei confronti di herpesvirus. L'esame parassitologico sarà effettuato mediante le metodiche "striscio a fresco" e mini-flotac successivamente alla raccolta di materiale fecale (emesso durante il contenimento o tramite l'effettuazione di lavaggi cloacali); tale esame consente di indagare la parassitofauna della popolazione esaminata per valutare le specie di parassiti presenti nell'area e per discriminare gli stati di infestazione/infezione asintomatica dagli stati di vera e propria malattia parassitaria.

L'esame microbiologico sarà effettuato tramite coltura di tamponi provenienti dal cavo orale e dalla cloaca dei soggetti catturati, tale esame potrà evidenziare eventuali microrganismi patogeni, o possibili commensali, presenti nella popolazione; tale valutazione potrà anche indicare la salubrità dell'ambiente e le possibili implicazioni sulla salute pubblica.

Le analisi genetiche verranno effettuate mediante estrazione di DNA, amplificazione di marcatori molecolari diagnostici, genotipizzazione, e confronto con database di riferimento già disponibile che include i genotipi di individui campionati in natura e in cattività in diverse aree italiane e europee (Perez et al. 2014; Biello et al., 2018).

È stata inoltrata la richiesta al Ministero dell'Ambiente (Direzione Protezione della Natura e del Mare) e all'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) dei permessi necessari per la manipolazione degli animali selvatici in loco è in corso (Autorizzazione per attività finalizzate al monitoraggio ai sensi dell'Art. 7 comma 2).

1.6 Descrizione degli Interventi per la Conservazione

All'interno della Riserva proponiamo l'installazione di uno spazio riproduttivo controllato (*Captive breeding*) per la di Testuggine di Hermann, indispensabile contributo ad azioni di salvaguardia e conservazione della popolazione.

Questo progetto comprende la costruzione, presso il centro visite, di un recinto per mantenimento temporaneo degli individui oggetto di studio. La finalità, oltre a quella di custodire esemplari rinvenuti durante l'orario di apertura del centro affinché possano essere inclusi nel progetto di monitoraggio e esaminati dai ricercatori nei giorni immediatamente successivi, è quella di istituire un sito riproduttivo controllato per incrementare la popolazione delle Dune.

Ciò è giustificato da situazioni potenzialmente critiche che potrebbero rendere vulnerabile questa popolazione: 1) età media molto elevata; 2) scarso successo riproduttivo dovuto a pressione predatoria, soprattutto sulle uova che potrebbe produrre un serio problema di decadimento e quindi di estinzione della stessa; 3) densità della popolazione dipendente da situazioni ambientali avverse.

Per salvaguardare la presenza di questa testuggine all'interno della Riserva è auspicabile la disposizione di un recinto ove poter allevare temporaneamente alcuni riproduttori provenienti dalla Riserva stessa e poter seguire la deposizione delle uova e la nascita delle giovani testuggini. La costituzione di "nursery" all'interno della Dune è indispensabile per il potenziamento della popolazione. Per ottenere buoni risultati è necessario allevare in cattività le giovani testuggini fino all'età di 3-4 anni quando raggiungono le dimensioni adatte alla liberazione. Esperienze decennali in altri Paesi europei hanno infatti dimostrato che per la riuscita di un progetto di reintroduzione di testuggini occorre ridurre al massimo i fattori di minaccia, rispettare tutte le necessità della sua biologia e comportamento e disporre di un elevato numero di "fondatori" adulti e giovani.

Caratteristiche del recinto. La collocazione del recinto sarà nei pressi del Centro visite della Riserva, in posizione facilmente accessibile e figurerà come centro di attrazione per i visitatori della Riserva che potranno osservare direttamente esemplari di testuggini. Il recinto avrà valenza educativa e didattica per le scuole e sarà supportato da una adeguata cartellonistica esplicativa. Le dimensioni totali del recinto saranno di 10 x 5 m, avrà una recinzione costituita da rete in acciaio, inserita nel suolo fino a una profondità 50 cm. Il recinto dovrà essere munito da una copertura in rete per evitare intrusioni di predatori, l'accesso sarà assicurato da una porta in rete a chiusura ermetica. L'interno del recinto avrà tre separazioni in rete per la stabulazione di esemplari maschi, femmine e dei giovani nati in cattività (Fig. 1). La vegetazione del recinto sarà quella naturale. Sarà necessario munire i tre settori di abbeveratoi, il cibo da fornire agli animali sarà prevalentemente prelevato direttamente nelle dune (erbe varie), con aggiunta di frutta (per indicazioni sull'alimentazione in cattività si suggerisce https://www.slideshare.net/Rosario5587/tabelle-alimentazione-testuggini?fbclid=IwAR3c5BvmHfY_x1ykbG6DtdQqa_Ru1_y-JyW3yQ7nEoBEQPXS5pXQaOI4j5E).

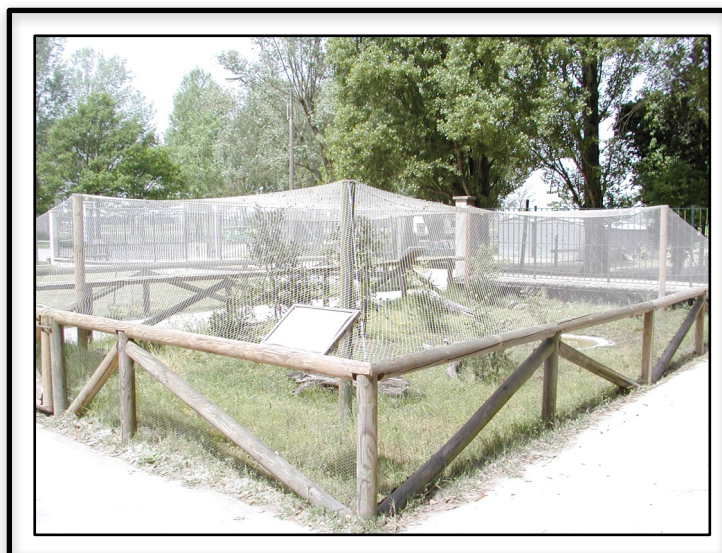


Figura 1. Modello di recinto

I riproduttori (al massimo 2 maschi e 4 femmine) saranno prelevati nella Riserva (Aprile-Maggio), collocati temporaneamente nel recinto, e tipizzati geneticamente per escludere animali alloctoni (da escludere dalla riproduzione). Gli animali adatti saranno poi rilasciati in libertà nella Riserva dopo gli accoppiamenti e le deposizioni. Per incrementare numericamente la popolazione i giovani nati nel recinto saranno poi reimmessi nella Riserva all'età di 3-4 anni. L'istituzione in parchi e riserve di questi dispositivi di riproduzione controllata sono la soluzione migliore per costituire un serbatoio di esemplari utili alla conservazione della popolazione (Mazzotti, 2007).

1.7 Obiettivi

Il fine ultimo del progetto di ricerca è quello di sviluppare un quadro completo di conoscenze sulla distribuzione e lo stato di salute della popolazione di testuggini che abitano le Dune al fine di garantirne la protezione, la salvaguardia e la conservazione.

Obiettivi specifici sono:

1. Censimento delle popolazioni di *T. hermanni* (e sottospecie) presenti nella Riserva Naturale Dune Fossili di Massenzatica.
2. Identificazione tramite caratterizzazione morfologica e genetica degli esemplari residenti.
3. Caratterizzazione ecologica e clinica dello stato di salute delle testuggini campionate.
4. Valutazione della salubrità dell'ambiente e possibili implicazioni sulla salute pubblica.

1.8 Strumenti e reagenti disponibili e/o da acquisire

Morfologia/ecologia popolazione

Da acquisire: N. 1 bilancia digitale, 1 termometro digitale, n. 200 microchip per marcatura e n. 2 radiolettori, n. 1 calibro digitale, 1 termo-igrometro per rilevazioni parametri ambientali.

Genetica

Disponibili: Termociclatore e Primers

Da acquisire: DNeasy Blood & Tissue Kit per estrazione di DNA, enzimi per la reazione di amplificazione per genotipizzazione

Clinica

Da acquisire: n. 100 Provette per sierologia, n. 100 provette Ca EDTA, n. 100 contenitori per materiale coprologico, n. 100 tamponi con terreno di trasporto

Dettagli su reagenti e costi sono specificati in *Tabella 1*, parte 3 (Budget).

1.9 Prodotti attesi e tempistica

Tramite il raggiungimento degli obiettivi proposti, il principale prodotto del progetto sarà la una valutazione ecologica, clinica e genetica delle popolazioni di testuggini residenti nella R.N.O. Dune Fossili di Massenzatica. Fra i prodotti è previsto i) aggiornamento su abbondanza di specie e sottospecie nella Regione Emilia Romagna; ii) descrizione di eventuale accrescimento (o riduzione) delle popolazioni nel tempo; iii) identificazione di parametri clinici da utilizzare con futuri valori referenza.

Il progetto si svolgerà **nell'arco del quinquennio 2020-2024**, come descritto dettagliatamente in 2 (Attività).

1.10 Programma di raccolta, conservazione e gestione dei dati e reperti

Dati ed immagini verranno raccolti in un database elettronico conservato al Museo Civico di Storia Naturale e presso il Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie dell'Università di Ferrara. I campioni di sangue verranno mantenuti presso i laboratori di biologia cellulare della sezione di Anatomia Comparata e citologia dell'Università di Ferrara, mentre eventuali ritrovamenti di carcasse verranno conservati al Museo di Storia Naturale. Dati e risultati saranno accessibili alla comunità scientifica e non, previa richiesta di autorizzazione motivata al personale competente.

1.11 Programma di formazione e divulgazione.

I dati raccolti verranno pubblicati in riviste di interesse zoologico e di conservazione e presentati a seminari presso il Museo Civico di Storia Naturale e convegni mirati (es. Congresso Nazionale di Testuggini e Tartarughe; Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica). Inoltre le informazioni verranno diffuse tramite coinvolgimento di studenti della Laurea triennale in Scienze biologiche e della Laurea Magistrale di Scienze Biomolecolari e dell'Evoluzione dell'Università di Ferrara e della Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria dell'Università di Milano.

Per supportare tale progetto è auspicabile lo sviluppo di supporti didattici illustranti le caratteristiche e lo status della Testuggine comune e gli scopi del dispositivo al fine di promuovere l'iniziativa verso il pubblico con particolare riguardo all'utenza scolastica e ai turisti (Fig. 2-3).

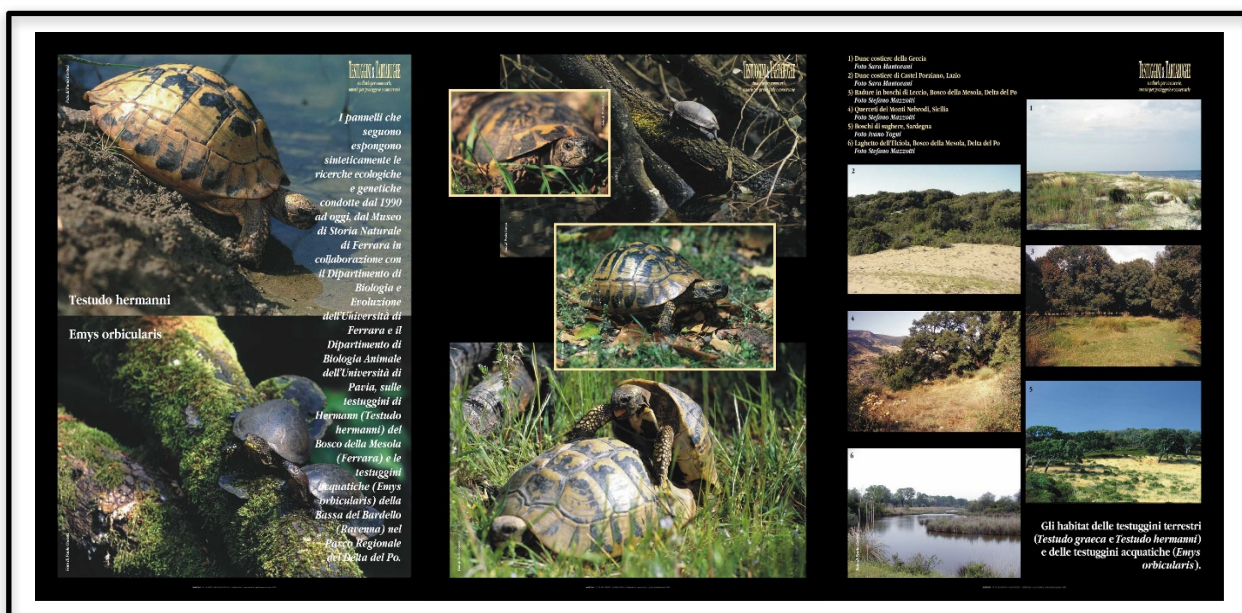


Figura 2. Modelli di cartellonistica didattica.



Figura 3. Attività didattiche e educative sulla conservazione della biodiversità e sulle testuggini.

1.12 Bibliografia essenziale

BIELLO R., ZAMPIGLIA M., CORTI C. ET AL., 2018 - Who's who in the western Hermann's tortoise conservation: a STR toolkit and a reference database for wildlife forensic genetic analyses. bioRxiv. Forensic Science International: Genetics, Under review.

BOUR R., 1997 - *Testudo hermanni* in: GASC et al. (Eds.) - Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Societas Europaea Herpetologica & Museum National d'Histoire Naturelle (IEGB/SPN), Paris, 496 pp.

CAPUTO V. & GUARINO F.M., 1992 - L'erpetofauna del Cilento. Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Storia Nat. Milano. 132, 22: 273-292.

- CAPUTO V. & GUARINO F. M., 1993 - Primo contributo per la realizzazione dell'Atlante erpetologico della Campania. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina, 21: 393-406.
- CAPUTO V. KALBY M. & DE FILIPPO G., 1985 - Gli Anfibi e i Rettili del Massiccio degli Alburni. Natura. Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Storia Nat. Milano. 76(1-4): 94-104.
- CHEYLAN M., 1981 - Biologie et écologie de la Tortue d'Hermann (*Testudo hermanni* Gmelin, 1789). Contribution de l'espèce à la connaissance des climats quaternaires de la France. Ecologie Pratique Hautes Etudes, Mémoires et Travaux Institut Montpellier, 11: 404 pp.
- CHEYLAN M., 1984 - The true status and future of Hermann's Tortoises *Testudo hermanni robermentensi* Wermuth 1952 in Western Europe. Amphibia-Reptilia, 5(1): 17-26.
- JESU R., 1994 - Testuggine comune in: DORIA G. & SALVIDIO S., Atlante degli Anfibi e Rettili della Liguria. Regione Liguria, Cataloghi dei Beni Naturali, 149 pp.
- LAPINI L., DALL'ASTA A., BRESSI N., DOLCE S. & PELLARINI P., 1999 - Atlante corologico degli Anfibi e dei Rettili del Friuli-Venezia Giulia. Ed. Museo Friulano di Storia Naturale, 43.
- MAZZOTTI S., CARAMORI G. & BARBIERI C., 1999 - Atlante degli Anfibi e dei Rettili dell'Emilia- Romagna. Quad. Staz. Ecol. civ. Mus. St. nat. Ferrara, 12: 121 pp.
- MAZZOTTI S., PISAPIA A., FASOLA M., 2002 - Activity and home range of *Testudo hermanni* in northern Italy. AMPHIBIA-REPTILIA, vol. 23, p. 305-312, ISSN: 0173-5373
- MAZZOTTI S., BERTOLUCCI C., FASOLA M., LISI I., PISAPIA A., GENNARI R., MANTOVANI S., VALLINI C., 2007 - La popolazione della testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*) del bosco della Mesola. QUADERNI DELLA STAZIONE DI ECOLOGIA DEL CIVICO MUSEO DI STORIA NATURALE DI FERRARA, vol. 17, p. 91-104, ISSN: 0394-5782
- MAZZOTTI S., 2004 - The Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*): current distribution in Italy and ecological data on a population from the N Adriatic coast. THE ITALIAN JOURNAL OF ZOOLOGY, vol. 1, p. 97-102, ISSN: 1125-0003
- PEREZ M., LIVOREIL B., MANTOVANI S. et al., 2014 - Genetic variation and population structure in the endangered Hermann's tortoise: the roles of geography and human-mediated processes, Journal of Heredity, 105: 70-81.
- POZIO E. & FRISENDA S., 1980 - Gli Anfibi e i Rettili della Regione Puglia. Atti VII Simposio nazionale sulla conservazione della Natura, pp.233-257. Cacucci, Bari
- TRIPEPI S., ROSSI F. & TRECROCI T., 1993 - Situazione dell'erpetofauna in Calabria con particolare riguardo alle specie minacciate. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina, 21: 407-413.
- TURRISI G.F. & VACCARO A., 1997 - Contributo alla conoscenza degli Anfibi e dei Rettili di Sicilia. Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat., 30 (353): 5-88.

2 Attività

Sito di Studio. Il sito di studio è rappresentato dalla Riserva Naturale Regionale Dune Fossili di Massenzatica che si trova nel Comune di Mesola (Fe) e, in piccola parte, nel Comune di Codigoro (Fe). Rientra nel Sito d'Importanza Comunitaria (SIC IT4060010) Zona di Protezione Speciale (ZPS IT4060010) «Dune di Massenzatica». Le Dune Fossili di Massenzatica sono antichi cordoni dunosi litoranei databili all'incirca al IX secolo a.C., che ora si trovano nell'entroterra per via dell'avanzamento verso est della linea costiera, causato dal graduale accumulo di depositi alluvionali. Questo antico litorale corrisponde alla linea di costa pre-etrusca che, da Ravenna, passava per le attuali località Argine Agosta, Marozzo, Ponte Maodino, S. Basilio proseguendo verso nord sino a Chioggia. A Massenzatica e S. Basilio le dune erano particolarmente elevate (massimo 7 m s.l.m.) e quindi sono ancora oggi ben visibili.

Le Dune ricoprono oggi una superficie di circa 50 ettari e si estendono, per 1.500 m circa, in direzione nord-sud con una larghezza media di 400 m. La presenza di terreno sabbioso molto permeabile determina, nel periodo estivo, condizioni di notevole aridità, per questo l'area è dominata da una tipica vegetazione erbacea xerofila, soprattutto sulla sommità delle dune. La specie dominante è una piccola graminacea, la codolina delle spiagge (*Phleum arenarium*), specie compagne sono la silene (*Silene conica*) e la peverina annuale (*Cerastium semidecandrum*). Nelle depressioni interdunali è presente una vegetazione arbustiva più fitta e varia costituita per la maggior parte da rovi (*Rubus* spp.) e, nelle depressioni più umide, da fitti popolamenti di felce aquilina (*Pteridium aquilinum*). Lungo il percorso naturalistico interno si può notare una farnia monumentale (*Quercus robur*). Alcuni punti del sito sono infestati da specie alloctone, quali l'ailanto, la robinia e lo spino di Giuda. Sono presenti 3 habitat di interesse comunitario, dei quali uno prioritario, che coprono il 40% della superficie del sito, con tipi dunali di prateria arida sabbiosa: dune fisse a vegetazione erbacea (dune grigie), prati dunali di Malcomietalia, lande secche (tutti i sottotipi). Sono presenti specie rare e minacciate quali *Kochia arenaria* e *Scabiosa argentea*. La prateria che cresce sulle dune è compatta sui colmi pianeggianti, rotta e a carattere pioniero sui dossi in pendenza, a prevalenza di graminacee che tendono al disseccamento estivo. Sui muschi colonizzatori della sabbia nuda poggiano i talli di licheni fogliosi e fruticosi (*Cladonia* spp.), che per primi colonizzano il substrato in condizioni di vita pressoché proibitive. Sono diverse le particolarità, a cominciare dal Panico articolato (*Corynephorus divaricatus*), una psammofila strettamente mediterranea che nella Riserva raggiunge il limite settentrionale del suo areale di distribuzione. La prateria accoglie bassi cuscinetti di suffrutici, con fusti lignificati alla base spesso contorti e prostrati, tra cui il raro camedrio polio (*Teucrium polium*). Tra le rarità botaniche è da segnalare infine il romice con frutto rinchiuso (*Rumex angiocarpus*), un'erbacea tipica dei suoli sabbiosi leggermente acidi. Sono presenti anche densi popolamenti di felce aquilina.

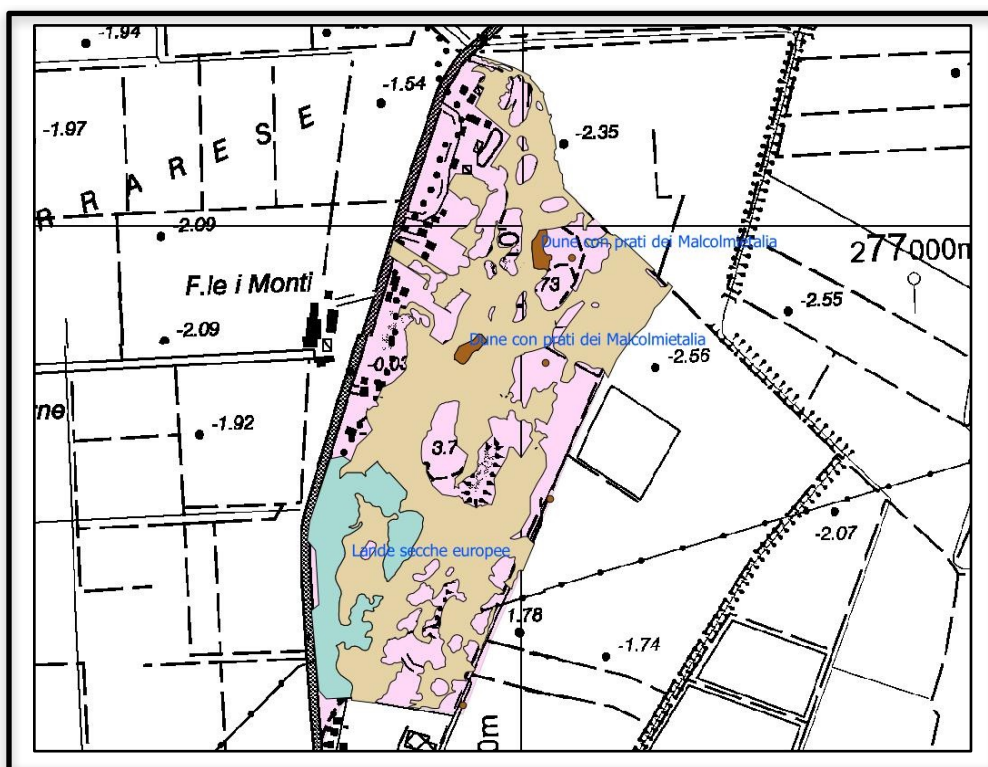


Figura 4. Mappa della Riserva Naturale Regionale Dune Fossili di Massenzatica

Periodo di realizzazione. Cinque anni di indagine nei periodi di attività di questa specie (marzo-ottobre) dal 2020 al 2024. Nello specifico per ogni anno si prevedono 2 attività di campionamento in primavera e 2 in autunno per un totale di 4 giornate di campionamento. Lo scopo dei campionamenti sarà specifico per ogni anno.

Tempistiche e azioni per anno.

1. 2020. Il primo anno di campionamento servirà per acquisire una stima del numero di animali, ottenendo il maggior numero di dati possibile in modo da avere informazioni reali riferite al numero di esemplari per sottospecie, sesso, maturità, stato di salute.
2. 2021. Nel secondo anno e terzo anno si cercherà di aumentare il numero di animali campionati per ottenere un pannello di valori di riferimento sia morfologici che ematici, pratici nell'identificazione futura di outliers e anomalie.
3. 2022. Alla conclusione del terzo anno verrà fatta la valutazione dello stato della popolazione di *T. hermanni* residenti nella R.N.O. Dune Fossili di Massenzatica.
4. 2023. Il quarto anno sarà rivolto, oltre alla cattura di nuovi esemplari, ad un nuovo campionamento di animali già esaminati in precedenza (ri-catture). La precedenza verrà sempre data a quegli animali che hanno presentato quadri clinici alterati o evidenti patologie.
5. 2024. Valutazione delle condizioni della specie e sottospecie (crescita e/o diminuzione) e stima dell'andamento sulla base delle variazioni osservate nel quinquennio.

3 Budget

Il costo totale è stato valutato considerando approssimativamente 4 giornate di campionamento (2 in primavera e 2 in autunno)/anno per 5 anni e un numero di animali analizzati tra 50 e 100.

Tabella 1. Costi relativi a personale, strumenti/reagenti per tipo di analisi.

Veterinario e Personale	Prelievo sangue, impianto di RFID per marcatura individuale, valutazione stato di salute generale, pesatura e principali variabili morfometriche, eventuale raccolta di tamponi cloacali e buccali.	1500 Euro
Analisi morfologica, marcatura e ecologia di popolazione	N. 1 bilancia digitale, 1 termometro digitale, n. 200 microchips per marcatura e n. 2 radiolettori, n. 1 calibro digitale, 1 termigrometro per rilevazioni parametri ambientali.	2500 Euro
Analisi genetiche	Estrazione di DNA (DNeasy Blood & Tissue Kit); amplificazione regioni di interesse (7 marcatori nucleari: 7 reazioni di PCR, una per ogni locus, con primers marcati per marcatori nucleari, pulizia enzimatica con ExoSAP, controllo su gel di agarosio); genotipizzazioni (elettroforesi di frammenti entrambi con sequenziatore automatico a capillare).	4000 Euro
Analisi cliniche	Visita clinica di tutti i soggetti; quadro ematico completo con emocromo e conta leucocitaria differenziale. Analisi emoparassitologica e coproparassitologica, analisi microbiologica completa e indagine sierologica per herpesvirus.	4000 Euro
TOTALE		10200 Euro

Non sono contabilizzati i costi di trasferimento per i sopralluoghi per le battute di cattura, misurazione e marcatura degli animali, quelli associati al mantenimento dei campioni a -20 gradi centigradi, i costi di ammortamento degli strumenti del laboratorio di biologia molecolare, e tutti i costi associati al personale universitario che svolgerà le analisi in laboratorio e statistiche dei dati. Questi costi sono a carico del gruppo di ricerca della Dott. Mancia e del Prof. Giorgio Bertorelle.