



Cofinanziato dall'Unione europea



# Piano di Gestione Integrato per la conservazione di *Emys orbicularis*

Coordinatore beneficiario



Beneficiari associati





Cofinanziato  
dall'Unione europea



# LIFE URCA PROEMYS

URgent Conservation Actions *pro Emys orbicularis*  
in Italy and Slovenia

Work Package 2

## PIANO DI GESTIONE INTEGRATO PER LA CONSERVAZIONE DI *EMYS ORBICULARIS*

2023

Coordinatore  
beneficiario

Beneficiari  
associati



# **PIANO DI GESTIONE INTEGRATO PER LA CONSERVAZIONE DI *EMYS ORBICULARIS***

## **A cura di:**

Andrea Agapito Ludovici, Saro Aiello, Gianluca Catullo, Claudio Ciofi, Matteo Dal Zotto, Sara Fratini, Guido Gnone, Fabrizio Oneto, Dario Ottonello, Valentina Parco, Iztok Škornik, Antonio Todaro, Ana Tratnik, Bruna Valettini, Marco Alberto Luca Zuffi

## **Hanno inoltre collaborato:**

Anna Alonzi, Tina Bakič, Paola Balboni, Matilde Boschetti, Riccardo Cavalcante, Stefania D'Angelo, Emma De Paoli, Nicola Ferrari, Vincenzo Ferri, Ernesto Filippi, Valerio Fioravanti, Alessio Franciosi, Piero Genovesi, Petra Hladnik, Alessio Iannucci, Gregor Lipovsek, Andrea Morisi, Johnny Nardi, Fausto Minelli, Davide Nespoli, Giuliano Pozzi, Isabella Pratesi, Lorenzo Stefani

## **Si ringraziano:**

Margherita Abbà, Remo Bartolomei, David Bianco, Giovanni Bombieri, Giacomo Bruni, Marco Carafa, Christian Cavalieri, Stefano Cannicci, Andrea Cerverizzo, Gianluca Cirelli, Annarita Colucci, Antonio Colucci, Andrea Corlenghi, Sandra Colombo, Giosuè Cuccurullo, Gianfrancesco D'Ambrosio, Ornella De Curtis, Emma De Paoli, Andrea Dellai, Luciano Di Tizio, Silvia Fiore, Alessio Franciosi, Alessandro Fuochi, Giulia Gagliardi, Giovanni Galluzzo, Giacomo Gasparini, Claudia Gili, Alessandro Giovannozzi, Marco Gottardi, Cristian Gori, Paolo Laghi, Remigio Lenza, Mirko Liuzzo, Simona Macchi, Tiziana Mattioli, Milo Manica, Silvia Messori, Fausto Minelli, Maurizio Minora, Francesca Montioni, Amanda Moretti, Barbara Morgan, Andrea Rosario Natale, Erika Ottone, Stefano la Padula, Andrea Pataro, Raffaello Pellizzon, Paolo Perlasca, Camilla Pedrazzini, Vito Petragallo, Anna Rampa, Jacopo Richard, Matteo Ruocco, Francesca Santicchia, Carlo Scocciati, Daniele Seglie, Cristiano Spilinga, Noemi Spagnoletti, Cristiano Spinea, Fabio Suppini, Giancarlo Tedaldi, Anna Tedesco

**In memoria del prof. Luigi Sala che ha partecipato con passione  
alla costruzione del LIFE URCA PROEMYS ma che ci ha lasciato troppo presto**

# Sommario

<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>IL PIANO DI GESTIONE INTEGRATO PER LA CONSERVAZIONE DI <i>EMYS ORBICULARIS</i></b> .....	2
<b>SCHEDE SPECIE</b> .....	4
<b>A. TIPOLOGIE DI INTERVENTO E MISURE DI CONSERVAZIONE</b> .....	7
<b>A.1. HABITAT</b> .....	7
<b>A.2. HABITAT di <i>Emys orbicularis</i></b> .....	8
<b>A.3. INTERVENTI DI HABITAT RESTORATION</b> .....	9
A.3.1. Creazione di nuovi specchi d'acqua .....	12
A.3.2. Realizzazione di strutture semi-naturali come rifugi temporanei e/o permanenti per <i>Emys orbicularis</i> e per la piccola fauna autoctona .....	17
A.3.3. Realizzazione di opere idrauliche ausiliarie per il controllo idrico (sistemi di regolamentazione idraulica) .....	20
A.3.4. Ripristino di un ex sito minerario e creazione di un habitat adatto alle testuggini .....	21
A.3.5. Costruzione di barriere (recinzioni) per impedire l'intrusione di predatori o ungulati ..	24
A.3.6. Creazione di una barriera per prevenire la predazione dei nidi da parte dei predatori.	25
<b>A.4. PROCEDURE</b> .....	27
A.4.1. Verifica titolarità dell'area.....	27
A.4.2. Vincoli ambientali.....	28
A.4.3. Vincolo paesaggistico.....	29
A.4.4. vincolo idraulico. ....	29
A.4.5. valutazione preliminare del rischio bellico residuo.....	30
A.4.6. formulario standard.....	32
A.4.7. normative in favore della rinaturazione .....	32
<b>B. RINFORZO POPOLAZIONI (RE STOCKING) - GENETICA</b> .....	34
<b>B.1. INTRODUZIONE</b> .....	34
<b>B.2 OBIETTIVI DELLE ANALISI GENETICHE</b> .....	35
<b>B.3 CAMPIONAMENTO</b> .....	37
<b>B.4 ANALISI GENETICHE</b> .....	39
B.4.1. Purificazione del DNA.....	39
B.4.2 Caratteristiche del DNA mitocondriale come marcatore molecolare.....	40
B.4.3. Reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction -PCR) per l'amplificazione di una porzione parziale della regione di controllo del DNA mitocondriale .....	41
B.4.4 Reazione di terminazione a catena o sequenziamento ciclico dei prodotti PCR.....	43
B.4.5. Risoluzione dei prodotti di sequenziamento ciclico mediante elettroforesi capillare ...	44
B.4.6. Caratteristiche dei loci microsatelliti come marcatori molecolari .....	46
B.4.7. Caratteristiche dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) come marcatori molecolari	49
<b>B.5 ANALISI STATISTICHE</b> .....	51
B.5.1. Analisi di diversità del DNA mitocondriale .....	51
B.5.2. Analisi di divergenza del DNA mitocondriale.....	52
B.5.3. Analisi di diversità allelica a loci microsatelliti .....	53
B.5.4. Assegnazione di individui di origine ignota alle popolazioni geneticamente simili .....	54
B.5.5. Analisi di parentela .....	55
<b>C. CENTRI DI RIPRODUZIONE E MANTENIMENTO DI <i>EMYS ORBICULARIS</i> LIFE URCA PROEMYS</b>	59
<b>C.1. CARATTERISTICHE DEI CENTRI DI RIPRODUZIONE E ALLEVAMENTO (REQUISITI MINIMI).</b>	59
Stabulario outdoor.....	59
Stabulario indoor .....	60

<b>D. CRITERI DI IDONEITA' PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE AREE IDONEE AL RESTOCKING DI <i>E. ORBICULARIS</i> PROVENIENTI DALLA CATTIVITÀ</b> .....	62
<b>D.1. SCHEDA CRITERI DI IDONEITA' PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE AREE IDONEE AL RESTOCKING DI <i>E. ORBICULARIS</i> PROVENIENTI DALLA CATTIVITÀ</b> .....	63
<b>D.2 LISTA PRELIMINARE DEI SITI DI RESTOCKING</b> .....	66
<b>E. CONTROLLO E/O ERADICAZIONE SPECIE ALIENE</b> .....	68
E.1 INTRODUZIONE ED ANALISI DEL CONTESTO .....	68
E.2 NORMATIVA DI RIFERIMENTO .....	74
<b>E.2.1 Norme comunitarie</b> .....	74
<b>E.2.2 Norme nazionali</b> .....	74
<b>ITALIA</b> .....	74
<b>SLOVENIA</b> .....	77
E.3 TRACHEMYS SCRIPTA (Thunberg in Schoepff, 1792).....	79
E.4 IMPATTI E SCENARI FUTURI.....	83
E.5 METODOLOGIE INTERVENTO.....	86
E.6 SORVEGLIANZA.....	88
E.7 CAMPAGNE D'INFORMAZIONE E SENSIBILIZZAZIONE .....	89
E.8 SORVEGLIANZA ORDINARIA.....	90
E.9 CAMPAGNE DI SORVEGLIANZA DEDICATE .....	90
E.10 MONITORAGGIO.....	91
E.11 CONTROLLO .....	92
E.12 METODI DI CATTURA.....	93
E.12 GESTIONE POST CATTURA .....	100
E.13 PERSONALE COINVOLTO .....	114
E.14 ALTRE SPECIE DI TESTUGGINI PALUSTRI ALLOCTONE.....	116
<b>F. MONITORAGGIO DELLO STATUS DELLE POPOLAZIONI</b> .....	124
F.1. TECNICHE DI MONITORAGGIO .....	124
F.2 STIMA DEL PARAMETRO POPOLAZIONE .....	125
F.3. STIMA DELLA QUALITÀ DELL'HABITAT PER LA SPECIE .....	125
<b>G. COMUNICAZIONE E DISSEMINAZIONE</b> .....	126
<b>ALLEGATO 1. PROTOCOLLO VETERINARIO</b> .....	146
<b>ALLEGATO 2. Codici di marcatura</b> .....	161
<b>ALLEGATO 3. Richiesta di parere per controllo Trachemys</b> .....	165
<b>ALLEGATO 4. Scheda dati di campo Trachemys</b> .....	168
<b>ALLEGATO 5. Modulo di consegna Centri</b> .....	169

# INTRODUZIONE

Il LIFE21-NAT-IT-LIFE URCA PROEMYS - **UR**gent **C**onservation **A**ctions pro *Emys orbicularis* in Italia and Slovenia (101074714/LIFE21-NAT-IT-LIFE URCA PROEMYS), è stato approvato (17 maggio 2022) nell'ambito del *Programme for Environment and Climate Action* (LIFE), Call: LIFE-2021-SAP-NAT.

L'obiettivo principale del LIFE21-NAT-IT-LIFE URCA PROEMYS è migliorare lo stato di conservazione di *Emys orbicularis* in Italia e Slovenia, mantenendo la diversità genetica delle popolazioni esistenti. Gli obiettivi specifici sono:

1. Sviluppare un Piano di Gestione Integrato per la protezione delle popolazioni italiane e slovene di testuggini *Emys*, compresi i protocolli veterinari. L'attuazione di questo compito è in conformità con il Regolamento UE 1143/2014, il Decreto Legislativo 230/2014 e il Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri, il Decreto Legislativo 230/2017 e le linee guida del Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica, dell'Istituto Superiore per la Ricerca e la Protezione Ambientale (ISPRA) e della Societas Herpetologica Italica (SHI); il Piano sarà adottato da tutti i siti Natura 2000 coinvolti nel progetto.
2. In Slovenia, il Piano di Gestione Integrato sarà svolto in collaborazione con la Società Erpetologica slovena (SHS), il Centro per la Cartografia della Fauna e della Flora (CKFF) e l'Istituto della Repubblica di Slovenia per la Conservazione della Natura.
3. Promuovere un modello di gestione transfrontaliera per *Emys orbicularis* basato sul Piano di Gestione di cui al precedente punto;
4. Migliorare le condizioni degli habitat naturali di *Emys orbicularis* in almeno 29 siti selezionati;
5. Adeguare e/o allestire 7 centri di salvataggio e riproduzione di *Emys orbicularis*;
6. Ripopolare e/o reintrodurre *Emys orbicularis* in almeno 13 aree selezionate;
7. Ridurre ( $\geq 80\%$  della popolazione) e/o eradicare le testuggini alloctone invasive in almeno 39 siti italiani e 3 sloveni e potenziare la rete di strutture per le testuggini invasive in Italia.
8. Stabilire un piano di monitoraggio a lungo termine per le popolazioni di *Emys orbicularis*;

9. Valutare l'attuazione del Piano di gestione integrata su scala regionale in una regione pilota;
10. Sensibilizzare l'opinione pubblica sulla conservazione di *Emys orbicularis* e sulla minaccia rappresentata dall'immissione di specie invasive negli habitat naturali.

## **IL PIANO DI GESTIONE INTEGRATO PER LA CONSERVAZIONE DI *EMYS ORBICULARIS***

La mancanza di coordinamento su scala nazionale – così come a livello transfrontaliero - tra le parti pubbliche e private coinvolte nella tutela di *Emys orbicularis* rappresenta una delle principali problematiche relative alla salvaguardia della specie. Uno degli obiettivi del LIFE è la stesura e adozione da parte degli enti competenti del presente Piano di gestione integrato per la conservazione di *Emys orbicularis* che intende fissare a livello nazionale e in maniera condivisa i principi e le azioni da mettere in atto per la salvaguardia della specie. Piano è realizzato coinvolgendo l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), il Ministero della Transizione Ecologica (MITE), l'Istituto della Repubblica Slovena per la Conservazione della Natura, esperti, tecnici e altre parti interessate. Il Piano include le procedure veterinarie, gestionali e diagnostiche per coprire tutti gli aspetti relativi alla salute e al benessere degli animali, alla tutela della salute pubblica, alla resistenza agli antibiotici, agli agenti patogeni zoonotici (UE Approccio One Health). Il protocollo veterinario contiene le procedure di gestione degli individui di *E. orbicularis* riprodotti ex situ e destinati a liberazione nei siti di ripopolamento e degli individui di *Trachemys spp.* (o altre specie alloctone) catturati nei siti di eradicazione e destinati ai centri di raccolta.

Il protocollo include:

- le procedure di gestione, manipolazione e trasporto degli animali per *E. orbicularis* e *Trachemys spp.* (o altre specie alloctone).
- le procedure di marcaggio e applicazione dei microchip di riconoscimento per *E. orbicularis* e *Trachemys spp.* (o altre specie alloctone).
- le procedure di ispezione veterinaria e analisi clinica per *E. orbicularis* e *Trachemys spp.*
- le procedure di intervento in presenza di agenti patogeni rilevati su *E. orbicularis* e *Trachemys spp.* (o altre specie alloctone).

E'anche aggiornato il *Disease Risk Analysis* (DRA), elaborato nel corso del progetto LIFE EMYS (LIFE12NAT/IT/000395) e già applicato in Liguria, e ad altre esperienze di ripopolamento nel contesto LIFE (LIFE09 NAT/ES/000529, LIFE14 IPE/IT/000018).

L'attuazione del Piano sarà monitorata attraverso approfondita analisi per l'intera durata del progetto in Emilia-Romagna, scelta come regione pilota dato che essa vede coinvolti nel progetto LIFE un elevato numero di aree protette e partners, inclusi i Consorzi di Bonifica Emilia Centrale e della Burana, gestori di opere in un'ampia porzione del territorio emiliano che parteciperanno ai tavoli di lavoro (vedi lettere di supporto). Inoltre, l'applicazione del Piano nei siti sloveni consentirà di testarne l'efficacia in un contesto legislativo diverso da quello italiano, e permetterà un confronto tecnico a livello di coordinamento transnazionale della conservazione della specie.





## SCHEDA SPECIE

- ***Emys orbicularis*** (Linnaeus, 1758) – Testuggine palustre europea
- ***Emys trinacris*** Fritz, Fattizzo, Guicking, Tripepi, Pennisi, Lenk, Joger & Wink, 2005 – Testuggine palustre siciliana

### DISTRIBUZIONE

Distribuzione globale. *E. orbicularis* è distribuita dal Nord Africa occidentale (Marocco, Algeria, Tunisia) all'Europa meridionale e centrale sino alla Danimarca, Polonia e Lituania; a est dal Portogallo, alla Penisola Balcanica attraverso l'Anatolia, coste del Mar Caspio (incluso l'Iran settentrionale) fino al Lago di Aral (Sindaco & Erenchenko, 2008). *E. trinacris* è distribuita in Sicilia (Ottonello et al., 2021).

Distribuzione italiana. In Italia *E. orbicularis* è presente in gran parte della Pianura Padana centro orientale e in modo frammentario lungo il versante adriatico, dalle coste abruzzesi sino a quelle pugliesi, e tirrenico, soprattutto lungo le coste toscane e laziali. Segnalata in Sardegna lungo la parte orientale dell'isola. *E. trinacris* è segnalata soprattutto nella porzione centro occidentale della Sicilia.

**Commento alla carta di distribuzione.** Per entrambe le specie le evidenti lacune distributive sono probabilmente da imputarsi alla scarsità di ambienti idonei, mentre per Sardegna, Campania e Calabria (*E. orbicularis*) per carenza di ricerca; in Sicilia (*E. trinacris*) è assente nel settore NE dell'isola (Monti Peloritani, gran parte delle Madonie e i Monti di Termini Imerese) ove mancano ambienti idonei.

Si evidenzia un miglioramento delle segnalazioni rispetto all'Atlante 2006, soprattutto per Toscana, Sardegna, Abruzzo e Molise.

**Limiti dell'areale italiano.** Non appaiono evidenze nei limiti dell'areale italiano.

Popolazioni disgiunte.

**Distribuzione insulare.** Le specie sono presenti a livello insulare solo in Sardegna (*E. orbicularis*) e in Sicilia (*E. trinacris*).

**Popolazioni introdotte.** Non sono note popolazioni introdotte di recente in nessuna parte dell'areale.

## ECOLOGIA

La testuggine palustre europea si riproduce in primavera-estate, la femmina depone da 3 a 9 uova (in media 6; Zuffi et al. 1999), a volte con doppia deposizione (Zuffi & Odetti 1998), mentre in Sud Italia le testuggini palustri hanno una dimensione di covata leggermente inferiore (Zuffi et al., 2007); le uova si sviluppano in circa due mesi (schiusa tra giugno e agosto). La maturità sessuale è raggiunta tra 5 e 10 anni di vita. In Sicilia le testuggini palustri hanno una dimensione di covata leggermente diversa (circa 4-5 uova, da 2 a 8; Ottonello et al., 2021), ma simile sviluppo e analoga maturità sessuale.

Lo spettro trofico include diversi vertebrati e invertebrati acquatici, ma anche vegetazione acquatica (*E. orbicularis*: Ottonello et al., 2005), con forte variazione a seconda del sito e della località (*E. trinacris*: Ottonello et al., 2017, 2021).

Le popolazioni italiane di *E. orbicularis* e siciliane di *E. trinacris* si trovano prevalentemente in due tipologie di habitat umidi, tipo stagno e tipo canale (Lebboroni & Chelazzi, 1998), sia in ambienti aperti sia in prossimità o a volte all'interno di zone boscate. Presenti normalmente in contesti naturali o semi-naturali si adattano anche ad ambienti di origine artificiale (casse di espansione, bacini di cave esaurite, ecc.). Si rinvencono anche in habitat naturali di media alta quota (Sud Italia e Sicilia). Gli ambienti ottimali sono caratterizzati da acque ferme e poco profonde ricche di elofite, anche se in particolari contesti possono frequentare corsi d'acqua minori spesso a regime intermittente, mentre, soprattutto lungo la costa veneta, può essere rivenuta anche in acque salmastre.

*E. orbicularis* si trova dal livello del mare a oltre i 1500 m di quota, con forte prevalenza per le basse quote (0-200 m). Le altitudini più elevate sono raggiunte solo nella porzione più meridionale dell'areale italiano, mentre nei settori centro-settentrionali è confinata a quote medio-basse in aree pianiziali. *E. trinacris* si trova dal livello del mare sino a 1250 m di quota, con una netta prevalenza per le aree pianeggianti costiere e collinari, ad eccezione dell'area dei Nebrodi dove è abbastanza comune nell'area montana.

Le specie sono attive dalla metà-fine febbraio sino a novembre, con maggiore attività tra marzo e la metà-fine di luglio, con significativa diminuzione nei mesi successivi. Giovani e subadulti hanno periodo di attività comparabile, mentre i neonati sono visibili dalla metà dell'estate sino a fine della stagione attiva.

In Sicilia la specie a livello del mare non va incontro a un periodo di latenza invernale prolungato, (Lo Valvo et al., 2008), mentre a quelle superiori il periodo di inattività va da metà ottobre ad aprile (Lo Valvo et al. 2014).

La specie tende a evitare l'uomo e le zone antropizzate.

**Antropofilia** la specie si incontra in habitat naturali e seminaturali

## **CONSERVAZIONE**

**Frequenza ed entità delle popolazioni.** Relativamente alle popolazioni note, la specie è in media diffusa ampiamente, mentre in altre parti dell'areale italiano risulta localizzata (es.: Sardegna, Calabria). La maggior facilità di osservazione occorre nelle aree pianeggianti, mentre in zone collinari o montane risulta essere maggiormente localizzata. Le densità delle popolazioni sono molto variabili, da circa 240-250 individui/ha (Liuzzo et al. 2021; Ottonello et al., 2021) a 3-10 individui/ha (Seglie, 2015; Mazzotti et al., 2007).

**Declino/incremento noti o percepiti delle popolazioni a livello regionale.** In alcune aree monitorate con una certa costanza [ultimi 30 anni, ad es. Bosco Mesola (Ravenna), Tenuta di San Rossore (Pisa), Parco regionale della Maremma (Grosseto)] la presenza e le densità risultano essere buone e non sono state osservate flessioni significative. Nel complesso si delinea un quadro di stabilità delle due specie che fa però seguito a un periodo di declino causato dalla distruzione, alterazione e frammentazione delle zone umide e, non ultimo, dall'introduzione delle specie alloctone. In quanto specie longeve, la sola presenza di individui adulti in aree isolate non è garanzia di uno stato di conservazione soddisfacente.

# A. TIPOLOGIE DI INTERVENTO E MISURE DI CONSERVAZIONE

## HABITAT RESTORATION

Il trend negativo di *Emys orbicularis* in Europa è legato a diverse minacce fra cui la perdita e/o trasformazione degli habitat per questa specie (Ficheux et al, 2014); è quindi indispensabile garantire il buono stato degli habitat, attraverso la loro tutela e ripristino, soprattutto dove persistono popolazioni “core” che possono essere rinforzate anche attraverso attività di restocking (Canessa et al., 2016).

Dall’esperienza del LIFE EMYS (LIFE12 NAT/IT/000395) e da quanto presente in bibliografia (Ficetola et al, 2004; Ficheux et al, 2014; Canessa et al., 2016), a seguito di interventi di ripristino ambientale può essere stimato un incremento di *E. orbicularis*, variabile, a seconda dei siti, tra il 5% e il 25%. Attualmente le densità riscontrate in alcune popolazioni sono molto variabili, da circa 240-250 individui/ha (Liuzzo et al. 2021; Ottonello et al. 2021), da 147 a 184 individui/ha (Zuffi et al. 2020), sino a 3-10 individui/ha (Mazzotti et al. 2007; Seglie 2015), possiamo precauzionalmente (tenendo conto che si tratta di sole tre situazioni), in attesa di avere i dati del primo anno di monitoraggio, stimare un incremento di individui di circa intorno ai 100 ind/ha

Prima di affrontare il concetto di “*habitat restoration*” si ritiene utile ricordare alcune definizioni, a partire da quella di “habitat”.

### A.1. HABITAT

*Zoologi e botanici, raccogliendo esemplari di esseri viventi per classificarli, indicavano sui cartellini dei Musei ove gli esemplari erano conservati, anche la voce “habitat” (“esso abita...”, in latino), ovvero una descrizione sintetica delle caratteristiche dei luoghi ove l’esemplare era stato trovato (ad esempio “habitat: bosco di conifere”); per estensione il termine è passato ad indicare l’ambiente prevalente dove il complesso degli individui delle varie specie dimora e può essere raccolto... l’habitat è dunque l’insieme di fattori biotici e fisici che nel loro complesso compongono le caratteristiche del luogo dove un animale vive (Malcevski, 1991<sup>1</sup>).*

---

<sup>1</sup> Malcevski S., 1991 – *Qualità ed impatto ambientale. Teoria e strumenti della valutazione d’impatto.*

La Direttiva “Habitat” 43/92/CEE, riprende in parte il significato originale e lo estende, definendo gli habitat naturali come “*zone terrestri o acquatiche che si distinguono grazie alle loro caratteristiche geografiche, abiotiche e biotiche, interamente naturali o seminaturali*”. La Direttiva distingue poi in Habitat naturali di interesse comunitario che sono gli habitat di cui all'articolo 1 che:

- i) rischiano di scomparire nella loro area di ripartizione naturale; ovvero
- ii) hanno un'area di ripartizione naturale ridotta a seguito della loro regressione o per il fatto che la loro area è intrinsecamente ristretta; ovvero
- iii) costituiscono esempi notevoli di caratteristiche tipiche di una o più delle cinque regioni biogeografiche seguenti: alpina, atlantica, continentale, macaronesica e mediterranea

La Direttiva distingue poi l'habitat di una specie come l'ambiente definito da fattori abiotici e biotici specifici in cui vive la specie in una delle fasi del suo ciclo biologico. Le tipologie inserite nella direttiva Habitat fanno sostanzialmente riferimento ad associazioni vegetazionali, generalmente riconducibili a una nomenclatura fisionomico-strutturale o fitosociologica a maggior dettaglio.

## **A.2. HABITAT di *Emys orbicularis***

“Le popolazioni italiane e slovene si trovano prevalentemente in due tipologie principali di habitat umidi, la prima rappresentata dal tipo di stagno, pozza, palude, acquitrino (Sacca del Bardello, Ravenna, Sečoveljske soline, Draga pri Igu), con canneti aperti (Valle delle Canne, Ravenna; Delta del Po) e ricca vegetazione acquatica. Questo tipo consiste di uno o più corpi d'acqua naturali, sia in aree aperte (Valle delle Canne, Ravenna) sia in aree di bosco maturo (monte Rufeno, Pollino, Castel Porziano). La seconda è il tipo “canale” (Bosco Mesola, camp Darby, Uccellina) (Lebboroni e Chelazzi, 1999), che è caratterizzata da corsi d'acqua (Zuffi, 1987) e canali artificiali di drenaggio, generalmente in aree aperte o con bosco ripariale. È possibile rintracciare *Emys orbicularis* anche in ambienti rimaneggiati dall'uomo come casse di espansione, bacini di cave esaurite (Alfonsine, Ravenna), maceri, risorgive e aree di risaia. Fuori dall'acqua essa frequentermente aree urbane, coltivi, boschi planiziali e igrofilo (Punte Alberete, Ravenna)

e pinete litoranee (Pineta di Classe e Pineta di san Vitale, Ravenna)” (Sindaco R., Doria G., Razzetti E. & Bernini E., 2006<sup>2</sup>)

Di seguito la lista degli habitat di interesse comunitario oggetto di interventi di habitat restoration del Life URCA PROEMYS che rappresentano un campione significativo degli habitat di *Emys orbicularis* in Italia e Slovenia:

- Mediterranean salt meadows (*Juncetalia maritimi*) (1410)
- Mediterranean and thermo-Atlantic halophilous scrubs (*Sarcocornetia fruticosi*) (1420)
- Calcareous fens with *Cladium mariscus* and *Caricion davallianae* (7210);
- Pseudo-steppe with grasses and annuals of *Thero-Brachypodietea* (6220);
- Natural eutrophic lakes with *Magnopotamion* or *Hydrocharition* (3150);
- Mediterranean temporary ponds (3170);
- Water courses of plain to montane levels with the *Ranunculion fluitantis* and *Callitriche-Batrachion* vegetation (3260);
- Estuaries (1130);
- Coastal lagoons (1150);
- Wooded dunes with *Pinus* spp. (2270);
- *Tilio-Acerion* forests of slopes, screes and ravines (9180);
- Arborescent matorral with *Laurus nobilis* (5230);
- Petrifying springs with Tufa formation (7220);
- Alluvial forests with *Alnus glutinosa* and *Fraxinus excelsior* (91E0);
- Eastern white oak woods (91AA);
- Fixed coastal dunes with herbaceous vegetation (2130);
- Coastal dunes with *Juniperus* spp. (2250);
- Semi-natural dry grasslands and scrubland facies on calcareous substrates (6210);
- Mediterranean salt meadows (*Juncetalia maritimi*) (1410).

### **A.3. INTERVENTI DI HABITAT RESTORATION**

Il ripristino di habitat (habitat restoration) può essere incluso nel più ampio concetto di rinaturazione, *intesa come l'insieme degli interventi e delle azioni atte a ripristinare le caratteristiche ambientali e la funzionalità ecologica di un ecosistema in relazione alle sue*

---

<sup>2</sup> Sindaco R., Doria G., Razzetti E. & Bernini E., 2006- *Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia/Atlas of Italian Amphibians and Reptiles*. Societas Herpetologica Italica. Ed. Polistampa, Firenze, pp.792

condizioni potenziali, determinate dalla sua ubicazione geografica, dal clima, dalle caratteristiche geologiche e geomorfologiche del sito e dalla sua storia naturale pregressa<sup>3</sup>. La rinaturazione può essere spinta fino a ripristinare le condizioni naturali preesistenti di un'area, come può essere realizzata in funzione di obiettivi intermedi o specifici (es. ripristino della capacità di laminazione; riduzione della velocità di corrivazione; recupero della capacità autodepurativa; salvaguardia di specie di particolare pregio). Gli interventi di habitat restoration sono azioni di rinaturazione “mirate” al ripristino delle condizioni favorevoli per specifiche biocenosi o di particolari specie, come *Emys orbicularis* nel caso del presente piano.

Tra le principali tipologie di interventi, previsti peraltro in diversi LIFE (LIFE12NAT/IT/000395, LIFE 21 NAT IT- URCA PROEMYS, LIFE 14IPE IT 018 - GESTIRE 2020), vi sono:

1. la creazione di nuovi specchi d'acqua;
2. la riqualificazione, l'ampliamento e la diversificazione di zone umide;
3. la realizzazione di barriere (recinzioni) per evitare intrusioni di predatori e ungulati;
4. la realizzazione di piccole opere idrauliche ausiliarie per il controllo idrico finalizzate a garantire un'adeguata presenza di acqua.

È bene che gli interventi siano realizzati nel **periodo** compreso tra la fine dell'estate e la fine dell'inverno, per minimizzare il disturbo sugli adulti in fase di riproduzione e ovodeposizione e sui giovani; ovviamente il periodo può variare a seconda della latitudine e dell'altitudine del luogo di intervento.

In via generale la **movimentazione di terra** potrà essere effettuata con mezzi meccanici (es. escavatori) e attrezzatura appropriate. I **punti di termoregolazione** (basking) potranno essere facilmente realizzati con materiali naturali (es. tronchi con grandi rami) ma, in particolari situazioni, anche con elementi galleggianti artificiali. Particolare attenzione deve essere riposta alla **regolazione delle acque** al fine di garantire un habitat idoneo alle testuggini in tutte le stagioni. È consigliabile **proteggere i siti di nidificazione** con recinzioni, barriere permanenti o repellenti per prevenire la predazione dei nidi o il disturbo dovuto al calpestio da parte di ungulati o all'attività di movimentazione del terreno effettuata dai cinghiali.

---

<sup>3</sup> in “Appendice.Definizioni” Pag 11 di: Autorità di bacino del fiume Po. Parma – *Direttiva per la definizione degli interventi di cui all'art.36 delle norme PAI. Linee guida tecnico procedurali per la progettazione e valutazione degli interventi di rinaturazione.* Allegata alla deliberazione n.8/2006 del 5 aprile 2006

Di seguito vengono schematicamente illustrate le principali tipologie di intervento. Non è stata inserita la stima dei costi perché troppo variabile da regione a regione e tra Italia e Slovenia. Per i costi è consigliabile consultare i prezzari regionali.





### A.3.1. Creazione di nuovi specchi d'acqua

**Obiettivi:** creare e mantenere nuovi habitat acquatici idonei per la vita di *Emys orbicularis*.

**Altre specie beneficiate:** anfibi in generale; altra piccola fauna dulciacquicola autoctona.

**Localizzazione:** la localizzazione di una nuova raccolta d'acqua deve tener presente le possibilità naturali di espansione della specie per le quali l'intervento è progettato. La testuggine palustre europea è solita compiere periodici spostamenti lungo le vie d'acqua che si dipartono dalla core area vitale: questo può portare alla colonizzazione di nuovi siti o ad un rischio di abbandono definitivo dell'area di provenienza o di perdita degli individui per le minacce presenti.

La superficie allagata, la modalità di riempimento, la profondità, il tipo di impermeabilizzazione sono caratteristiche che dipendono dai diversi contesti progettuali; in genere si usano teli impermeabilizzanti o la messa a dimora di strati di argilla o bentonite; in diverse situazioni si è rilevata la maggior tenuta (ad esempio rispetto all'argilla) di teli da Discarica (R.N.Gessi Bolognesi)

**Note di attenzione:** è importante che la massima profondità di una nuova raccolta d'acqua venga raggiunta mediante sponde digradanti e almeno sui lati maggiori con pendenze molto dolci; che il perimetro sia il più frastagliato possibile e che il profilo risulti asimmetrico. Per garantire un sufficiente apporto idrico a questi invasi grazie al deflusso superficiale delle acque o delle piogge, deve essere realizzata in un avvallamento o alla base di preesistenti ruscellamenti meteorici o in loro vicinanza, o di realizzare un approvvigionamento diretto da un punto irriguo, da un pozzo artesiano o da serbatoi di raccolta. La realizzazione di una nuova raccolta d'acqua, destinata alla frequentazione e all'instaurarsi di un nucleo vitale di testuggine palustre, se opportunamente allestita e gestita, non è incompatibile con la frequentazione antropica (se controllata, marginale e sensibilizzata almeno con un cartello regolamentare affisso in zona), ma almeno nei periodi più critici, come quelli riproduttivi, dovrebbe essere disincentivata. Ovviamente la costituzione di una barriera visiva sul lato di camminamento dei visitatori e di un punto di osservazione mimetizzato (tipo capanno per bird-watching) può evitare qualsiasi rischio di impatto verso cheloni particolarmente sensibili. Nell'oasi WWF Stagni di Casale (Vicenza) sono stati effettuati scavi per creazione di piccole zone umide - 1.2-15 m di profondità. Gli scavi furono realizzati prevedendo di intercettare la falda (particolarmente superficiale) e garantire la presenza stabile di una quota idrica collegata ad essa. Periodi di siccità hanno però comportato lo svuotamento dei piccoli invasi nei mesi estivi comportando svantaggi (difficoltà di sopravvivenza delle idrofite) e vantaggi (prolungata siccità allontana specie aliene come gambero della Louisiana e azzerà eventuali colonizzazioni di *Pseudorasbora*). Nel

sito dell'Oasi rimangono comunque a poca distanza invasi allagati tutto l'anno. Negli ultimi anni, però, in varie situazioni la siccità ha creato grossi problemi di mancanza d'acqua: per ovviare a queste situazioni si suggerisce la creazione di due corpi idrici separati ma connessi, uno temporaneo e uno permanente, in modo da permettere il controllo dei livelli di acqua ma anche i movimenti delle specie aliene.

**La manutenzione:** l'assenza di interventi di manutenzione negli anni successivi alla realizzazione renderebbe in breve tempo quasi inutile la nuova raccolta d'acqua. Fondamentale è la tenuta del fondo garantendo una efficace impermeabilizzazione.

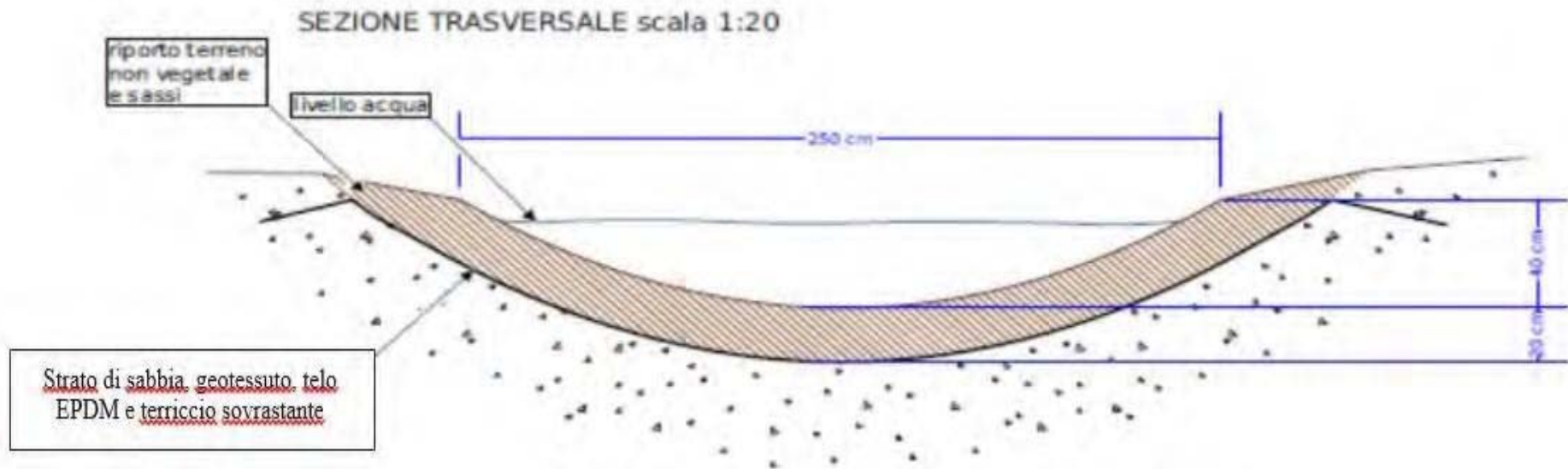
**Indicatori di stato:** il tempo di mantenimento dell'acqua nella nuova pozza è l'indicatore principale per valutare l'efficacia dell'intervento; per *Emys orbicularis* la permanenza d'acqua dovrebbe essere garantita tutto l'anno (per gli anfibi, ad esempio, questa condizione non è tassativa). Nella stragrande maggioranza dei nuclei conosciuti italiani, lo svernamento avviene in acqua, sul fondo del bacino abitato; la riproduzione sempre in acqua nei mesi primaverili; l'alimentazione sempre in acqua sia in giovani che adulti durante tutta la fase attiva, da marzo a ottobre, con uscite invernali nel Centro-Sud Italia nelle giornate più tiepide.



**Descrizione dell'azione:** la nuova raccolta d'acqua dovrebbe avere una destinazione multi-funzionale: per le esigenze di *Emys orbicularis* e di altre specie e della fauna dulciacquicola invertebrata (in primo luogo Odonati, Coleotteri Idroadezefagi, Molluschi Gasteropodi autoctoni che stanno tutti subendo un tracollo generalizzato). Inoltre, con le dovute attenzioni, , la nuova raccolta d'acqua potrà essere inserita in un percorso di sensibilizzazione ed educazione naturalistica.

**Fasi operative:** in generale è questa la successione delle attività necessarie per la realizzazione di una piccola raccolta d'acqua, ma che proporzionalmente - per quanto riguarda le dimensioni- è applicabile anche a un grande specchio d'acqua:

1. lo scavo con una piccola ruspa dell'alveo di massima della raccolta d'acqua, avendo cura di accantonare lo strato più superficiale del terreno asportato per la successiva azione di rinaturazione delle sponde. Media della profondità di scavo: 80-120 cm, massima profondità 150-200 cm; per una superficie di 20-30 m di lunghezza per 10-20 m di larghezza;
2. l'eliminazione di tutti i materiali presenti sul fondo e sui lati dello scavo che possano avere asperità tali da causare alla lunga un danno ai geotessuti e al pannello impermeabilizzante sovrapposti; l'eliminazione con drastico taglio delle radici che si dipartono da alberi e/o arbusti troppo vicini allo scavo (per evitarlo sarebbe bene localizzare lo scavo a distanza di almeno tre-quattro metri da questi); radici che allungandosi nel tempo possano anch'esse ledere lo strato impermeabilizzante;
3. la pressatura e la battitura del terreno di fondo;
4. la distribuzione di uno strato di 20-30 cm di terriccio sabbioso su tutta la superficie di scavo;
5. la posa di una rete zincata a maglie piccole (ca 2 cm di lato) per evitare l'ingresso dal fondo di arvicole e talpe;
6. la posa di teli in geotessile su tutta la superficie facendo attenzione che siano ben disposti sino al limite della cavità scavata;
7. la posa di un telo impermeabile EPDM (sono teli in gomma ad alte prestazioni di spessore e resistenza commisurata al progetto) per coprire ampiamente tutta la superficie; la parte eccedente la cavità dell'invaso sarà interrata in un apposito solco perimetrale; sopra questo solco saranno appoggiate prima grosse pietre piatte poi il terreno e/o ampie zolle provenienti dalla scoticatura precedente;



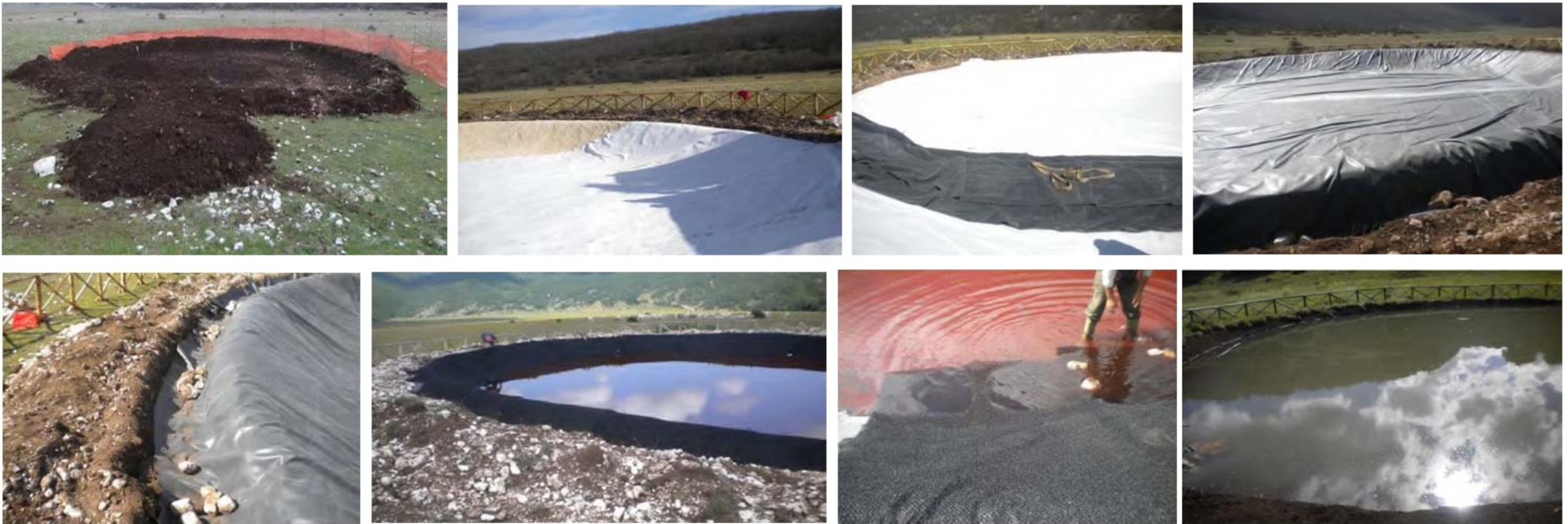
Lo schema di massima per la realizzazione di una nuova Pozza.

8. la posa su tutta la superficie di un pannello coprente in geotessile, per evitare lo “scivolamento” dei piccoli animali causa la crescita di mucillagine sulla superficie del telo EPDM;
9. la distribuzione di 20-30 cm di terriccio inerte (nel senso che non arrechi eutrofizzazione dell’acqua, ma possa diventare un ottimo mascheramento a copertura degli strati di impermeabilizzazione-protezione e di sostegno per idrofite); quale alternativa la posa di uno strato di argilla di 15 cm;
10. la sistemazione delle sponde in modo che esse e l’acqua all’interno siano accessibili ai piccoli animali (1/3 di sponda ripida e 2/3 di sponda con piccoli gradini naturali o con innalzamento progressivo del fondo). La profondità massima sarà ricavata verso il lato più ombreggiato (in mancanza di vegetazione nelle vicinanze –oltre 2 metri per evitare che le radici possano rovinare l’impermeabilizzazione- saranno piantumati alcuni arbusti);
11. l’allagamento dell’invaso fino al livello di massima;

12. il posizionamento perimetrale di una barriera anti-intrusione e di sicurezza (tipo staccionata e nel caso di presenza di cinghiali anche con rete elettrosaldata zincata sorretta da paletti, con trattamento in autoclave, ed interrata parzialmente, quadrati di 10 cm);
13. piantumazione delle rive con specie erbacee adatte alla formazione di una cintura di vegetazione igrofila ripariale (usare solo carici in quanto tife e canne risulterebbero invasive e a grande capacità interrante);
14. monitoraggio ambientale annuale e attivazione di un monitoraggio a lungo termine;
15. la sistemazione di una bacheca con pannello informativo che illustra le specie interessate e le finalità dell'intervento;
16. una manutenzione ordinaria annuale svolta nel caso con giornate-evento rivolte a volontari.

**Monitoraggio dopo la realizzazione:** due verifiche di controllo *post-operam* (a fine marzo e a fine maggio del primo anno) e successivamente monitoraggio costante negli anni per valutare la frequentazione, un conteggio degli adulti presenti e l'attività biologica della specie.

**Risultati attesi:** presenza stabile di un nucleo vitale di *Emys orbicularis*.



### A.3.2. Realizzazione di strutture semi-naturali come rifugi temporanei e/o permanenti per *Emys orbicularis* e per la piccola fauna autoctona

**Obiettivi** Creare punti di rifugio per ridurre le minacce ai rettili e agli anfibi nelle prime fasi di vita. Rifugi utili per le fasi di estivazione e svernamento degli adulti riproduttori e come nascondigli.

**Note:** la presenza di predatori di *Emys orbicularis* obbliga ad attente valutazioni sul sito di collocazione delle strutture in oggetto. Si consiglia in punti accessibili anche per il monitoraggio. Possono essere previste anche barriere anti-intrusione intorno ai rifugi contro ungulati selvatici e domestici. La zona non deve essere raggiungibile dall'acqua (né dalle precipitazioni né dall'aumento del livello della falda).

Nella sequenza fotografica le fasi di realizzazione di una struttura di rifugio temporaneo.



#### Descrizione:

**Rifugio semi-interrato** (temporaneo - svernamento). Scavo con profondità e larghezza di 50 cm, lunghezza 100 cm. In successione vengono inseriti nello scavo una grande massa di trinciato di legno e di foglie secche, tutto naturale; poi grandi pezzi di rami tagliati, sovrapposti con altri di minor spessore e fascine verdi; il tutto poi ricoperto con altri rami a creare un cumulo. Da posizionare in punti strategici per la fauna interessata.

**Rifugio interrato (per svernamento)** Scavo con profondità e larghezza di 50 cm, lunghezza 100 cm, altezza pietre all'esterno, almeno 50 cm. In successione vengono inseriti nello scavo pezzi di grossi rami tagliati, grosse pietre a spigoli vivi, fascine verdi. Da posizionare in punti strategici per la fauna interessata.

**Rifugio interrato (anti fuoco)** Scavo con profondità e larghezza di 100 cm, lunghezza 150 cm, altezza pietre all'esterno, almeno 50 cm. In successione vengono inseriti nello scavo grandi pezzi di grossi rami tagliati, sovrapposti in modo da lasciare ampio spazio per l'ingresso degli animali; poi uno strato di fascine verdi su cui stendere pietre piatte di varie dimensioni. Da posizionare in punti strategici per la fauna interessata.

**Manutenzione.** Tutte queste strutture hanno una durata di circa due anni, dopodiché hanno bisogno di una ricostruzione parziale o totale.

**Monitoraggio:** dopo la realizzazione: due verifiche di controllo post-operam (a fine marzo e a fine ottobre del primo anno) e successivamente monitoraggio per capire il mantenimento della funzionalità e l'urgenza o meno della manutenzione del ripristino.

**Risultati attesi:** favorire il rifugio di *Emys orbicularis*





### A.3.3. Realizzazione di opere idrauliche ausiliarie per il controllo idrico (sistemi di regolamentazione idraulica)

**Obiettivi:** mantenere habitat acquatici idonei a *Emys orbicularis*.

**Altre specie beneficate:** anfibi in generale; altra piccola fauna dulciacquicola autoctona.

**Note:** la regolazione della disponibilità idrica all'interno di invasi semi-naturali o artificiali è spesso fondamentale per mantenere habitat idonei alla vita della fauna acquatica. Oltre a una adeguata impermeabilizzazione, potrebbero essere necessari chiusini manuali o meccanici per regolare il deflusso di acqua in uscita. Queste strutture devono essere sempre accessibili per le operazioni di gestione e per le periodiche manutenzioni. E' importante valutare il possibile rischio per altre specie (possono rimanere intrappolate) ed eventualmente realizzare piccoli accorgimenti che permettano alla fauna intrappolata di uscire.

**La manutenzione:** e' necessario garantire una manutenzione costante alle strutture.



#### **A.3.4. Ripristino di un ex sito minerario e creazione di un habitat adatto alle testuggini**

**Obiettivo:** abbassare gli argini sporgenti esistenti e ridurre la pendenza. Eliminare la vegetazione che impedisce alle testuggini di trovare luoghi adatti per prendere il sole

**Descrizione e modalità di intervento** Si sono dovuti allargare e abbassare gli argini esistenti con un piccolo escavatore, oltre a ridurre la pendenza verso l'acqua e a creare rampe di terra per facilitare l'accesso al terreno. La vegetazione in eccesso è stata rimossa a macchina e a mano

**Località dell'intervento:** Rudnik-Korea 45.479046°N+ 13.619268°E

**Risultati:** Gli argini sono stati abbassati e la pendenza è minore e le testuggini possono entrare e uscire più facilmente dall'acqua. È stato anche aggiunto del terreno agli argini per consentire alle testuggini di nidificare. L'eliminazione della vegetazione cresciuta eccessivamente ha garantito alle testuggini più spazio per il basking.

**Monitoraggio dopo la realizzazione:** viene effettuato un regolare monitoraggio mensile

**Referente azione:** Iztok Škornik, 0038651261350, [iztok.skornik@soline.si](mailto:iztok.skornik@soline.si)





### **A.3.5. Costruzione di barriere (recinzioni) per impedire l'intrusione di predatori o ungulati**

**Obiettivi:** ripristinare, migliorare, mantenere gli habitat acquatici adatti alla vita di *Emys orbicularis*.

**Altre specie beneficiate:** anfibi in generale; altra piccola fauna dulciacquicola autoctona.

**Modalità d'intervento:** Creazione di una barriera di sicurezza per prevenire le invasioni di ungulati selvatici (cinghiali) e domestici. Si prevede l'utilizzo di efficaci materiali anti-intrusione per delimitare un piccolo recinto per la vita in sicurezza dei giovani testuggini. La struttura sarà costituita da pali di legno perimetrali, posizionati ogni 3 metri, sui quali verrà posizionata una rete elettrosaldata. Per la realizzazione di questa struttura sono necessari:

- pali di legno di 1,50 m di altezza e 8-10 cm di diametro;

- fogli (porzioni) di rete elettrosaldata, alti 2 m, lunghi 2 m, con filo da 4 mm, maglia 10 x 10 cm. Ogni porzione sarà tagliata in due strisce di 1m x 2m.

I pali saranno infissi nel terreno a una profondità di almeno 50 cm, senza l'uso di calcestruzzo. Ogni foglio di rete elettrosaldata sarà ancorato ai pali della struttura e conficcato nel terreno per 20-30 cm.

La struttura può essere rinforzata esternamente, nella parte superiore (a un'altezza di circa 1,5 metri) e nella parte inferiore (a un'altezza di circa 30 cm) da due cavi metallici elettrificabili. Per questa parte sono necessari: cavo in acciaio o in lega di alluminio-magnesio; isolatori a vite per pali in legno per il cavo; n. 1 elettrificatore da 3 Joule; n. 1 pannello solare da 25 Watt, comprese le staffe di fissaggio; n. 1 batteria ricaricabile da 80 Ampere; targhette di segnalazione della recinzione elettrica bifacciali; n. 1 palo di messa a terra; n. 1 parafulmine per recinzioni elettriche.



### **A.3.6. Creazione di una barriera per prevenire la predazione dei nidi da parte dei predatori**

In alcune situazioni può essere necessario proteggere i nidi con una struttura in rete metallica di 19x19 mm, alta 100 cm (30 interrata e 70 scoperta). La struttura temporanea deve essere rimossa alla schiusa delle uova (ciò richiede un monitoraggio costante dell'area). È costituita da paletti di legno perimetrali (1,20 m di altezza e 4-8 cm di diametro), posizionati a un metro di distanza l'uno dall'altro, la rete incassata di almeno 30 cm e posta intorno all'area di nidificazione; per garantire una maggiore sicurezza, è consigliabile coprirla con una rete simile per evitare intrusioni dall'alto.

**Monitoraggio post-operam:** una verifica di controllo post-operativa seguita da un monitoraggio costante per valutare la funzionalità e la necessità di manutenzione.

**Risultati attesi:** efficace difesa dagli ungulati selvatici e domestici.



**Sistemi di protezione temporanea dei nidi di testuggini palustri** (fonte

[https://www.reddit.com/r/turtles/comments/14baq3u/eastern\\_painted\\_turtle\\_nest\\_protection/?rdt=33871](https://www.reddit.com/r/turtles/comments/14baq3u/eastern_painted_turtle_nest_protection/?rdt=33871) e da Riley J. L., Litzgus J. D., 2013

## **A.4. PROCEDURE**

Gli interventi di ripristino ambientale, soprattutto se di una certa consistenza, con movimentazioni di terra e trasformazione dello stato dei luoghi, per essere eseguiti necessitano di particolari procedure.

Pur trattandosi in generale di interventi di riqualificazione naturalistica, attuata con opere di ingegneria naturalistica a basso impatto e finalizzata ad un miglioramento della qualità paesaggistica e ambientale, occorre considerare la difficoltà di inquadramento di opere simili nel normale quadro pianificatorio ed autorizzativo previsto dai diversi Enti, e la conseguente necessità di una verifica preliminare delle autorizzazioni non solo previste, ma ancor prima richieste dagli uffici preposti all'interno dei diversi Enti settoriali e responsabili del governo del territorio (settore acque, difesa del suolo, paesaggio, Aree Protette ecc.).

È pertanto indispensabile, prima di attivare un qualunque intervento, effettuare un'analisi di fattibilità preliminare che permetta da un lato di verificare la coerenza con gli strumenti pianificatori esistenti, soprattutto rispetto ai vincoli, e dall'altro attivare di conseguenza il coinvolgimento degli Enti e degli Uffici nel processo decisionale. Questo permette di avere subito un elenco il più esaustivo possibile delle autorizzazioni, nulla osta e pareri necessari per procedere con gli interventi. Nel caso, ad esempio, di opere che prevedano una trasformazione dei luoghi, come lo scavo di uno stagno o piantumazioni di una certa estensione, è possibile ipotizzare un iter procedurale come segue:

### **A.4.1. Verifica titolarità dell'area**

Lo status di proprietà privata o pubblica necessita ovviamente di iter differenti. In particolare in caso di privati, è utile stipulare una convenzione che garantisca il mantenimento dell'opera a lungo termine, e permetta di procedere con le opportune richieste di autorizzazione con una semplice procura per attivare i cantieri. Una volta ottenuta la procura, è possibile procedere come descritto in seguito per le opere in aree pubbliche.

In caso di aree pubbliche, è necessario comunicare l'avvio dei lavori al comune di riferimento (generalmente è sufficiente una CILA<sup>4</sup>) allegando una sintesi progettuale e le opportune

---

<sup>4</sup> Comunicazione di Inizio Lavori Asseverata



autorizzazioni che il comune deve acquisire o che il proponente ha già acquisito. Ogni comune ha le sue procedure interne per presentare le istanze con costi che possono variare da comune a comune. Se l'intervento ricade in area demaniale, è necessario verificare che tipologia di Demanio si tratti e cosa venga richiesto per intervenire e donare opere permanenti (in alcuni casi il Demanio richiede una comunicazione e deve "accettare" di ricevere l'opera).

#### **A.4.2. Vincoli ambientali**

Se l'intervento ricade in Aree Natura2000, è necessario richiedere all'Ente Gestore una valutazione della compatibilità dell'intervento con le indicazioni previste nei Piani di Gestione e/o nelle Misure di Conservazione sito specifiche (DPR 357/97 e ss.mm.ii). Pur trattandosi di interventi mirati alla conservazione di una specie di interesse unionale per il sito, potrebbero intervenire criticità puntuali che li rendono incompatibili con gli strumenti di gestione vigenti (es. l'intervento ricade in un'area interessata da un habitat dell'All. I della Dir. 92/43/CEE per cui la Misure di Conservazione e Piani di gestione prevedono il mantenimento o miglioramento). Per questo occorre usare lo strumento dello Screening di incidenza. Ogni Regione ha ormai recepito nella propria normativa quanto indicato dalle Linee guida nazionali per la valutazione di incidenza (VInCA) 5. - Direttiva 92/43/CEE "HABITAT" articolo 6, paragrafi 3 e 4 emanate con Intesa del 28 Dicembre 2019, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. Tutte le Regioni (e gli Enti di Gestione di conseguenza) hanno adeguato le norme specifiche in ambito di Vinca adottando lo strumento e il modello di Screening di Incidenza.

Trattandosi di interventi a favore della conservazione di specie ed habitat, lo Screening di Incidenza può semplicemente richiedere una "verifica di corrispondenza di proposte pre-valutate" rese disponibili dalle singole regioni (ove le regioni non avessero ancora adempiuto a tale obbligo sarà comunque possibile procedere con una verifica di Screening di Incidenza classica), ed occorre una sintesi progettuale. In questi casi l'iter si conclude con il parere dell'Ente Gestore.

Nel caso in cui l'intervento ricada fuori Aree Natura2000 ma all'interno di Aree Protette, occorre verificare i singoli strumenti di pianificazione delle Aree Protette per accertare la necessità del nulla

---

5 "Linee guida nazionali per la valutazione di incidenza (VInCA) Direttiva 92/43/CEE "Habitat" art. 6, paragrafi 3 e 4" G.U. 28-12-2019, Serie generale - n. 303

osta dell'Ente Gestore dell'Area Protetta, che potrà comunque essere richiesto congiuntamente con la CILA.

### **A.4.3. Vincolo paesaggistico**

Quando si interviene su aree umide già esistenti che necessitano di interventi di manutenzione (es. spurgo, rimozione dei sedimenti e del materiale, taglio vegetazione in alveo) nelle aree assoggettate alla disciplina paesaggistica ai sensi del Decreto Legislativo n. 42 del 22 gennaio 2004 e s.m.i. normalmente non è necessario acquisire l'autorizzazione paesaggistica, ma resta comunque buona prassi un confronto con l'ente competente. Nel caso in cui si realizzino nuovi bacini, soprattutto se dotati di manufatti idraulici per la regolazione dei livelli idrici, si deve invece espletare la pratica per l'ottenimento dell'autorizzazione paesaggistica, che, a seconda del tipo di intervento, può essere semplificata od ordinaria. È quindi consigliabile innanzitutto operare una verifica sul vincolo paesaggistico, possibile ad esempio consultando il sito <http://vincoliinrete.beniculturali.it/VincoliInRete/vir/utente/login>. In presenza di vincoli di questo tipo è probabile che sia necessaria l'attivazione di un'istanza presso gli enti competenti (Parchi, Comuni, ecc.), acquisendo successivamente l'eventuale titolo edilizio (SCIA<sup>6</sup>, CILA, ecc.).

### **A.4.4. vincolo idraulico.**

Se l'intervento ricade in demanio fluviale (all'interno dell'alveo attivo o nelle fasce di rispetto individuate dai singoli Piani di bacino, è necessario richiedere il nulla osta idraulico, a cui occorre allegare una sintesi progettuale e alcuni elementi fondamentali come ad esempio la destinazione dei materiali di risulta (es tagli di vegetazione) e le rocce e terre da scavo. Soprattutto per interventi in aree a vincolo idraulico, ma anche per scavi in altre tipologie di territorio, è importante un'attenta valutazione dei volumi scavati e della tipologia di suolo per poter individuare una destinazione compatibile con la normativa vigente. Ad esempio è consigliabile prevedere in fase progettuale il ricollocamento delle rocce e delle terre in loco (ad esempio per rimodellamento delle sponde degli stagni, limitando la traslocazione o lo smaltimento dei terreni, anche per esigenze di costi. Il nulla osta idraulico può essere richiesto generalmente agli uffici Difesa del suolo regionali o provinciali.

---

<sup>6</sup> Segnalazione certificata di Inizio Attività

#### **A.4.5. valutazione preliminare del rischio bellico residuo.**

Ai sensi della L. n° 177 del 01 ottobre 2012 “Modifiche ed integrazioni del D. Lgs 81/2008”, è obbligatorio per le progettualità che prevedano scavi l’onere di svolgere una valutazione preliminare del rischio bellico residuo, che può o meno portare a un’effettiva bonifica ordigni esplosivi residuati bellici. Questo obbligo riguarda il Committente del progetto, e dovrebbe essere valutato soprattutto per quelle aree in cui vi sia una testimonianza di eventi critici nell’ultimo conflitto (bombardamenti e attività analoghe) o recenti ritrovamenti di ordigni nel territorio di riferimento. Tale obbligo implica l’individuazione di una ditta specializzata e di ulteriori costi che in media sono di circa 3-4.000 €.

Occorre ricordare infine che tutte le istanze presentate alla Pubblica Amministrazione per le richieste di autorizzazione o nulla osta prevedono dei costi: di segreteria, bolli, in alcuni casi costi fissi legati alla tipologia di istanza. Tali costi variano da Ente a Ente, ma possono lievitare in media fino a 200 e 300 euro.

Per quanto riguarda la compatibilità degli interventi con lo stato attuale dei luoghi e delle popolazioni di *Emys orbicularis* e di altre specie di interesse patrimoniale e oggetto di tutela, è bene ricordare che opere che interessino aree di rilevanza naturalistica potrebbero interferire, involontariamente, con altre componenti della biodiversità locale (habitat e specie.).

Per questo nell’ambito della fattibilità preliminare dell’intervento/opera, occorre inventariare le conoscenze sulle aree a progetto, facendo attenzione a scegliere in modo accurato siti e tempistiche migliori e compatibili.

Nel caso di realizzazione o ripristino di stagni, si ricorda quanto segue:

Stagni di nuova realizzazione al di fuori di zone umide esistenti:

- verifica se trattasi di area limitrofa a stagni con popolazioni di *E. orbicularis*, se idonea e già utilizzata per la nidificazione;
- verifica che il cantiere non interferisca con aree di nidificazione di *E. orbicularis* se di aree vicine a stagni con popolazioni di *E. orbicularis*, nel caso effettuare i lavori agosto/settembre
- verifica dell’assenza di interferenze con habitat ai sensi della Dir. 92/43/CEE o di habitat di specie;

Stagni ripristinati in aree umide esistenti, con *E. orbicularis* presente nell’area:

- i lavori di approfondimento e rimodellamento vanno svolti fra agosto e settembre, preferibilmente agosto (impatto limitato su avifauna e erpetofauna);

- scavare avanzando in modo graduale, con supervisione di un esperto per verificare che non ci siano animali in attività. Ad esempio lavorare prima su un lato e poi spostarsi dalla parte opposta;
- il materiale asportato, se non sistemato immediatamente per risagomare le sponde, è consigliabile sia lasciato almeno una notte fermo in loco in modo che eventuali animali (invertebrati ecc) abbiano modo di rientrare in acqua;
- prima di realizzare/ripristinare collegamenti fra stagni o con il reticolo superficiale, verificare non ci siano specie alloctone/indesiderate (es pesci) e assicurarsi che vi siano sistemi di tutela dei nuovi ambienti contro queste specie
- in caso di eventuali diradamenti di canneti, vegetazione acquatica e spondale ecc, svolgere le attività in agosto/settembre, lasciando aree coperte dalla vegetazione e aprendo solo chiarie/canali fra la vegetazione.

In genere sono attività di edilizia libera<sup>7</sup>, cioè «i movimenti di terra strettamente pertinenti all'esercizio dell'attività agricola e le pratiche agro-silvo-pastorali, compresi gli interventi su impianti idraulici agrari». Un esempio arriva da una sentenza del Tribunale della giustizia amministrativa della Campania. I giudici della sezione di Napoli del TAR regionale hanno infatti citato questa norma del Testo Unico per qualificare alcune opere di ingegneria naturalistica consistenti nella posa di pali di legno e tavole in legno a sostegno e contenimento di una siepe lunga circa 4 metri e di altezza 1,20 metri, con piantumazione di alberi di arancio<sup>8</sup>. In base alla decisione dei giudici, contenuta nella sentenza n. 1839 del 4 aprile 2016, un'attività di tal genere si configura come un intervento di manutenzione ordinaria «che non comporta l'alterazione permanente dello stato dei luoghi, ovvero di interventi inerenti l'esercizio dell'attività agro-silvo-pastorale». In ogni caso, è anche necessario tener conto La normativa di riferimento per le Terre e rocce da scavo e si rimanda al Testo Unico Ambiente (D.Lgs. n.152/2006 per la parte di gestione dei materiali)<sup>9</sup>.

---

<sup>7</sup> Gli interventi di edilizia libera non necessitano determinate autorizzazioni del Comune o non c'è bisogno di depositare documenti e comunicazioni di inizio attività, per cui non è necessario né il permesso di costruire, né la Cil, la Cila o la Scia

<sup>8</sup> <https://www.ediltecnico.it/39646/quando-movimento-terra-si-classifica-come-attivit%C3%A0-edilizia-libera/>

<sup>9</sup> In seguito, è stato emanato il DPR 120/2017 in vigore dal 22 agosto 2017, il Regolamento nazionale delle Terre e rocce da scavo, che ricomprende, in un unico corpo normativo tutte le disposizioni relative alla gestione delle terre e rocce da scavo qualificate sottoprodotti, abrogando i provvedimenti precedenti fra i quali:

- il decreto del Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio del mare 10 agosto 2012, n. 161 "Regolamento sulla disciplina dell'utilizzazione delle terre e rocce da scavo" (da noi commentato);
- l'art. 41, comma 2, e 41 bis del DL 21 giugno 2013, n. 69 convertito con modificazioni dalla legge 9 agosto 2013, n. 98 (Decreto del Fare, in modifica del Codice Ambiente)
- l'articolo 184-bis, comma 2-bis, del Testo unico Ambiente, rubricato "Sottoprodotti".

#### **A.4.6. formulario standard**

Si consiglia di verificare anche se nel Formulario standard del Sito se è indicata la presenza di *Emys orbicularis*, perché può succedere che in alcune situazioni la specie non sia stata inserita. Prima di qualsiasi azione, se la specie è presente ma non indicata nel Formulario, bisognerebbe indurre la Regione a modificare il Formulario del sito aggiornando l'elenco delle specie di interesse comunitario presenti con *Emys orbicularis*.

#### **A.4.7. normative in favore della rinaturazione**

La necessità di ripristinare l'ambiente è divenuta una priorità a livello mondiale e le Nazioni Unite hanno promosso un appello affinché il 2021-2030 sia il Decennio per il ripristino degli ecosistemi (UN Decade on Ecosystem Restoration<sup>10</sup>), dedicato alla protezione e alla rinascita degli ecosistemi in tutto il mondo, a beneficio delle persone e della natura. Sono diverse le Strategie europee volte alla tutela e al ripristino ambientale (Strategia Europea per la Biodiversità<sup>11</sup>, Farm to Fork<sup>12</sup>..) o le Direttive che già prevedono obiettivi specifici per la tutela e il ripristino della natura a cominciare dalla Direttiva "Habitat" 43/92/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche.

La Direttiva Quadro Acque (2000/60/CE) ha il principale obiettivo di raggiungere il "buono stato ecologico" dei corpi idrici entro il 2027. Considerando che gran parte degli ecosistemi acquatici non è in buone condizioni, c'è la necessità di una diffusa azione di riqualificazione degli ecosistemi d'acqua dolce. In Italia ciò è possibile promuovendo "interventi integrati per il miglioramento dello stato ecologico dei corsi d'acqua e la tutela degli ecosistemi e della biodiversità (dall'articolo 7, comma 2, del decreto-legge 12 settembre 2014, n. 133, convertito, con modificazioni, dalla legge 11 novembre 2014, n. 164), di cui le regioni dovrebbero farsi carico. In questo modo potrebbero essere ripristinati in modo specifico anche habitat per *Emys orbicularis*.

---

<sup>10</sup> <https://www.decadeonrestoration.org/about-un-decade>

<sup>11</sup> [https://www.europarl.europa.eu/news/it/headlines/society/20200519STO79422/tutelare-la-biodiversita-in-europa-la-strategia-dell-ue?at\\_campaign=20234-Green&at\\_medium=Google\\_Ads&at\\_platform=Search&at\\_creation=DSA&at\\_goal=TR\\_G&at\\_audience=&at\\_topic=Biodiversity&gclid=EAlalQobChMIhNybpLv3\\_glVivZ3Ch1J-Q1qEAAYASAAEglq4PD\\_BwE](https://www.europarl.europa.eu/news/it/headlines/society/20200519STO79422/tutelare-la-biodiversita-in-europa-la-strategia-dell-ue?at_campaign=20234-Green&at_medium=Google_Ads&at_platform=Search&at_creation=DSA&at_goal=TR_G&at_audience=&at_topic=Biodiversity&gclid=EAlalQobChMIhNybpLv3_glVivZ3Ch1J-Q1qEAAYASAAEglq4PD_BwE)

<sup>12</sup> <https://www.europarl.europa.eu/italy/it/succede-al-pe/strategia-farm-to-fork-e-politica-agricola-comune-nella-prossima-programmazione-ue-2021-2027>

Nella nuova Politica Agricola Comune (PAC) vi sono obiettivi specifici, per contribuire alla mitigazione e all'adattamento al cambiamento climatico (Obiettivo specifico 4) e per perseguire degli obiettivi ambientali in tema di tutela delle risorse naturali e di protezione della biodiversità (rispettivamente, Obiettivi specifici 5 e 6). Il Piano Strategico Nazionale della PAC 2023-2027 è stato declinato a livello regionale, ad esempio in Lombardia, tramite il “Complemento per lo Sviluppo Rurale del Piano Strategico Nazionale della PAC 2023-2027 della Regione Lombardia” e offre notevoli opportunità per la realizzazione di azioni di habitat restoration. Vi sono investimenti non produttivi per la “realizzazione e/o ripristino della funzionalità di infrastrutture ecologiche connesse all’acqua (a titolo esemplificativo, aree umide, fontanili, pozze e altre strutture di abbeverata)”; per il “ripristino o impianto della vegetazione in alveo (macrofite) e sulle sponde (fasce riparie) nel reticolo idrico minore quali il ripristino e/o l’impianto della vegetazione acquatica e ripariale o altri interventi di riqualificazione ecologica”. Vi è la possibilità di realizzare infrastrutture irrigue e di bonifica o di prevedere la “manutenzione straordinaria, ad opera degli Enti irrigui, del reticolo artificiale di pianura avente finalità di irrigazione e bonifica e relativi impianti, allo scopo di mantenere o creare la fornitura di servizi ecosistemici legati agli ecosistemi acquatici”; vi possono, inoltre essere interventi di gestione attiva delle infrastrutture ecologiche che prevedono un pagamento annuale ad ettaro per chi si impegna nella gestione di infrastrutture ecologiche come, ad esempio, le zone umide

Inoltre si può promuovere azioni di habitat restoration accedendo a programmi europei quali i programmi Horizon<sup>13</sup> finanziati al 100% o i programmi LIFE, che consentono cofinanziamenti tra il 60 e il 75%.

Infine, vi sono fondi multilaterali (es. Green Climat Found -GFC)<sup>14</sup> oppure l’Adaptation Fund <sup>15</sup>), le banche multilaterali di sviluppo (es. Asian Development Bank<sup>16</sup>), swap debito contro natura<sup>17</sup>, attività di cooperazione tecnica e finanziaria, fondazioni e filantropia.

A livello nazionale, in Italia, esistono diverse possibilità con l’impiego di risorse nazionali pubbliche ma anche da soggetti privati quali banche, Fondazioni (Es. Fondazione Cariplo, Fondazione con il Sud, CariVerona), compagnie assicuratrici<sup>18</sup> le imprese private (responsabilità sociale d’impresa).

---

<sup>13</sup> [https://www.catalyze-group.com/horizon-europe-2023/?utm\\_campaign=Horizon%20Europe&utm\\_term=Horizon%20Europe%20funding&gclid=EAlaIQobChMImpP-Qj4r3\\_glVWPI3Ch2wnwk6EAAYASAAEgKQ7\\_D\\_BwE](https://www.catalyze-group.com/horizon-europe-2023/?utm_campaign=Horizon%20Europe&utm_term=Horizon%20Europe%20funding&gclid=EAlaIQobChMImpP-Qj4r3_glVWPI3Ch2wnwk6EAAYASAAEgKQ7_D_BwE)

<sup>14</sup> <https://www.greenclimate.fund/>

<sup>15</sup> <https://www.adaptation-fund.org/>

<sup>16</sup> <https://www.adb.org/>

<sup>17</sup> [https://en.wikipedia.org/wiki/Debt-for-nature\\_swap](https://en.wikipedia.org/wiki/Debt-for-nature_swap)

<sup>18</sup> <https://www.swissre.com/our-business/public-sector-solutions/our-solutions/nature-based-solutions.htm>

## **B. RINFORZO POPOLAZIONI (RE STOCKING) - GENETICA**

### **B.1. INTRODUZIONE**

Durante l'ultimo decennio, la genetica di popolazione e lo sviluppo di nuove metodologie d'indagine del DNA integrate a studi ecologici e demografici hanno trovato ampia possibilità d'impiego in contesti multidisciplinari, come la biologia della conservazione, indirizzati verso lo sviluppo di piani di gestione faunistica e di conservazione di popolazioni animali selvatiche. Lo studio della struttura genetica di popolazioni permette, infatti, di identificare unità sufficientemente distinte da poter essere considerate unità gestionali separate, di determinare la popolazione d'origine di singoli individui ed i gradi di parentela, il tutto per fornire informazioni necessarie allo sviluppo di piani di reintroduzione o di rinforzo genico e demografico.

Vengono a tale proposito utilizzate porzioni del DNA nucleare e del DNA mitocondriale. Per il DNA nucleare, la classe di marcatori genetici è rappresentata da unità di sequenze genomiche nucleari ripetute, chiamate microsatelliti, il cui grado di polimorfismo viene determinato dal numero delle ripetizioni osservate tra individui. Le dimensioni contenute dei microsatelliti (100-500 nucleotidi) permette la loro identificazione, tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR), a partire da quantità minime di DNA. Il processo di caratterizzazione del livello di variabilità genetica a loci microsatelliti viene comunemente denominato DNA fingerprinting, perchè capace di distinguere inequivocabilmente, tranne che per gemelli omozigoti, un individuo dall'altro. I microsatelliti vengono utilizzati per la definizione dei rapporti di parentela e per determinare la popolazione di provenienza di un individuo tramite analisi di struttura di popolazione e test di assegnazione.

Un ulteriore livello di definizione si può ottenere mediante l'analisi di dati di sequenza del DNA nucleare ottenuti tramite tecniche di sequenziamento di nuova generazione. L'analisi di questi dati consente di identificare decine se non centinaia di migliaia di variazioni genetiche lungo tutto il genoma degli individui esaminati. Le variazioni genetiche relative a una singola posizione lungo la sequenza di DNA sono dette polimorfismi a singolo nucleotide (*single-nucleotide polymorphism* o SNP). Queste variazioni consistono nella sostituzione di una delle quattro basi azotate con un'altra in una posizione specifica del genoma. Gli SNP sono il tipo più comune di variazione genetica, si trovano in tutto il genoma e sono responsabili di gran parte della diversità genetica all'interno di una popolazione. Questi marcatori genetici sono diventati uno strumento prezioso in vari campi della genetica e della genomica, tra cui la genetica di popolazione e la biologia forense.

Il DNA mitocondriale è, nella maggior parte dei casi, presente in singole copie in ogni cellula eucariota, nei vertebrati si trasmette per via materna, è caratterizzato da un elevato tasso di evoluzione, principalmente a causa della mancanza di meccanismi che correggono gli errori compiuti in fase di replicazione del DNA, ed è praticamente esente da fenomeni di ricombinazione. La caratterizzazione della sequenza di regioni codificanti e non codificanti del DNA mitocondriale fornisce informazioni sulle linee materne che, affiancate ai risultati di fingerprinting e SNPs, possono aumentare il grado di risoluzione dell'indagine genetica. Un primo livello di assegnazione genetica, ad esempio, si basa sul confronto di specifiche sequenze del DNA mitocondriale tra le testuggini che compongono le popolazioni naturali e gli individui di origine ignota. Tale confronto riguarda la determinazione del grado di similitudine in termini di composizione in basi nucleotidiche interindividuale e viene utilizzato per assegnazioni su macroscala, come ad esempio l'appartenenza di un individuo alle popolazioni del versante Tirrenico piuttosto che del versante Adriatico della penisola Italiana.

## **B.2 OBIETTIVI DELLE ANALISI GENETICHE**

Nella pianificazione di azioni di rinforzo demografico di popolazione naturali di *Emys orbicularis* o di reintroduzione di individui in aree in cui la specie è scomparsa ma le condizioni ambientali adatte per la sua sopravvivenza e riproduzione sono state ricostituite, le analisi genetiche, in ottemperanza alle prescrizioni dettate dall'IUCN si articolano sui seguenti punti:

- a) genotipizzazione delle popolazioni naturali mediante caratterizzazione della variabilità allelica a loci microsatelliti e/o SNPs e confronto di sequenze del DNA mitocondriale per la definizione del livello di differenziazione genetica intraspecifica come strumento base per la gestione dei ripopolamenti;
- b) genotipizzazione e assegnazione alle rispettive popolazioni naturali di origine degli individui presenti nei centri di recupero e riproduzione, inclusi i potenziali riproduttori presenti (o in futuro ingresso) tramite analisi dei marcatori genetici utilizzati per lo studio delle popolazioni naturali;
- c) Identificazione di individui con basso legame di parentela per la formazione di coppie o terne (un maschio e due femmine) riproduttive in modo da minimizzare l'inincrocio e conservare la variabilità genetica dei riproduttori. I riproduttori dovrebbero inoltre provenire dalla stessa popolazione di origine, in modo da evitare una possibile riduzione di idoneità della prole a causa di depressione da esoincrocio dovuta alla perdita di specifiche interazioni geniche di individui adattati a determinate condizioni ambientali;



- d) genotipizzazione e test di paternità della prole, per assicurarsi che, nonostante la possibilità di ritenzione spermatica nelle femmine, questa sia effettivamente derivata dalla fecondazione tra gli individui scelti come riproduttori.

La caratterizzazione genetica delle popolazioni Italiane di *E. orbicularis* vede come riferimento 29 principali popolazioni dell'Italia continentale e peninsulare, 4 popolazioni della Sardegna e 6 in Sicilia per quanto riguarda *E. trinacris* (Fig. 1). Le popolazioni della Sicilia sono considerate tra le popolazioni di riferimento (*baseline*) anche se appartenenti a *E. trinacris*, così da rilevare una possibile provenienza insulare di individui mantenuti in condizioni di cattività.

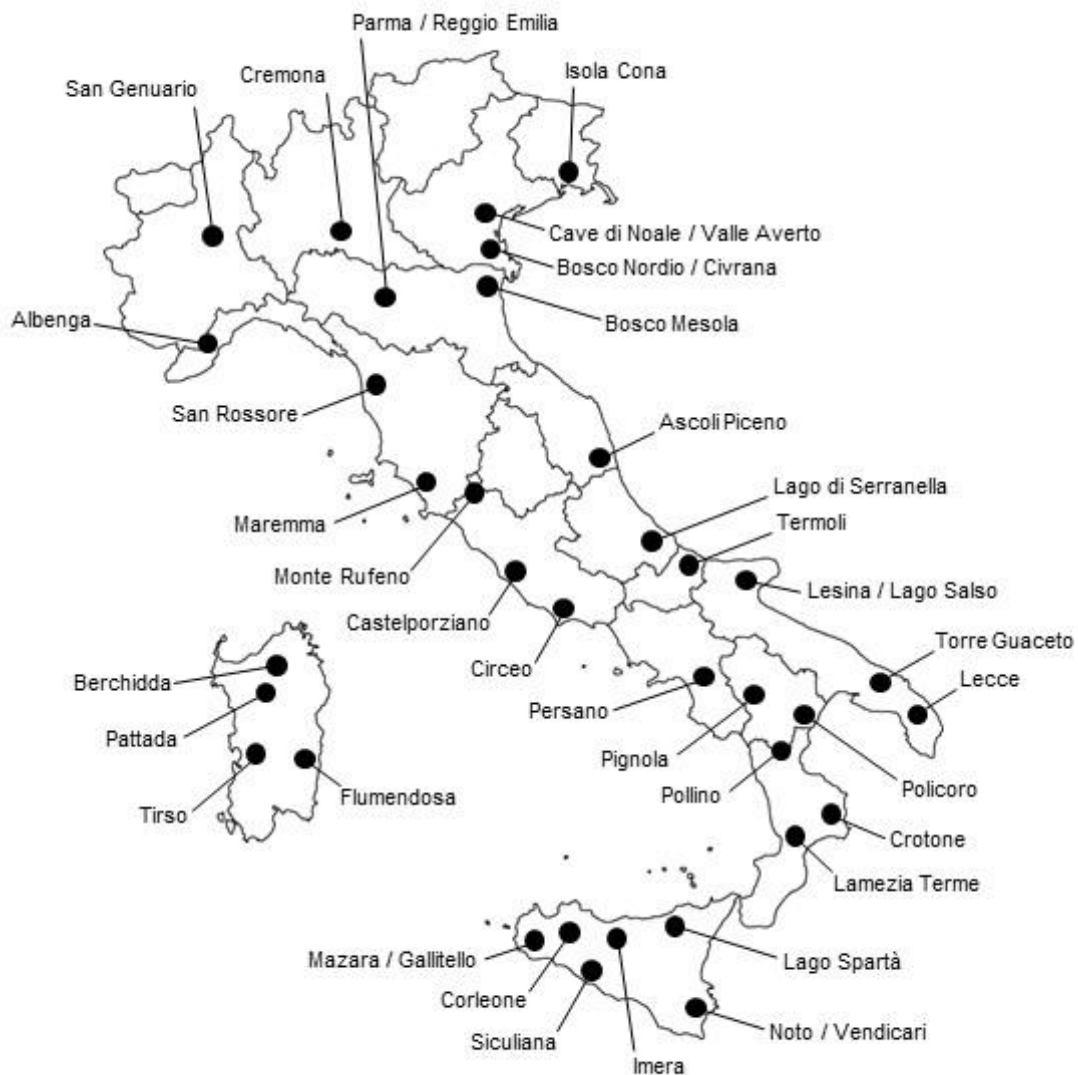


Figura 1. Mappa delle principali popolazioni Italiane naturali di *Emys orbicularis* ed *E. trinacris* (Sicilia) con struttura genetica nota, utilizzate per la determinazione delle aree di origine di individui mantenuti in condizioni di cattività.

### B.3 CAMPIONAMENTO

La caratterizzazione genetica di individui di *E. orbicularis* viene effettuata a partire da DNA purificato da campioni di sangue.

Per ogni individuo, dipendentemente dalle dimensioni, vengono prelevati circa 0,05 cc (individui giovani) e 0,1 cc (individui di taglia media e adulti) di sangue dal plesso venoso subcarapaciale utilizzando una siringa da 1 ml e un ago monouso da 23Gx1" o 26Gx½" rispettivamente per individui adulti e immaturi (Fig. 2). Un ago da 30Gx5/16" viene invece utilizzato per il prelievo di sangue da individui giovani. I campioni di sangue vengono temporaneamente conservati a temperatura ambiente in una fiala da criogenia da 2,0 ml contenente 0,8 ml di un tampone di lisi (0,1M Tris, 0,1M EDTA, 0,2M NaCl, 1% sodio dodecil solfato, pH 8,0). La conservazione dei campioni di sangue a temperatura ambiente richiede condizioni che inibiscano l'attività delle nucleasi. Un'alta concentrazione di sale riduce l'attività delle nucleasi e un risultato simile si ottiene con un'alta concentrazione di EDTA. Le nucleasi sono enzimi dipendenti dai cationi divalenti. L'EDTA chela i cationi metallici polivalenti come il Mg<sup>2+</sup>, indebolendo così i legami ionici. L'EDTA è utilizzato anche come anticoagulante, in quanto complessa il Ca<sup>2+</sup> del plasma e impedisce la coagulazione del sangue. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un forte detergente che degrada i componenti lipidici delle membrane cellulari e nucleari, permettendo così la miscelazione degli acidi nucleici con l'EDTA. I campioni vengono poi conservati in modo permanente a - 80 °C.



Figura 2. Prelievo di un campione di sangue dal plesso venoso subcarapaciale di un adulto di *Emys ricularis*.

## B.4 ANALISI GENETICHE

### B.4.1. Purificazione del DNA

Il DNA viene purificato da campioni di sangue utilizzando un protocollo standard basato sulla rottura delle membrane citoplasmatiche, sulla rimozione dei contaminanti proteici con solventi organici e successivo isolamento degli acidi nucleici ad alto peso molecolare in presenza di sale ed etanolo. La purificazione del DNA viene eseguita a partire da 50-100  $\mu$ l di campione mediante disgregazione delle componenti citoplasmatiche e dissociazione proteica con proteasi *K* in presenza di un 0,7 ml di un tampone di lisi contenente 100 mM Tris, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS, pH 8,0 per circa 8 ore a 37 °C su un agitatore orbitante. Il DNA viene successivamente separato dai componenti proteici mescolando il prodotto della digestione con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (24:24:1). Centrifugando la miscela a 13,000 rpm si ottengono due fasi: una fase fenolica organica inferiore che contiene le componenti proteiche e una fase acquosa meno densa superiore contenente gli acidi nucleici. Dopo la centrifugazione, la fase acquosa superiore viene rimossa e il processo viene ripetuto con cloroformio-alcool isoamilico (24:1). Dopo il secondo processo di separazione, il surnatante viene mescolato con 2,5 volumi di etanolo al 99,9% per concentrare gli acidi nucleici. Il precipitato di acidi nucleici viene quindi sedimentato per centrifugazione, l'etanolo viene rimosso e il precipitato viene risospeso in un tampone di mantenimento contenente 100 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0. L'EDTA chela gli ioni di metalli pesanti, comunemente necessari per l'attività della DNAasi, mentre l'uso di un pH basico minimizza la deamidazione. Il DNA viene poi conservato a - 80 °C.

Un metodo alternativo di purificazione del DNA prevede il legame e la successiva eluizione del DNA su una membrana di silice. La lisi si ottiene incubando il campione in una soluzione proprietaria contenente SDS e proteinasi *K* a 70 °C per 15 minuti. Il campione viene quindi collocato su una membrana di silice in una colonna da microcentrifuga che viene a sua volta inserita in una provetta di raccolta. Le condizioni ottimali per il legame del DNA alla matrice di silice sono ottenute con l'aggiunta di sali caotropici ed etanolo al lisato, che viene poi centrifugato per eliminare i contaminanti proteici e i detriti cellulari attraverso la matrice, nella provetta di raccolta. La membrana di silice viene successivamente lavata due volte mediante centrifugazione con due diversi tamponi. In ogni fase, il liquido risultante dalla centrifugazione viene scartato. Il legame del DNA con la matrice è reversibile e specifico per gli acidi nucleici. Il DNA viene eluito in condizioni di

bassa forza ionica in presenza di un tampone di eluizione leggermente alcalino mediante centrifugazione in una nuova provetta di raccolta. Il DNA viene poi conservato a - 80 °C.

#### **B.4.2 Caratteristiche del DNA mitocondriale come marcatore molecolare**

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è il genoma dei mitocondri, strutture all'interno delle cellule che convertono l'energia proveniente dal cibo in una forma che le cellule possono utilizzare per i processi metabolici. Il DNA mitocondriale dei vertebrati è una molecola circolare a doppio filamento di circa 16,000-18,000 coppie di basi nucleotidiche (bp). I due filamenti del mtDNA si distinguono per il loro contenuto nucleotidico: il filamento ricco di guanina è detto filamento pesante, mentre quello ricco di citosina è detto filamento leggero. Il mtDNA comprende anche un'importante regione non codificante (la regione di controllo) che è responsabile della replicazione e della trascrizione del genoma mitocondriale.

Nella riproduzione sessuale, i mitocondri vengono generalmente ereditati per via materna. I mitocondri presenti della coda degli spermatozoi vengono solitamente distrutti dalla cellula uovo dopo la fecondazione o comunque eliminati con la perdita della coda dello spermatozoo durante la fecondazione. Pertanto, mentre il DNA nucleare ha un'eredità diparentale e diploide, il mtDNA è aploide e viene ereditato asessualmente, prevalentemente, se non completamente, attraverso la linea materna. Studiare la differenziazione del mtDNA equivale quindi a studiare la popolazione femminile. Questo, unito alla sua caratteristica aploide, rende la dimensione effettiva della popolazione di questo genoma quattro volte inferiore a quella del genoma nucleare. Di conseguenza, il tasso di differenziazione dovuto alla deriva genetica è particolarmente rapido nel genoma mitocondriale quando la dimensione complessiva della popolazione è piccola. Inoltre, a differenza del DNA nucleare, che viene ereditato da entrambi i genitori e in cui i geni sono soggetti al processo di ricombinazione, non si verificano grosse variazioni nel mtDNA dal genitore alla progenie. Sebbene la ricombinazione avvenga anche per il mtDNA, questa avviene prevalentemente all'interno dello stesso mitocondrio. Per questo motivo e a causa della bassa dimensione effettiva della popolazione e del tasso di mutazione relativamente alto, il mtDNA è estremamente utile per tracciare la discendenza matrilineare ed è utilizzato per valutare le relazioni genetiche ed evolutive tra individui, gruppi, popolazioni sia livello intraspecifico che interspecifico. L'analisi del DNA mitocondriale viene generalmente effettuata esaminando le variazioni di sequenza delle regioni codificanti che non comportano la sostituzione degli amminoacidi o delle sequenze intergeniche

non codificanti, come la regione di controllo che non sono sottoposte a vincoli selettivi e hanno quindi un tasso di mutazione più elevato. Ciò consente di valutare il grado di differenziazione genetica tra gruppi che si sono diversificati di recente come le popolazioni all'interno di una specie. La regione di controllo del mtDNA, in particolare, è un'area del genoma mitocondriale costituita da DNA non codificante. Contiene l'origine di replicazione del filamento pesante e l'origine di trascrizione per entrambi i filamenti, ed è la sequenza più polimorfica del genoma mitocondriale, con diversi gradi di polimorfismo concentrato nelle regioni ipervariabili. Il mtDNA di *E. orbicularis* è lungo circa 16.770 paia di basi (bp) e contiene tutti i 33 geni tipicamente presenti in altre specie della superfamiglia Testudinoidea (Lourenco et al. 2012) e ha una regione di controllo lunga circa 1.000 bp. La caratterizzazione e il confronto delle sequenze della regione di controllo del mtDNA forniscono un approccio appropriato e rapido per l'analisi della differenziazione intraspecifica delle popolazioni di *E. orbicularis* lungo la penisola italiana e per la valutazione della popolazione di origine degli individui in cattività e allevati in cattività.

La regione di controllo del mtDNA viene prima amplificata mediante reazione a catena della polimerasi (vedi § 4.3), e la sequenza nucleotidica dei prodotti di amplificazione viene successivamente caratterizzata mediante reazione di terminazione di catena (vedi § 4.4). I prodotti del sequenziamento ciclico sono poi risolti mediante elettroforesi capillare in un analizzatore automatico di acidi nucleici (§ 4.5).

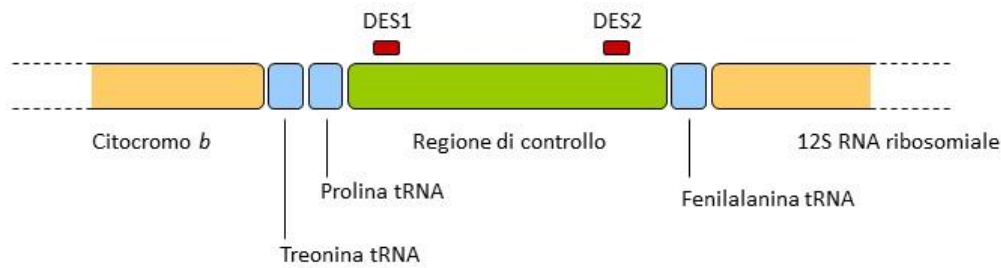
### **B.4.3. Reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction -PCR) per l'amplificazione di una porzione parziale della regione di controllo del DNA mitocondriale**

La reazione a catena della polimerasi (*polymerase chain reaction* – PCR) è una tecnica che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni. Viene in pratica ricostruito in vitro uno specifico passaggio della riproduzione cellulare: la ricostituzione (sintesi) di un segmento di DNA completo (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il processo di amplificazione in vitro avviene tramite la *Taq* polimerasi, una DNA polimerasi stabile fino a circa 95 °C (originaria dal batterio *Thermus aquaticus* che vive ad alte temperature). La *Taq* polimerasi sintetizza una nuova catena utilizzando deossinucleotidi liberi, a partire da un filamento a singola elica legato ad una semielica di DNA costituito da 10-30 deossinucleotidi chiamato innesco o *primer*. I *primers* vengono sintetizzati in vitro ed hanno sequenze specie-specifiche in modo da

trovare corrispondenza rispettivamente alle sequenze a monte (*primer forward*) e a valle (*primer reverse*) della porzione di DNA da caratterizzare. La PCR consiste quindi in una prima fase di denaturazione della doppia elica del DNA, una seconda fase in cui i *primers* si legano alle sequenze complementari delle semieliche denaturate (*annealing*), ed una terza fase di polimerizzazione delle semieliche complementari alle semieliche denaturate per formare due nuove doppie eliche di DNA dalla doppia elica di partenza. Tale processo viene ripetuto circa 35 volte così che ad ogni ciclo di amplificazione il numero di doppie eliche del DNA viene raddoppiato ed il DNA viene amplificato in modo esponenziale.

La PCR richiede una serie di reagenti tra i quali: 1) il DNA che contiene la regione da amplificare, 2) due primers con sequenze complementari rispettivamente alle sequenze a monte e a valle della porzione di DNA da amplificare, 3) la *Taq* polimerasi, 4) deossinucleosidi trifosfati (dNTP) che costituiranno il nuovo filamento di DNA, 5) una soluzione tampone che fornisce un ambiente chimico adatto per stabilità e attività ottimali della DNA polimerasi, e 6) cationi divalenti ( $Mg^{++}$ ), un cofattore per l'attività della *Taq* polimerasi. I cationi aiutano anche a stabilizzare i due filamenti dopo la denaturazione e vengono aggiunti alla reazione sotto forma di  $MgCl_2$ .

La regione di controllo del DNA mitocondriale di *E. orbicularis* viene amplificata utilizzando il *primer* del filamento leggero (*forward*) DES1 (5' - GCATTCATCTATTTTCCGTTAGCA - 3') ed il *primer* del filamento pesante (*reverse*) DES2 (5' - GGATTTAGGGGTTTGACGAGAAT - 3'). Il primer a filamento leggero DES1 e il primer a filamento pesante DES2 si legano rispettivamente alla posizione 15,967 e alla posizione 16,627 nella regione di controllo del DNA mitocondriale di *E. orbicularis* (Fig. 3). Le posizioni di attacco dei *primers* si riferiscono alla posizione della base 3' sulla sequenza del genoma mitocondriale di *E. orbicularis* pubblicata da Lourenco et al. (2012). La PCR viene effettuata in un volume totale di 10  $\mu$ l con circa 10 ng di DNA totale, 1 x soluzione tampone, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M di ciascun dNTP, 0,5  $\mu$ M di ciascun primer e 0,5 unità di *Taq* DNA polimerasi. I profili termici consistono in una fase iniziale di denaturazione di 5 minuti a 95 °C, seguita da 35 cicli di 30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, con una fase finale di polimerizzazione di 10 minuti a 72 °C. La PCR produce un amplicone di 707 bp di sequenza della regione di controllo del DNA mitocondriale.



**Figura 3.** Posizioni di attacco dei primers DES1 e DES2 per l'amplificazione di una porzione parziale della regione di controllo del DNA mitocondriale relativamente ad altri geni contigui (vedi testo per ulteriori dettagli).

#### **B.4.4 Reazione di terminazione a catena o sequenziamento ciclico dei prodotti PCR**

Il metodo della terminazione a catena è concettualmente simile alla PCR in quanto utilizza la capacità della DNA polimerasi di sintetizzare una copia complementare di un filamento di DNA. La sintesi del filamento complementare alla semielica di stampo avviene a partire da uno solo dei due *primers* utilizzati in §4.3. La DNA polimerasi polimerizza la nuova semielica aggiungendo nucleotidi mediante legami fosfodiesterici tra il gruppo 3'-idrossile dell'ultimo nucleotide aggiunto e il 5'  $\alpha$ -fosfato del successivo dNTP. La reazione di sintesi viene terminata con l'incorporazione di un nucleotide modificato che non permette una successiva incorporazione dinucleotidica (da qui il nome di terminazione a catena). I dinucleotidi modificati che terminano la reazione sono i 2',3'-dideossinucleosidi 5'-trifosfati (ddNTP), che si differenziano dai dNTP convenzionali per la mancanza di un residuo idrossilico in posizione 3' del deossiribosio. Una volta incorporati dalla DNA polimerasi, l'assenza di un residuo 3'-idrossile impedisce la formazione di un legame fosfodiesterico con il dNTP successivo. I prodotti della reazione sono quindi una serie di catene oligonucleotidiche la cui lunghezza è determinata dalla distanza tra la terminazione del *primer* e i siti di terminazione. Utilizzando i quattro diversi ddNTP ognuno marcato con un fluoroforo di colore differente, si generano gruppi di oligonucleotidi che terminano nelle posizioni occupate da ogni A, C, G o T che vengono successivamente risolti mediante elettroforesi capillare (vedi §4.5). Ogni reazione contiene DNA polimerasi, template, primer, tampone, tutti e quattro i dNTP e quattro ddNTP, ciascuno etichettato con un colorante (fluorocromo) di colore diverso.

La reazione di terminazione a catena viene eseguita attraverso 25 cicli di denaturazione, annealing di un *primer* specifico su un solo filamento e polimerizzazione in presenza di *Taq* DNA polimerasi. Sebbene sia simile alla PCR, nel sequenziamento ciclico l'amplificazione avviene su un singolo filamento (utilizzando un solo *primer* per reazione) ed è quindi lineare. L'amplificazione tramite PCR



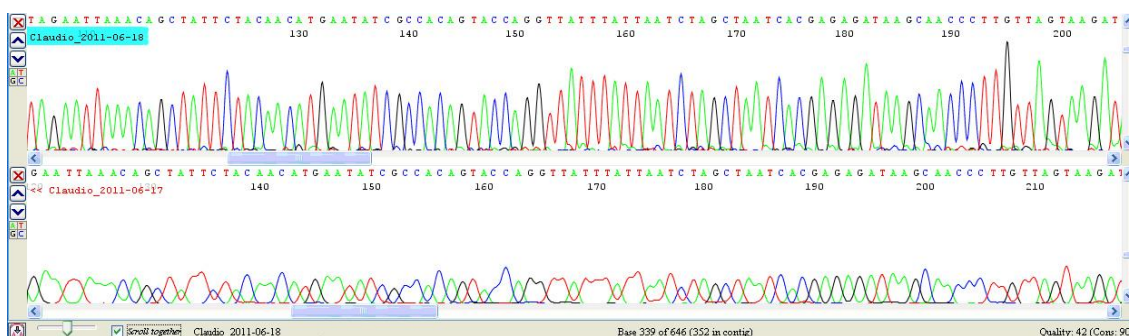
è invece esponenziale poiché i due filamenti vengono sintetizzati simultaneamente. La reazione di terminazione di catena per la caratterizzazione della sequenza della regione di controllo del mtDNA di *E. orbicularis* amplificata secondo il metodo descritto in §4.3, viene effettuata in un volume totale di 10 µl con circa 20 ng di prodotto PCR, 0,5 µl di Terminator Ready Reaction Mix (contenente polimerasi, dNTPs, ddNTPS marcati con fluorocromi e ioni), 1X di soluzione tampone e 3,2 µM di *primer*. I profili termici consistono in una fase iniziale di denaturazione di 3 minuti a 95 °C, seguita da 25 cicli di 10 sec a 95 °C, 5 sec a 50 °C e 4 min a 60 °C. Una volta terminate le reazioni, i prodotti di sequenziamento ciclico vengono precipitati in isopropanolo, il quale viene successivamente fatto evaporare, risospeso in formamide deionizzata (Hi-Di) e risolti mediante elettroforesi capillare. Per ogni prodotto di PCR vengono effettuate due reazioni di sequenziamento ciclico. La prima reazione di sequenziamento utilizza il primer DES1, mentre il primer DES2 viene aggiunto alla seconda reazione. Questo è necessario perché la reazione di terminazione a catena produce una serie di oligonucleotidi, ciascuno marcato con una fluorescenza di colore differente dipendentemente dal dideoccinucleotide finale, i quali durante la loro risoluzione per elettroforesi capillare non permettono una definizione delle basi nucleotidiche affidabile per lunghezze maggiori di circa 600 basi a partire dal *primer* (vedi anche §4.5). La sequenza di DNA ottenuta con il *primer* DES1 è inversa e complementare alla sequenza ottenuta utilizzando il *primer* DES2. Il decremento di segnale che si osserva alla fine della reazione a partire dal *primer* DES1 viene quindi compensato dal forte segnale che viene invece ottenuto dalla reazione a partire dal *primer* DES2 e viceversa (Fig. 4).

#### **B.4.5. Risoluzione dei prodotti di sequenziamento ciclico mediante elettroforesi capillare**

La reazione di elettroforesi capillare dei prodotti di terminazione a catena avviene, per ogni campione, all'interno di un capillare nel quale viene iniettato un polimero che costituisce il nuovo mezzo attraverso il quale si sviluppa la corsa elettroforetica. L'elettroforesi capillare avviene all'interno di un analizzatore automatico di acidi nucleici. Il sequenziatore automatico è composto da due unità: una camera elettroforetica dotata di un laser fisso e un computer esterno collegato alla camera, dotato di un software in grado di analizzare l'emissione di fluorescenza. Vi è inoltre una camera di rilevazione, dove ogni capillare giunge in prossimità del laser. In questa sezione, i fluorocromi dei prodotti di terminazione a catena che migrano per elettroforesi verso l'anodo vengono eccitati dal laser ed emettono fluorescenza. I frammenti di DNA separati per elettroforesi arrivano in tempi diversi nella zona del capillare esposta al laser, con il conseguente eccitamento

del fluorocromo del frammento che emette una fluorescenza che viene direzionata attraverso una serie di lenti ad uno spettrografo che separa le lunghezze d'onda e le indirizza ad una camera CCD (Charged-Coupled-Device) dotata di filtri diversi a seconda dei fluorocromi che devono essere analizzati. Tale camera analizza lo spettro di emissione e converte il segnale luminoso in segnale digitale che viene registrato sul computer associato alla macchina. I dati ricavati dai segnali emessi durante l'elettroforesi capillare per la caratterizzazione allelica ed elaborati da opportuni software sono poi rappresentati come linee grafiche con la posizione di ogni picco sull'asse delle ascisse che rappresenta un prodotto di terminazione a catena di differente lunghezza.

In particolare, i prodotti che terminano un ddATP vengono rappresentati da un segnale verde, un segnale blu indica la terminazione con ddCTP, i segnali neri rappresentano frammenti terminati con ddGTP e i segnali rossi indicano oligonucleotidi terminati con ddTTP. Il computer associato all'analizzatore automatico di acidi nucleici assembla la sequenza di DNA in base al colore e all'ordine con cui i prodotti di sequenziamento ciclico passano davanti al laser. I dati grezzi ottenuti dall'elettroforesi capillare vengono successivamente trasformati in elettroferogrammi (Fig. 4).



**Figura 4. Electroferogrammi di una porzione della regione di controllo del mtDNA di *E. orbicularis*. Il segnale di bassa qualità della parte terminale della sequenza ottenuta a partire dal primer DES2 (in basso) viene compensato dal segnale di alta qualità della sequenza ottenuta utilizzando il primer DES1 (in alto). La medesima ma inversa situazione si propone alla fine della sequenza ottenuta con DES1 per ottenere una sequenza consenso per ogni individuo di 659 bp.**

Per ogni individuo, i quattro gruppi di prodotti di sequenziamento ciclico, ognuno caratterizzato da un colore differente vengono risolti per elettroforesi in un unico capillare. Per ogni testuggine, i prodotti di sequenziamento ottenuti a partire dal *primer* DES1 vengono stati separati in un capillare, mentre una seconda reazione di elettroforesi capillare distingue i prodotti ottenuti a partire dal *primer* DES2. Il complemento inverso di una delle due sequenze viene quindi allineato alla sequenza complementare in modo da creare una sequenza di consenso per la regione di controllo di ogni singola testuggine. La sequenza di consenso corrisponde ad un totale di 659 nucleotidi della regione

di controllo del mtDNA dopo aver eliminato le sequenze corrispondenti ai *primers* ed alcune zone con segnale non ottimale.

#### **B.4.6. Caratteristiche dei loci microsatelliti come marcatori molecolari**

Una seconda classe di marcatori molecolari particolarmente utile per determinare il grado di variabilità genetica intraspecifica e nello specifico per assegnare gli individui di origine sconosciuta alla popolazione geneticamente più simile sono una particolare tipologia di *Variable Numbers of Tandem Repeats* (VNTRs) del DNA nucleare chiamate *Simple Sequence Polymorphisms* o microsatelliti.

I microsatelliti sono ripetizioni di sequenze genomiche corte, costituite in media da 2 a 6 nucleotidi, come (TG)<sub>n</sub> o (AAT)<sub>n</sub>. I microsatelliti rappresentano dei marcatori genetici molto polimorfici e si trovano distribuiti nel genoma nucleare di eucariotici e alcuni procarioti. La caratterizzazione delle differenze alleliche a livello intra- ed inter-individuale è dovuta alla variazione nel numero di ripetizioni delle suddette sequenze nucleotidiche. L'utilità dei microsatelliti in genetica della popolazione risiede nelle dimensioni relativamente contenute dei loci. Una sequenza costituita in media da 40 ripetizioni dinucleotidiche corrisponde ad un locus microsatellite di 80 nucleotidi. Una porzione del genoma di tali dimensioni può essere facilmente amplificata tramite PCR per un prodotto finale di 100-300 nucleotidi, se consideriamo la porzione del prodotto definitiva che include le sequenze dei primers. E' quindi evidente che uno studio di variazione allelica interindividuale basato su loci microsatelliti può essere effettuato anche su campioni di DNA degradato in cui la probabilità di avere un locus microsatellite interrotto è molto bassa. Inoltre, tali dimensioni permettono di individuare differenze alleliche molto fini, fino ad un singolo nucleotide di differenza interindividuale tramite elettroforesi capillare. Vengono inoltre ereditati per via Mendeliana e quindi rappresentano un marcatore genetico ideale per analisi di parentela ed investigazioni demografiche fini, a livello di singola popolazione e per test di assegnazione genetica. Le due forme di un locus microsatellite di un individuo, chiamate alleli, possono essere della stessa lunghezza (stesso numero di ripetizioni) o di lunghezza diversa (diverso numero di ripetizioni). Nel primo caso una testuggine è omozigote per quel particolare locus microsatellite, nel secondo caso l'animale è eterozigote. La caratterizzazione delle due forme alleliche in un particolare locus microsatellite fornisce il genotipo di un individuale per quel locus. Il numero di alleli varia quindi in una popolazione per un determinato locus, fino ad un numero massimo di  $2 \times N$  alleli, dove  $N$  è il numero di individui che compongono una popolazione. Poiché l'unità di ripetizione del microsatellite è generalmente inferiore a 6 basi nucleotidiche, l'intera sequenza microsatellitare

raramente supera 300 bp. I loci microsatelliti vengono amplificati mediante PCR (vedi §4.3.1) e possono essere rilevate differenze nelle dimensioni degli alleli tra individui anche di una sola unità di ripetizione.

La definizione dei profili genetici del DNA nucleare di *E. orbicularis* si basa sulla determinazione della diversità allelica a 14 loci microsatelliti, di cui 8 caratterizzati da Ciofi et al. (2009) ed in particolare Emys1, Emys2, Emys4, Emys5, Emys6, Emys7, Emys8, Emys11, e 6 definiti da Pedall et al. (2009), nello specifico msEo2, msEo21, msEo22a, msEo25, msEo29, msEo32.

La procedura di genotipizzazione prevede la marcatura dei primers *forward* di ciascun locus microsatellite con un fluorocromo, necessario per l'identificazione del prodotto di amplificazione PCR da parte del sistema laser dell'analizzatore automatico di acidi nucleici (§4.5) durante il processo di elettroforesi capillare. Per l'analisi di caratterizzazione allelica vengono utilizzati quattro fluorocromi di colore differente. Per ogni campione possono così venire analizzati simultaneamente quattro loci microsatelliti con primers *forward* marcati con fluorocromi di lunghezze spettrali differenti.

La reazione di amplificazione viene eseguita utilizzando primers *forward* marcati con fluorescenze FAM, HEX, NED, PET. Per ciascun locus microsatellite, la PCR viene condotta in un volume totale di 10 µl contenente circa 10 ng di DNA, 1X di soluzione tampone, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM di ciascun dNTP, 0,5 µM di primer *forward* e *reverse*, e 0,5 unità di *Taq* DNA polimerasi. I profili termici consistono in una fase iniziale di denaturazione a 94 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di 40 s a 94 °C, annealing per 40 s alla temperatura specifica del primer, e polimerizzazione di 90 s a 72 °C, con una fase finale di polimerizzazione di 5 minuti a 72 °C.

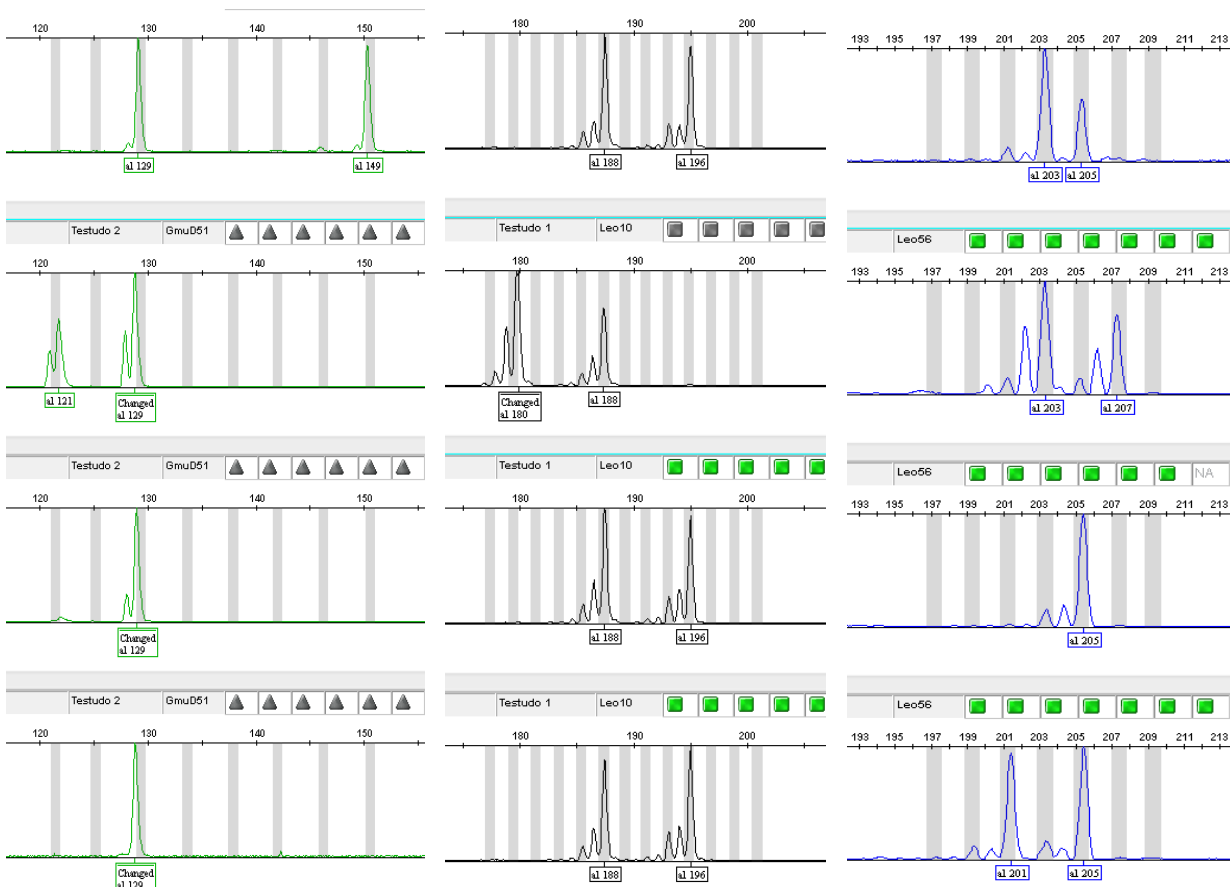
I prodotti della PCR (gli alleli di ciascun locus microsatellite) vengono identificati tramite la rilevazione della fluorescenza nel momento in cui gli alleli, durante il processo di elettroforesi capillare scorrono davanti al laser dell'analizzatore automatico di acidi nucleici. Il segnale fluorescente viene elaborato e trasformato in un segnale che risulta in un picco di intensità proporzionale alla quantità di prodotto amplificato.

Per ogni individuo vengono rilevati due alleli della stessa lunghezza (individui omozigoti) o di lunghezza diversa (individui eterozigoti) per ciascun locus. Tutti gli alleli microsatelliti per un locus saranno identificati da una fluorescenza dello stesso colore e differiranno tra loro dipendentemente dal numero di ripetizioni nucleotidiche. Alleli di loci microsatelliti differenti si distingueranno dipendentemente dal fluorocromo utilizzato per marcare i primers *forward*. I dati ricavati dai segnali emessi durante l'elettroforesi capillare per la caratterizzazione dei loci microsatelliti sono

rappresentati da uno o due picchi rispettivamente se l'individuo è omozigote o eterozigote per quel determinato locus (Fig. 5).

Per ogni testuggine, i prodotti PCR di quattro loci con fluorescenze diverse possono essere analizzati contemporaneamente nello stesso capillare. In ogni capillare, insieme ai prodotti PCR viene inserito un pool di 16 frammenti a singolo filamento di lunghezza nota da 35 bp a 500 bp, marcati con un fluorocromo differente da quelli utilizzati per marcare i *primers forward* dei microsatelliti. Questi *size standards* sono necessari per la successiva definizione delle dimensioni alleliche di ciascun locus microsatellite per ciascun individuo. In questo modo, quattro loci microsatelliti possono essere analizzati contemporaneamente per ciascun individuo.

Le dimensioni alleliche per ciascun locus microsatellite vengono determinate grazie al confronto con i frammenti di lunghezza nota del *size standard* utilizzando il software GENEMAPPER (ABI). Per ciascun capillare, il software confronta il tempo di corsa elettroforetica degli alleli di ciascun locus microsatellite con il tempo intercorso dall'inizio della reazione elettroforetica al momento in cui ogni frammento di lunghezza nota arriva davanti al laser. Le dimensioni alleliche vengono per cui relativizzate alle dimensioni del *size standard*. La Figura 5 mostra i genotipi di quattro individui per tre loci microsatelliti marcati rispettivamente con i fluorocromi HEX, NED e FAM. La dimensione dell'allele è indicata per ogni individuo. I picchi non etichettati nella figura sono artefatti della PCR.



**Figura 5. Risoluzione tramite elettroforesi capillare dei genotipi di quattro individui per tre loci microsatelliti marcati con fluorocromi differenti: HEX (verde), NED (nero) e FAM (blu). I picchi di intensità minore a monte degli alleli sono artefatti di PCR.**

Le dimensioni alleliche determinate per ciascun locus e per ogni individuo vengono successivamente trasferite in una tabella di calcolo come riportato in Fig. 6.

#### **B.4.7. Caratteristiche dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) come marcatori molecolari**

Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione permettono di produrre massivamente informazioni relative a una grande parte del materiale genetico di una specie, anche per più campioni contemporaneamente. L'analisi di questi dati consente di identificare centinaia di migliaia di variazioni genetiche lungo tutto il genoma degli individui esaminati. Le variazioni genetiche relative a una singola posizione lungo la sequenza di DNA sono dette polimorfismi a singolo nucleotide (*single-nucleotide polymorphism* - SNP). Queste variazioni consistono nella sostituzione di una delle quattro basi azotate con un'altra in una posizione specifica del genoma. Gli SNP sono il tipo più comune di variazione genetica, si trovano in tutto il genoma e sono responsabili di gran parte della diversità genetica all'interno di una popolazione. Questi marcatori genetici sono diventati uno strumento prezioso in vari campi della genetica e della genomica, tra cui la genetica di popolazione e la biologia forense.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
1	SAMPLING SITE	LOCATION	Sample	Emys1-FAM	Emys2-HEX	Emys4-FAM	Emys5-H/F	Emys6-NED	Emys7-NED	Emys8-FAM	Emys11-HEX								
14	LIGURIA	Albenga	EAL029	117	117	176	176	98	98	110	110	157	157	127	127	127	127	87	87
15	LIGURIA	Albenga	EAL030	117	121	176	186	98	108	110	110	157	157	127	127	127	127	95	103
16	LIGURIA	Albenga	EAL031	117	153	176	186	108	108	110	110	157	179	127	127	127	127	87	87
17	LIGURIA	Albenga	EAL033	117	117	176	176	98	108	110	112	155	157	127	127	127	127	87	87
18	LIGURIA	Albenga	EAL036	121	121	178	186	108	108	110	110	145	157	127	127	127	141	87	87
19	LIGURIA	Albenga	EAL037	117	121	176	186	98	108	110	110	157	157	127	127	127	127	87	103
20	LIGURIA	Albenga	EAL047	125	153	176	186	108	108	110	110	155	157	127	127	99	127	87	87
21	LIGURIA	Albenga	EAL049	117	153	186	186	108	108	110	110	157	179	127	127	99	99	87	87
22	LIGURIA	Albenga	EAL081	117	125	176	186	108	108	110	110	155	179	127	127	127	129	87	87
23	LIGURIA	Albenga	EAL083	117	153	176	176	108	108	110	110	155	179	127	127	99	99	87	87
24	LIGURIA	Albenga	EAL093	117	117	176	186	108	108	110	110	179	179	127	127	99	99	87	87
25	LIGURIA	Albenga	EAL100	117	121	176	186	108	108	110	110	145	157	127	135	99	127	87	87
26	LIGURIA	Albenga	EAL101	117	121	176	186	108	108	110	110	145	145	127	135	127	141	87	87
27	LIGURIA	Albenga	EAL102	137	137	174	174	96	96	106	136	157	157	129	131	135	141	97	117
28	LIGURIA	Albenga	EAL103	133	143	162	188	96	96	110	128	157	173	129	129	131	145	91	107
29	PIEMONTE	San Genuario	EPI001	125	163	178	178	94	108	110	110	151	167	127	139	93	145	87	95
30	PIEMONTE	San Genuario	EPI002	163	163	178	194	108	108	110	110	145	151	127	127	99	141	87	87
31	PIEMONTE	San Genuario	EPI003	145	163	176	176	108	108	100	110	151	155	127	127	99	141	87	95
32	PIEMONTE	San Genuario	EPI004	125	163	176	178	94	108	108	110	155	155	127	127	141	145	87	87
33	PIEMONTE	San Genuario	EPI005	125	151	176	194	94	108	110	110	145	145	127	151	93	99	87	95
34	PIEMONTE	San Genuario	EPI006	159	161	176	178	94	108	96	110	145	151	127	127	141	141	87	95
35	PIEMONTE	San Genuario	EPI007	125	125	176	178	108	108	96	110	145	151	139	139	141	141	87	95
36	PIEMONTE	San Genuario	EPI008	125	163	176	176	108	108	110	110	151	157	127	127	99	145	87	95
37	PIEMONTE	San Genuario	EPI009	125	153	176	178	94	108	96	110	145	155	127	139	141	145	87	87
38	PIEMONTE	San Genuario	EPI010	125	145	176	178	94	108	100	110	145	151	127	127	99	141	87	95
39	PIEMONTE	San Genuario	EPI011	125	145	176	176	108	108	106	136	145	151	127	139	141	141	87	95
40	PIEMONTE	San Genuario	EPI012	125	125	176	178	94	94	110	110	155	167	127	127	141	145	87	87
41	PIEMONTE	San Genuario	EPI013	125	163	176	178	108	108	110	110	145	151	127	141	99	137	87	87
42	PIEMONTE	San Genuario	EPI014	125	157	176	178	94	108	110	110	151	167	127	151	141	141	87	95
43	PIEMONTE	San Genuario	EPI015	125	163	176	176	94	108	96	110	151	157	127	127	141	145	87	95
44	PIEMONTE	San Genuario	EPI016	125	163	176	176	108	108	110	110	151	157	127	127	99	145	95	107
45	PIEMONTE	San Genuario	EPI017	125	153	176	178	94	108	96	110	145	155	139	139	145	145	87	87

**Figura 6. Esempio di tabella di calcolo in cui vengono riportati, per ogni testuggine oggetto di studio, la regione e luogo di campionamento, il nome del campione e le dimensioni alleliche per 8 dei 14 loci sui quali vengono successivamente effettuate le analisi statistiche.**

Un'applicazione degli SNP è quella nei test di assegnazione, utilizzati per determinare la probabile popolazione di origine di un individuo in base al suo profilo genetico. I test di assegnazione prevedono il confronto del profilo SNP di un individuo con i profili SNP delle popolazioni di riferimento per stimare la probabilità che l'individuo appartenga a ciascuna popolazione. In particolare, la presenza o l'assenza di determinati alleli SNP può essere utilizzata per dedurre l'origine ancestrale o la popolazione di provenienza di un individuo. Il processo di utilizzo degli SNP in un test di assegnazione prevede in genere le seguenti fasi:

1. Raccolta dei dati SNP: La prima fase consiste nell'ottenere il profilo SNP dall'individuo da testare. Questo può essere fatto sequenziando massivamente il DNA dell'individuo in esame. I dati prodotti vengono poi utilizzati per genotipizzare l'individuo mediante l'identificazione degli alleli specifici ai vari loci SNP.
2. Raccolta dei dati della popolazione di riferimento: Per condurre il test di assegnazione, è necessario un database completo di profili SNP provenienti dalle varie popolazioni di riferimento di *E. orbicularis* definite in Fig. 1. Queste popolazioni di riferimento

rappresentano la diversità della variazione genetica in diverse regioni geografiche dell'areale di distribuzione della specie.

3. **Analisi dei dati:** Il profilo SNP dell'individuo viene confrontato con i dati della popolazione di riferimento. I metodi statistici Bayesiani o i test di verosimiglianza sono comunemente impiegati per stimare la probabilità che il profilo genetico dell'individuo appartenga a ciascuna delle popolazioni di riferimento. Sulla base dell'analisi, il test di assegnazione fornisce probabilità o punteggi per l'appartenenza dell'individuo a ciascuna popolazione di riferimento. La popolazione con la probabilità più alta è considerata la fonte di ascendenza più probabile per l'individuo (vedi §5.4).

È importante notare che anche i test di assegnazione che utilizzano gli SNP, così come quelli basati sui microsatelliti, non sono determinanti assoluti dell'ascendenza o dell'origine di un individuo. Forniscono probabilità statistiche basate sui dati disponibili e le incertezze derivano dalla natura complessa delle dinamiche delle popolazioni in analisi e della deriva genetica. Inoltre, questi test sono più accurati quando le popolazioni di riferimento corrispondono strettamente alle vere popolazioni ancestrali dell'individuo esaminato.

## **B.5 ANALISI STATISTICHE**

### **B.5.1. Analisi di diversità del DNA mitocondriale**

Le variazioni di sequenza della regione di controllo del DNA mitocondriale viene determinata dal numero di aplotipi e dei siti nucleotidici segreganti. Il numero di aplotipi si riferisce al numero di sequenze che differiscono per uno o più nucleotidi. Testuggini che mostrano la stessa sequenza della regione di controllo hanno lo stesso aplotipo. Se consideriamo un insieme di sequenze di DNA allineate e confrontiamo ogni sito nucleotidico omologo tra queste sequenze, i siti in cui le sequenze differiscono nella base nucleotidica sono chiamati siti di segregazione. Il numero di siti segreganti fornisce un'indicazione del grado di variazione della sequenza di DNA presente in un campione.

Un primo parametro per quantificare la diversità della regione di controllo del mtDNA in una popolazione è la diversità aplotipica o genica ( $h$ ), cioè la probabilità che due aplotipi scelti a caso in un gruppo di individui siano diversi (vedi formula in Nei 1987). Una seconda importante misura del polimorfismo del DNA mitocondriale è il numero medio di differenze nucleotidiche tra tutte le coppie di sequenze. Questo parametro, ponderato per il numero di siti nucleotidici nella sequenza, rappresenta il numero medio di differenze per sito tra tutte le coppie di sequenze, o diversità nucleotidica  $\pi$  (vedi formula in Nei 1987).



### B.5.2. Analisi di divergenza del DNA mitocondriale

La stima della distanza genetica tra le sequenze della regione di controllo del mtDNA viene effettuata valutando il numero di siti e la percentuale di siti per i quali due aplotipi sono diversi (rispettivamente *pairwise difference* e *percentage difference*). Una serie di correzioni basate sulla percentuale di differenze nucleotidiche tra le sequenze di DNA vengono generalmente utilizzate a fronte di sostituzioni multiple per sito nucleotidico (Jukes & Cantor 1969; Tajima & Nei 1984) e dei diversi tassi di sostituzione tra transizioni e trasversioni (Kimura 2-parametri, Kimura 1980; Tamura & Nei 1993) con frequenze nucleotidiche disuguali (Tamura 1992).

Il grado di diversità o somiglianza genetica tra le sequenze della regione di controllo del mtDNA di *E. orbicularis* viene valutato in particolare attraverso la ricostruzione dei rapporti filogenetici tra le sequenze degli individui di origine ignota e le sequenze delle popolazioni naturali di riferimento. Tra i metodi utilizzati per ricostruire le relazioni filogenetiche consideriamo 1) le tecniche che operano su una matrice di distanze genetiche tra le sequenze (come il metodo neighbor-joining), in cui ogni valore di distanza genetica rappresenta una stima della quantità di divergenza tra due testuggini dal momento in cui hanno condiviso per l'ultima volta un antenato comune, e 2) metodi discreti come la massima parsimonia, che considera direttamente le variazioni ad ogni sito nucleotidico e identifica l'albero che richiede il minor numero di cambiamenti evolutivi, o la massima verosimiglianza, che seleziona l'albero (o gli alberi) che, tra tutti, ha la maggiore probabilità di aver prodotto i dati osservati (Page & Holmes 1998; Hall 2001; Lemey et al. 2009).

Poiché un albero filogenetico viene solitamente costruito a partire da una quantità limitata di dati, è importante esaminare l'affidabilità dell'albero ottenuto. L'analisi bootstrap è una tecnica semplice ed efficace per verificare la stabilità relativa dei gruppi all'interno dell'albero filogenetico (Felsenstein 2004, p. 338). L'idea di base del bootstrap consiste nel dedurre la variabilità di una distribuzione sconosciuta da cui sono stati estratti i dati mediante un ricampionamento dei dati stessi. Nel ricampionamento bootstrap, gli  $n$  siti nucleotidici di una sequenza sono scelti a caso e vengono utilizzati per costituire un nuovo insieme di sequenze di DNA, che viene utilizzato per costruire un altro albero. La topologia di questo albero viene quindi confrontata con quella dell'albero originale. A ogni ramo interno dell'albero originale che fornisce la stessa partizione di sequenze dell'albero simulato viene attribuito il valore 1 (valore di identità), mentre agli altri rami interni viene attribuito il valore 0. Questo processo viene ripetuto diverse centinaia di volte e viene calcolata la percentuale di volte in cui ogni ramo interno dell'albero originale riceve il valore di identità 1. Questo è il valore di confidenza bootstrap (Nei & Kumar 2000 § 9.3). Rami dell'albero o

gruppi con valori di confidenza maggiori del 75% vengono reputati affidabili, e viene quindi ritenuta affidabile l'appartenenza dell'aplotipo di una testuggine di origine ignota ad un gruppo di aplotipi che caratterizzano le testuggini di una determinata area (Lemey et al. 2009 § 5.3.1).

### **B.5.3. Analisi di diversità allelica a loci microsatelliti**

La variazione genetica ai loci microsatelliti viene quantificata utilizzando la frequenza allelica e dei genotipi. Le frequenze genotipiche sono rappresentate dalla proporzione di individui che mostrano un determinato genotipo, mentre la descrizione della frequenza genica comporta l'identificazione degli alleli presenti a ciascuno locus microsatellite e il calcolo delle proporzioni delle diverse tipologie alleliche.

La proporzione dei genotipi eterozigoti in un gruppo di individui viene utilizzata per calcolare l'eterozigosi osservata ( $H_o$ ) per ogni locus ed i valori medi sui 14 microsatelliti per ogni gruppo di individui. Tramite le frequenze alleliche viene invece calcolata l'eterozigosi attesa sotto equilibrio di Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) per ogni locus e in media sui 14 loci microsatelliti utilizzati nelle analisi (Nei 1987; Nei & Kumar 2000).

Le proprietà genetiche di una popolazione sono influenzate da una generazione all'altra da diversi fattori, tra i quali le mutazioni, immigrazione ed emigrazione, accoppiamento differenziale ed il rapporto tra i sessi. Anche la selezione dovuta a differenze di fertilità dei genitori o ai diversi tassi di sopravvivenza della prole può determinare una variazione della struttura genica e genotipica tra generazioni. Di particolare importanza è la variazione delle frequenze geniche tra generazioni successive dovuta al campionamento casuale dei gameti che vanno a formare gli zigoti della nuova generazione. I geni che vengono trasmessi da una generazione all'altra sono un campione della generazione dei genitori e quanto più piccolo è il numero dei genitori, tanto maggiore è la variazione dovuta al campionamento allelico. Questo processo dispersivo è un concetto noto anche come deriva genetica ed è particolarmente rilevante quando consideriamo la perdita di variabilità genetica in piccole popolazioni o gruppi limitati di individui mantenuti in condizioni di cattività.

Per valutare se la struttura genetica di un gruppo di individui è influenzata da questi fattori, l'eterozigosi osservata viene confrontata con l'eterozigosi attesa in una popolazione panmittica (con accoppiamento casuale) con un numero molto elevato di individui, in assenza di selezione, mutazione e migrazione. In questa situazione, la frequenza dei geni e dei genotipi non varia significativamente da una generazione all'altra. La popolazione è detta in equilibrio di Hardy-Weinberg e le frequenze genotipiche previste dal principio di Hardy-Weinberg sono calcolate utilizzando le frequenze alleliche osservate nel gruppo di individui oggetto dello studio come se

fossero le frequenze della generazione precedente. Se la differenza tra i valori di  $H_O$  e  $H_E$  non è statisticamente significativa, il gruppo di individui rappresenta una popolazione in equilibrio di Hardy Weinberg. Al contrario, se i valori sono statisticamente differenti, uno o più fattori influiscono sulla demografia della popolazione, e in particolare, se  $H_O$  è minore di  $H_E$  è molto probabile che la popolazione in questione sia costituita da un numero troppo piccolo di individui con bassa variabilità genetica e quindi richieda un rinforzo demografico.

Il  $\chi^2$  *goodness-of-fit test* può essere utilizzato per verificare una differenza significativa tra  $H_O$  e  $H_E$ . Tuttavia, poiché questo test porta talvolta a un falso rifiuto o falsa conferma delle proporzioni di Hardy-Weinberg quando le dimensioni del campione sono piccole, viene generalmente utilizzato il test di esatta probabilità di Fisher (Guo e Thompson 1992; Raymond & Rousset, 1995).

#### **B.5.4. Assegnazione di individui di origine ignota alle popolazioni geneticamente simili**

L'assegnazione di testuggini di origine ignota alle principali popolazioni naturali Italiane, rappresentate in 29 siti continentali, 4 in Sardegna e 6 in Sicilia per quanto riguarda *E. trinacris* (Fig. 1) viene effettuata mediante tests di assegnazione genotipica sviluppati da Piry et al. (2004). L'appartenenza di singoli individui ad un gruppo di origine certa viene confermata o esclusa in base alla caratterizzazione di genotipi multilocus. I criteri di assegnazione genotipica utilizzati sono descritti in Baudouin & Lebrun (2000) e Paetkau et al. (1995). L'analisi utilizza un algoritmo Monte Carlo per calcolare, per ogni individuo, la probabilità di appartenere ad una determinata popolazione di riferimento. L'algoritmo in questione, basato sul lavoro di Paetkau et al. (2004) crea, in base ai genotipi multilocus osservati, una nuova popolazione della medesima dimensione di quella reale e calcola la probabilità di assegnazione degli individui di origine ignota alla popolazione simulata. L'operazione viene ripetuta per 10.000 iterazioni. Le probabilità di assegnazione degli individui di origine ignota alla popolazione reale vengono confrontate con i valori ottenuti dalle simulazioni per ottenere una significatività statistica della probabilità (maggiore del 5%) di assegnazione osservata.

Una seconda metodica di assegnazione di genotipi multilocus di individui di origine ignota alla popolazione più simile da un punto di vista genetico si basa su un'analisi modellistica di clustering bayesiano sviluppata da Pritchard et al. (2000). Il metodo considera un numero sconosciuto di  $K$  popolazioni caratterizzate da un insieme di frequenze alleliche per ciascun locus e tenta di assegnare probabilisticamente gli individui sulla base dei loro genotipi alle popolazioni, o congiuntamente a due o più popolazioni se i loro genotipi indicano una provenienza mista. Il programma stima il

numero più appropriato ( $K$ ) di popolazioni necessarie per interpretare i genotipi osservati (probabilità posteriore di  $K$ , o la probabilità di osservare i genotipi  $X$  dato un certo  $K$ ), e quindi fornisce la proporzione del genoma di una testuggine che proviene da una certa popolazione (cluster). Il valore di  $K$  con la massima probabilità posteriore è quindi utilizzato come informazione preliminare per stimare la probabilità che un individuo appartenga a un determinato cluster.

### **B.5.5. Analisi di parentela**

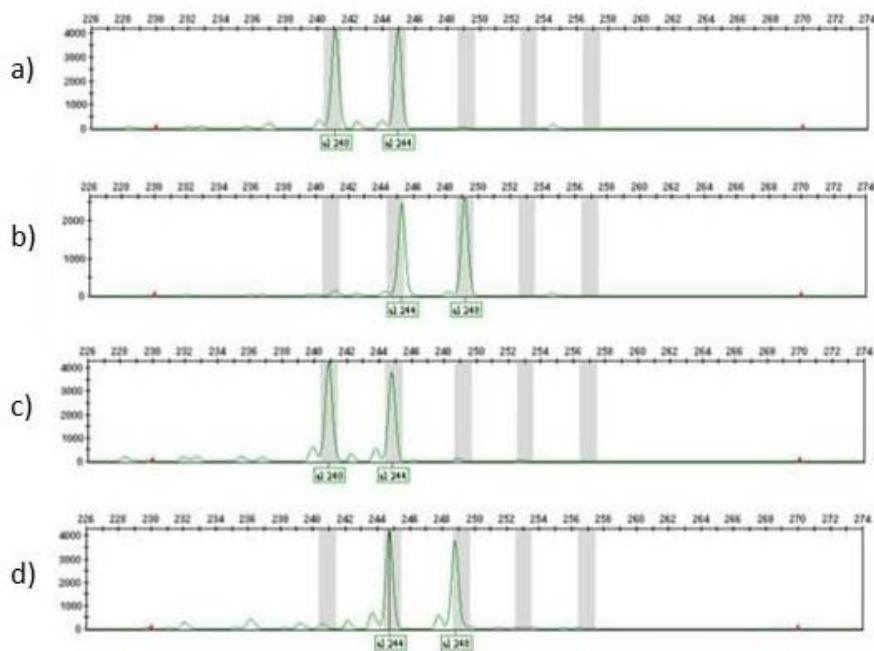
La definizione dei piani di riproduzione in cattività presuppone la conoscenza delle popolazioni naturali di provenienza dei singoli riproduttori, determinata tramite analisi di struttura di popolazione e test di assegnazione genotipica (§ 5.4). Stabilita l'origine dei singoli individui, l'allevamento in cattività mirato alla reintroduzione o rinforzo demografico ha come obiettivo quello di mantenere la diversità genetica e prevenire la depressione da inincrocio (riproduzione tra individui consanguinei). La depressione da inincrocio è un problema causato da difetti fisiologici e/o morfologici a causa di mutazioni genetiche deleterie che hanno probabilità di insorgere principalmente in piccole popolazioni in cui si verificano solo accoppiamenti tra individui imparentati. Vengono per cui selezionate coppie o terne di individui (ad esempio un maschio e due femmine) che provengono dalla medesima popolazione naturale ma che mostrano un basso grado di parentela. In questo modo, viene massimizzata la diversità genetica della progenie e ridotto al minimo il rischio sia da inincrocio che depressione da esoincrocio. Quest'ultimo fattore definisce una riduzione di idoneità della prole a causa di accoppiamenti tra individui provenienti da regioni differenti e dalla conseguente perdita, nella prole, di specifiche interazioni geniche di individui adattati ad determinate condizioni ambientali.

Il grado di inincrocio all'interno di una popolazione o gruppo di individui si può determinare calcolando un coefficiente di consanguineità o un indice di identità. Siccome due individui strettamente imparentati condividono con più probabilità alleli identici per discesa rispetto a due individui non imparentati, si può definire  $r_{xy}$  = due volte la probabilità che un allele scelto casualmente da un individuo  $x$  sia identico per discendenza ad un allele scelto sempre casualmente da un individuo  $y$ . Siccome gli individui strettamente imparentati producono con più probabilità prole omozigote, si può in alternativa, misurare gli effetti della consanguineità come la proporzione di loci omozigoti (per alleli identici per discendenza) nella prole (Belkhir et al. 2002).

Una volta determinate le coppie o terne di individui per l'accoppiamento e a seguito della produzione di uova da parte della femmina, la determinazione della parentela tra i possibili genitori e la prole viene effettuata per escludere la fecondazione delle uova da parte di spermatozoi frutto

di accoppiamenti pregressi. La parentela viene determinata, per ogni microsatellite, identificando la presenza degli alleli di ciascun figlio nei genitori. Essendo i microsatelliti marcatori genetici a eredità biparentale, i due alleli presenti nel figlio dovranno ritrovarsi rispettivamente uno nel genotipo del padre ed uno nel genotipo della madre.

Ad esempio, se due genitori sono eterozigoti rispettivamente per gli alleli 240,244 (il padre) e 244,248 (la madre) e due figli mostrano genotipi eterozigoti 240,244 e 244,248, per il primo figlio l'allele 240 viene necessariamente ereditato dal padre ed il 244 dalla madre, mentre il secondo figlio eterozigote 244,248 avrà l'allele 248 ereditato dalla madre e quindi il 244 dal padre (Fig. 7).



**Figura 7. Genotipi per un un singolo locus microsatellite di due genitori (a, b) e della loro prole (c, d).**

La ricostruzione di parentela viene effettuata utilizzando genotipi multilocus e nel caso di *E. orbicularis* confrontando gli alleli a 14 loci microsatelliti tra i genitori e la prole.

Un semplice approccio all'analisi di parentela si basa su un processo di esclusione. I genotipi dei genitori candidati vengono confrontati con il genotipo della prole (tenendo conto del genotipo dell'altro genitore, se disponibile). I possibili genitori vengono esclusi come tali se si verifica una mancata corrispondenza in uno o più loci. La presenza o assenza di alleli paterni o materni viene anche utilizzata per identificare eventi di paternità multipla. In Figura 8 sono rappresentati i genotipi multilocus di due femmine di *E. orbicularis* (in rosso) e quelli della rispettiva prole. Il locus Emys3 mostra, per entrambe le femmine, il contributo di 3 alleli maschile alla prole e quindi evidenza di poliandria.

Con pochi genitori candidati e loci altamente polimorfici, questo processo di solito dovrebbe lasciare un solo genitore candidato non escluso per entrambi i sessi. Tuttavia, in circostanze meno favorevoli, è comune che più genitori candidati rimangano non esclusi. In questo caso l'approccio di esclusione è inadeguato perché non è possibile identificare quale genitore candidato non escluso sia il genitore effettivo. Anche nel caso di paternità multipla legata alla scelta di terne (due maschi ed una femmina) piuttosto che coppie, il numero degli accoppiamenti pregressi e non monitorati può essere tale da portare ad un decremento del livello di definizione.

Animale #	Nido	Emys1	Emys2	Emys3	Emys4	Emys5	Emys6	Emys7	Emys8	Emys11									
EMR044	DAMA	117	117	182	186	107	107	100	110	116	124	153	153	123	123	127	163	103	105
EMR176	NIDO 044	117	117	186	186	107	107	100	110	116	126	153	173	123	123	127	157	103	105
EMR177	NIDO 044	117	159	180	182	107	131	100	100	124	124	153	153	123	137	157	163	95	105
EMR178	NIDO 044	117	117	180	186	107	135	110	110	114	116	153	153	123	137	127	157	103	103
EMR049	DAMA	117	117	180	206	107	123	100	110	114	114	153	153	123	123	127	159	103	103
EMR169	NIDO 049	117	159	180	182	107	131	100	110	114	118	149	153	123	137	127	159	103	103
EMR170	NIDO 049	117	159	180	182	107	131	100	110	114	114	149	153	123	137	127	157	103	103
EMR171	NIDO 049	117	117	180	206	113	123	110	110	114	126	153	173	123	123	157	159	103	103
EMR172	NIDO 049	117	117	206	206	123	135	100	100	114	114	153	153	123	123	157	159	103	103

**Figura 8. Genotipi multilocus di due femmine (in rosso) e della loro rispettiva prole (in nero. A seguito di un confronto basato sull'eredità biparentale degli alleli, il locus Emys3 mostra la presenza, in ambedue le deposizioni, di 3 alleli di provenienza paterna e quindi evidenza paternità multipla in entrambi i casi.**

In questi casi si ricorre ad una stima di verosimiglianza il cui scopo è quello di trovare i parametri che hanno più probabilità di aver prodotto i dati osservati, ad esempio la probabilità che un genotipo multilocus corrisponda al genotipo del genitore date le distribuzioni alleliche nel genotipo della prole.

In particolare, viene calcolata la verosimiglianza che, ad esempio, un determinato maschio sia il vero padre (*Likelihood of paternity*). Questo valore viene poi confrontato con la verosimiglianza che un maschio qualunque della popolazione sia il vero padre, e viene calcolato il logaritmo del rapporto di verosimiglianza (LOD - Log-Likelihood ratio). Un valore di LOD = 0 implica che il presunto padre ha la stessa probabilità di essere il padre della prole come un maschio selezionato casualmente. Un valore positivo di LOD implica che è più verosimile che il presunto padre sia il vero padre della prole rispetto ad un maschio qualunque. Valori di LOD negativi si possono avere se il presunto padre e prole condividono un insieme di alleli che si ritrovano spesso all'interno della popolazione. Più

comunemente, i valori negativi di LOD indicano che il genotipo di un presunto genitore non corrisponde a quello della prole ad uno o più loci.

Nel caso di una coppia riproduttrice e la presenza, nella prole, di genotipi multilocus di due o più maschi con un valore positivo e relativamente alto di LOD, viene calcolato un secondo parametro, ovvero la differenza tra il valore di LOD del genitore più probabile ed il valore di LOD del secondo genitore più probabile:  $\Delta = \text{LOD1} - \text{LOD2}$ . Successivamente, vengono generati genotipi simulati per un numero relativamente alto di prole (es 10,000). Ciascuno di questi genotipi sono utilizzati per determinare il valore di  $\Delta$  per i probabili genitori, e produrre così una distribuzione di valori di  $\Delta$  risultanti dalle simulazioni, con la quale viene confrontato il valore di  $\Delta$  reale (Marshall et al. 1998).

## **C. CENTRI DI RIPRODUZIONE E MANTENIMENTO DI EMYS ORBICULARIS LIFE URCA PROEMYS**

Il rispetto del benessere degli animali è un requisito fondamentale del progetto LIFE URCA, sia per questioni etiche, sia per raggiungere gli obiettivi di progetto; condizioni di scarso benessere possono infatti favorire malattie, aumentare la mortalità e compromettere il successo riproduttivo. Vengono di seguito illustrati alcuni requisiti minimi necessari per le strutture adibite alla riproduzione e mantenimento delle testuggini ex situ.

### **C.1. CARATTERISTICHE DEI CENTRI DI RIPRODUZIONE E ALLEVAMENTO (REQUISITI MINIMI)**

Al fine di garantire il benessere degli animali, tutti i centri di riproduzione e allevamento devono rispettare gli standard minimi di mantenimento e gestione. I centri devono avere uno stabulario outdoor, con condizioni ambientali seminaturali, e uno stabulario indoor, con condizioni ambientali controllate.

#### **Stabulario outdoor**

- Lo stabulario outdoor dovrà ospitare gli individui riproduttori e per questo è necessario che sia soggetto ai naturali cicli delle stagioni, sia per quel che riguarda il fotoperiodo, sia per la temperatura dell'aria e dell'acqua. Di seguito sono indicati i requisiti minimi.
- Lo stabulario outdoor deve essere costituito da un minimo di tre vasche: una per gli individui riproduttori, una per gli immaturi, una per gli animali sotto trattamento. Le vasche devono avere una profondità non inferiore a 70 cm, per evitare picchi eccessivi di temperatura (positivi o negativi) nella stagione estiva e invernale.
- Le vasche devono essere munite di impianti di ricircolo e depurazione dell'acqua, con filtri meccanici e/o di fitodepurazione e/o sistema di ricambio periodico dell'acqua.
- Le vasche dovranno ospitare un numero di animali compatibile con le dimensioni delle vasche stesse, evitando situazioni di sovraffollamento che potrebbero causare stress agli animali e inadeguata qualità dell'acqua. Il rapporto può essere considerato idoneo quando ogni individuo adulto disponga di 2 mq di superficie; per le testuggini subadulte ed i giovani di 1-3 anni la superficie minima richiesta scende rispettivamente a 1 mq e 0,5 mq.



- Le vasche devono prevedere aree idonee per il *basking* (esposizione al sole), la deposizione delle uova e l'ibernazione, tenendo conto del numero di individui ospitati; per il benessere degli animali è importante che esse dispongano anche di zone sommerse poco illuminate, realizzate tramite vegetazione ripariale e oggetti galleggianti (ad es. pezzi di corteccia di sughero).
- Le strutture devono prevedere delle recinzioni e copertura di rete metallica adeguate a evitare la fuga delle testuggini e l'ingresso di predatori.
- Le strutture devono essere dotate di impianto di videosorveglianza.

### **Stabulario indoor**

- Lo stabulario indoor dovrà ospitare gli individui neonati (di età inferiore all'anno) in condizioni ambientali controllate. Il mantenimento in condizioni controllate permetterà di evitare il primo letargo invernale (ibernazione), diminuendo significativamente la mortalità nel primo anno di vita e aumentando il tasso di crescita. Dopo la prima stagione invernale, al compimento di circa un anno di età, i piccoli immaturi potranno essere trasferiti nello stabulario outdoor, per proseguire lo sviluppo in condizioni seminaturali, prima della liberazione (che avverrà attorno ai due anni di età).
- Lo stabulario indoor deve essere costituito da almeno una vasca per ospitare gli individui neonati, di dimensioni sufficienti a evitare situazioni di sovraffollamento e garantire il benessere degli animali. La dimensione può essere considerata idonea quando ogni individuo abbia a disposizione un volume minimo pari a 15 litri, con profondità dell'acqua compresa tra 15 e 20 centimetri.
- La temperatura dell'acqua deve essere mantenuta in un range compreso tra 25 e 28° C per garantire che le testuggini siano attive e si alimentino con regolarità anche durante la stagione fredda.
- Lo stabulario deve essere dotato di impianto di filtrazione adeguato al volume dell'acqua e al numero di testuggini ospitate; in alternativa, dovrà essere assicurata una frequenza di ricambi d'acqua che consenta il mantenimento di una qualità idonea dell'ambiente di allevamento.
- Lo stabulario indoor deve essere munito di impianto di illuminazione a lampade infrarossi e UVB, con fotoperiodo simile a quello naturale, e aree per il *basking* e la termoregolazione.
- È importante che la vasca sia allestita con abbondante vegetazione sommersa (anche sintetica), che possa servire da riparo e da appiglio per raggiungere facilmente la superficie.

o Lo stabulario indoor deve prevedere inoltre una incubatrice artificiale, che potrà essere utilizzata per migliorare il successo riproduttivo delle testuggini e/o per determinare il sesso dei nascituri (regolando la temperatura di incubazione delle uova).

Qualora il centro avesse difficoltà ad allestire al suo interno uno stabulario indoor, potrà appoggiarsi a un altro centro di riproduzione, pubblico o privato, disponibile ad accogliere temporaneamente (almeno per il primo anno di vita) i nuovi nati presso le proprie strutture.



## D. CRITERI DI IDONEITA' PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE AREE IDONEE AL RESTOCKING DI *E. ORBICULARIS* PROVENIENTI DALLA CATTIVITÀ

É importante selezionare siti idonei per azioni di *restocking* e/o reintroduzione. Questi siti, caratterizzati per habitat/microhabitat, devono garantire la sopravvivenza, la riproduzione e l'aumento delle popolazioni di *E. orbicularis* sul lungo periodo all'interno delle aree Natura 2000 interessate da queste azioni. La selezione dei siti si basa su alcuni criteri vincolanti e alcuni altri di "contorno" che consentono di meglio definire le caratteristiche del sito e l'identificazione di eventuali azioni migliorative. La scheda seguente sintetizza i criteri necessari per una valutazione di idoneità. Il risultato della compilazione della scheda deve consentire di dichiarare il sito "idoneo", "potenzialmente idoneo" a fronte di alcune azioni o misure migliorative, "non idoneo" se non vi sono nemmeno i margini di un necessario miglioramento della situazione.

I criteri prendono in considerazione l'ubicazione, la gestione dell'area, il contesto in cui è ubicata, l'habitat per *Emys orbicularis*, le minacce ed eventuali precedenti (o in corso) azioni di conservazione.



Centro di riproduzione La Bora (San Giovanni in Persiceto)

## D.1. SCHEDA CRITERI DI IDONEITA' PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE AREE IDONEE AL RESTOCKING DI *E. ORBICULARIS* PROVENIENTI DALLA CATTIVITÀ

### DATI GENERALI

Area: (nome dell'area protetta/Natura2000, della riserva etc) \_\_\_\_\_

Estensione dell'area<sup>19</sup> (ha) \_\_\_\_\_

Estensione dell'habitat di specie<sup>20</sup> (ha) \_\_\_\_\_

Regione \_\_\_\_\_ Comune (Provincia) \_\_\_\_\_ Località \_\_\_\_\_

Ente gestore dell'area \_\_\_\_\_

Popolazione *E.orbicularis* di riferimento: Meridionale\_\_\_ Adriatica\_\_\_ Tirrenica\_\_\_

Centro di riproduzione *E.orbicularis* più vicino \_\_\_\_\_ KM \_\_\_\_\_

Zona umida interna ad area protetta (Parco Naturale, Riserva, Oasi, ZSC, ZPS, etc)	SI		NO
Disponibilità dell'area	Idonea <sup>21</sup>	Potenzialmente idonea	Non idonea
<b>CONTESTO TERRITORIALE</b>			
Connettività (matrice acqua). S'intende il collegamento con altre popolazioni vitali esterne o habitat idonei alla colonizzazione	Idonea <sup>22</sup>	Potenzialmente idonea <sup>23</sup>	Non idonea <sup>24</sup> Non so
Uso del suolo nel raggio di 500 m dalla zona umida	<b>Idoneo</b> Naturale o seminaturale (prevalenza di aree non utilizzate dall'uomo o con attività agro-silvo-pastorali estensive)		<b>Non idoneo</b> Antropizzato (prevalenza di aree artificiali o utilizzate per agricoltura intensiva)
<b>HABITAT</b>			
Eterogeneità all'interno dell'habitat di specie	<b>Elevata</b> (es. presenza di zone umide permanenti e temporanee, canali, laghi, stagni)	<b>Media</b> (es. netta dominanza di una tipologia rispetto ad un'altra)	<b>Bassa</b> (es. presenza di una sola tipologia)
Pendenza delle sponde	<b>Bassa</b> (in prevalenza < 25°)	<b>Media</b> (in prevalenza tra 25° e 45°)	<b>Elevata</b> (in prevalenza > 45°)
Velocità acqua	Acque lentiche	Debolmente lotiche	lotiche
Zone con acque poco profonde (max 2 metri)	>30% dello specchio d'acqua		<30% dello specchio d'acqua

<sup>19</sup> S'intende l'intera estensione dell'area protetta o del sito

<sup>20</sup> Indicare l'estensione dell'area utilizzata dalle testuggini palustri che è generalmente più ridotta dell'estensione di cui al precedente punto

<sup>21</sup> "Idonea" s'intende se l'area è di proprietà dell'ente che gestisce le azioni di reintroduzione o *restocking*, o se esiste una convenzione/accordo con un soggetto adeguato a seguire queste attività; "Potenzialmente idonea" s'intende quando ci sono le possibilità di acquisizione o di sottoscrivere una convenzione o accordo per il suo utilizzo; "Non idonea" quando non ci sono le garanzie per gestire adeguatamente il *restocking*.

<sup>22</sup> presenza di canali e/o corsi d'acqua che attraversano la zona umida che collegano ad altre popolazioni vitali o habitat idonei alla colonizzazione

<sup>23</sup> presenza di ostacoli/barriere che possono essere rimossi o bypassati, consentendo poi il collegamento ad altre popolazioni vitali o habitat idonei alla colonizzazione

<sup>24</sup> presenza di ostacoli o infrastrutture che impediscono la connettività isolando l'area e non possono essere rimossi o bypassati

Vegetazione (copertura elofite)	>60% delle sponde	tra 30 e 60% delle sponde	<30% delle sponde	
Presenza di siti di <i>basking</i> (termoregolazione)	<b>Elevata</b> (diffusa presenza di tronchi emergenti dall'acqua e di vegetazione idrofita/elofita)	<b>Media</b> (presenza di tronchi emergenti dall'acqua e/o di vegetazione idrofita/elofita)	<b>Bassa</b> (scarsa presenza di tronchi emergenti dall'acqua e di vegetazione idrofita/elofita)	
Presenza di siti idonei alla nidificazione nel raggio di 100 m dalla zona umida	<b>Idoneo</b> (>30% del terreno occupato da vegetazione erbaceo-arbustiva)	<b>Potenzialmente idoneo</b> – portare almeno al 30%	<b>Non idoneo</b>	
<b>MINACCE</b>				
Presenza di testuggini alloctone	<b>Idoneo</b> <sup>25</sup>	<b>Potenzialmente idoneo</b> <sup>26</sup>	<b>Non idoneo</b> <sup>27</sup>	<b>Non so</b>
Presenza di specie ittiche alloctone predatrici	<b>Idoneo</b> <sup>28</sup>	<b>Potenzialmente idoneo</b> <sup>29</sup>	<b>Non idoneo</b> <sup>30</sup>	<b>Non so</b>
Specie ittiche alloctone presenti				
Altre specie alloctone pericolose per <i>Emys</i>				
Presenza di garzaie nella zona umida o in prossimità (< 5 Km)	<b>SI</b> (Abbondante presenza di nidi e diversità di specie)	<b>SI</b> (Bassa presenza di nidi e diversità di specie)	<b>Assenti</b>	
Presenza di attività antropiche di disturbo nella zona umida	<b>Idonea</b> (non ve ne sono)	<b>Potenzialmente idonea</b> (ve ne sono, ma possono essere eliminate o regolamentate)	<b>Non idoneo</b> (Non possono essere limitate le attività antropiche di disturbo)	
<b>Attività antropiche di disturbo (facoltativo l'inserimento del codice di pressione e minaccia specifico che si trova nell'allegato Pressioni e Minacce)</b>	A. Agricoltura ___ Codice __ B. Selvicoltura __ Codice __ C. Attività mineraria, estrattiva e produzione di energia __ Codice __ D. Infrastrutture per la produzione e il trasporto dell'energia __ Codice __ E. Urbanizzazione, sviluppo residenziale e commerciale __ Codice __ F. Risorse biologiche escluse agricoltura e silvicoltura _____ Codice __ G. Intrusione umana e disturbo __ Codice __ H. Inquinamento __ Codice __ I. Altre specie e geni invasivi o problematici __ Codice __ J. Modificazioni dei sistemi naturali __ Codice __ K. Processi biotici ed abiotici naturali (escluse catastrofi) __ Codice __ L. Eventi geologici, catastrofi naturali __ Codice __ M. Cambiamenti climatici __ Codice __ XO Minacce o pressioni provenienti da fuori lo Stato Membro __ Codice __ XE Minacce o pressioni provenienti da fuori il territorio UE __ Codice __			
<b>PRECEDENTI AZIONI DI CONSERVAZIONE</b>				

<sup>25</sup> Non sono presenti testuggini palustre alloctone o la loro presenza è minima e/o sono controllate dall'ente gestore

<sup>26</sup> Presenza di testuggini palustre alloctone che possono essere rimosse

<sup>27</sup> Abbondante presenza di testuggini palustri alloctone non eradicabili

<sup>28</sup> Non presenti o presenza insignificante

<sup>29</sup> Presenza di ittiofauna alloctona predatrice che però può essere contenuta o rimossa

<sup>30</sup> Presenza di ittiofauna alloctona predatrice che non può essere contenuta o rimossa

<b><i>E. orbicularis</i> è presente nell'area?</b>	SI (attualmente o storicamente, specificare)	NO	Non so
<b>La popolazione è:</b>	vitale	Costituita da pochi individui	Non so
<b><i>E. orbicularis</i> è stata reintrodotta?</b>	SI	NO	Non so
<b>Se sì quando e quante</b>	Anno e n°	Anno e n°	Anno e n°
<b>Sono state fatte azioni di restocking?</b>	SI	NO	Non so
<b>Se sì quando e quante</b> (almeno inserire le ultime 3 immissioni)	Anno e n°	Anno e n°	Anno ultima immissione e n°
<b>Provenienza delle <i>Emys</i> reimmesse</b> (inserire "non so" nel caso la provenienza è ignota)			
<b>Risultati</b>	Buoni <sup>31</sup>	Insufficienti <sup>32</sup>	Non so

**NOTE**

DATA \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_

COMPILATORE Nome e cognome \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_ Telefono \_\_\_\_\_

<sup>31</sup> Costatato aumento significativo della popolazione

<sup>32</sup> Popolazione più o meno stabile e aumenti irrilevanti o nulli

## **D.2 LISTA PRELIMINARE DEI SITI DI RESTOCKING**

La seguente lista è preliminare ed è stata stilata sulla base di indicazioni ed azioni pregresse da gestori di Aree Natura 2000.

### **ABRUZZO:**

IT7140215 "Lago di Serranella e Colline di Guarenna" \*

### **BASILICATA:**

IT9220055 "Bosco Pantano di Policoro e Costa ionica Foce Sinni" \*

IT9220080 "Costa Ionica Foce Agri"

### **EMILIA-ROMAGNA:**

IT4040015 "Valle di Gruppo"

IT4030007 "Fontanili di Corte Valle Re"

IT4040007 "Salse di Nirano".

IT4030011 "Casse di espansione del Secchia"

IT4020001 "Boschi di Carrega"

IT4020025 "Parma Morta"

IT4020006 - ZSC - Monte Prinzerà

IT4090002 - ZSC - Torriana, Montebello, Fiume Marecchia

IT4020017 "Aree delle risorgive di Viarolo, Bacini di Torrile, Fascia golenale del Po"

IT4050019 "La Bora" \*

IT4040009 "Manzolino" \*

IT4050025 "Biotopi e ripristini ambientali di Crevalcore" \*

IT4050031 "Cassa di espansione del torrente Samoggia" \*

IT4050023 "Biotopi e ripristini ambientali di Budrio e Minerbio" \*

### **LIGURIA:**

IT1324909 "Torrenti Arroscia e Centa" \*

IT1324896 "Lerrone – Valloni" \*

### **MARCHE:**

IT5310022 "Fiume Metauro da Piano di Zucca alla foce"

**LAZIO**

IT6030023 "Macchia Grande di Focene e Macchia dello Stagneto" \*

**PIEMONTE:**

IT1120007 "Palude di San Genuario" \*

IT1180005 "Ghiaia Grande" \*

IT1180028 "Fiume Po - tratto vercellese alessandrino"\*



## E. CONTROLLO E/O ERADICAZIONE SPECIE ALIENE

### E.1 INTRODUZIONE ED ANALISI DEL CONTESTO

Le specie invasive sono considerate uno dei principali fattori diretti della perdita di biodiversità dopo la distruzione degli habitat (<http://www.cbd.int/invasive/>). È stato inoltre valutato che le specie esotiche invasive (IAS) potrebbero costare all'economia mondiale fino al 5% del PIL globale (Pimental et al., 2005). Il costo per Stati membri dell'UE, soprattutto in termini di gestione o di impatti economici diretti piuttosto che di conseguenze ecologiche, potrebbe raggiungere circa 12 miliardi di euro ([https://environment.ec.europa.eu/topics/nature-and-biodiversity/invasive-alien-species\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/nature-and-biodiversity/invasive-alien-species_en)) all'anno. Gli animali domestici sono stati tenuti e trasportati dall'uomo per millenni. Attualmente, la metà delle famiglie europee detiene animali da compagnia, con specie appartenenti a un'ampia gamma di taxa (compresi mammiferi, uccelli, rettili, anfibi, pesci e invertebrati acquatici e terrestri).

Ma il costante aumento del commercio internazionale ha portato a un'escalation di invasioni biologiche in tutto il mondo, senza chiari segni di stabilizzazione nel prossimo futuro (Hulme, 2009; Seebens et al., 2015), che determinano un aggravamento dello stato di conservazione a scala di regione biogeografica di specie ed habitat, già compromesso da una vasta gamma di impatti riconducibili ad attività umane, oltre a mettere a rischio i pochi ambienti ancora integri da un punto di vista ecologico. Da un punto di vista ecologico, i costi sono relativi a diverse criticità causate alle specie ed habitat autoctoni. L'introduzione di biota al di fuori del loro areale geografico nativo e la loro potenziale diffusione influiscono non solo sulla biodiversità nativa e sui servizi ecosistemici attraverso, per esempio, la sostituzione competitiva (Betolino et al., 2014) o l'ibridazione con taxa nativi (Beukema et al., 2015; van Riemsdijk et al., 2020), la trasmissione di patogeni (Kilpatrick et al., 2010; Mihalca et al., 2017) e la modificazione della rete alimentare (David et al., 2017), ma anche sulla salute umana (Pauwels et al., 2015; Schindler et al., 2015) e sull'economia (Kettunen et al., 2009; Lovell et al., 2006). La gestione delle specie aliene invasive (IAS) si traduce in prevenzione, eradicazione e controllo, il cui successo si basa principalmente sull'individuazione precoce delle popolazioni incipienti (Eyre et al., 2021). Anche per i rettili il commercio di animali domestici esotici è la causa più significativa dell'introduzione di taxa alieni in tutto il mondo (Kraus, 2009), e le più alte densità di rettili esotici in Europa sono state registrate negli habitat acquatici (Pysek et al., 2010). Le testuggini palustri in particolare sono molto popolari nel commercio di animali domestici e molto frequentemente vengono abbandonate o rilasciate in natura, dove possono naturalizzarsi

dopo un periodo variabile in funzione della specie e del territorio (Masin et al., 2014; Perry et al., 2007). Anche se le testuggini sono considerate un ordine relativamente povero di specie, hanno il più alto numero di eventi di introduzione tra i rettili (Kraus, 2009): almeno 61 specie di cheloni sono state registrate nel commercio mondiale di animali da compagnia (Gong et al., 2009) e in Europa sono state segnalate almeno 17 testuggini aliene in ambiente naturale, di cui 13 di acqua dolce (Kopecky et al., 2013; Kalaentzis et al., 2023). E sono stati riportati proprio in Italia "hot-spot" di cheloni alloctoni con una decina di specie presenti sintopicamente, di cui diverse già riproductentesi con successo (Ferri et al., 2020, 2021; Di Blasio et al., 2021).

Fra le testuggini d'acqua dolce, molto famose sono storicamente le sottospecie e ibridi della testuggine palustre americana *Trachemys scripta* (Thunberg in Schoepff, 1792). Le testuggini appartenenti a questo gruppo erano oggetto di un commercio su scala globale (Ballasina, 1995; Kraus, 2009) e venivano solitamente vendute nelle fasi giovanili, favorendo il loro rilascio in natura una volta cresciute e non più gestibili in ambito domestico (Crescente et al., 2014; Foglini et al., 2017).

*Trachemys* ssp. rappresenta una minaccia significativa per le testuggini d'acqua dolce autoctone, con le quali compete per le fonti di cibo, i siti di basking e di nidificazione (Polo-Cavia et al., 2010; 2014). *T. scripta elegans* (Wied, 1838), in particolare, secondo il Global Invasive Species Database (GISD) è una delle IAS più dannose al mondo (GISD—Global Invasive Species Database, 2023) e nel 2016 è stata inserita tra le IAS di interesse unionale (Regolamento UE 2016/1141). È stata la sottospecie di testuggine d'acqua dolce più commercializzata a partire dagli anni Cinquanta e fino al suo divieto nell'UE nel 1997 (Regolamento UE 338/1997; Regolamento UE 349/2003). Finora sono state segnalate popolazioni riproduttive in Spagna (Pleguezuelos et al., 2003), Italia (Ficetola et al., 2003), Francia (Cadi et al., 2004), Portogallo (Martins et al., 2018) e forse anche in Grecia (Bruekers et al., 2006; Tzoras et al., 2018), Serbia (Đordević, et al., 2015) e Slovenia (Standfuss et al., 2016). In seguito al divieto europeo di importazione di *T. s. elegans* nel 1997, l'interesse del commercio di animali da compagnia si è spostato non solo sulle altre sottospecie e ibridi di *T. scripta*, ma anche su altre specie di testuggini (Ficetola et al., 2012; Scalera, 2007).

*Apalone*, *Graptemys*, *Kinosternon*, *Mauremys*, *Pelodiscus*, *Pelomedusa*, *Pseudemys* e *Sternotherus* sono solo alcuni esempi tra i generi più commercializzati, grazie a un prezzo di vendita al dettaglio per ogni piccolo molto conveniente (Masin et al., 2014; Foglini, 2021). Alcune specie, come *Chelydra serpentina* (L., 1758) e *Macrochelys temminckii* (Troost in Harlan, 1835) sono invece vietate in alcuni Paesi dell'UE (Italia e Germania) in quanto considerate "specie pericolose" (Masin et al., 2014).

In Italia, l'Art. 12 del Decreto del Presidente della Repubblica 8 settembre 1997, n. 357 e ss.mm.ii stabilisce che “Sono vietate la reintroduzione, l'introduzione e il ripopolamento in natura di specie e popolazioni non autoctone.” Questo principio è ribadito e meglio definito dal Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare del 2 aprile 2020, con cui si chiariscono i “Criteri per la reintroduzione e il ripopolamento delle specie autoctone di cui all'allegato D del decreto del Presidente della Repubblica 8 settembre 1997, n. 357, e per l'immissione di specie e di popolazioni non autoctone”. Ad oggi sussiste pertanto il divieto di introduzione deliberata di specie alloctone sul territorio italiano, comprese le specie di testuggini disponibili in commercio e di libera vendita. A seguito di specifica analisi del rischio condotta a livello europeo, con il Regolamento n. 1143/2014, entrato in vigore il 1° gennaio 2015, l'Unione Europea ha stabilito in modo organico le norme atte a prevenire, ridurre al minimo e mitigare gli effetti negativi sulla biodiversità causati dall'introduzione e dalla diffusione, sia deliberata che accidentale, delle specie esotiche invasive all'interno dell'Unione. Fra queste l'unica specie di testuggine palustre elencata nel Regolamento è *T. scripta*, comprese le sue sottospecie e ibridi. Il 30 gennaio 2018 è stato pubblicato il Decreto Legislativo 230 del 15 dicembre 2017 per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del Regolamento 1143/2014, che è entrato in vigore il 14 febbraio 2018. L'elenco delle specie soggette alle indicazioni del Regolamento è aggiornato periodicamente, e a oggi *T. scripta* resta l'unica specie di testuggine inserita. In Slovenia, le specie esotiche sono incluse nella Legge sulla Conservazione della Natura (Gazzetta Nazionale n. 96/04 – testo ufficiale modificato, 61/06 – ZDru-1, 8/10 – ZSKZ-B, 46/14, 21/18 – ZNOrg, 31/18 e 82/20). Questa legge definisce le specie animali e vegetali alloctone e contiene disposizioni su norme e requisiti riguardanti l'introduzione intenzionale di specie esotiche e l'allevamento di animali esotici. Tuttavia, l'attuale legislazione slovena non fornisce basi sufficienti per l'attuazione del Regolamento UE 1143/2014 (Kus Kus Veenvliet et al., 2020).

Il riconoscimento di specie aliena invasiva di interesse unionale determina divieti ma anche obblighi per gli Stati membri della UE, che a seguito della rettifica e adeguamento della propria normativa devono attuare tutte le idonee strategie per contrastare la diffusione in ambiente naturale della specie e preservare gli ecosistemi e le specie autoctone. In Italia, allo stato attuale *T. scripta* è presente su tutto il territorio, comprese le isole maggiori. La specie risulta maggiormente diffusa soprattutto nel nord Italia (Ferri & Soccini, 2008), ma anche nel centro Italia, con particolare riferimento a Toscana e Lazio (Ferri et al., 2019), mentre la distribuzione nel sud Italia e nelle isole risulta più localizzata e puntiforme.

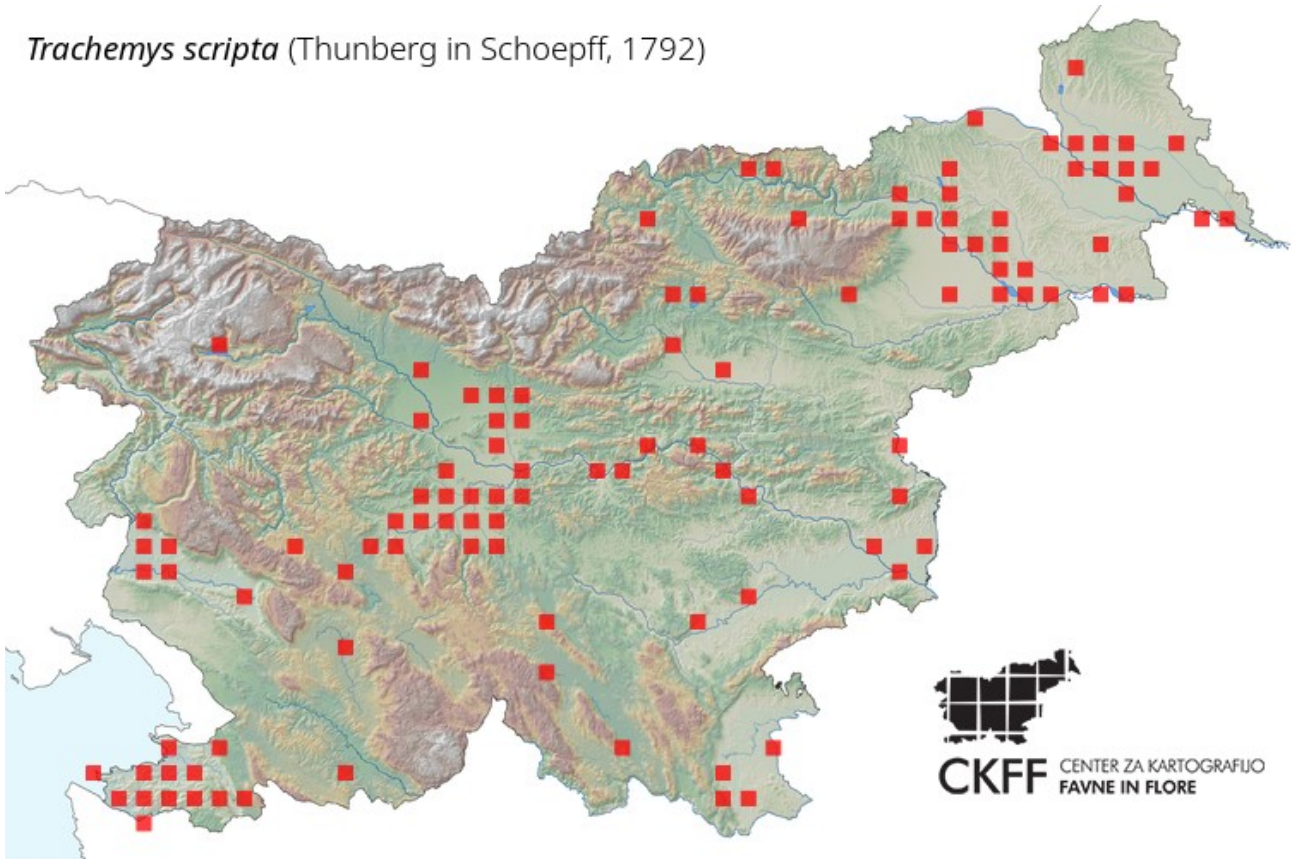
In Slovenia la specie è molto diffusa e abita soprattutto stagni, cave di ghiaia, pozze morte, laghi di accumulo, ma anche fiumi (ad es. Ljubljanica, Vipava, Krka) e ruscelli. La maggior parte dei dati sulla sua presenza provengono da Lubiana, Nova Gorica, dalla zona costiera e da un'area più ampia intorno a Maribor e Murska Sobota. La specie si riproduce con successo nella Primorska, nella Valle del Vipava e in alcune zone della Slovenia centrale.

Nel 2022 il Ministero della Transizione ecologica (ora Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica) in collaborazione con ISPRA ha redatto, conformemente a quanto richiesto dal Reg. 1143/2014, uno specifico "*Piano nazionale di gestione della testuggine palustre americana (Trachemys scripta)*". Il Piano definisce Obiettivi e strategie per la prevenzione di introduzione e espansione e gestione di *T. scripta* sul territorio nazionale.

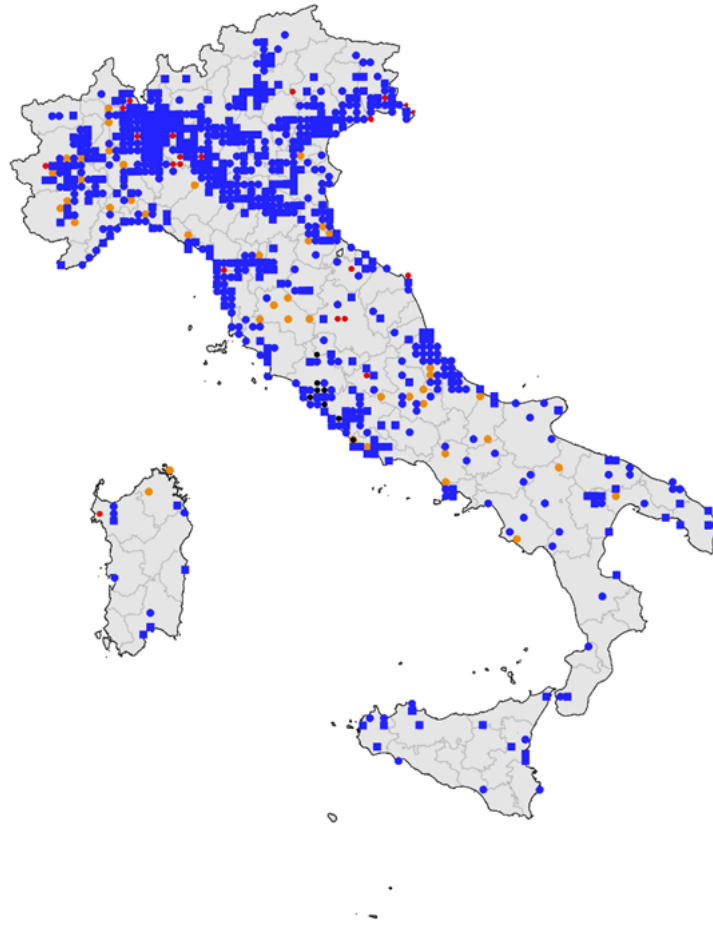
A seguito di quanto riportato, ad oggi *T. scripta* è la specie di testuggine palustre aliena prioritaria su cui è necessaria e richiesta la pianificazione di azioni e strategie, a livello nazionale ma soprattutto regionale e locale, per il suo contenimento e ove possibile eradicazione ai fini di preservare le popolazioni autoctone di *Emys orbicularis* ed *E. trinacris*.

Nel 2018 l'Istituto della Repubblica di Slovenia per la Conservazione della Natura ha preparato una base di esperti per la gestione delle specie esotiche invasive diffuse per la testuggine palustre alloctona (*Trachemys scripta*), che comprendeva la descrizione della specie, il suo status in Slovenia, le vie di introduzione e le raccomandazioni per misure di gestione (misure preventive, controllo in natura e manipolazione degli esemplari).

*Trachemys scripta* (Thunberg in Schoepff, 1792)



Distribuzione di *Trachemys scripta* in Slovenia (fonte: CKFF, 2023. Karta razširjenost *Trachemys scripta*. Center za kartografijo favne in flore (stanje: 1.12.2023))



**Distribuzione di *Trachemys scripta* in Italia (Fonte: Nuovo Atlante SHI)**

Ciò non toglie che l'apertura dei mercati a nuove specie di testuggini palustri già ora possa determinare l'introduzione di altre specie di testuggini alloctone in natura, potenzialmente invasive (Ficetola et al., 2007; Ficetola, 2009) con effetti su cui non sono state ancora effettuate idonee valutazioni ed analisi, ma che potenzialmente possono arrecare danni alla biodiversità autoctona. Pertanto, pur concentrandosi sulle specie di interesse unionale e cioè *T. scripta*, si ritiene indispensabile che sia adottata per un principio di precauzione la stessa strategia anche a tutte le specie di testuggine palustre aliene transitanti sul territorio italiano e sloveno. Il piano di gestione nazionale sloveno di *Trachemys scripta* sottolinea inoltre che è importante sensibilizzare gli acquirenti di testuggini esotiche non ancora invasive e ancora disponibili sul mercato sulla longevità e sulla cura adeguata delle testuggini d'acqua dolce per impedirne il rilascio nella natura.

## E.2 NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Si elencano a seguire le principali normative e Piani di riferimento per quanto riguarda la gestione delle specie alloctone per il territorio italiano, comprese le specie aliene invasive (IAS).

### E.2.1 Norme comunitarie

Normativa	Oggetto
Regolamento (UE) N. 1143/2014 del 22 ottobre 2014	Disposizioni volte a prevenire e gestire l'introduzione e la diffusione delle specie esotiche invasive
Regolamento di esecuzione (UE) 2016/1141 del 13 luglio 2016	Adozione un elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale in applicazione del regolamento (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio
Regolamento di esecuzione (UE) 2022/1203 del 12 luglio 2022	Modifica del regolamento di esecuzione (UE) 2016/1141 per aggiornare l'elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale

### E.2.2 Norme nazionali

## ITALIA

DPR 8 settembre 1997 n° 357	<p>Regolamento recante attuazione della direttiva 92/43/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali, nonché della flora e della fauna selvatiche</p> <p>Temi inerenti le specie alloctone:</p> <p>Art. 2 Definizioni: <i>r) introduzione: immissione di un esemplare animale o vegetale in un territorio posto al di fuori della sua area di distribuzione naturale.</i></p> <p>Art. 12 Comma 3: <i>Sono vietate la reintroduzione, l'introduzione e il ripopolamento in natura di specie e popolazioni non autoctone</i></p>
DPR 5 luglio 2019 n° 102	<p>Regolamento recante ulteriori modifiche dell'articolo 12 del decreto del Presidente della Repubblica 8 settembre 1997, n. 357, concernente attuazione della direttiva 92/43/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali, nonché della flora e della fauna selvatiche</p> <p>Temi inerenti specie alloctone:</p> <p>Art. 1 Definizioni: <i>rbis) immissione: qualsiasi azione di introduzione, reintroduzione e ripopolamento di esemplari di specie e di popolazioni non autoctone.</i></p> <p>Art. 2 Modifiche all'articolo 12 del decreto del Presidente della Repubblica 8 settembre 1997, n. 357:</p> <ol style="list-style-type: none"><li><i>1. Il Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, sentiti il Ministero delle politiche agricole, alimentari, forestali e del turismo, il Ministero della salute e la Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano, previo parere del Consiglio del Sistema nazionale di cui all'articolo 13, comma 2, della legge 28 giugno 2016, n. 132, adotta con proprio decreto i criteri</i></li></ol>

*perla reintroduzione e il ripopolamento delle specie autoctone di cui all'allegato D, nonché per l'immissione di specie e di popolazioni non autoctone di cui al comma 3, nel rispetto delle finalità del presente regolamento e della salute e del benessere delle specie.*

*3. È vietata l'immissione in natura di specie e di popolazioni non autoctone, salvo quanto previsto dal comma 4. Tale divieto si applica anche nei confronti di specie e di popolazioni autoctone per il territorio italiano quando la loro introduzione interessa porzioni di territorio esterne all'area di distribuzione naturale, secondo i criteri di cui al comma 1.*

*4. Su istanza delle regioni, delle province autonome di Trento e di Bolzano o degli enti di gestione delle aree protette nazionali, l'immissione in natura delle specie e delle popolazioni non autoctone di cui al comma 3 può essere autorizzata per motivate ragioni di rilevante interesse pubblico, connesse a esigenze ambientali, economiche, sociali e culturali, e comunque in modo che non sia arrecato alcun pregiudizio agli habitat naturali nella loro area di ripartizione naturale né alla fauna e alla flora selvatiche locali.*

DPR 15 dicembre 2017 n° 230

Adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 ottobre 2014, recante disposizioni volte a prevenire e gestire l'introduzione e la diffusione delle specie esotiche invasive

Temi inerenti specie alloctone:

*Art. 1 Finalità: 1. Il presente decreto stabilisce le misure per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) n. 1143 del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 ottobre 2014, di seguito regolamento, con particolare riferimento:*

*a) ai controlli ufficiali necessari a prevenire l'introduzione deliberata di specie esotiche invasive di rilevanza unionale;*

*b) al rilascio delle autorizzazioni previste dagli articoli 8 e 9 del regolamento;*

*c) all'istituzione del sistema nazionale di sorveglianza previsto dall'articolo 14 del regolamento;*

*d) alle misure di gestione volte all'eradicazione, al controllo demografico o al contenimento delle popolazioni delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale, transnazionale o nazionale;*

*e) alla disciplina sanzionatoria per la violazione delle disposizioni del regolamento e del presente decreto.*

DD Ministero Transizione Ecologica 16 marzo 2022

Individuazione dei ruoli e dei compiti nell'ambito del Sistema di sorveglianza degli esemplari delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale e nazionale e definizione delle Linee guida per l'impostazione dei sistemi e dei programmi di monitoraggio regionali, ai sensi dell'art. 18 del decreto legislativo 15 dicembre 2017, n. 230

Temi inerenti specie alloctone:



*Art. 2 Ruoli e compiti nell'ambito del Sistema di sorveglianza*

*Art. 3 Monitoraggio delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale e nazionale ancora assenti dal territorio regionale o della provincia autonoma*

*Art. 4 Monitoraggio delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale e nazionale già presenti sul territorio regionale o della provincia autonoma*

*Art. 5 Raccolta, validazione e trasmissione dei dati*

Allegato I al DD 16 marzo 2022

“Linee guida per la redazione dei programmi di monitoraggio delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale o nazionale”, riporta fra l'altro:

*Per il monitoraggio delle specie esotiche di rilevanza unionale, le Regioni e Province autonome si avvalgono di una specifica struttura in grado di organizzare le attività di monitoraggio e provvedere alla raccolta e analisi centralizzata delle informazioni. La struttura è composta da personale formato e competente in materia di specie esotiche invasive e di pianificazione delle attività di monitoraggio.*

*Al fine di ottimizzare le risorse, il monitoraggio delle specie esotiche di rilevanza unionale si avvale, quando possibile, delle strutture e delle reti di monitoraggio già esistenti sul territorio, come ad esempio quelle deputate all'attuazione dell'articolo 11 della direttiva 92/43/CEE (“Direttiva Habitat”), dell'articolo 8 della direttiva 2000/60/CE (“Direttiva Acque”) e dell'articolo 11 della direttiva 2008/56/CE (Direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino).*

DL 5 agosto 2022 n° 135

Disposizioni di attuazione del regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016 in materia di commercio, importazione, conservazione di animali della fauna selvatica ed esotica e formazione per operatori e professionisti degli animali, anche al fine di ridurre il rischio di focolai di zoonosi, nonché l'introduzione di norme penali volte a punire il commercio illegale di specie protette, ai sensi dell'articolo 14, comma 2, lettere a), b), n), o), p) e q), della legge 22 aprile 2021, n. 53.

Temi inerenti specie alloctone:

*Art. 1 Ambito di applicazione e definizioni: c) specie alloctona o esotica o aliena: specie che non appartiene alla fauna o alla flora originaria di una determinata area geografica, ma che vi è giunta per l'intervento diretto intenzionale o accidentale dell'uomo;*

*e) stabilimento: i locali e le strutture di qualsiasi tipo o, nel caso dell'allevamento all'aria aperta, qualsiasi ambiente o luogo in cui sono detenuti animali o materiale germinale, su base temporanea o permanente, escluse le abitazioni in cui sono detenuti animali da compagnia, gli ambulatori o le cliniche veterinarie, di cui all'articolo 4, punto 27), del regolamento (UE) 2016/429;*

*Art. 3 Divieti concernenti gli esemplari vivi di specie selvatiche ed esotiche ed i loro ibridi:*

*1) Fatto salvo quanto disposto al comma 2, è vietato a chiunque importare, detenere, commerciare e riprodurre animali vivi di specie selvatiche ed esotiche prelevati dal loro ambiente naturale nonché gli ibridi tra esemplari delle predette specie e di altre specie selvatiche o forme domestiche prelevati dal loro ambiente naturale.*

2) Fermo restando quanto disposto dal decreto legislativo 15 dicembre 2017, n. 230, e dall'articolo 4, il divieto di cui al comma 1, non si applica:

e) agli stabilimenti autorizzati ai sensi degli articoli 8 e 10 del decreto legislativo 15 dicembre 2017, n. 230

Art. 4 Specie pericolose per la salute, l'incolumità pubblica o per la biodiversità:

1. Fermo restando quanto disposto all'articolo 3, è vietato a chiunque detenere animali vivi di specie selvatica, anche nati e allevati in cattività, che costituiscano pericolo per la salute e per l'incolumità pubblica o per la biodiversità, nonché gli ibridi tra esemplari delle predette specie e di altre specie selvatiche o forme domestiche e le loro successive generazioni.

3. Il divieto di cui al comma 1, non si applica ai detentori di animali impiegati nei progetti, nei piani nonché nelle attività di reintroduzione o ripopolamento autorizzati secondo la normativa vigente e ai seguenti stabilimenti:

e) stabilimenti di cui agli articoli 8 e 9 del regolamento (UE) n. 1143/2014, e al decreto legislativo 15 dicembre 2017, n. 230, autorizzati, se necessario, dal Ministero della transizione ecologica anche alla detenzione di esemplari delle specie di cui al comma 1, d'intesa con l'ASL competente per territorio;

4) centri di detenzione di animali di specie esotiche invasive attivati dalle regioni ai sensi del decreto legislativo 15 dicembre 2017, n. 230, unicamente nel caso di esemplari di specie incluse nell'elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale o nell'elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza nazionale.

DM 28 settembre 2022

Decreto di approvazione del Piano di gestione nazionale della Testuggine palustre americana

Temi inerenti specie alloctone:

Piano nazionale di gestione della testuggine palustre americana (*Trachemys scripta*)

<https://www.mase.gov.it/pagina/piano-di-gestione-nazionale-della-testuggine-palustre-americanab>

Linee guida per la corretta detenzione degli animali da compagnia appartenenti a specie esotiche invasive (D.Lgs 230/2017, art. 27, comma 4)

Linee guida per la corretta detenzione degli animali da compagnia appartenenti a specie esotiche invasive (D.Lgs 230/2017, art. 27, comma 4) Appendice per la testuggine palustre americana, *Trachemys scripta*

## SLOVENIA

Legge sulla Conservazione della Natura (ZON - UPB2, Gazzetta Ufficiale n. 96/2004)

La presente legge stabilisce misure per la conservazione della biodiversità e stabilisce un sistema per la protezione generale dei valori naturali, al fine di contribuire all'obiettivo di conservazione della natura.

Questioni rilevanti delle specie alloctone:

- Definisce specie animali alloctone (art. 11, comma 21), e specie vegetali alloctone (art. 11, comma 21).

- Divieto di introduzione di specie animali e vegetali alloctone. È possibile derogare a tale divieto se, previa valutazione positiva del rischio per la natura, viene rilasciata dal Ministero competente una speciale autorizzazione per l'introduzione di specie esotiche (articolo 17).

- Legge sulla Conservazione della Natura (ZON - UPB2, Gazzetta Ufficiale n. 96/2004)

La presente legge stabilisce misure per la conservazione della biodiversità e stabilisce un sistema per la protezione generale dei valori naturali, al fine di contribuire all'obiettivo di conservazione della natura.

Questioni rilevanti delle specie alloctone:

- Definisce specie animali alloctone (art. 11, comma 21), e specie vegetali alloctone (art. 11, comma 21).
- Divieto di introduzione di specie animali e vegetali alloctone. È possibile derogare a tale divieto se, previa valutazione positiva del rischio per la natura, viene rilasciata dal Ministero competente una speciale autorizzazione per l'introduzione di specie esotiche (articolo 17).

Regolamento sulla conduzione della valutazione del rischio naturale e sull'ottenimento dell'autorizzazione

Il presente regolamento specifica le condizioni e i metodi per la valutazione del rischio prima dell'introduzione o del ripopolamento di piante e animali selvatici non autoctoni in natura o dell'allevamento di animali selvatici non autoctoni.

Questioni rilevanti delle specie alloctone:

Disposizioni introduttive (Sez. 1), Valutazione dei rischi (Sez. 2), Autorizzazione (Sez. 3), Disposizioni transitorie e finali (Sez. 4).

Regolamento sulle specie di animali selvatici che non richiedono un permesso per l'allevamento in cattività

Il presente regolamento stabilisce le specie selvatiche di animali alloctoni e autoctoni che non sono tenuti a ottenere il permesso per l'allevamento in cattività poiché non minacciano le specie autoctone.

Decreto sulle zone di protezione speciale (Natura 2000)

Il presente decreto istituisce le zone di protezione speciale Natura 2000, gli obiettivi di sicurezza in tali aree e le politiche di conservazione per mantenere o raggiungere uno stato di conservazione soddisfacente delle specie animali e vegetali selvatiche, dei loro habitat e della conservazione dei tipi di habitat.

Questioni rilevanti delle specie alloctone:

- Stabilisce politiche di conservazione, tra cui "le specie non indigene di animali e piante e gli organismi geneticamente modificati non devono essere introdotti nelle aree protette"

Decreto sul Parco paesaggistico Ljubljansko barje

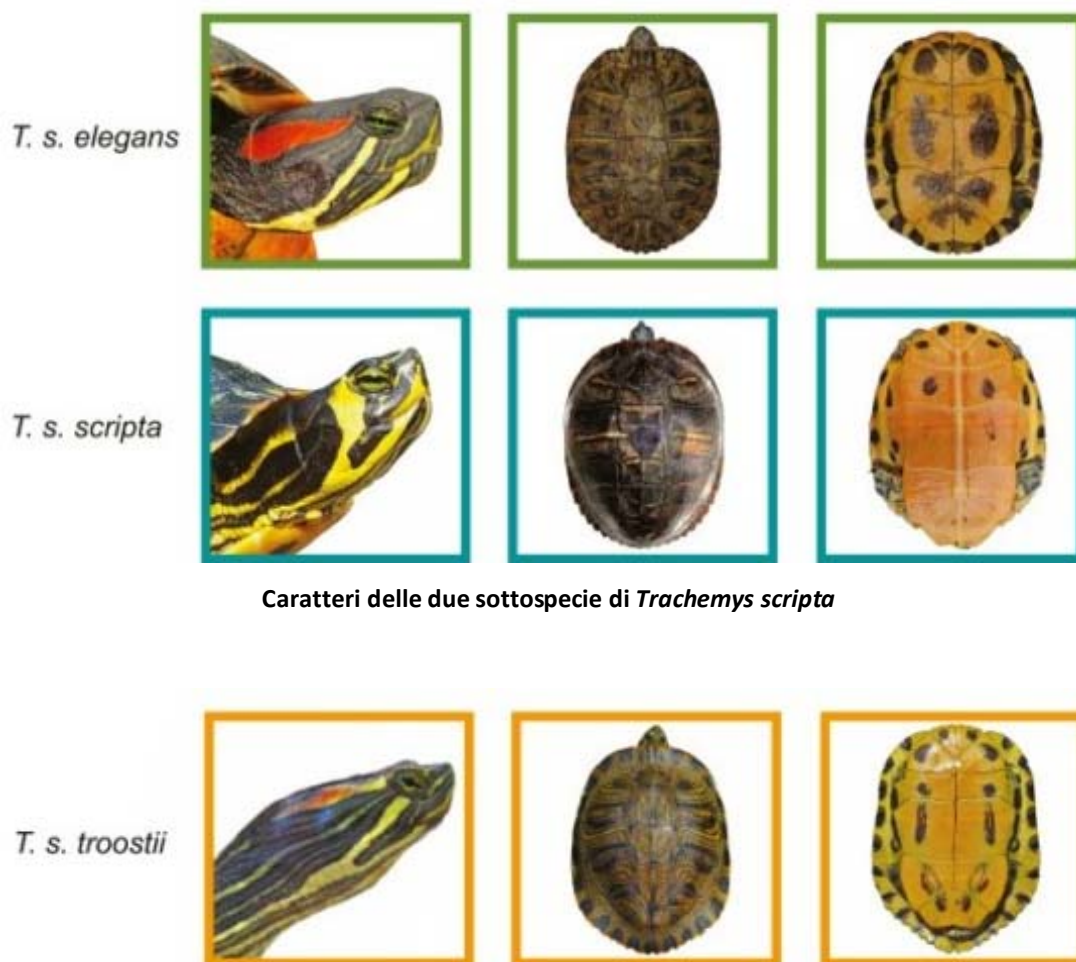
Il presente regolamento definisce le aree del parco paesaggistico, le aree protette e le aree vincolate, le regole di gestione, i regimi di protezione, le modalità di gestione e controllo, il finanziamento e le altre pratiche relative al raggiungimento degli obiettivi del parco paesaggistico come nonché le linee guida per lo sviluppo del parco naturale e il modo in cui devono essere attuate.

Questioni rilevanti delle specie alloctone:

- In particolare, non è consentita l'introduzione nel parco naturale di specie vegetali e animali non autoctone (art. 10, comma 9).
- Compito di conservazione della natura da svolgere nel parco paesaggistico è anche la prevenzione della diffusione di specie vegetali e animali alloctone e particolarmente invasive (articolo 18, comma 5).

### E.3 TRACHEMYS SCRIPTA (Thunberg in Schoepff, 1792)

Testuggine alloctona di dimensioni medio-grandi, con carapace ovale e appiattito, di colore bruno-verdastro ed attraversato da strie gialle. Il piastrone è giallo con macchie scure, mentre la testa presenta una colorazione che può essere rossa, gialla o arancione a seconda della sottospecie (*T. s. elegans*, *T. s. scripta*) o di eventuali forme ibride (ex *T. s. troostii*).



Caratteri delle due sottospecie di *Trachemys scripta*

Caratteri delle forme ibride attribuite in modo non univoco a *T. s. troostii*. Questa forma è stata recentemente confutata sulla base di analisi genetiche (Parham et al., 2020) e ridotta al rango di ibrido tra le due sottospecie *T. s. scripta* e *T. s. elegans*.

Il dimorfismo sessuale è dato dalle dimensioni corporee: le femmine sono più grandi dei maschi, che possiedono una coda più lunga e più larga alla base e le unghie delle zampe anteriori decisamente più lunghe:

#### Femmine

- Taglia superiore a quella dei maschi (da 1,15 a 1,55 volte): fino a 30 cm (max. 35). La taglia massima sino a oggi ufficialmente nota in Italia è stata registrata in una femmina di *T. s.*

*elegans*: 28,3 x 20,0 cm, rispettivamente lunghezza e larghezza carapace (Di Tizio e Di Cerbo, 2011).

- Peso: fino a 3 kg (record di quasi 5 kg)
- Unghie delle zampe posteriori in genere più sviluppate
- 9 Maturità sessuale intorno ai 3-5 anni (lunghezza del carapace: ca. 18 cm)



### Maschi

- Piastrone leggermente più concavo
- Distanza tra l'attaccatura del piastrone e la cloaca maggiore
- Coda più lunga e più ingrossata all'attaccatura
- Unghie del 2°, 3° e 4° dito delle zampe anteriori quasi sempre più lunghe
- Maturità sessuale: 2-3 anni (lunghezza carapace: ca. 10-12 cm)



Gli accoppiamenti avvengono marzo-aprile a ottobre, soprattutto sul fondo dei corpi idrici. Nelle aree di origine le femmine possono deporre più volte all'anno, da 10 a 30 uova per covata, di aspetto biancastro e allungato (circa 4 cm di lunghezza):

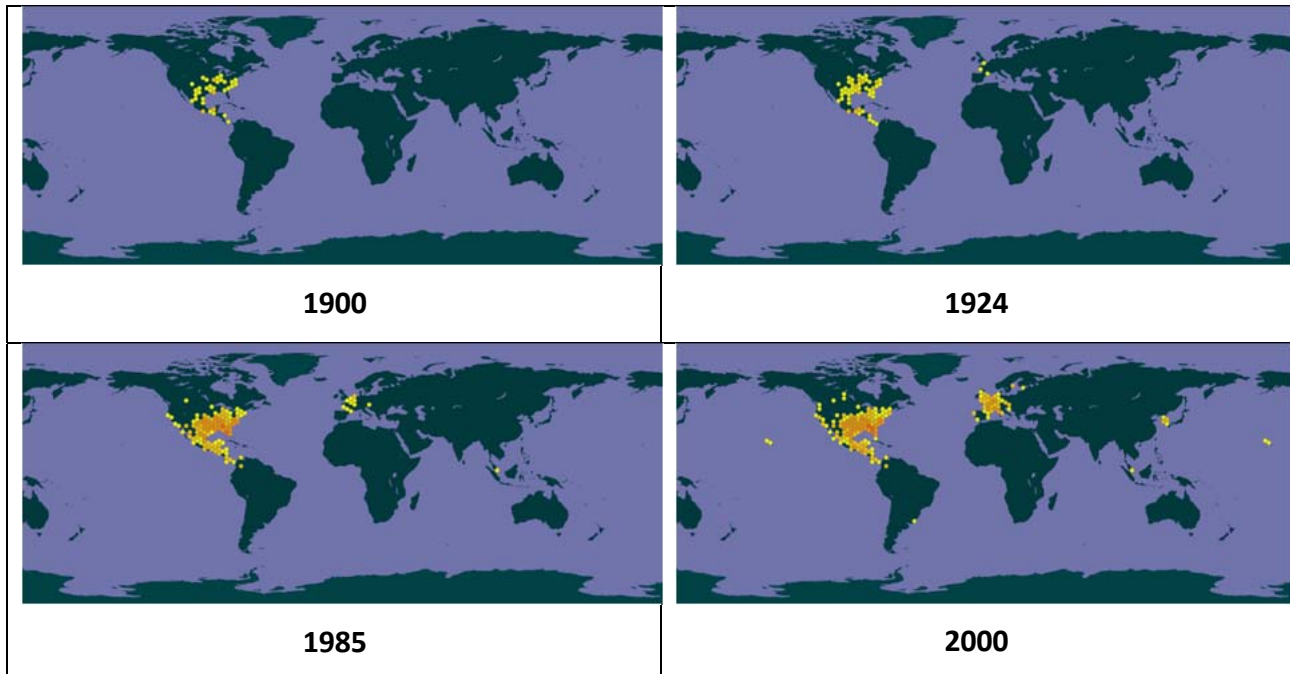
- 1-3 nidiate all'anno: tra aprile-giugno - Da 2 a 25 uova per covata secondo Ernst & Barbour (1989), da 6 a 16 uova in Lombardia (Ferri & Soccini, 2003), da 1 a 16 (media 4,3 per nido) nel lago Angitola, dove la nidificazione della sottospecie *T. scripta elegans* è stata studiata per tre anni, nel periodo 2008-2010, con dati basati su 1081 uova deposte in 250 nidi (Crescente et al., 2014).
- TSD (< 28 °C: maschi, > 29 °C: femmine)

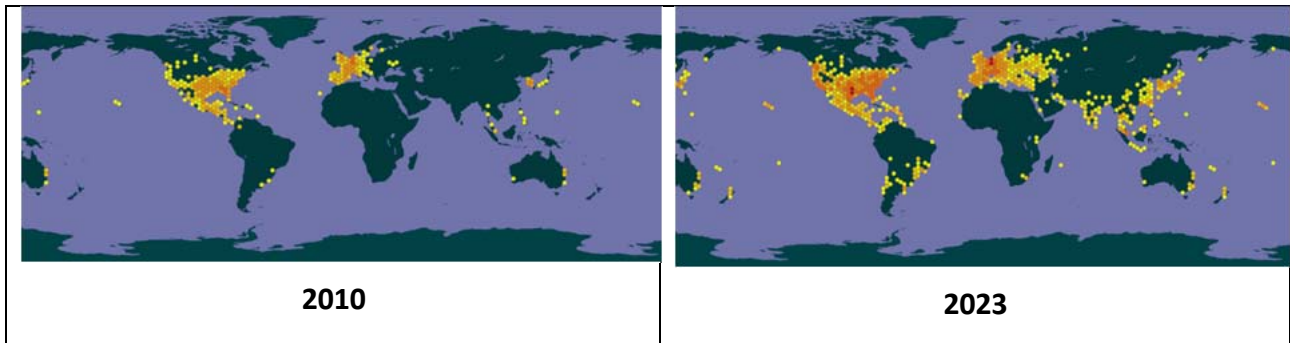
- Incubazione: 60-90 giorni
- Schiusa: agosto-settembre
- Ritenzione spermatica
- Covate tardive: neonati che trascorrono l'inverno nel nido



Fonte: LIFE09 NAT/ES/000529 TRACHEMYS

In Italia la specie sverna solitamente sul fondo degli habitat acquatici, nel fango oppure interrata presso le sponde, tra novembre e marzo. Di solito si attiva, anche in Inverno se le condizioni lo permettono, con temperature al di sopra dei 12-14° C. Si tratta di una specie onnivora ed opportunista, si può nutrire di piante, pesci, anfibi, nidiacei di uccelli e invertebrati.





Evoluzione dell'espansione di *T. scripta* (GBIF 2023: <https://www.gbif.org/species/2443002>)

Si riscontra comunque nei giovani individui una dieta prevalentemente carnivora (52%), che si trasforma in un regime essenzialmente vegetariano o solo limitatamente carnivoro (9%) negli adulti (Clark e Gibbons, 1969; Agosta e Parolini, 1999). Il passaggio da un regime alimentare all'altro, avverrebbe solitamente intorno al secondo anno di età e, in modo particolare, alla fine della stagione estiva. La scelta degli adulti verso una dieta prevalentemente vegetariana è opportunistica: la ricerca di materiale vegetale, infatti, è sicuramente meno dispendiosa, in termini di spesa energetica, rispetto a quella di prede mobili (Agosta e Parolini, 1999).

È una specie caratterizzata da una notevole plasticità ecologica, che le ha permesso di ambientarsi senza problemi in molte aree del pianeta. In grado di colonizzare le più disparate raccolte d'acqua, sia naturali che artificiali: fiumi, canali, laghi di piccole e grandi dimensioni, stagni, fontane e cave dismesse, esiste la concreta possibilità di espansione numerica dei nuclei presenti e conseguente naturalizzazione della specie, già segnalata. Il successo riproduttivo della specie al di fuori dell'areale originario è maggiore nei paesi con clima mediterraneo, tuttavia, anche laddove la riproduzione non sia accertata, gli individui adulti rilasciati dall'uomo possono sopravvivere per molti anni anche in zone sub ottimali. Oltre all'incremento nel numero degli individui, l'espansione spaziale della specie può avvenire in ambienti umidi temporaneamente o permanentemente in connessione tra loro, in contesti naturali o artificiali, o per via terrestre, grazie alle discrete capacità motorie di questa specie sulla terraferma, che può compiere tragitti anche abbastanza lunghi alla ricerca di nuove zone umide.

L'esportazione dagli Stati Uniti ad altri Paesi ha raggiunto milioni di individui all'anno (Telecky 2001; Reed e Gibbons 2003). Dalla fine del XX secolo, l'allevamento commerciale su larga scala di *T. s. elegans* è iniziato anche in Cina e nei Paesi del Sud-est asiatico, dove viene utilizzato per il consumo umano (van Dijk et al. 2000).

## E.4 IMPATTI E SCENARI FUTURI

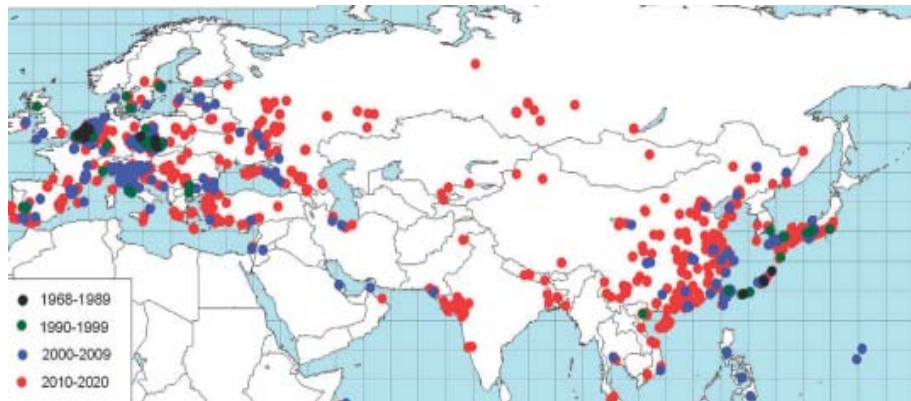
In cattività *T. scripta* cresce rapidamente e gli esemplari di grandi dimensioni richiedono più spazio, sono meno attraenti alla vista, aggressivi e possono mordere. Liberarli nel corpo idrico più vicino è un modo comune per sbarazzarsi di un animale domestico fastidioso. Questa testuggine si adatta facilmente alle condizioni esterne e può riprodursi e stabilire popolazioni stabili in regioni con un clima adeguato (Rödder et al., 2009; Heidy Kikillus et al., 2010; Crescente et al., 2014). Una volta stabilitasi, soprattutto in ristretti bacini, può indurre un impatto negativo sulle macrofite e sugli animali autoctoni (Ficetola et al., 2012). Gli anfibi sono considerati particolarmente vulnerabili perché questa testuggine si nutre di girini e la presenza di segnali chimici rilasciati da questo predatore può influenzare il tasso di sviluppo e le dimensioni alla metamorfosi dei girini (Polo-Cavia et al. 2010; Vodrážková et al., 2020). Questa specie alloctona, date le maggiori dimensioni e le caratteristiche riproduttive più elevate può competere con successo con le specie autoctone di testuggine palustre per il cibo, i siti di basking e, in alcuni casi, per i luoghi di deposizione delle uova (Cadi e Joly, 2003; Perez-Santigosa et al., 2008; Pérez-Santigosa et al., 2011; Polo-Cavia et al., 2011; Pearson et al., 2015). Studi sperimentali hanno confermato una maggiore mortalità della testuggine europea nativa in presenza dell'invasivo cursore dalle orecchie rosse (Cadi e Joly, 2004). Inoltre, questa testuggine palustre aliena è coinvolta nei cicli vitali di specie parassitarie autoctone, che sono in grado di infettare le testuggini palustri autoctone aumentandone il rischio di zoonosi, (Iglesias et al., 2015; Demkowska-Kutrzepa et al., 2018). Inoltre, può essere portatrice di microorganismi patogeni per l'uomo (Nagano et al. 2006; Shen et al. 2011) ed in passato sono stati reiterati anche in Italia blocchi all'importazione di neonati di *T. scripta elegans* dagli USA fino all'emanazione di un regolamento sanitario che ha imposto il "Salmonella free" degli individui commerciati (Soccini & Ferri, 2004).

Reshetnikov et al. (2023) hanno analizzato le caratteristiche dell'invasività di *T. scripta elegans* in diverse parti dell'Eurasia, per giungere ad una verifica del suo status di "specie invasiva" e degli scenari futuri di gestione, analizzando circa 7.500 dati raccolti da fonti verificate.



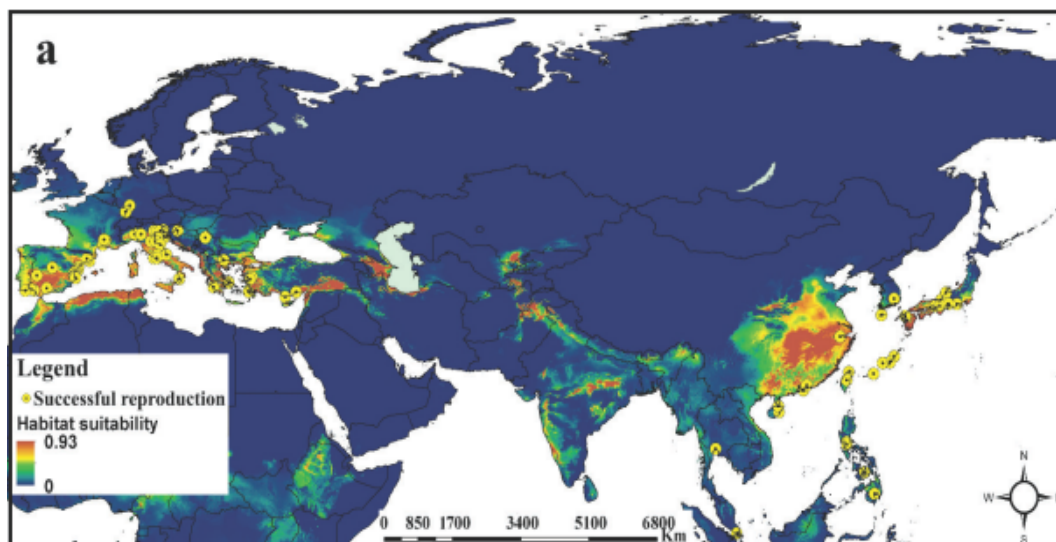


**Distribuzione geografica di *T. s. elegans* in Eurasia (Reshetnikov et al., 2023)**

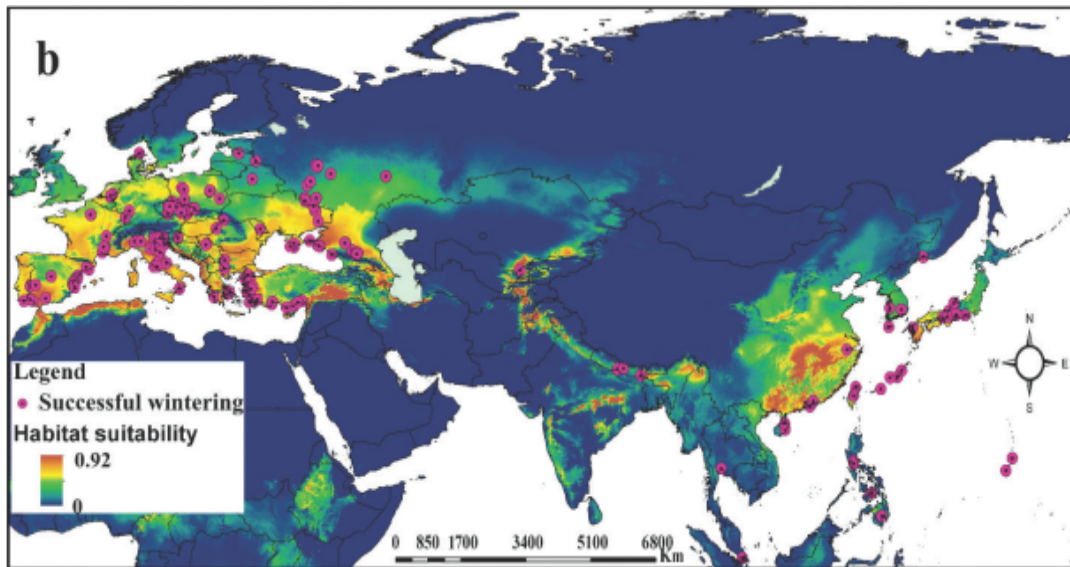


**Distribuzione spazio-temporale dei dati di *T. s. elegans* in Eurasia (Reshetnikov et al., 2023)**

Lo studio analizza il successo riproduttivo e la capacità di svernamento nelle diverse località di presenza, confermando come la riproduzione sia più efficace nel Sud Europa ed Asia. Il successo nello svernamento in Europa invece sarebbe correlato negativamente con la latitudine.



**Range potenziale del successo riproduttivo in *T. s. elegans* in Eurasia (Reshetnikov et al., 2023)**



**Range potenziale del successo nello svernamento in *T. s. elegans* in Eurasia (Reshetnikov et al., 2023)**

I risultati dello studio confermano una maggiore densità di osservazioni in Europa e in Asia orientale. La densità delle osservazioni inoltre può essere correlata positivamente con la densità della popolazione umana (Banha et al. 2017). La pressione di diffusione (il numero di eventi di rilascio) è spesso correlata positivamente con la densità della popolazione umana, mentre la sopravvivenza e il successo riproduttivo delle testuggine dipende principalmente dalle condizioni climatiche, cioè dalla nicchia ecologica. Pertanto, sia i fattori climatici sia quelli antropici sono fondamentali per l'invasione di questa specie ed analizzando l'ecologia dell'invasione, rilevano come molte caratteristiche del successo dell'invasione (ad esempio, una porzione più elevata di corpi idrici naturali abitati, un numero più elevato di individui per corpo idrico, uno svernamento riuscito, la presenza di individui giovani, una riproduzione riuscita e l'insediamento di popolazioni) tendono a essere presenti nelle regioni costiere, come la costa mediterranea dell'Europa meridionale, la parte occidentale dell'Asia occidentale, la costa pacifica dell'Asia orientale e le isole. Le regioni costiere potrebbero avere regimi termici più miti e di umidità più favorevoli, importanti quindi per la riproduzione di questo rettile. Tuttavia, l'attuale diffusione geografica di questa testuggine non è limitata alle aree climaticamente adatte alla riproduzione, e poiché il principale vettore e spinta di invasione è il rilascio di animali domestici (García-Díaz et al. 2015), la geografia delle introduzioni iniziali non dipende dalle caratteristiche climatiche. Nonostante la riproduzione sia limitata a poche regioni dell'Eurasia con temperature estive relativamente elevate e sufficiente umidità dell'aria, gli individui di *T. scripta elegans* rilasciati in natura possono tollerare un'ampia gamma di temperature ed umidità dell'aria nei pressi dei corpi idrici riceventi.

Al contrario, il successo nello svernamento è registrato in diverse parti di tutti i continenti, salvo nelle regioni settentrionali dell'Asia, caratterizzate da basse temperature invernali. Occorre ricordare come la sopravvivenza in inverno di questa specie sia legata a sue particolari caratteristiche fisiologiche: durata della copertura ghiacciata nei corpi idrici utilizzati, in quanto la specie non resiste oltre 44-50 giorni a condizioni anossiche in acqua (Ultsch, 2006); numero di giorni con temperatura dell'acqua superiore a 10° C nella stagione calda prima dello svernamento, in grado di influenzare ad esempio le riserve di lipidi necessari per la lunga ibernazione senza nutrirsi.

Risulterebbe pertanto importante, anche nella pianificazione di interventi di eradicazione, definire la capacità di sostenere lo svernamento di questa specie nei diversi territori, piuttosto che limitare la capacità riproduttiva, in quanto questa testuggine è un ottimo esempio di specie invasiva ad ampio spettro geografico, che non dipende dalla naturalizzazione delle sue popolazioni (=riproduzione) ma piuttosto dal reclutamento di nuovi individui legati a liberazioni reiterate che accrescono le popolazioni.

## **E.5 METODOLOGIE INTERVENTO**

Il Piano di gestione nazionale di *T. scripta* evidenzia come non sia possibile individuare una strategia univoca a livello nazionale, a causa della notevole disomogeneità nella distribuzione e nelle caratteristiche degli ambienti colonizzati. Resta comunque fermo il principio per cui in presenza di nuclei isolati e numericamente ridotti o di nuove segnalazioni in aree ecologicamente rilevanti l'eradicazione rapida deve essere considerata azione prioritaria, soprattutto nei casi di sintopia con le testuggini autoctone.

Il Piano definisce un quadro delle azioni gestionali regionali come evidenziato nella figura seguente: Le strategie di gestione riguardano sostanzialmente il controllo e l'eradicazione delle popolazioni di testuggini aliene sul territorio. A queste azioni si accompagna sempre un monitoraggio utile per la verifica dello stato delle popolazioni alloctone, delle possibili criticità nell'azione di eradicazione/controllo e del successo delle azioni intraprese.

In considerazione delle caratteristiche di invasività della specie, è prevedibile un processo di prioritizzazione che permette di definire l'urgenza di un intervento di controllo/eradicazione, sulla base ad esempio di: caratteristiche intrinseche dell'organismo, caratteristiche dell'ambiente nell'area oggetto di segnalazione che definiscano i rischi per la biodiversità (es. presenza di popolazioni di testuggini autoctone), la possibilità di diffusione sul territorio regionale e la facilità di controllo/eradicazione.

Regione	Eradicazione	Controllo	Risposta rapida	Monitoraggio
Abruzzo	X		X	X
Basilicata	X		X	X
Bolzano	X		X	X
Calabria	X		X	X
Campania		X		X
Emilia Romagna		X		X
Friuli Venezia Giulia		X		X
Lazio		X		X
Liguria		X		X
Lombardia		X		X
Marche		X		X
Molise		X		X
Piemonte		X		X
Puglia		X		X
Sardegna	X		X	X
Sicilia	X		X	X
Toscana		X		X
Trento		X		X
Umbria		X		X
Valle d'Aosta	X		X	X
Veneto		X		X

#### Azioni gestionali regionali (Piano di gestione nazionale *T. scripta*)

Integrando le informazioni riguardanti la presenza di testuggini alloctone, con quelle ad esempio inerenti la distribuzione attuale e potenziale di testuggini autoctone o di altri elementi di pregio, la presenza ed estensione territoriale degli ambienti acquatici di interesse per la conservazione della biodiversità e altre informazioni biogeografiche, o rispetto alla distribuzione locale della Rete Natura2000, è possibile disegnare una mappa delle aree a rischio elevato cioè aree del territorio regionale in cui devono essere concentrate le risorse di prevenzione, allerta rapida, eradicazione/controllo, per una difesa efficace del patrimonio di biodiversità. Tali aree possono essere definite sulla base dell'elaborazione dei dati in ambiente GIS riferiti alla distribuzione delle specie esotiche di testuggine, confrontati con quelli della distribuzione dei *taxa* autoctoni e con altri tematismi quali: le aree protette (Rete Natura 2000, in particolare), il reticolo idrico, la presenza di specie di anfibi e rettili di interesse conservazionistico (potenziali competitori o prede delle testuggini aliene); la localizzazione vicino ad infrastrutture o aree molto frequentate.

A seconda dello stato riscontrato e dunque delle linee di intervento da intraprendervi, le diverse aree di intervento possono essere categorizzate come segue:

- **Aree per la prevenzione.** Aree a più elevato rischio di arrivo delle testuggini invasive, dove attivare opportuni meccanismi di prevenzione. Si tratta di una prevenzione nel luogo di

destinazione, per cui da attivare con modalità diverse a seconda della tipologia di area/sito di, attraverso una sorveglianza efficace ed efficiente e, se occorre, l'applicazione altrettanto efficace di protocolli di EDRR (*Early Detection and Rapid Response*) opportunamente calibrati;

- **Aree per il monitoraggio.** Aree in cui le specie invasive sono naturalizzate, ma in cui sussistono comunque emergenze tali da rendere necessario un attento controllo delle popolazioni delle specie invasive e degli ecosistemi e relative componenti ospitanti;
- **Aree per il contenimento.** Siti caratterizzati da emergenze naturalistiche minacciate e al tempo stesso prioritarie nei quali, ad esempio per le condizioni del contesto, è irrealizzabile una eradicazione;
- **Aree per l'eradicazione.** Siti che sono sede di emergenze naturalistiche prioritarie per la Regione ed in cui sussistono condizioni ambientali e logistiche, o densità della popolazione aliena tali da ipotizzare la riuscita di una campagna di eradicazione.

La buona riuscita di interventi a favore di una specie autoctona o di contrasto alla diffusione di una specie esotica necessita il coinvolgimento del maggior numero possibile di Enti e realtà anche di volontariato locale ad esse correlate. Il coinvolgimento attivo permette, infatti, da un lato di far conoscere le problematiche, dall'altro di condividere sforzi e obiettivi ottimizzando le risorse soprattutto umane disponibili sul territorio. Ad esempio per le attività di sorveglianza e controllo maggiore è il coinvolgimento e maggiore saranno le probabilità di rendere efficace questa attività.

## E.6 SORVEGLIANZA

L'attività di sorveglianza è una delle fasi principali nel processo di controllo della diffusione di specie alloctone. Essa si dovrà concentrare in quelle aree più a rischio, in particolare, dove non si è ancora avuta alcuna segnalazione della presenza di queste specie e in quelle poste nelle vicinanze dell'area di presenza delle specie alloctone. L'attività può essere in carico agli enti territoriali preposti (es enti Gestori di Rete Natura2000 o Aree protette), e potrà essere supportata anche attraverso strumenti di *citizen science* e da tutti coloro che, si trovano a frequentare questi ambienti, realizzando così un monitoraggio continuo e segnalazioni tempestive. È necessario pertanto il coinvolgimento del personale di vigilanza degli Enti amministrativi, i Carabinieri forestali, la vigilanza volontaria (GEV, ecc..) ma anche i tecnici ARPA, gli operatori della Protezione Civile, i pescatori dilettanti e professionali e il maggior numero di cittadini che semplicemente si possono trovare a frequentare

questi ambienti. Al fine di rendere il più possibile efficace l'attività di sorveglianza, occorre una corretta formazione di chi è coinvolto e a cui si deve offrire un protocollo d'azione semplice ed efficace, di facile comprensione ed attuazione.



## E.7 CAMPAGNE D'INFORMAZIONE E SENSIBILIZZAZIONE

Le azioni mirate ad informare e a sensibilizzare coloro che direttamente e indirettamente risultano coinvolti in questo ambito riguardano in particolare le realtà coinvolte a vario titolo nella vigilanza ambientale come Carabinieri forestali, personale di vigilanza di Enti territoriali e GEV (Guardie Ecologiche Volontarie). Per tali soggetti devono essere realizzati incontri mirati di formazione sulle specie esotiche invasive e delle problematiche a loro connesse, la legislazione vigente e le modalità di intervento operativo sia dal punto di vista della vigilanza, del monitoraggio e delle precauzioni sanitarie da intraprendere. Accanto a percorsi formativi mirati, è possibile ipotizzare la produzione di materiale didattico/divulgativo. Sarebbe inoltre opportuno coinvolgere queste realtà in attività pratiche in campo per poter applicare concretamente quanto appreso.

Attività simili sono da realizzarsi anche per i pescatori dilettanti o professionali, coinvolgendo ad esempio le associazioni di settore (FIPSAS, ecc...) in quanto soggetti a stretto contatto in molte realtà regionali con gli ambienti di presenza sia delle testuggini palustri autoctone sia di quelle alloctone. Per quanto riguarda gli occasionali frequentatori di Aree protette può essere utile come mezzo informativo e di sensibilizzazione, la realizzazione di pannelli informativi distribuiti nel territorio o lungo i corsi d'acqua così come brochure informative da mettere a disposizione negli *info-point* dei parchi e riserve. Tutto questo materiale dovrebbe essere reso disponibile anche on-line su eventuali siti o pagine social delle Aree protette.

Infine. Anche coloro che sono deputati allo svolgimento di attività didattiche a vari livelli (Guide Ambientali e turistiche, ecc), dovrebbero essere correttamente formati su queste problematiche sia attraverso corsi dedicati sia attraverso materiale informativo.

## **E.8 SORVEGLIANZA ORDINARIA**

Le attività di sorveglianza ordinaria rientrano tra le attività svolte durante le normali mansioni lavorative o di volontariato. Questo implicherà la verifica della presenza di eventuali individui di testuggini esotiche e autoctone, o la presenza individui morti in acqua o rinvenuti investiti sulle infrastrutture prossime ai corpi idrici attenzionati. Per i pescatori inoltre, potrà essere utile il controllo dei contenuti stomacali dei pesci catturati e trattenuti in alcuni contesti, ad esempio in presenza di pesci predatori o di grandi dimensioni come il luccio, il persico trota o il siluro.

## **E.9 CAMPAGNE DI SORVEGLIANZA DEDICATE**

Le attività di sorveglianza dedicata sono legate a siti di particolare interesse dove sussistano particolari condizioni e che è opportuno mantenere controllati e monitorati in maniera sistematica. In particolare è importante che siano monitorate quelle aree prossime alle zone di diffusione delle testuggini invasive e i siti ancora liberi e colonizzati dalle sole specie autoctone.

L'attività di sorveglianza risulta efficace se attuata in maniera continuata e sistematica, con personale formato e ben motivato. A tal fine è utile redigere un calendario di attività annuale relativo ai diversi siti da monitorare, soprattutto nei periodi di maggiore attività delle testuggini in funzione della latitudine (indicativamente marzo - ottobre).

L'attività di monitoraggio dovrà essere svolta tramite una delle tecniche qui presentate a cui il personale deputato dovrà essere debitamente formato, come richiesto dalla normativa vigente e dalle Linee guida nazionali. Durante l'attività di campo saranno recuperati una serie di dati sia ambientali che relativi agli animali catturati/individuati, compilando una scheda simile a quella riportata in Allegato 3.

I dati ottenuti da queste attività forniranno un quadro storico fondamentale utile a determinare il trend di espansione locale delle diverse specie di testuggini esotiche, con particolare attenzione a *T. scripta*, oltre a mantenere aggiornato il quadro delle conoscenze su *Emys* sp.

## E.10 MONITORAGGIO

L'azione ha una funzione propedeutica alle attività di controllo ed eradicazione e di verifica del trend delle popolazioni a seguito degli interventi, e può pertanto distinguersi in monitoraggio ex ante e monitoraggio ex post.

In entrambi i casi, le attività vengono svolte attraverso conteggio (*Visual Encounter Survey*) da punti di osservazione fissi o lungo transetti, con le seguenti modalità:

- Scelta di stazioni fisse di osservazione in funzione della tipologia dell'ambiente, con buona visibilità dalle sponde e possibilità di osservare senza disturbo gli animali in basking. In questo senso possono in alcuni casi essere utilizzate le strutture esistenti per attività di birdwatching e altro nelle aree di monitoraggio. Il numero di stazioni/transetti è funzionale a coprire le aree dei siti monitorati, e ciascuna stazione/transetto saranno schedati e georeferenziati per permettere un piano di monitoraggio sul lungo periodo.
- Svolgimento nel periodo di attività delle testuggini (marzo – ottobre in funzione dell'area) di almeno 3 sessioni di osservazione, annotando su apposite schede (Allegato 3) l'area monitorata, la stazione di osservazione, e informazioni quali ora e condizioni meteo.
- Conteggio del numero massimo d'individui contemporaneamente osservabili, annotando su apposite schede (Allegato 3) la specie, se riconoscibile in modo univoco, un'indicazione della classe di età (giovane/adulto), il sesso ove possibile e indicazioni sull'attività (in basking, ecc). Le osservazioni potranno anche essere integrate con dati relativi ad altre specie sia autoctone sia alloctone. Per il mantenimento della coerenza del monitoraggio non è necessario determinare al livello specifico o sottospecifico le specie di testuggini alloctone, soprattutto per non incorrere in errori nel caso di utilizzo di osservatori non specialisti. Questo vale anche per le eventuali osservazioni di *Emys orbicularis*, che deve essere annotata solo se l'osservazione è effettuata da personale esperto e in caso contrario verificata prima di consolidare il dato.

Preventivamente alla pianificazione del monitoraggio vanno raccolte e validate le eventuali informazioni e i dati specie-specifici già esistenti per l'area di interesse, tramite ricognizione dei progetti di vario genere (ricerca, monitoraggio, *citizen science*, ecc.), attivi o conclusi.

Il monitoraggio tramite *Visual Encounter Survey* non necessita di autorizzazioni specifiche, salvo quelle necessarie per l'accesso alle aree, ove richieste.

Per il monitoraggio è necessaria la presenza di almeno un operatore, tuttavia per aumentare la robustezza dei dati raccolti, si consiglia l'utilizzo del doppio osservatore con confronto dei dati



raccolti da ciascuno. Il doppio osservatore può anche essere utile per motivi di sicurezza in relazione alle particolari tipologie di ambienti frequentati.

## E.11 CONTROLLO

Nelle aree individuate a seguito delle azioni di sorveglianza e monitoraggio, e identificate come prioritarie, è necessario delineare una strategia di gestione delle testuggini alloctone che minimizzi gli impatti negativi della stessa sulla biodiversità, sui servizi ecosistemici collegati, sulla salute pubblica e sulla sanità animale, sul patrimonio agro-zootecnico o sull'economia (art. 22 D.Lgs. 230/17), attraverso misure di controllo mirate e diversificate a seconda del contesto ambientale e del grado di diffusione della specie.

Per questo è possibile operare con:

- **Rimozione** dei nuclei/popolazioni delle specie esotiche tramite cattura con trappole a vivo nelle aree classificate come idonee all'eradicazione e prioritariamente nei siti di simpatia con presenza riconosciuta e significativa delle altre testuggini palustri autoctone.
- **Contenimento** dei nuclei/popolazioni delle specie esotiche tramite cattura con trappole a vivo nelle aree classificate come aree idonee al solo contenimento in quanto le specie sia così diffusa da rendere l'eradicazione non praticabile o non fattibile, anche sulla base dell'analisi costi/benefici.

In Italia le attività saranno svolte da personale formato e autorizzato a livello regionale come previsto dal Piano di Gestione Nazionale. Il personale sarà formato sulle modalità di intervento, gestione degli animali catturati, modalità di gestione post-cattura. La richiesta di autorizzazione potrà essere inviata agli uffici competenti delle regioni in cui si opererà. In Slovenia le attività saranno svolte dal personale del progetto, che effettuerà la rimozione delle specie esotiche di testuggini.

In caso si intervenga in aree con presenza di testuggini autoctone o altre specie inserite nell'Allegato IV della Dir. 92/43/CEE, sarà necessario richiedere in via precauzionale anche l'autorizzazione in deroga per la cattura e manipolazione di specie al Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica <https://www.mase.gov.it/pagina/deroghe-ai-sensi-dellart-16-della-direttiva-habitat> ai sensi dell'Art. 11 del DPR 357/97.

Gli individui di specie alloctone catturati non potranno essere rilasciati, ma dovranno essere trattenuti per essere destinati alla soppressione eutanasica o conferiti presso centri di detenzione, individuati dalle Regioni o Province autonome che hanno la competenza per l'applicazione sul

territorio delle misure di eradicazione e gestione ai sensi del D.Lgs. 230/17, in cui saranno tenuti permanentemente in cattività.

Per quanto riguarda le catture, analogamente a quanto fatto per le attività di monitoraggio tramite osservazione diretta, si possono sintetizzare alcuni parametri univoci:

- Periodo: aprile-ottobre o - per evitare un impatto su specie ornitiche nidificanti nei siti di intervento - luglio-ottobre.
- Stabilire il punto di cattura in base alla tipologia di trappola.
- Rilevare le coordinate GPS del punto di cattura (mediante qualsiasi App telefonica idonea allo scopo).
- Segnare il punto in cui viene posizionata la trappola con nastro segnaletico legato alla vegetazione o a un supporto presente in loco.

## **E.12 METODI DI CATTURA**

Sono ormai molte le esperienze in tutto il mondo che hanno verificato la funzionalità e l'efficienza di trappole di diverse tipologie per la cattura di testuggini palustri, autoctone o no: Italia (LIFEEmys, 2016), Spagna (Martinez-Silvestre et al., 2006; Izquierdo et al., 2010; Valdeon et al., 2010; LIFE Trachemys, 2016), Lettonia (Pupins & Pupina, 2011), Olanda (Bugter et al., 2011), Brasile (Bujes, 2010), Taiwan (Chen, 2006), Stati Uniti (Lui et al., 2013) e Australia (O'Keeffe, 2009).

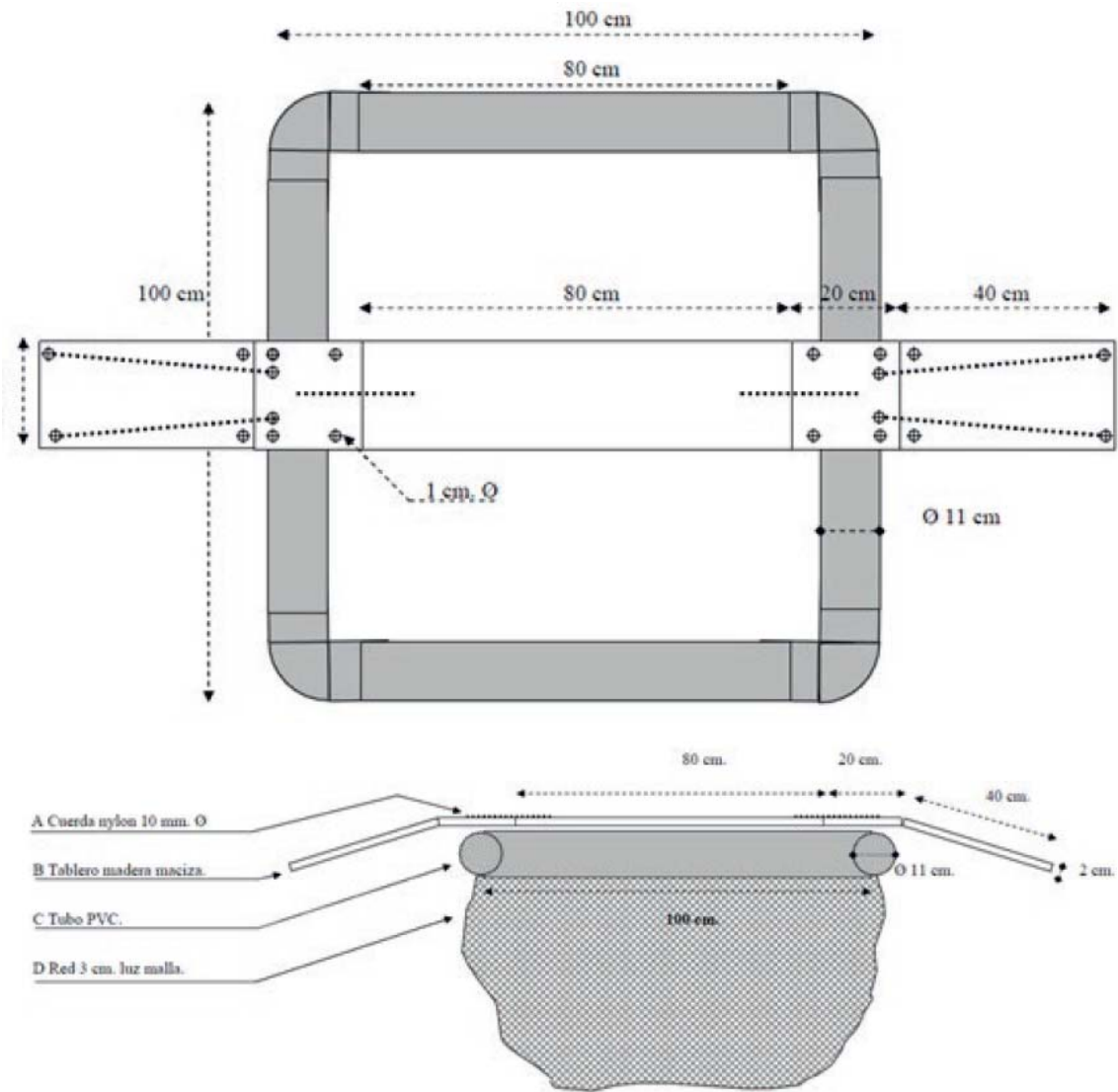
Soprattutto il LIFE Trachemys ha verificato le diverse tipologie di trappole e la loro efficienza in funzione delle casistiche di zone umide in cui effettuare i trappolaggi. Di seguito si propongono le tecniche più efficaci e proposte per le attività previste.

### **BASKING TRAPS**

Si tratta di trappole idonee per la cattura di testuggini alloctone nei corpi idrici di ampie dimensioni, in particolare in posizioni distanti dalle rive. La trappola è composta da un corpo centrale galleggiante di lato almeno 1 metro con una rete sommersa, a cui le testuggini accedono tramite rampe in legno sui 4 lati. Eventualmente può essere aggiunta una tavola di legno al centro della trappola. Da alcune esperienze (es Stagni di Casale, Vicenza) si è visto che se si fissa nella parte centrale e nelle rampe in acqua, ad esempio, della corteccia per simulare meglio un sito di basking naturale si ha un aumento delle catture. Gli animali accedono alla trappola per fare basking e cadono nella rete quando si rituffano in acqua.



Esempio di *basking traps*



Schema di *basking traps* (Sancho Alcayde et al., 2015)

Queste trappole hanno un'ottima catturabilità in corpi idrici grandi e con pochi siti di *basking* naturali, ee sono piuttosto selettive catturando quasi esclusivamente testuggini palustri.



**Posizionamento di *basking traps***

Queste nasse sono state utilizzate in diversi progetti in molte aree geografiche diverse, con ottima riuscita. Tuttavia presentano alcuni inconvenienti e criticità che possono renderle la scelta non più adatta in alcuni casi:

- Le nasse devono essere costruite, in commercio esistono dei modelli ma molto costosi. La realizzazione non è complicata, in quanto sono necessari materiali disponibili in un qualunque negozio di materiali edili o idraulici a poco prezzo. Però se sono necessarie molte nasse la realizzazione può diventare onerosa in termini di tempo e spazio.
- Sono nasse molto voluminose e relativamente pesanti. La struttura galleggiante è fissa di almeno 1 m<sup>2</sup>, mentre la rete sommersa di almeno 70 cm di profondità può essere rigida o flessibile. In ogni caso lo stoccaggio e il trasporto necessitano di molti operatori e di mezzi adeguati. In caso di aree non raggiungibili in auto il trasporto può diventare difficoltoso.
- Le trappole vanno posizionate in acque profonde e lontano da siti di *basking* esistenti. Pertanto è necessario dotarsi di un'imbarcazione per sistemarle.
- In aree con discreta presenza di siti di *basking*, l'attrattività delle trappole può diminuire sensibilmente (LIFE Emys).
- Occorre effettuare una manutenzione costante, in quanto la rete o il sistema di galleggiamento possono danneggiarsi col tempo e perdere di efficacia

### **BERTOVELLI E ANALOGHI**

Si tratta di comuni nasse ad inganno utilizzate nella lesca dell'anguilla e di altri prodotti ittici soprattutto in zone di laguna. La nassa può essere costituita da un unico elemento di cattura con inganno singolo sommerso e capo opposto legato fuori dall'acqua: la testuggine entra nella nassa e risale la trappola fino alla parte emersa restando intrappolata.



Schema di bertovello a inganno singolo (Sancho Alcayde et al., 2015)

Una variante molto funzionale è caratterizzata da due nasse a inganno singolo, collegate da una rete-barriera centrale di lunghezza variabile (2-3 metri). I capi estremi delle nasse vengono legati fuori dall'acqua a pali e strutture idonee in loco mentre gli inganni e la rete-barriera sono sommerse: le testuggini incontrando la rete-barriera tendono a muoversi lateralmente e a entrare attivamente nelle nasse fino alla parte emersa, restando intrappolate.

Queste tipologie di nasse hanno un'elevata catturabilità (Ottonello et al., 2016), soprattutto in corrispondenza di canali o elementi di passaggio obbligato degli animali sott'acqua (es aperture fra il canneto fitto o presso punti preferenziali di uscita dall'acqua sulle rive).

Sono poco selettive, in quanto posso attirare e catturare facilmente anche uccelli acquatici (gallinelle d'acqua, anatidi ecc.), mammiferi (es. nutrie) o anfibi e gamberi alloctoni (es tipicamente *Procambarus clarkii* e *Orconectes limosus* negli ambienti in oggetto), pesci. In questi casi in presenza di specie diverse possono verificarsi fenomeni di predazione o cannibalismo.





**Bertovelli a doppio inganno e rete-barriera**

Queste trappole sono molto efficaci per la cattura di testuggini palustri. Tuttavia anche in questo caso sussistono delle criticità da considerare nella pianificazione di una campagna di catture prolungata:

- Le nasse devono essere acquistate, e il costo può essere molto elevato (circa 80/100 euro a nassa), rendendo troppo onerosa una campagna di catture basata su queste trappole.
- Queste nasse funzionano bene in ambiti a profondità modesta, non superiore a 1 m, per aumentare la possibilità di intercettare animali che si spostano sul fondo. Necessitano pertanto di un'analisi preliminare dei siti di cattura per la verifica della loro idoneità.
- Le nasse devono essere posizionate in modo da lasciare una parte fuori dall'acqua, per permettere alle testuggini di uscire a respirare. Devono pertanto essere legate a pali o sostegni presenti facendo attenzione che non cedano o posano finire in acqua, ad esempio, in presenza di molte testuggini e un peso maggiore.
- Se gli ambienti hanno un fondo non stabile su cui camminare in sicurezza con stivali, e non è possibile posizionare le trappole in acqua, è necessaria un'imbarcazione per sistemarle.

### **NASSE DI RETE A DOPPIO INGANNO**

Si tratta di nasse disponibili in commercio, con formati e dimensioni diversi, caratterizzati da un unico corpo trappola con due inganni laterali di dimensione variabile. Le nasse vengono utilizzate normalmente per la cattura di crostacei e pesci. Diventano utilizzabili anche per le testuggini palustri aggiungendo uno o più elementi che ne garantiscano il galleggiamento (anche di recupero, come bottiglie di plastica), e l'emersione almeno della porzione superiore per permettere la respirazione agli animali catturati. Le nasse possono essere dotate di una tasca interna, in cui posizionare un'esca per aumentarne in modo sensibile la catturabilità.

Queste tipologie di nasse hanno un'elevata catturabilità (Ottonello et al., 2016), soprattutto in corrispondenza delle rive o dei siti di *basking* nelle aree maggiormente frequentate dalle testuggini. Sono poco selettive, in quanto possono attirare e catturare facilmente anche uccelli acquatici (gallinelle d'acqua, anatidi ecc.), mammiferi (es. nutrie) o anfibi e gamberi alloctoni (es tipicamente *Procambarus clarkii* e *Orconectes limosus* negli ambienti in oggetto), pesci. In questi casi in presenza di specie diverse possono verificarsi fenomeni di predazione o cannibalismo.

I prodotti in commercio prevedono una rete ripiegabile richiudibile, che non necessita di grandi spazi per lo stoccaggio e rende facile anche il trasporto di un grande numero di trappole in aree non raggiungibili in auto.

Queste nasse hanno una catturabilità medio alta delle testuggini palustri, ed è indispensabile utilizzare un'esca (normali prodotti in commercio, come cibo per cani/gatti, pesce in scatola al naturale, ecc) per garantire la piena funzionalità di queste trappole in tutte le tipologie di ambienti. Possono essere utilizzate anche da volontari adeguatamente formati e posizionate da riva, avendo l'accortezza di legarle a riva alla vegetazione o a altri elementi esistenti.

Alcune criticità legate al loro utilizzo:

- Le nasse disponibili in commercio possono avere una fabbricazione approssimativa e rompersi dopo alcuni utilizzi in acqua, soprattutto la parte emersa e le cuciture.
- Soprattutto dopo diversi mesi in acqua, le nasse possono diventare fragili e facilitare la fuga agli animali catturati.
- Le nasse devono essere posizionate con sistemi di galleggiamento aggiuntivi, e occorre monitorarle frequentemente per evitare casi di morte per annegamento delle testuggini (es, in presenza di molti animali).





**Nasse a doppio inganno galleggianti**

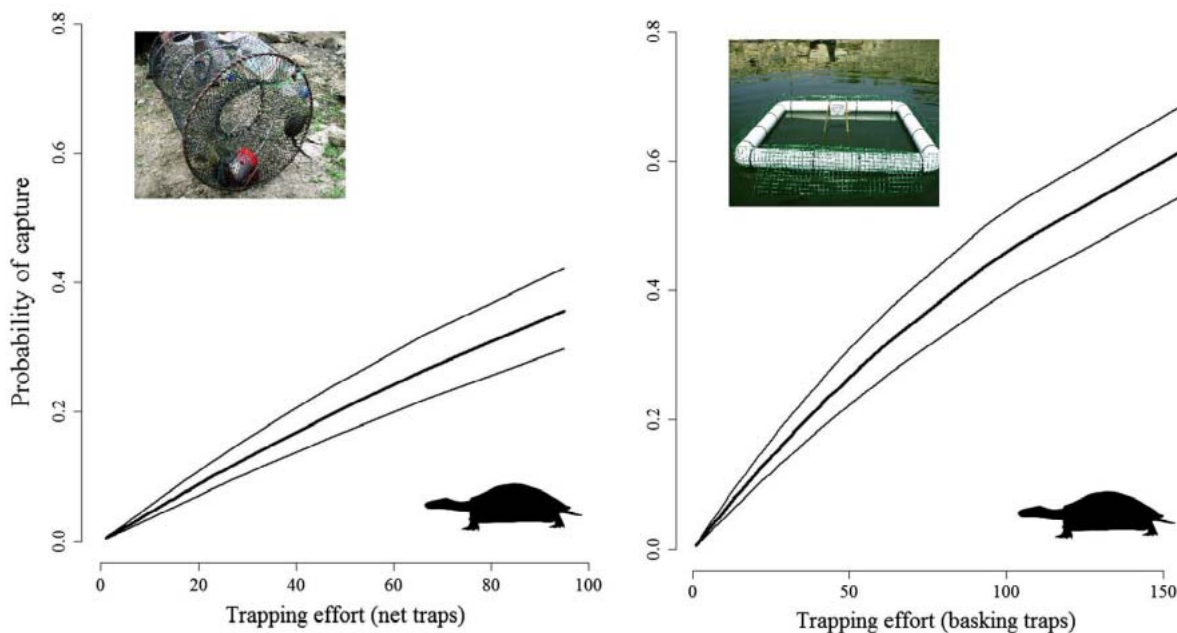
Nella pianificazione di una campagna di catture, è necessario pertanto valutare alcuni aspetti prioritari prima di impegnare risorse umane ed economiche o per modularle in modo efficace:

- Identificare preliminarmente i siti, all'interno di un'area di cattura, dove vi sia la maggiore densità di testuggini palustri alloctone e/o maggiori impatti con le popolazioni di testuggini palustri autoctone.
- Valutare la fattibilità l'impegno necessario per posizionare e controllare le trappole sul lungo periodo (raggiungibilità con mezzi, accessibilità alle rive in presenza di ricca vegetazione in primavera-estate, necessità di un'imbarcazione o altri mezzi per posizionare le nasse e controllarle).
- Budget a disposizione in relazione allo sforzo di cattura necessario. In alcuni casi può essere superfluo impegnare risorse in situazioni che necessitano solo contenimento piuttosto che puntare sull'eradicazione in aree a maggiore impatto.
- Disponibilità di personale: una volta calate le nasse, qualunque tipologia sia scelta, è necessario un controllo costante per tutto il periodo di cattura almeno 2 volte alla settimana, per limitare decessi, danneggiamenti alle trappole o furti. Inoltre è consigliabile l'impegno di almeno due operatori, per facilitare le attività e per motivi di sicurezza.
- Valutare la possibilità di attivi di vandalismo (da parte di pescatori, ambientalisti o bracconieri).

Garcia-Diaz et al. (2017) hanno effettuato una valutazione dell'efficacia dell'eradicazione a Valencia comparando fra le altre cose nasse con inganno e *basking traps*. Con una leggera vittoria delle *basking traps* se utilizzate per un periodo continuativo e adeguato di tempo.

Resta pertanto prioritaria una valutazione sulla fattibilità legata alle situazioni contingenti di ogni area di cattura.





Confronto fra sforzo di cattura e probabilità di cattura in Garcia-Diaz et al. (2017)

## E.12 GESTIONE POST CATTURA

### REGISTRAZIONE DEGLI ANIMALI CATTURATI

Le testuggini alloctone catturate, non devono essere liberate ma avviate a un percorso o di detenzione definitiva o alla soppressione eutanassica.

In primo luogo, per ogni animale catturato occorre:

- Determinare la specie, il sesso e stimare la classe di età (giovane/adulto). Si consiglia di fare una foto dell'animale intero, al piastrone e un particolare della testa per possibili verifiche sull'accuratezza della determinazione.
- Annotare alcuni dati morfometrici (lunghezza carapace e piastrone e peso) utili per caratterizzare la struttura e le caratteristiche della popolazione di testuggini alloctone (facoltativo).
- Marcare ogni animale con un codice univoco permanente sulle placche marginali del carapace (codice individuo) e sulle placche del piastrone (codice area).
- Annotare eventuali patologie evidenti o altro utile per la caratterizzazione dell'animale catturato.

Tutti i dati devono essere registrati su una scheda (Allegato 3).

Soprattutto per le testuggini affidate a un centro di stabulazione permanente è necessaria l'applicazione di una marcatura individuale. Rispetto alla marcatura permanente, si propongono due possibilità:

- Applicazione di un microchip, secondo le normative vigenti e valutando le tecnologie al momento disponibili (conformemente all'art. 66 del Regolamento UE n. 865/06).
- Applicare tramite un'incisione un codice univoco permanente sulle placche marginali del carapace (codice individuo) e sulle placche del piastrone (codice area).

Nell'ambito del gruppo di lavoro del LIFE URCA PROEMYS, è stata effettuata una valutazione costi/benefici riguardo all'utilizzo o meno di una delle precedenti modalità di marcatura.

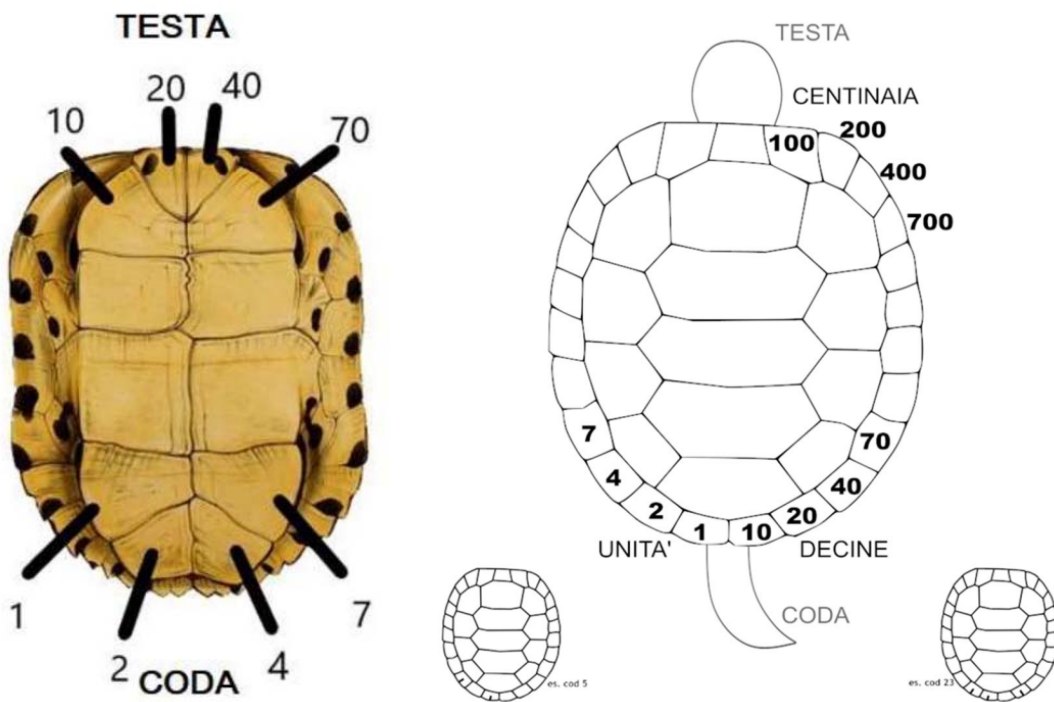
In generale, l'applicazione di un microchip è la soluzione ideale e permanente per la marcatura di una testuggine. Tuttavia a seguito di una valutazione rispetto agli obiettivi e alle esigenze del progetto sono emerse alcune criticità che devono essere considerate quando viene pianificata un'attività di eradicazione:

- Costo associato: il microchip e il sistema di lettura hanno un costo che incide nel bilancio di un progetto, soprattutto se è prevista la cattura di numeri consistenti di testuggini.
- Applicazione: l'applicazione del microchip deve essere effettuata da un veterinario, per garantire il benessere animale. Questo implica la disponibilità presso le aree di cattura di personale veterinario ed eventualmente un ulteriore costo da considerare.
- Non è scontato che i microchip possano essere letti da tutti i lettori in commercio, pertanto esiste la possibilità che a distanza di anni i sistemi utilizzati diventino obsoleti. Inoltre il microchip non è visibile, pertanto eventuali animali catturati in natura non possono essere immediatamente ricondotti a catture e centri di stabulazione.

A seguito di queste valutazioni il progetto LIFE URCA PROEMYS ha scelto di effettuare sulle testuggini alloctone solo la marcatura a mezzo incisione sulle placche marginali. Ciò non toglie che in progetti con budget adeguato o al contrario di piccole dimensioni non possa essere considerata l'opzione del microchip.

In caso di marcatura sulle placche, il progetto LIFE URCA PROEMYS ha proposto di effettuare incisioni con un seghetto sulle placche marginali del piastrone e del carapace:

1. Codice area: marcatura del piastrone
2. Codice individuo: marcatura del carapace



Esempio di incisione su *Trachemys scripta* e codice marcatura utilizzato nel LIFE URCA PROEMYS

Per quanto riguarda le fotografie, in alcuni casi necessarie per confermare la determinazione della specie, occorre fare una foto dell'animale intero, del piastrone del carapace, del capo lateralmente e catalogare le foto in funzione delle aree di cattura.



## **GESTIONE POST CATTURA**

Ai sensi della vigente normativa europea e nazionale, e in base a quanto indicato nel Piano di gestione nazionale, gli individui catturati non potranno essere rilasciati, ma dovranno essere trattenuti per essere destinati alla soppressione eutanاسica o conferiti presso centri di stabulazione, individuati dalle Regioni o Province autonome che hanno la competenza per l'applicazione sul territorio delle misure di eradicazione e gestione ai sensi del D.Lgs.230/17, in cui saranno tenuti permanentemente in cattività. Piano specifica come la soppressione eutanاسica, seppur attuata con metodi atti a risparmiare ogni possibile sofferenza agli animali, sia una pratica che trova forti opposizioni, soprattutto da parte dell'opinione pubblica, a volte anche dalle parti politiche, in particolare se parliamo di *pets*, nonostante sia prevista dalle norme comunitarie e nazionali.

Inoltre, l'attività di controllo/eradicazione ha dei costi che in alcuni casi raggiungono cifre notevoli, inevitabilmente sottratte alle attività di conservazione per le specie autoctone.

Il Piano pertanto prevede che si operi una scelta oggettiva attraverso una valutazione costi/benefici confrontando l'opzione dell'eutanاسia vs stabulazione permanente.

L'analisi costi/benefici dovrà considerare i costi relativi alle seguenti voci:

- Costo unitario e complessivo della stabulazione temporanea (acquisto una tantum sistemi di stabulazione, realizzazione eventuale impianto gestione acque reflue, ore uomo per il mantenimento, cibo, eventuali cure veterinarie).
- Costo unitario e complessivo trasporto animali presso la struttura di stabulazione permanente.
- Costo unitario e complessivo di mantenimento per almeno 25 anni degli animali nel Centro.
- Costo unitario e complessivo applicazione eutanاسia (parcella veterinario, eventuali attrezzature)
- Costo unitario e complessivo trattamento carcasse.

Nel caso in cui a parità di benefici per la biodiversità, risulti sproporzionato il costo della stabulazione permanente, il Piano specifica come occorra procedere con l'opzione eutanاسica, operando un'adeguata campagna informativa preventiva.

In Slovenia non esistono rifugi per animali esotici, quindi l'eutanاسia al momento è l'unica opzione.

## **CENTRI DI STABULAZIONE TEMPORANEA E PERMANENTE**

Secondo quanto previsto dall'art. 27, comma 4, del DLgs 230/2017 il MATTM ha pubblicato lo scorso 14 maggio 2018 le "Linee guida per la corretta gestione delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale tenute come animali da compagnia a scopo non commerciale", con particolare riferimento ai rischi connessi a tale detenzione. Le linee guida, elaborate con il supporto di ISPRA e della *Societas Herpetologica Italica*, sono disponibili al seguente indirizzo:

[http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/biodiversita/Linee\\_guida\\_animali\\_compagnia\\_specie\\_esotiche\\_invasive\\_appendice\\_Trachemys\\_scripta.pdf](http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/biodiversita/Linee_guida_animali_compagnia_specie_esotiche_invasive_appendice_Trachemys_scripta.pdf) e hanno una specifica appendice dedicata alla *Trachemys scripta*, la specie, presente nell'elenco di specie esotiche invasive di rilevanza unionale, in assoluto maggiormente diffusa come animale da compagnia. Successivamente sono state redatte da ISPRA nell'ambito di LIFE ASAP (Alonzi A., Carnevali L., Di Tizio I., Genovesi P., Ferri V., Zuffi M.A., 2018; Raccomandazioni per la corretta detenzione degli animali da compagnia appartenenti a specie esotiche invasive di rilevanza unionale: la testuggine palustre americana *Trachemys scripta*) mirate raccomandazioni per i proprietari o i centri che detengano esemplari di tali specie circa i criteri per una corretta detenzione anche tesa ad assicurare il benessere delle testuggini (Piano di controllo e gestione delle specie esotiche di testuggini palustri (*Trachemys scripta* ssp. Ferri, 2019).

In questa sede distinguiamo fra i punti di stabulazione temporanea e i Centri di stabulazione permanente.

In particolare i punti di stabulazione temporanea sono direttamente connessi all'attività di cattura, e a supporto del personale operante le sessioni di cattura sul territorio.

In alcuni casi, infatti, non è possibile trasportare immediatamente le testuggini alloctone presso i Centri per diversi motivi: mancanza di Centri nel territorio di cattura, problemi logistici, mancanza di tempo e operatori, necessità di controlli veterinari. In questi casi le testuggini catturate dovrebbero essere trasportate in un'area già individuata e attrezzata, dotata di vasche o altre tipologie di ricoveri temporanei per gli animali, che devono essere considerati esclusivamente siti per stabulare gli individui catturati prima del conferimento ai centri di detenzione.

In questo caso sono necessarie:

- Vasche fuori terra di dimensioni adeguate, anche acquistate fra i modelli in commercio come ad esempio cargopallet o vasche ad uso agricolo (mastelli) che impediscano la fuga degli animali
- Vasche interrato con fondo artificiale in cemento o simile senza copertura vegetale e recintate per facilitare il recupero degli animali ed evitare la fuga.

- Impianto di carico e svuotamento delle acque della vasca. Le acque di scarico devono confluire in fogna.
- Disponibilità di acqua, anche da acquedotto.
- Copertura delle vasche che garantisca l'ombreggiatura
- Disponibilità di un'area protetta, non liberamente accessibile.



**Esempi di vasche per il mantenimento temporaneo degli animali catturati**



**Esempio di stabulazione temporanea (Life12 NAT/IT/000395 Emys).**



**Esempio di struttura per la stabulazione temporanea (LIFE12 NAT/IT/000395 Emys). Le vasche più alte sono serbatoi in cui l'acqua resta raggiungendo la temperatura ambiente**

In questi siti di stabulazione temporanea gli animali non dovrebbero restare al massimo una settimana, prima di spostarle ai Centri di stabulazione permanente.

Per quanto riguarda i Centri di stabulazione permanente, a partire dal 2018 sono stati prodotti diversi contributi per la definizione di Linee guida per la corretta individuazione dei Centri e la gestione degli animali stabulati. Si rimanda a questi documenti per un approfondimento:

- Linee guida per la corretta gestione delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale tenute come animali da compagnia a scopo non commerciale

[http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/biodiversita/Linee\\_guida\\_animali\\_compagnia\\_specie\\_esotiche\\_invasive\\_appendice\\_Trachemys\\_scripta.pdf](http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/biodiversita/Linee_guida_animali_compagnia_specie_esotiche_invasive_appendice_Trachemys_scripta.pdf)

- Raccomandazioni per la corretta detenzione degli animali da compagnia appartenenti a specie esotiche invasive di rilevanza unionale: la testuggine palustre americana *Trachemys scripta*

[https://www.lifeasap.eu/file/LifeASAP\\_Raccomandazioni-Trachemys-estese.pdf](https://www.lifeasap.eu/file/LifeASAP_Raccomandazioni-Trachemys-estese.pdf)

- Piano di controllo e gestione delle specie esotiche di testuggini palustri (*Trachemys scripta ssp*) LIFE IP GESTIRE2020<sup>33</sup>

In sintesi, si ricordano le caratteristiche che devono avere i Centri per essere adeguati alle richieste normative e biologiche delle specie stabulate:

- Devono essere considerati come siti di stabulazione controllata definitiva, ovvero permanente fino alla fine della vita naturale degli individui ospitati.
- Le strutture di detenzione possono anche essere impianti quali vasche, fontane o laghetti idonei al confinamento definitivo degli esemplari, a patto che siano organizzati in modo da scongiurare ogni rischio di fuga ed impedire la riproduzione degli animali.
- I centri eventualmente connessi ad ambienti naturali devono essere completamente chiusi o recintati, con una rete adeguatamente alta e interrata per almeno 50 cm nel suolo. Tutte le vasche, comprese quelle di stabulazione temporanea (quarantena), qualora connesse ad ambienti naturali, devono essere costruite in modo da escludere ogni possibile fuoriuscita, prevedendo ad esempio delle sponde alte in cemento, che hanno anche la finalità di impedire eventuali deposizioni delle uova nel terreno.
- Al fine di evitare la riproduzione (espressamente vietata dalla legge) è consigliabile eseguire o l'amputazione del pene nei maschi, o la sterilizzazione endoscopica nelle femmine o la distruzione delle uova non appena deposte, nel caso le sponde delle vasche consentano la deposizione. In alternativa, i due sessi vanno detenuti separatamente.
- Anche nei centri di detenzione è consentita la soppressione eutanassica degli individui malati in primis ma anche di individui catturati in natura in caso di sovraffollamento del centro.

Allo stato attuale non tutte le regioni e province autonome si sono dotate di queste strutture. Di seguito è riportato un elenco non esaustivo e passibile di futuri aggiornamenti (da LIFE URCA PROEMYS), comprendente i Centri attivi a maggio 2023 e quelli in attivazione.

---

<sup>33</sup><https://www.regione.lombardia.it/wps/wcm/connect/85638e14-7506-4107-96d1-52d11f5df1bb/Piano+di+controllo+e+gestione+delle+specie+esotiche+di+testuggini+palustri+-+Azione+A7.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE-85638e14-7506-4107-96d1-52d11f5df1bb-mM0b5g0>



Elenco e contatti Centri stabulazione permanente testuggini palustri in Italia (Maggio 2023)

	Regione	Nome	Gestione	Per informazioni
1	Emilia Romagna	Centro a Neviano degli Arduini	ENPA Parma	ENPA sezione provinciale di Parma telefono 0521 1716793 (orari giovedì 17-19 e sabato 10-13) e Associazione Rescue Dogs di Noceto telefono 388 6443131 e rescue.dogs@libero.it
2	Emilia Romagna	Centro a Mirandola di Riccò Federico	Azienda agricola di Riccò Federico	Riccò Federico: info@aziendaagricolaricco.it, telefono 334 9959604 (orari 9 - 12 e 15 - 19 dal lunedì al sabato) <a href="https://www.aziendaagricolaricco.it/">https://www.aziendaagricolaricco.it/</a>
3	Emilia Romagna	Centro di Recupero Testuggini Acquatiche Alloctone Pianura Cesenate	Tarta Club Italia	Mirko Giorgioni (vice-presidente Tarta Club Italia) centrorecupero@tartaclubitalia.it / info@tartaclubitalia.it
5	FVG	Centro Regionale detenzione animali esotici	Regione FVG	dal lunedì al sabato dalle 15.30 alle 19.00 Baradel Damiano ai n. 348 4056523 o 338 4786312 o 0481 711574 <a href="https://www.regione.fvg.it/rafvfg/cms/RAFVG/salute-sociale/igiene-urbana-veterinaria/FOGLIA28/">https://www.regione.fvg.it/rafvfg/cms/RAFVG/salute-sociale/igiene-urbana-veterinaria/FOGLIA28/</a>
6	Lazio	LabTer del Parco Riviera di Ulisse	Parco Riviera di Ulisse	Ad oggi esaurito, in attesa di nuovi spazi
7	Liguria	Centro Bormida	Regione Liguria	Attivazione prevista 2023
8	Marche	Parco del Conero	Parco del Conero	Parco Naturale del Conero info@parcodeconero.eu 071/9331161
9	Marche	C.R.A.S Marche - Centro di Recupero Animali Selvatici Regionale	Provincia di Pesaro e Urbino	cras.pu@libero.it dal lunedì al venerdì dalle ore 7.00 alle 13.30 - telefono 3667786451 sabato dalle ore 7.00 alle ore 13.00 - telefono 3667786451 dal lunedì al sabato dalle ore 14.00 alle ore 6.00 - telefono 3667786450 festivi 24 ore su 24 - telefono 3667786450
10	Piemonte	Centro Recupero Animali Selvatici di Bernezzo	privato	Tel/Fax: 0171-82305 Cell: 328-5325296 E-mail: info@centrorecuperoselvatici.it <a href="https://www.centrorecuperoselvatici.it/">https://www.centrorecuperoselvatici.it/</a>

	Regione	Nome	Gestione	Per informazioni
1 1	Puglia	Centro autorizzato Calimera	Regione Puglia/Città di Calimera	ogni giorno dalle 9.30 alle 12.30 324 8898814 info@msns.it <a href="https://www.msns.it/centro-recupero-fauna-selvatica/">https://www.msns.it/centro-recupero-fauna-selvatica/</a>
1 2	Toscana	CRAS WWF "L'ASSIOLO"	WWF	0585/241768 Cell. 360/234789 parcodidattico@virgilio.it; massacarrara@wwf.it centrodidatticoronchi@hotmail.it Sul web: <a href="http://centrodidatticowwfronchi.wordpress.com/">http://centrodidatticowwfronchi.wordpress.com/</a>
1 3	Umbria	Centro Ittiogenico del Trasimeno di S.Arcangelo	Provincia di Perugia	366 8309346 orario: 08:30 – 13:00 - da lunedì a venerdì <a href="https://www.regione.umbria.it/turismo-attivita-sportive/centri-ittiogenici">https://www.regione.umbria.it/turismo-attivita-sportive/centri-ittiogenici</a>
1 4	Veneto	Comune di Bovolone	Comune	Attivazione prevista nel 2023

Il trasporto e l'affidamento delle testuggini alloctone, in particolare di *T. scripta*, deve avvenire garantendo il benessere degli animali e la tracciabilità degli stessi.

Per questo possono essere predisposti dei moduli di consegna e ricevuta degli animali da compilare e firmare all'atto del passaggio di consegne, si riporta in allegato (Allegato 4)

Per quanto riguarda il trasporto, in considerazione delle caratteristiche delle specie in oggetto, si ritiene sia sufficiente per il trasporto ai Centri un normale mezzo, anche in dotazione ai singoli operatori escludendo servizi specialistici di trasporto animali vivi che determinerebbero solo un aggravio di costo poco sostenibile.

In questo caso, è necessario dotarsi di contenitori adeguati, ad esempio una ghiacciaia igloo da almeno 100 lt di capacità o contenitori termici in polistirolo forati in base alla distanza da percorrere.

Per limitare che gli animali si feriscano possono essere utilizzati sacchetti di juta inumiditi.

### **SOPPRESSIONE ED EUTANASIA**

Il D. Lgs 230/2017, all'art. 19. Rilevamento precoce ed eradicazione rapida, al comma 3 si dice che:

*Le Regioni, le Province autonome di Trento e Bolzano e gli enti gestori delle aree protette nazionali: (b) assicurano l'eliminazione completa e permanente della popolazione di specie esotica invasiva risparmiando agli esemplari oggetto di eradicazione dolore, angoscia o sofferenza evitabili, limitando l'impatto sulle specie non destinarie delle misure e sull'ambiente e tenendo in debita considerazione la tutela della salute pubblica e della sanità animale, del patrimonio agro-zootecnico e dell'ambiente.*

Pertanto la soppressione delle testuggini esotiche deve essere praticata con tecniche atte a minimizzare il dolore, l'angoscia e la sofferenza degli animali, tenendo conto delle migliori prassi e delle linee guida internazionali ([www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf)). In ambito veterinario, l'eutanasia degli animali viene effettuata per alleviare sofferenze e si pratica prima anestetizzando l'animale e quindi somministrando farmaci che provocano un blocco cardio-respiratorio. Viene comunemente utilizzata l'associazione dei principi attivi: Embutramide + Mebezonio ioduro + Tetracaina (denominazione commerciale Tanax). Tuttavia nei rettili, per la loro fisiologia, questo farmaco risulta poco applicabile.

Il pentobarbital di sodio (Sodium pentobarbitone/Pentobarbitone, Morbital®) può essere somministrato per via endovenosa o intracelomatica con dosi variabili a seconda della specie, che variano dai 60 a 100 mg/kg di peso corporeo. In caso di difficoltà nella somministrazione del farmaco eutanasi è possibile somministrare precedentemente altri principi attivi quali Ketamina oppure

una combinazione Tiletamina+ Zolazepam. Per essere certi dell'avvenuto decesso, nell'animale incosciente, è possibile l'utilizzo di un metodo fisico aggiuntivo quale il congelamento. ( Divers & Stahl, 2019. Ottenere l'accesso venoso che costituisce la principale via di somministrazione di sostanze anestetiche nei cheloni è abbastanza complesso. Nel caso non fosse possibile somministrare il farmaco per questa via, è possibile procedere con una intracelomatica.

Species		Anaesthesia	Electrical stunning	Cervical dislocation	Cranial concussion	Captive bolt	Free shooting	Carbon dioxide (gradual fill)
American ruddy duck	<i>Oxyura jamaicensis</i>	✓		✓ (with sedation)				✓
Amur sleeper	<i>Percottus glenii</i>	✓	✓		✓			
Striped eel catfish	<i>Plotosus lineatus</i>	✓	✓		✓			
Raccoon*	<i>Procyon lotor</i>	✓					✓ (in field with competent marksman)	
Stone moroko	<i>Pseudorasbora parva</i>	✓	✓		✓			
Grey squirrel	<i>Sciurus carolinensis</i>	✓		✓ (with sedation)	✓			✓
Fox squirrel	<i>Sciurus niger</i>	✓		✓ (with sedation)	✓			✓
Siberian chipmunk	<i>Tamias sibiricus</i>	✓		✓	✓			✓
Sacred ibis	<i>Threskiornis aethiopicus</i>	✓						✓
Red-eared, yellow-bellied, and Cumberland sliders	<i>Trachemys scripta</i>	✓			✓	✓ (when large)	✓ (in field with competent marksman)	

L'eutanasia è un atto medico, che quindi solo il veterinario è autorizzato a compiere. Invece seppur la soppressione, non è un atto medico e può essere effettuata da personale formato non medico, se effettuata tramite farmaci deve essere praticata da medici veterinari in quanto autorizzati alla somministrazione di questi principi attivi.

La Direttiva 2010/63/UE che pur è indirizzata agli animali utilizzati per la ricerca, aggiunge all'eutanasia, i metodi di soppressione ed i requisiti minimi di benessere che devono essere rispettati. La direttiva stabilisce che gli animali devono essere soppressi con il minimo dolore, sofferenza e angoscia e che devono essere soppressi da una persona competente (articolo 6 della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici). La direttiva stabilisce inoltre metodi specifici (allegato IV) che sono accettabili per diverse classi di animali. La tabella seguente mostra quali metodi sono accettabili per le IAS individuate dalla UE, se si seguissero i criteri di questa direttiva. Va notato che non tutte queste tecniche sono applicabili o pratiche in una situazione di campo o quando si controllano grandi numeri, ma fornisce una base etica per il tipo di gestione indicato.

Inoltre l'Unione Europea ha prodotto nel 2022 un manuale per la gestione dei Vertebrati alieni invasivi nell'Unione (A manual for the management of vertebrate invasive alien species of Union concern, incorporating animal welfare, <https://www.specieinvasive.it/8-home/125-manuale-di-vertebrates-management-and-animal-welfare>).

Tale documento contiene anche una matrice con le misure applicabili per sopprimere le 22 specie di vertebrati di rilevanza unionale. Si noti che il manuale presenta una valutazione dell'impatto di ogni misura sul benessere degli animali, insieme a informazioni sulla sua efficacia per i diversi obiettivi di gestione (eradicazione rapida, eradicazione, controllo della popolazione e contenimento), e sui costi e gli effetti collaterali. Nel caso specifico si riferisce a *T. scripta*.

Measure	Commonly integrated with	Objective and availability					Effectiveness and costs
		Un	RE	Er	CI	Ct	
<b>Cage traps</b>	Shooting; Sterilisation; Immun contraceptive vaccines by injection	A	P	A	A	A	Cage trapping provides a widely used, flexible and effective method to catch and restrain a wide variety of different species. It is a frequently used and successful method to support the management of IAS. The requirement for regular checking brings significant implications for cost and their cost-effectiveness can be low in situations where the rate of animal capture is poor. Although the method is known to be available for the target species, further details are needed on its effectiveness and costs.
<b>Hand removal</b>	Trapping; Passive netting; Electrofishing; Pond fencing	P	A	A	A	A	Hand removal is considered effective for eradication or population control only when combined with other removal techniques. The method includes also the destruction of eggs, nests, and hatchlings. <i>Trachemys scripta</i> can be captured by hand or through various trapping devices. Eradication could be obtained by draining a water body, removing sliders by hand, and finally filling again with water.
<b>Physical fishing methods</b>	Electrofishing; Hand removal; Shooting; Biocontrol; Pond draining	P	A	P	A	A	Seine nets, longline fishing, various traps, hook and line are all physical fishing methods used for <i>Trachemys</i> . For example, longline fishing can be used to help control populations of <i>T. scripta</i> . Fishing with a hook and line has been tested as a management technique for <i>T. scripta</i> . In Spain, France, Portugal and Italy, population control and eradication campaigns have successfully used various types of traps to capture specimens of <i>T. scripta</i> ; fyke nets seemed to be particularly effective in canals and ditches. A particular type of trap that has also been effectively used in management campaigns of <i>T. scripta</i> are basking traps, which consist in floating enclosures with sloping sides and a basking surface, from which a mesh basket hangs suspended. In Corsica, France, the use of the trapping technique proved relatively effective in a confined and isolated area, but did not eradicate the species.

Measure	Commonly integrated with	Objective and availability					Effectiveness and costs
		Un	RE	Er	CI	Ct	
<b>Aquatic habitat management - Pond drying/ draining</b>	Hand removal; Trapping; Netting; Spearing; Shooting; Electrofishing	P	P	A	P	P	Draining invaded waterbodies can be used for localised management of <i>T. scripta</i> populations. This has been successfully implemented in Australia, where a series of water bodies invaded with <i>T. scripta</i> were drained, de-silted using an excavator, filled and compacted; the muck was spread, turned and raked with a tractor, and all remaining animals were removed by hand. When a water body is drained rapidly, up to 75% of sliders will emigrate, therefore sites should be secured with fences and pitfall traps to prevent emigration.
<b>Shooting</b>	Traps; Judas animals; Pond draining		P	P	A	A	Shooting is widely used as a wildlife management tool. This reflects its selective nature, its ability to manage animals at a distance, and the flexibility offered by the range of weapons and applications available. Although the method is known to be available for the target species, further details are needed on its effectiveness and costs
<b>Native predators</b>	Many other non-lethal measures				P		The measure might include introducing predators where they have recently been absent, or enhancing the predatory activity of existing native predators. Although the method is known to be (potentially) available for the target species, further details are needed on its effectiveness and costs.
<b>Hunting dogs (tracking/ baying)</b>	Traps		P	P	A		Detection dogs which never hunt or come in direct contact with the IAS, are used to find egg laying places for <i>Trachemys</i> species, e.g. in Spain. In particular, the LIFE <i>Trachemys</i> project mentioned that the measure works for new laid nests or for hatchlings, but that older nests are missed by sniffer dogs, which reduces the effectiveness of the measure. The method seems particularly effective for early detection/rapid eradication projects. Care needs taken when undertaken in places where native turtles also nest.
<b>Physical terrestrial barriers</b>	Trapping; Pond drainage	P				P	In France, the measure was very effective in keeping the red-eared sliders in the studied ponds during the project duration (4 years). However, fences were temporary, therefore the long-term effectiveness (individuals can live for up to 40 years) is unknown and will depend upon regular upkeep and maintenance. The relatively high cost of fencing—both building and maintenance—means it is only appropriate for use in relatively small or specific areas.
<b>Judas animals</b>	Hunting dogs; Shooting; Sterilisation	U					The Judas animal technique, which is based on the use of tagged individuals to find conspecifics, in species that are known to aggregate, is considered as potentially applicable to pond sliders. The method is most cost-efficient at very low densities of the target population. When only few animals are left in a population up for eradication, Judas animals will often be the only way of finding them all. Although the method is known to be potentially available for the target species, further details are needed on its effectiveness and costs.

Disponibilità ed efficacia delle misure di gestione di *Trachemys scripta* (A = Disponibile; U = In fase di sviluppo; P= Potenziale)

Lo stesso documento riporta i metodi per la soppressione e la disponibilità valutati per *T. scripta*.

Measures to dispatch/remove once captured	
Measure	Availability
Freezing	A
Injection euthanasia	A
Shooting - dispatch restrained animals	A
Cervical dislocation	P
Cranial depression	P
Electrocution	P
Keeping in captivity	A
Surgical sterilisation	A
Modified atmospheres	P

**Disponibilità delle misure di soppressione di *Trachemys scripta* dopo la cattura (A = Disponibile U = In fase di sviluppo P = Potenziale)**

### **TRATTAMENTO CARCASSE**

Il Piano di gestione nazionale di *T. scripta*, specifica che l'eliminazione delle carcasse avverrà mediante conferimento delle stesse alle strutture preposte allo smaltimento, secondo quanto previsto dalla normativa vigente, o presso laboratori addetti ad eventuali analisi sanitarie (es. Istituti Zooprofilattici Sperimentali competenti), per la verifica della presenza di parassiti trasmissibili ad altre specie animali e all'uomo. È possibile prevedere anche il conferimento di esemplari a istituti di ricerca o musei che ne facciano esplicita richiesta.

Insieme alle autorità sanitarie competenti per territorio dovranno venire concordate tutte le problematiche di carattere igienico sanitario, quali il trasporto, secondo parametri di legge, delle carcasse degli animali abbattuti, l'individuazione di eventuali e temporanei siti di stoccaggio (congelatori, etc.), l'individuazione di idonei metodi di smaltimento delle carcasse (ad es. mediante filiere legate alle attività di macellazione).

### **E.13 PERSONALE COINVOLTO**

Gli operatori coinvolti nelle attività inerenti la gestione delle IAS, dovrà essere debitamente formato e/o esperto nelle diverse procedure che prevedono cattura, manipolazione e conferimento alle Centri di stabulazione o ai presidi veterinari deputati alla soppressione degli animali. Il Piano di gestione nazionale di *T. scripta* prevede infatti che gli interventi condotti da personale appositamente formato e specificatamente autorizzato dalla Regione, Provincia Autonoma o Area

protetta territorialmente competente. Il piano d'azione sloveno per la *Trachemys scripta* suggerisce che le azioni sul campo dovrebbero essere eseguite da persone esperte e adeguatamente formate nella cattura delle testuggini per garantire misure di benessere degli animali e prevenire danni alle specie autoctone.

Allo stesso modo le Linee guida di cui al DD del 16 marzo 2022 n° 12 prevede che:

*Il monitoraggio attivo di specie esotiche invasive di rilevanza unionale deve essere effettuato da personale specializzato o adeguatamente formato. La formazione e l'aggiornamento del personale vengono erogati dalle Regioni e Province autonome attraverso un approccio di formazione continua, reso indispensabile dalla complessità e dell'estremo dinamismo del tema delle specie esotiche invasive.*

*b) La formazione può essere effettuata tramite realizzazione di attività didattiche in presenza, a distanza (registrate o in diretta) o attraverso l'affiancamento a personale specializzato durante la realizzazione delle attività di monitoraggio. Sul sito [www.specieinvasive.it](http://www.specieinvasive.it) sono disponibili materiali utilizzabili nell'ambito dei percorsi di formazione del personale.*

*c) A prescindere dal fatto che si tratti di corsi di formazione di base o di corsi di aggiornamento per personale già formato, le attività didattiche devono essere svolte da esperti riconosciuti nel campo dello studio e della gestione delle specie aliene invasive.*

*d) La realizzazione di corsi di formazione di base deve essere programmata in relazione alle specifiche esigenze (es. entità del monitoraggio, competenze specie-specifiche); al contrario per l'attività di aggiornamento professionale è necessario prevedere una cadenza almeno annuale.*

*e) Gli argomenti che devono necessariamente caratterizzare la formazione di base sono i seguenti:*

- quadro normativo, unionale e nazionale, in materia di specie esotiche invasive*
- elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale e nazionale*
- descrizione della presenza e della distribuzione delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale e nazionale sul territorio nazionale e regionale*
- modalità di monitoraggio e di gestione specie-specifiche contenuti dei piani di gestione nazionali*
- principale letteratura tecnica e scientifica in materia di monitoraggio delle specie considerate*
- organizzazione del sistema regionale o provinciale di monitoraggio delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale e nazionale*
- modalità di raccolta e validazione dei dati*



L'autorizzazione a svolgere gli interventi relativi alla gestione delle IAS, e in particolare di *T. scripta* e di altre specie di testuggini palustri alloctone, può essere ottenuta tramite la compilazione di un modulo che riporti le informazioni minime inerenti:

- Inquadramento del progetto nell'ambito delle problematiche nazionali e/o internazionali di ricerca e conservazione inerenti alla specie
- Azioni e metodologie previste dal progetto
- Elenco delle aree in cui si intende operare e localizzazione dei siti di intervento
- Elenco del personale coinvolto con indicazione dell'avvenuta formazione e/o di eventuale esperienza dimostrabile
- Modalità di trasporto e destinazione degli animali catturati

In allegato (Allegato 2) un esempio di richiesta di autorizzazione proposta per la Regione Emilia Romagna dal LIFE URCA PROEMYS.

#### **E.14 ALTRE SPECIE DI TESTUGGINI PALUSTRI ALLOCTONE**

Molti studi scientifici provano per molte delle specie di testuggini palustri esotiche commerciate (p.e. Ficetola, Thuiller & Miaud, 2007; Ficetola et al., 2009; Ferri, 2019) una paragonabile o addirittura superiore invasività rispetto a *T. scripta*.

Si tratta di specie già ben normate da convenzioni internazionali come la CITES o da decenni messe al bando come il D.M. del 19/04/1996 "Legislazione Animali pericolosi". Nonostante questo è da rilevare come esista un importante commercio clandestino diffuso in tutte le aree geografiche e una scarsa sensibilità ed etica ambientale nella gestione di queste testuggini in cattività.

Di seguito un elenco non esaustivo delle testuggini esotiche segnalate in Italia (<https://www.urcaproemys.eu/testuggini-esotiche/>).

- ✓ *Apalone spinifera*
- ✓ *Apalone ferox*
- ✓ *Chelydra serpentina*
- ✓ *Chelus fimbriatus*
- ✓ *Chelodina longicollis*
- ✓ *Clemmys guttata*
- ✓ *Clemmys insculpta*
- ✓ *Chrysemys picta* (C. p. *picta* e C. p. *bellii*)
- ✓ *Graptemys geographica*
- ✓ *Graptemys ouachitensis*
- ✓ *Graptemys pseudog.* (G. p. *pseudog.* e G. p. *kohni*)
- ✓ *Macrochelys temminckii*
- ✓ *Mauremys sinensis*
- ✓ *Mauremys reevesii*
- ✓ *Pelomedusa olivacea*
- ✓ *Pelomedusa subrufa*
- ✓ *Pseudemys concinna* (P. c. *concinna* e P. c. *floridana*)
- ✓ *Pseudemys nelsonii*
- ✓ *Pseudemys peninsularis*
- ✓ *Pseudemys rubriventris*
- ✓ *Pelodiscus sinensis*
- ✓ *Kinosternon subrurum*
- ✓ *Sternotherus carinatus*
- ✓ *Sternotherus odoratus*



Queste specie hanno un diverso livello di minaccia per la biodiversità autoctona, in funzione delle proprie caratteristiche ecologiche e biologiche.

Il Piano di controllo e gestione delle specie esotiche di testuggini palustri (*Trachemys scripta* ssp.) elaborato dal WWF nell'ambito del LIFE IP GESTIRE2020 per la Lombardia, descrive il livello di rischio per la biodiversità legato alla diffusione di alcune di queste specie, descrivendo come l'invasività può essere facilitata o meno dalle caratteristiche dello sviluppo embrionale e della riproduzione di questi animali.

Tutte le testuggini depongono infatti le loro uova in nidi e il successo nello sviluppo dipende dalla temperatura di incubazione, cioè dalla temperatura media del luogo di nidificazione durante il periodo di sviluppo embrionale. Nella maggior parte dei Cheloni gli embrioni si sviluppano con successo con temperature di incubazione comprese nell'intervallo di 24 - 32 °C, ma in molte specie la sex ratio dei giovani nati dipende dalla temperatura (*Temperature dependent Sex Determination*, TSD).

Sono due le varianti, di cui uno è il più comune: *TSD 1A*, dove vengono a nascere soprattutto maschi con temperature di incubazione relativamente fredde e soprattutto femmine con temperature di incubazione relativamente calde. Soltanto l'incubazione delle uova intorno ad un accertato centro termico (tipicamente intorno a 29 °C) produce entrambi i sessi (sistema MF, maschi e femmine).

Tuttavia, alcune specie di tartaruga hanno un sistema FMF, chiamato *TSD II*, in cui sia i maschi che le femmine si producono intorno a due diversi centri termici (intorno al primo, tra 20 e 21 °C, e al di

sopra del secondo, solitamente tra 26 e 28 °C, sono prodotte solo femmine), mentre con temperature intermedie tra questi centri termici si hanno solo maschi (Wyneken et al., 2008; Ferri, 2019).

Ad esempio hanno il sistema FMF tre specie abbastanza commerciate e presenti in Europa: la *Sternotherus odoratus*, *Chelydra serpentina* e *Chrysemys picta*. Tutte queste specie hanno una distribuzione nordamericana particolarmente vasta con un range latitudinale notevole, segno che possono resistere bene in ambienti con clima temperato.

Una minoranza ha una determinazione del sesso genotipica (GSD) e questo è tipico delle specie con distribuzione in territori relativamente temperati.

Delle specie elencate in precedenza, escludendo *T. scripta*, quattro hanno GSD, due un sistema TSD II e solo tre hanno un sistema TSD 1A confermato. Per le specie rimanenti il sistema non è chiaro. Pertanto la maggioranza di quelle specie ha la possibilità di riprodursi ed avere una corretta sex-ratio alla nascita anche in condizioni di basse temperature medie, quindi un fondamentale passo verso la naturalizzazione in gran parte dei paesi europei (Ferri, 2019).

Di seguito vengono riportate alcune delle altre specie di testuggini palustri esotiche potenzialmente invasive per il nostro territorio, con un'indicazione del livello di rischio (materiale iconografico tratto da Uetz et al., 2023).

## Emydidae

Gran numero di specie, soprattutto del Nuovo Mondo

### Cooters

*Pseudemys concinna* (*P. c. concinna* e *P. c. floridana*)



*Pseudemys nelsonii*



*Pseudemys peninsularis*



*Pseudemys rubriventris*



*Chrysemys picta*  
(*C. p. picta* e *C. p. bellii*)



*Clemmys guttata*

EN



*Clemmys insculpta*



Map turtles

*Graptemys geographica*



*Graptemys pseudozeographica*



*Graptemys ouachitensis*



## Geoemydidae

Famiglia col maggior numero di specie al mondo:  
60 specie in 23 generi

*Mauremys reevesii*



*Mauremys sinensis*



Altre *Mauremys* autoctone in Europa...

## Kinosternidae

Musk turtles

*Sternotherus odoratus*



*Sternotherus carinatus*



Mud turtles

*Kinosternon subrumum*



(Herpetology News, volume 14: 201-207 (2021) (published online on 07 February 2021))

First records for Europe of the non-native turtles  
*Kinosternon subrumum* Bonnatere, 1789 and  
*Pelomedusa olivacea* (Schweigger, 1812) in a  
suburban wetland in central Italy

Vincenzo Ferrò<sup>1</sup>, Corrado Battisti<sup>2</sup>, Christiana Soccini<sup>3</sup>, and Riccardo Santori<sup>4</sup>

## Pelomedusidae

### Helmeted turtles

Specie africane...

### *Pelomedusa subrufa*



### *Pelomedusa olivacea*

## Trionychidae

### Softshell turtles

### *Apalone ferox*

- ✓ Sud-est USA
- ✓ Femmine fino a 70 cm e 40 kg di peso
- ✓ No TSD
- ✓ Fino a 7 ovodeposizioni/anno



### *Apalone spinifera*



### *Pelodiscus sinensis*

VU



- ✓ Est e Sud-est asiatico
- ✓ Chelone più commercializzato: ca. 200 milioni di individui/anno
- ✓ Cibo e pet trade



## Chelydridae

### Snapping turtle

*Chelydra serpentina*



Il D.M. 18 aprile 1996 include *C. serpentina* tra gli **animali pericolosi**



Modena: 2018

### Alligator snapping turtle

*Macrochelys temminckii*



Anche *M. temminckii* è inclusa tra gli **animali pericolosi** ai sensi del nel D.M. 18 aprile 1996

Sottordine: Pleurodira  
Famiglia: Chelidae

Chelodina longicollis



Snake turtle

✓ Australia



Chelus fimbriatus



Mata mata

✓ America latina





## F. MONITORAGGIO DELLO STATUS DELLE POPOLAZIONI

Nel Manuale per il monitoraggio di specie e habitat di interesse comunitario in Italia riferito alle specie animali<sup>34</sup> sono indicate le modalità per il monitoraggio di *Emys orbicularis* ed *E. trinacris* per la corretta redazione del Rapporto della Direttiva Habitat (92/43/CEE) che i Paesi UE devono redigere periodicamente. Il LIFE URCA PROEMYS ha esplicitamente fatto riferimento a quanto indicato da ISPRA e che si riporta di seguito. Per quanto riguarda i monitoraggi di *Trachemys* si veda E.10.

### F.1. TECNICHE DI MONITORAGGIO

Nei siti con accesso al corpo idrico la stima di popolazione dovrà essere effettuata tramite il metodo di cattura-marcatura-ricattura (CMR), metodo che necessita di autorizzazioni ministeriali. In alternativa, nei siti con difficile accesso al corpo idrico ma con buona visibilità delle sponde anche a distanza, è possibile effettuare conteggi ripetuti da effettuarsi sia su (i) aree note o (ii) lungo transetti. Le stazioni di campionamento saranno individuate all'interno di un congruo numero di celle 10×10 km in cui la specie è nota. Per il monitoraggio all'interno dei singoli SIC/ZSC si propone l'applicazione di studi di popolazione tramite cattura/marcatura/ricattura o in alternativa il metodo dei conteggi ripetuti. Tutti i siti prescelti saranno schedati e i transetti o i punti di osservazione/cattura cartografati per permettere ripetizioni standardizzate negli anni. La valutazione della distribuzione di *E. orbicularis* a scala nazionale sarà effettuata utilizzando modelli basati sul rilevamento del numero di "località" all'interno della griglia nazionale di 10×10 km. Per ogni specie e per ogni anno di rilevamento, verrà considerato il numero di segnalazioni per ogni cella.

Il numero di segnalazioni totali in tale cella verrà considerato come una misura dello sforzo di campionamento. Per *Emys trinacris*, a causa del ridotto numero di segnalazioni, tale parametro sarà valutato tramite conferma periodica della presenza della specie in tutte le celle 10×10 km in cui è segnalata.

---

<sup>34</sup> M. Lo Valvo, F. Oneto, D. Ottonello, M.A.L. Zuffi in: Stoch F., Genovesi P. (ed.), 2016. Manuali per il monitoraggio di specie e habitat di interesse comunitario (Direttiva 92/43/CEE) in Italia: specie animali. ISPRA, Serie Manuali e linee guida, 141/2016

## F.2 STIMA DEL PARAMETRO POPOLAZIONE

Si cercherà di ottenere stime numeriche in un congruo numero di siti campione per ogni regione biogeografica e, nei siti in cui si adotterà il metodo CMR, sarà possibile ottenere anche dati su *sex-ratio* e struttura di popolazione.

## F.3. STIMA DELLA QUALITÀ DELL'HABITAT PER LA SPECIE

I principali parametri per definire la qualità dell'habitat delle testuggini palustri sono: la presenza di vegetazione acquatica e ripariale, la presenza

di siti di basking e di idonee aree per la deposizione e, in genere, la bassa profondità dell'acqua, oltre all'assenza di specie competitive alloctone, di fonti inquinanti, assenza di strade in prossimità dei siti, e scarso disturbo antropico in genere.

**Indicazioni operative:** Per stimare l'abbondanza assoluta tramite CMR occorre posizionare almeno cinque nasse o bertovelli ogni 100 m per sito, per almeno 1000 m di sponda; le sessioni di cattura devono essere intervallate di almeno una settimana. Il periodo più idoneo è compreso tra i mesi di maggio e agosto, quest'ultimo mese è da escludere per le località più calde del sud Italia. Per i conteggi ripetuti sono necessarie almeno tre sessioni per sito. Il campionamento va protratto per un massimo di 20 minuti/uomo per punto di osservazione. Il periodo più idoneo è compreso tra i mesi di marzo e maggio a seconda delle caratteristiche climatiche del sito di campionamento. Sono da evitare le giornate ventose, con pioggia o con abbondante copertura nuvolosa.

Giornate di lavoro stimate all'anno. Per CMR da tre a cinque sessioni/anno costituite da almeno tre giornate ciascuna per sito nel periodo indicato, possibilmente distribuite in visite equidistanti nel tempo. Per conteggi ripetuti tre giornate anno per sito nel periodo indicato.

Numero minimo di persone da impiegare. Per realizzare il monitoraggio è necessaria la presenza di almeno due operatori nel caso di CMR, di uno nel caso dei conteggi.

Numero di monitoraggi da effettuare nell'arco dei sei anni ex art. 17 di Direttiva Habitat. Il monitoraggio va ripetuto ogni due anni.<sup>35</sup>

---

<sup>35</sup> M. Lo Valvo, F. Oneto, D. Ottonello, M.A.L. Zuffi in: Stoch F., Genovesi P. (ed.), 2016. Manuali per il monitoraggio di specie e habitat di interesse comunitario (Direttiva 92/43/CEE) in Italia: specie animali. ISPRA, Serie Manuali e linee guida, 141/2016.

## G. COMUNICAZIONE E DISSEMINAZIONE

In ogni progetto di conservazione della natura è essenziale che, oltre alle azioni concrete di salvaguardia si svolga anche un'estesa e intensa azione di comunicazione e sensibilizzazione, fondamentale per il successo degli sforzi di conservazione messi in atto e per far sì che vi sia il radicamento dei risultati sul territorio e un costante filo diretto con la popolazione locale, al fine di renderla partecipe dei progressi, delle difficoltà, dei successi conseguiti durante l'attuazione delle azioni e invogliare alla fruizione compatibile delle risorse naturali locali da parte della popolazione e dei turisti.

Per la comunicazione sulla conservazione di *Emys orbicularis* è opportuno che i messaggi siano adattati ad un'audience non specialistica, evitando un linguaggio tecnico complesso e privilegiando le storie e altri elementi (visivi e non) che rendano il messaggio di facile comprensione. Particolare attenzione occorre riservare ai messaggi relativi alla gestione e al contenimento delle specie alloctone (vedi anche E.7), che devono necessariamente puntare a far adottare comportamenti virtuosi ai singoli individui, come risultato di una acquisita sensibilità e attenzione rispetto alla tematica. E' pertanto prioritario stimolare tali comportamenti, aumentando la conoscenza dell'opinione pubblica sulle testuggini alloctone e la consapevolezza della necessità e urgenza della gestione delle stesse mediante programmi di comunicazione ben pianificati e mirati.

Gli obiettivi generali da tenere a mente sono:

- 1) l'accrescimento della consapevolezza da parte dell'opinione pubblica e dei diversi portatori di interesse in merito alla presenza di *Emys orbicularis* sul territorio, i rischi di conservazione ai quali è sottoposta, gli impatti causati dall'alterazione/distruzione dell'habitat e dalle specie aliene invasive sulla sua sopravvivenza e le modalità per prevenire l'inserimento in natura di specie alloctone di testuggini palustri;
- 2) la partecipazione attiva dei cittadini, finalizzata all'adozione di comportamenti positivi che limitino l'immissione in natura di specie esotiche e alla raccolta di dati utili in merito alla presenza e alla diffusione delle specie aliene invasive;
- 3) il coinvolgimento attivo degli Enti gestori dei siti Natura 2000 e delle autorità pubbliche nell'applicazione del piano di gestione.

Di seguito alcuni suggerimenti per una comunicazione/disseminazione efficace:

1. **Conoscenza della specie:** Assicurarsi di avere una conoscenza approfondita sulla testuggine palustre *Emys orbicularis*, comprese le minacce che affronta, il suo habitat naturale e il suo ruolo nell'ecosistema. Queste informazioni forniranno una base solida per la comunicazione.
2. **Comunicazione positiva:** Utilizzare un tono positivo e ispirante nella comunicazione. Sottolineare il valore intrinseco della biodiversità e il ruolo chiave che la testuggine palustre svolge nell'equilibrio dell'ecosistema.
3. **Storie coinvolgenti:** Raccontare storie coinvolgenti sulla vita delle testuggini palustri e sui successi nella loro conservazione. Le storie personali e gli esempi concreti possono connettere emotivamente il pubblico al problema.
4. **Visual storytelling:** Utilizzare immagini e video per comunicare in modo visivo. Mostrare la bellezza e la vulnerabilità della testuggine palustre e del suo habitat per suscitare empatia e attenzione.
5. **Coinvolgimento del pubblico:** Coinvolgere attivamente il pubblico nelle iniziative. Organizzare eventi, workshop, o attività educative che consentano alle persone di sperimentare direttamente l'importanza della conservazione.
6. **Collaborazioni:** Collaborare con organizzazioni ambientali, istituzioni scientifiche e altre entità interessate alla conservazione. Le partnership possono aumentare la portata delle iniziative e fornire risorse aggiuntive.
7. **Utilizzo dei social media:** Sfruttare i social media per raggiungere un pubblico più ampio. Creare contenuti interessanti, utilizzare hashtag pertinenti e coinvolgere la comunità attraverso sondaggi e discussioni.
8. **Educazione ambientale:** Fornire informazioni educative attraverso materiali stampati, seminari o presentazioni nelle scuole e nelle comunità. L'educazione ambientale è fondamentale per aumentare la consapevolezza.
9. **Coinvolgimento delle comunità locali:** Coinvolgere le comunità locali nelle attività di conservazione. Comprendere e rispettare le tradizioni locali può contribuire a una maggiore adesione alla causa.
10. **Sostenibilità a lungo termine:** Pianificare iniziative che abbiano un impatto a lungo termine sulla conservazione della testuggine palustre. Fornire e suggerire al pubblico modi e attività concrete per contribuire alla causa nel tempo.

È importante ricordare che la chiave per una comunicazione efficace è la coerenza nel messaggio e la capacità di coinvolgere il pubblico in modo efficace. Si veda anche il sito del LIFE Urca PROEMYS <https://www.urcaproemys.eu/materiale-educativo/>

**INFORMAZIONI DA DISSEMINARE E MESSAGGI CHIAVE:**

<b>Argomento</b>	<b>Messaggio</b>	<b>Target</b>	<b>Modifica dei comportamenti</b>	<b>Attività/canali</b>
Importanza delle testuggini palustri autoctone per il mantenimento della biodiversità delle zone umide	Attenzione: <i>Emys orbicularis</i> e <i>Emys trinacris</i> sono in pericolo	Turisti, visitatori delle aree protette studenti, insegnanti	Non distrurbare le testuggini palustri, non distruggere l'habitat	Distribuzione di materiale informativo, attività e visite guidate outdoor, eventi, comunicazione sui social media, siti web
Effetti delle attività antropiche su <i>Emys</i> spp.	Le attività umane possono avere effetti negative sugli ambienti umidi, causando perdita di biodiversità	Bambini, visitatori delle aree protette grande pubblico, utilizzatori del web	Metti in atto comportamenti responsabili, tenendo presente che i nostri comportamenti hanno un impatto sull'ambiente	Disseminazione di video e materiali informativi, social media, eventi educativi
Specie aliene invasive	Le testuggini palustri aliene sono una delle principali minacce per la sopravvivenza di <i>Emys</i> spp	Commercianti di animali da compagnia, proprietari di testuggini aliene, bambini, studenti, grande pubblico	Non rilasciare le testuggini esotiche in natura. Informare i clienti che vogliono acquistare una testuggine palustre esotica delle conseguenze che questo può comportare	Produzione e disseminazione di materiale informativo dedicato, disseminazione di informazioni attraverso canali social e riviste specializzate, creazione e diffusione della lista dei centri di ricovero per le testuggini aliene
Occorre mettere in campo azioni di conservazione	<i>Emys</i> spp. presentano uno stato di conservazione sfavorevole inadeguato Questo è in linea col fatto che nell'ultimo secolo la specie ha affrontato un drastico declino dovuto all'estensivo prosciugamento e bonifica delle aree umide.	Enti gestori dei siti Natura 2000, istituti di ricerca, enti coinvolti nella gestione e nella protezione dell'ambiente	Collaborazione e partecipazione alla stesura del piano di gestione integrato, acquisizione del piano di gestione	Workshops, technical meetings

ALCUNI ESEMPI DI MATERIALE DIDATTICO



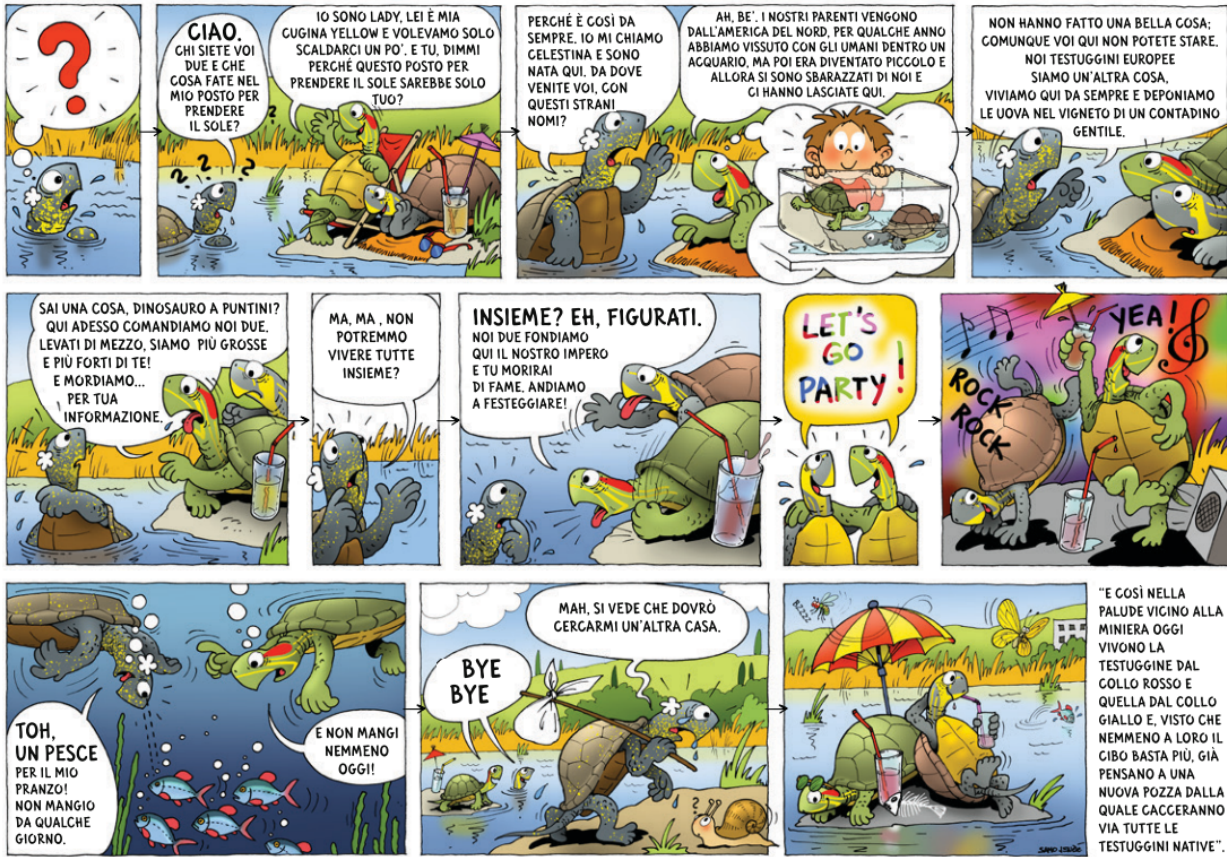
Ligurian Invasive Fauna Eradication Pro Indigenous *Emys orbicularis* Restocking

ATTENTI... A QUEL  
**ATTENTI... A QU**  
**..A QUELLE DUE!**



Con il contributo dello strumento finanziario LIFE + della comunità europea





## TESTUGGINE PALUSTRE EUROPEA

(*Emys orbicularis*)



La testuggine palustre europea è l'unica testuggine d'acqua dolce autoctona slovena. La incontriamo più frequentemente nelle Barje di Lubiana, nella Bela Krajina, nel bacino del fiume Sava e nell'Istria slovena, ma la si trova anche in altre zone della Slovenia. È elencata nella Convenzione di Berna ed è anche protetta dalla rete di siti NATURA 2000.

Vive in acque interne stagnanti e a lento corso con scarsa vegetazione ripariale. È facile notarla mentre prende il sole sulla riva, ma è molto timida e corre in acqua al minimo segnale di allarme. La gente la confonde con la testuggine palustre americana *Trachemys scripta* più frequente e non autoctona, che è molto più aggressiva e che, tra le altre cose, scaccia continuamente la *Emys orbicularis* dal suo habitat. Trascorre la maggior parte del tempo in acqua, dove cattura le sue prede e può vivere fino a 120 anni.

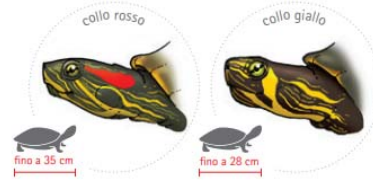
Il Parco Naturale delle saline di Sicciole ospita probabilmente la più grande popolazione slovena di questa specie. Si trova nell'area della palude d'acqua dolce nei pressi della miniera di Sicciole, nel fossato vicino all'aeroporto, nell'estuario del fiume Dragonja e alle Stojbe.

### LO SAPEVATE?

- Che la testuggine palustre europea non può inghiottire il cibo senz'acqua.
- Che la testuggine palustre europea può vivere fino a 120 anni.
- Che la testuggine palustre europea è un indicatore di buone condizioni ambientali.
- Che in Slovenia vivono due sottospecie di testuggine palustre europea e nell'Istria slovena è presente solamente la sottospecie *E. o. hellenica* che può raggiungere fino a 16 cm di lunghezza.

## TESTUGGINE PALUSTRE AMERICANA

(*Trachemys scripta*)



Delle tre sottospecie note se ne riconoscono facilmente due, ossia quella dal collo rosso (*T. s. elegans*) e quella dal collo giallo (*T. s. scripta*). La testuggine palustre americana, originaria dell'America settentrionale e centrale, è da molto tempo uno degli animali domestici preferiti. Oggi è la specie aliena di testuggine più diffusa in Slovenia che, oltre a svernare con successo se rilasciata nell'ambiente, è in grado di riprodursi. In natura la testuggine palustre americana sceglie un habitat simile a quello della testuggine palustre europea con la quale lotta con successo per accaparrarsi i posti migliori per prendere il sole e deporre le uova. Scaccia la testuggine di palude, influenza negativamente anche altre specie e, inoltre, mette in pericolo persino la salute umana trasmettendo nuove malattie. Dal 2016 è inclusa nell'elenco delle specie esotiche invasive nell'UE ed è soggetta a misure rigorose, tra le quali il divieto di vendita e il divieto di rilascio nell'ambiente. Oltre alla testuggine americana, in futuro si può prevedere la diffusione di altre specie di testuggine non autoctone.

### LO SAPEVATE?

- Che sono riconosciute tre sottospecie di testuggine palustre americana, vale a dire: la testuggine dalle orecchie rosse, la testuggine dalle orecchie gialle e la testuggine dalle orecchie arancioni.
- Che la testuggine palustre americana può raggiungere anche i 60 cm di lunghezza.
- Che la testuggine palustre americana in cattività può vivere fino a 50 anni.

Editore: KPSS, SOLINE Privitelna soli d.o.o. | Testo: Iztok Štornik, Kim Leban e Maja Makovec | Strig e illustrazioni: Samo Jendrič | Grafica: Polona Peterca | Tiratura: 2000 copie | Finanziamento: MOP, Sklad za podnebne spremembe (Fondo per i cambiamenti climatici)

## TESTUGGINE PALUSTRE AMERICANA

La conoscete?





## BIBLIOGRAFIA

1. AAVV, 2019 - "*Linee guida nazionali per la valutazione di incidenza (VInCA) Direttiva 92/43/CEE "Habitat" art. 6, paragrafi 3 e 4*" G.U. 28-12-2019, Serie generale - n. 303
2. Aguirre A.A., Ostfeld R.S., Tabor G.M., 2002 - *Conservation medicine: ecological health in practice*. Oxford University Press, Oxford.
3. Agosta F. e Parolini L., 1999 - *Autoecologia e rapporti sinecologici di popolazioni introdotte in Lombardia di Trachemys scripta elegans*. Dati preliminari. Atti 2° Congr. Naz.le SHI, Praia a Mare, 6-10 ottobre 1998. Riv. Idrobiol., 38, 1/2/3: 421-430.
4. Alonzi A., Carnevali L., Di Tizio L., Genovesi P., Ferri V., Zuffi M. A. L. , 2018 - *Raccomandazioni per la corretta detenzione degli animali da compagnia appartenenti a specie esotiche invasive di rilevanza unionale: la testuggine palustre americana Trachemys scripta*. ([https://www.lifeasap.eu/file/LifeASAP\\_RaccomandazioniTrachemys-estese.pdf](https://www.lifeasap.eu/file/LifeASAP_RaccomandazioniTrachemys-estese.pdf)).
5. Alonzi A., Carnevali L., Di Tizio I., Genovesi P., Ferri V., Zuffi M.A., 2018 - *Piano di Gestione nazionale per la testuggine palustre americana (Trachemys scripta)*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del territorio e del Mare, ISPRA, Sistema Naz. Prot. Ambiente: 1-27
6. Armstrong, D., Jakob-Hoff R., Seal U. S. 2003 - *Animal movements and disease risk – a workbook*. Conservation Breeding Specialist Group (SSC/IUCN). Apple Valley, Minnesota.
7. AVMA, 2013 - *Guidelines for the Euthanasia of Animals Edition*
8. Bailey R., 1993 - *The False Prophets of Enviromental Apocalypse*. San Martin's Press, New York, 226.
9. Ballasina D., 1995 - *Salviamo le tartarughe*. Edagricole, Bologna.
10. Banha F., Gama M. & Anastácio P., 2017 - *The effect of reproductive occurrences and human descriptors on invasive pet distribution modelling: Trachemys scripta elegans in the Iberian Peninsula*. Ecological Modelling. 360. 45–52. 10.1016/j.ecolmodel.2017.06.026.
11. Ballou J.D., 1993 - *Assessing the risks of infectious diseases in captive breeding and reintroduction programs*. J. Zoo and wildfile Med 24 (3) 327-335.
12. Barnard S. M., Upton S.J., 1994 - *A Veterinary guide to the parasites of reptiles*. ISBN 0-89464-832
13. Baudouin L., Lebrun P., 2000 - *An operational bayesian approach for the identification of sexually reproduced cross-fertilized populations using molecular markers*. Acta Horticulturae 546:81-93.
14. Belkhir K., Castric V., Bonhomme F., 2002 - *IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods*. Molecular Ecology Notes 2:611-614.
15. Bertolino S., di Montezemolo N.C., Preatoni D.G. et al., 2014 - *A grey future for Europe: Sciurus carolinensis is replacing native red squirrels in Italy*. Biol Invasions 16, 53–62 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0502-3>.
16. Beukema W., Bok B., Tiemann L. & Speybroeck J., 2015 - *Local hybridisation between native Triturus cristatus and introduced Triturus marmoratus (Urodela: Salamandridae) in the Netherlands*. Herpetology Notes. 8. 549-552.
17. Brown J.D., Sleeman J.M., 2002 - *Morbidity and mortality of reptiles admitted to the Wildlife Centre of Virginia*. J. Wild. Dis. 38, 699-705.

18. Bruekers J., Uijterschout G. & Brouwer A., 2006 - *Erstnachweis einer natürlichen Vermehrung der Rotwangen-Schmuckschildkröte (Trachemys scripta elegans) auf der griechischen Insel Kos*. Schildkröten im Fokus, 3(3),29–34.
19. Bugter R.J.F., Ottburg F.G.W.A., Roessink, I., Jansman H., van der Grift E. & Griffioen A., 2011 - *Invasion of the turtles? Exotic turtles in the Netherland: a risk assessment*. Plant Physiology - PLANT PHYSIOL.
20. Bujes CS., 2010 - *Os testudines continentais do Rio Grande do Sul, Brasil: taxonomia, história natural e conservação*. Iheringia Sér Zool. 100:413–424.
21. Burke R., 1991 - *Relocations, repatriations, and translocations of amphibians and reptiles: taking a broader view*. Herpetologica 47, 350-357.
22. Cadi A. and Joly P., 2003 - *Competition for basking places between the endangered European pond turtle (Emys orbicularis galloitalica) and the introduced red-eared slider (Trachemys scripta elegans)*. Canadian Journal of Zoology. 81(8): 1392-1398. <https://doi.org/10.1139/z03-108>.
23. Cadi A., Delmas V., Prieuvot- Julliard A.C., Joly P., Pieau C. & Girondot M., 2004 - *Successful reproduction of the introduced slider turtle (Trachemys scripta elegans) in the South of France*. Aquatic Conservation: Marine And Freshwater Ecosystems, 14, 237–246.
24. Camin J.H., Moss W.W., Oliver J.H., 1967 - *Cloacaridae, a new family of cheyletoids mites from the cloaca of aquatic turtles*. J. Med Entomology 4, pag. 261-272. Canadian Cooperative. (2001). Wildlife Health Centre.
25. Canessa S., Guillera-Arroita G., Lahoz-Monfort J.J., Southwell D.M., Armstrong D.P., Chadès I., Lacy R.C., Converse S.J., 2016 *Gestione adattiva per migliorare la conservazione delle specie in tutto lo spettro della specie in cattività-selvatica* – Biol.Conse.: 123-131.
26. CKFF, 2023. *Karta razširjenost Trachemys scripta*. Center za kartografijo favne in flore (stanje: 1.12.2023)
27. Chen Tien-Hsi, 2006 - *Distribution and status of the introduced red-eared slider (Trachemys scripta elegans) in Taiwan*.  
[https://www.researchgate.net/publication/242226974\\_Distribution\\_and\\_status\\_of\\_the\\_introduced\\_red-eared\\_slider\\_Trachemys\\_scripta\\_elegans\\_in\\_Taiwan](https://www.researchgate.net/publication/242226974_Distribution_and_status_of_the_introduced_red-eared_slider_Trachemys_scripta_elegans_in_Taiwan)
28. Cherry S., 2005 - *A clean bill of health: practice hygiene*. In Practice 27, 548-551
29. Clark D.B. & Gibbons J.W., 1969 - *Dietary shift in the Turtle Pseudemys scripta (Schoepff) from youth to maturity*. Copeia 4: 704-706.
30. Ciofi C., Tzika A.C., Natali C., Chelazzi G., Naziridis T., Milinkovitch M.C., 2009 - *Characterization of microsatellite loci in the European pond turtle Emys orbicularis*. Molecular Ecology Resources 9:189–191.
31. Cooper J.E., Jackson O.F., 1981 - *Disease of Reptilia*. 1 & 2, Accademic Press, New York.
32. Cunningham A.A., 1996 - *Disease Risks of wildlife translocations*. Cons. Biol. 10, 349-353.
33. Crescente A., Sperone E., Paolillo G., Bernabò I., Brunelli E. & Tripepi S. , 2014 - *Nesting ecology of the exotic Trachemys scripta elegans in an area of Southern Italy (Angitola Lake, Calabria)*. AMPHIBIA-REPTILIA. 35. 366-370. [10.1163/15685381-00002955](https://doi.org/10.1163/15685381-00002955).
34. Davidson W.R., Nettles V.F., 1992 - *Relocation of wildlife: identifying and evaluation disease risks*. Trans. N. am. Wild: Nat. Resour. Conf. 57, 466-473.

35. Davidson W.R., Nettles V.R., 1997 - *Field manual of wildlife disease in the southeastern United States*. Southeastern Cooperative Wildlife Disease Study, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens.
36. Deem S.L., Terell S.P., Forrester D.J., 1998 - *A retrospective study of morbidity and mortality of raptors in Florida*. J. Zoo. Wild. Med. 29, 160-164.
37. Demkowska-Kutrzepa M., Studzińska M., Roczeń-Karczmarz M., Tomczuk K., Abbass Z. & Różański P., 2018 - *A review of the helminths co-introduced with Trachemys scripta elegans - A threat to European native turtle health*. Amphibia-Reptilia. 39. 10.1163/15685381-17000159.
38. Di Blasio L., Santoro R., Ferri V., Battisti C., Soccini C., Egidì A., Scalici M., 2021 - *First successful reproduction of the Chinese striped-necked turtle Mauremys sinensis (Gray, 1834) in a European wetland*. BioInvasions Records 10(3): 721– 729, <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.3.22>.
39. Divers J. S. & Stahl J. S., 2019 - *Mader's Reptile and amphibian medicine and surgery*, 3° edizione, Elsevier.
40. Dodd, C.K., Seigel R.A., 1991- *Relocation, repatriation and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work?* Herpetologica 47 (3) 336-350.
41. Đorđević S. & Anđelković M., 2015 - *Possible reproduction of the red-eared slider, Trachemys scripta elegans (Reptilia: Testudines: Emydidae), in Serbia, under natural conditions*. Hyla, 2015 (1), 44-49. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/147161>.
42. Duszynski D.W., Upton S.J., Couch L., 2000 - *Coccidia (Eimeria and Isospora) of Chelonia*. NSF-PEET DEB 9521687.
43. Ernst C.H. and Barbour R.W., 1989 - *Turtles of the world*. Smithsonian Inst. Press, pp. 313.
44. Ewen J.G., Armstrong D.P., Parker K.A., Seddon P.J., 2011 - *Reintroduction Biology : integrating science and management*. Ed Wiley-Blackwell pg 337-359.
45. Felsenstein J., 2004 - *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
46. Ficetola G.F., Padoa-Schioppa E., Monti A., Massa R., De Bernardi F. e Bottoni L., 2004 - *L'importanza dell'habitat acquatico e terrestre per la testuggine palustre europea (Emys orbicularis): implicazioni per la pianificazione e la gestione della conservazione*. Can. J. Zool. 82: 1704–1712 (2004).
47. Ferri V. & Soccini C., 2003 - *Riproduzione di Trachemys scripta elegans in condizioni seminaturali in Lombardia. (Italia Settentrionale)*. Natura Bresciana. Ann. Mus. Civ. Sc. Nat., Brescia, 33, 2003: 89-92.
48. Ferri V., Soccini C., 2008 - *Case Study 11. Management of Abandoned North American Pond Turtles (Trachemys scripta) in Italy*. In: *Urban Herpetology*. Eds. Joseph C. Mitchell, Robin Jung Brown, Breck Bartholomew. Herpetological Conservation n.3: 529-534.
49. Ferri V. (a cura di), 2019 - *Piano di controllo e gestione delle specie esotiche di testuggini palustri (Trachemys scripta ssp)*. LIFE14 IPE IT 018GESTIRE2020, Documento tecnico; 112 pp.
50. Ferri V., Grano M., Marini D., Soccini C., Filippi E., Cervoni F. & Masulli A., 2020 - *La biodiversità aliena dei Cheloni nel Lazio: monitoraggio dei nuclei di testuggini esotiche terrestri e palustri introdotti negli ambienti naturali della regione*. Atti del II Congresso Nazionale Testuggini e Tartarughe. Albenga (Sv).

51. Ferri V., Battisti C., Soccini C., and Santoro R., 2021 - *First record for Europe of the non-native turtles Kinosternon subrubrum Bonnaterre, 1789 and Pelomedusa olivacea (Schweigger, 1812) in a suburban wetland in central Italy.* Herpetology Notes 14: 303–307.
52. Ficetola G.F., Thuiller W., Miaud C., 2007 - *Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species – the American bullfrog.* Divers Distrib. 13: 476-485.
53. Ficetola G.F., Thuiller W., Padoa-Schioppa E., 2009 - *From introduction to the establishment of alien species: bioclimatic differences between presence and reproduction localities in the slider turtle.* Divers Distrib. 15: 108-116.
54. Ficetola G. F., Rödder D., & Padoa-Schioppa E., 2012 - *Trachemys scripta (Slider terrapin).* In Francis R.A., *Handbook of global freshwater invasive species.* Routledge: Earthscan, Taylor & Francis Group Abingdon, UK: 331-339.
55. Ficheux S., Olivier A., Faya R., Crivelli A., Besnardc A., Béchet A., 2014 - *Rapid response of a long-lived species to improved water and grazing management: The case of the European pond turtle (Emys orbicularis) in the Camargue, France.* Journ.Nat.Conser., <sup>Vol.22, 4:</sup> 342-348
56. Foligni C., Salvi R., - 2017 - *Non-native turtles in a peri-urban park in northern Milan (Lombardy, Italy): species diversity and population structure.* Acta Herpetologica, 12(2): 151-156, 2017.
57. Foglini C., 2021 - *Not only pond sliders: freshwater turtles in the water bodies of the Milan northern urban area (Italy).* Natural History Sciences, 8(2), 53–58. <https://doi.org/10.4081/nhs.2021.529>.
58. Fowler M.E., Miller R.E., 1999 - *Zoo and wild animal medicine: current therapy 4.* Saunders company: 1-240.
59. Fox G.A., 2001 - *Wildlife and sentinels of human health effects in the Great Lakes- St. Lawrence Basin.* Environ. Health Perspect. 109, 853-861.0
60. Frank W., 1981 - *Endoparasites in disease of the reptilian.* 1 Ed. J.A Cooper and O.F. Jackson Academic Press London.
61. Freitas Raso T.D., Godoy S.N., Milanelo L., 2004 - *An outbreak of Chlamydia in captive blue-fronted Amazon parrots (Amazona festiva) in Brasil.* J. Zoo. Wild. Med. 35, 94-96.
62. García-Díaz P., Ross J.V., Ayres C. and Cassey P., 2015 - *Understanding the biological invasion risk posed by the global wildlife trade: propagule pressure drives the introduction and establishment of Nearctic turtles.* Glob Change Biol, 21: 1078-1091. <https://doi.org/10.1111/gcb.12790>.
63. García-Díaz P., Ramsey D.S.L., Woolnough A.P., Franch M., Llorente G.A., Montori A., Buenetxea, X., Larrinaga A.R., Lasceve M., Álvarez A., Traverso J.M., Valdeón A., Crespo A., Rada V., Ayllón E., Sancho V., Lacomba J.I., Bataller J.V. and Lizana M., 2017 - *Challenges in confirming eradication success of invasive Red-eared Sliders.* Biological Invasions 19: 2739-2750. doi: 10.1007/s10530-017-1480-7.
64. Gartrell B.D., Kirk E.J., 2005 - *Euthanasia of Reptiles in New Zealand: Current Issues and Methods Kokako.* 12 (1): 12-15.
65. Gibbs J.P., Shriver W.G., 2002 - *Estimating the effects of road mortality on turtle populations.* Con. Biol. 16, 1647-1652.

66. Goldstein T., Mazzet J.A.K., Gulland F.M.D., 2004 - *The transmission of phocine herpesvirus-1 in rehabilitating and free-ranging Pacific harbor seals (Phoca vitulina) in California*. Vet. Microbiol. 103, 131-141.
67. Gong S., Chow A., Fong J., & Shi H., 2009 - *The chelonian trade in the largest pet market in China: Scale, scope and impact on turtle conservation*. Oryx, 43(2), 213-216. doi:10.1017/S0030605308000902.
68. Guo S.W., Thompson E.A., 1992 - *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles*. Biometrics 43:805–811.
69. Hall B.G., 2001 - *Phylogenetic Trees Made Easy*. Sinauer, Sunderland, MA.
70. Harwood V.J., Butler J., Parrish D., Wagner V., 1998 - *Isolation of Fecal Coliform Bacteria from the Diamondback Terrapin (Malaclemys terrapin centrata)*. Department of Natural Sciences, University of North Florida, Jacksonville, Florida 32224-2645.
71. Hidalgo-Vila J., Diaz-Paniagua C., De Frutos-Escobar C., Jimenez-Martinez C., Perez-Santigosa N., 2007 - *Salmonella in free living terrestrial and aquatic turtles*. Veterinary Microbiology 119 311– 315.
72. Hidalgo-Vila J., Martinez-Silvestre A., Ribas A., Casanova J.C., Santigosa, Diaz-Paniagua C., 2010 - *Pancreatitis Associated with the Helminth Serpinema microcephalus (Nematoda: Camallanidae) in Exotic Red-Eared Slider Turtles (Trachemys scripta elegans)*.
73. Honigberg B.M., 1950 - *Intestinal flagellates of amphibians and reptiles*. Doctoral dissertation. University of California, Berkeley, CA.
74. Holladay S.D., Wolf J.C., Smith S.A., 2001 - *Aural abscess in wild-caught box turtles (Terrapene carolina): possible role of organochlorine-induced hypovitaminosis*. A. Ecotox. Environ. Safety 48, 99-106.
75. ISPRA, 2022 - *Manuale operative per il prelievo di campioni biologici finalizzato alle analisi genetiche nell'ambito della Convenzione di Washington (CITES)*.
76. Jacobson E.R., Gaskin J.M., Brown M.B., 1991 - *Chronic respiratory tract disease of free-ranging desert tortoise (Xerobates agassizii)*. J. Wildl. Dis. 27, 296-316.
77. Jacobson, E.R., 1993 - *Implications of infectious diseases for captive propagation and introduction programs of threatened/ endangered reptiles*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 24 (3): 245-255.
78. Jacobson E.R., Schumacher J., Green M.E., 1992 - *Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematological and plasma biochemical determinations in the desert tortoise (Xerobates agassizii)*. Copeia, 237-241.
79. Jacobson E. R., Behrer J.L., Jarchow J. L., 1999 - *Health assessment of chelonians and release into the wild*. Zoo and wild animal medicine: current therapy, 4 (30): 232-241. W.B. Saunders & Co., Philadelphia.
80. Jenkins M.D., 1995 - *Tortoises and freshwater turtles: the trade in Southeast Asia*. International, United Kingdom.
81. Jenkins S.R., Perry D.B., Winkler W.G., 1988 - *The ecology and epidemiology of raccoon rabies* Review of infectious diseases 10: 620-625.
82. Jenkins S.R., Winkler W.R., 1987 - *Descriptive epidemiology from an epizootic of raccoon rabies in the middle Atlantic states*. Am. J. Epidemiol.126, 429-437.

83. Jesu R., Mamone A., Lamagni L., Ortale S., 2000 - *Nuovi dati sulla presenza del Pelodite punteggiato (Pelodytes punctatus) e della Testuggine palustre europea (Emys orbicularis) in Liguria*. In: Giacoma C. – Atti I Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica, Mus. Reg. Sc. Nat. Torino: 611-618.
84. Jesu R., Salvidio S., Lamagni L., Ortale S., Piombo R., Mattioli F., Mamone A., Mulattiero F., 2000 - *The European Pond Terrapin in Liguria (NW Italy) status and conservation measures undertaken*. Proceedings 2nd Symposium on *Emys orbicularis*, 123–126, Gonfaron.
85. Johnson C.A., Griffith J.W., Tenorio P., Hytrek S., Lang C.M., 1998 - *Fatal trematodiasis in research turtles*. Lab Anim Sci 48, 340-343.
86. Jukes T., Cantor C., 1969 - *Evolution of protein molecules*. In: *Mammalian Protein Metabolism*. Edited by Munro HN, New York Academic press: 21-132.
87. Kalaentzis K., Kazilas C., Strachinis I., Tzoras E., Lymberakis P., 2023 - *Alien Freshwater Turtles in Greece: Citizen Science Reveals the Hydra-Headed Issue of the Pet Turtle Trade*. Diversity 2023, 15, 691. <https://doi.org/10.3390/d15050691>.
88. Karesh W.R. – 1995 – *Wild rehabilitation: additional considerations for developing countries*. J. Zoo. Wildl. Med. 26, 2-9.
89. Kettunen M., Genovesi P., Gollasch S., Pagad S., Starfinger U. ten Brink, P. & Shine C., 2008 - *Technical support to EU strategy on invasive species (IAS) - Assessment of the impacts of IAS in Europe and the EU (final module report for the European Commission)*. Institute for European Environmental Policy (IEEP), Brussels, Belgium: 1-44 + Annexes.
90. Kikillus K., Hare K., Hartley S., 2010 - *Minimizing false-negatives when predicting the potential distribution of an invasive species: A bioclimatic envelope for the red-eared slider at global and regional scales*. Animal Conservation. 13. 5 - 15. 10.1111/j.1469-1795.2008.00299.x.
91. Kilpatrick M., Briggs C. J., Daszak P., 2010 - *The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians*. Trends in Ecology & Evolution, Volume 25, Issue 2, 2010: 109-118.
92. Kimura M., 1980 - *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.
93. Kolluru R.V., 1996 - *Risk assessment and management: an unified approach*. In Kolluru R.V., Bartel S., Pitblado R., Stricoff S. (eds.): *Risk assessment and management handbook for environmental, health and safety professionals*. McGraw-Hill, New York: 1.3-1.41.
94. Kopecký O., Kalous L. & Patoka J., 2013 - *Establishment risk from pet-trade freshwater turtles in the European Union*. Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst. 2: 1- 410.
95. Kovačević A.S., Ozvegy J., Krstić N., Rusvai M., Jakab C., Stanimirović Z., Becskei Z., 2013 - *Skin and skeletal system lesions of european pond turtles (Emys orbicularis) from natural habitats*. Acta Vet Hung, 11:1-14.
96. Kraus F. (eds), 2009 - *Alien Reptiles and Amphibians. Invading Nature - Springer Series In Invasion Ecology*. 4. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8946-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8946-6_6).
97. Kus Veenvliet, J. (Ed.), 2020. A.-A. Dragomirović, H. Hadžihajdarević, I. Sučić, L. Basrek, V. Hima R. Bukvić, M. Bartula, B. Panjković, K. Szabados, T. Bošnjak, A. Kiš, A. Tratnik. Review of

key policies and stakeholders on invasive alien species in countries of the Sava River basin.  
Project Output of the Work Package 6 of the Sava TIES project, Euronatur.

98. Lovell S.J., S.F. Stone and L. Fernandez., 2006 - *The economic impacts of aquatic invasive species: a review of the literature*. Agricultural and Resource Economics Review 35: 1-195. <https://doi.org/10.1017/S1068280500010157>.
99. Iglesias R., García-Estévez J.M., Ayres C., Acuña A., Cordero-Rivera A., 2015 - *First reported outbreak of severe spirorchiidiasis in *Emys orbicularis*, probably resulting from a parasite spillover event*. Diseases of Aquatic Organisms, 113(1): 75-80.
100. Izquierdo G. Alarcos, et al., 2010 - *Distribution records of non-native terrapins in Castilla and Leon region (Central Spain)*. Aquatic invasions 5.3 (2010): 303-308.
101. Hulme P., 2009 - *Trade, transport and trouble: Managing invasive species pathways in an era of globalization*. Journal of Applied Ecology. 46. 10 - 18. 10.1111/j.1365-2664.2008.01600.
102. Labbe A., 1893 - *Coccidium delagei* coccidie nouvelle parasite des tortues d'eau douce. Archives de Zoologie Experimentale et Generale 1: 267-280.
103. Liu D. et al., 2013 - *Prevalence of antibiotic-resistant gram-negative bacteria associated with the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*)*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine (2013): 666-671.
104. Lebboroni, M., Chelazzi, G., 1998 - *Habitat use, reproduction and conservation of *Emys orbicularis* in a pond system in Central Italy*. In: Boothy J. (Ed) - *Ponds and pond landscapes of Europe*. Proceedings, International Conference of the Pond Life Project. Maastricht, The Netherlands: 1- 5.
105. Le Dien D., Broad S., 1995 - *Investigations into Tortoise and Freshwater Turtle Trade in Vietnam*. IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland and Cambridge, U.K., IUCN: 34-40.
106. Leighton F.A., 2002 - *Health risk assessment of the translocation of wild animals*. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 21: 187-195.
107. Lemey P, Salemi M, Vandamme A.M., 2009 - *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press, New York.
108. Liuzzo, M., Borella, S., Ottonello, D., Arizza, V., Malavasi, S., 2021 - *Population abundance, structure and movements of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758) based on capture-recapture data in a Venice Lagoon wetland area, Italy*. Ethol. Ecol. Evol., DOI: 10.1080/03949370.2020.1870567
109. Lourenco J.M., Claude J., Galtier N., Chiari Y., 2012 - *Dating cryptodiran nodes: origin and diversification of the turtle superfamily Testudinoidea*. Molecular Phylogenetics and Evolution 62: 496-507.
110. Lo Valvo, M., D'Angelo, S., Regina, G., 2008 - *Applicazioni di radiotracking in *Testuggine palustre siciliana**. In: Herpetologia Sardiniae, Corti, C., Ed, Edizioni Belvedere, Latina, "Le scienze" 8: 328-330.
111. Lo Valvo, M., Cumbo, V., Chiara, R., Bartolotta, E., Giacalone, G., 2014 - *Spazi vitali e comportamenti della *Testuggine palustre Siciliana* (*Emys trinacris*) nella R.N.O. "Monte*

- Capodarso e Valle dell'Imera meridionale"* (Caltanissetta). X Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica.
112. Martínez-Silvestre A., Soler Massana J., Gorriç A., Munne P. & de Roa E., 2006 - *Trachemys scripta elegans* and other invasive species of chelonians in Catalonia (North-eastern Iberian peninsula). *Chelonii*, 4: 53-54.
  113. Martins R. A., André Moreira A., and Molina F. B., 2014 - *The presence of the Red-eared slider, Trachemys scripta elegans (Wied, 1838) (Testudines, Emydidae), an invasive species, in the Paraíba river basin, South eastern Brazil*. *Herpetology Notes* 7 (2014): 437-441.
  114. Martins B. H., Azevedo F. and Teixeira J., 2018 - *First reproduction report of Trachemys scripta in Portugal ria formosa natural park*. Algarve. *Limnetica* 37.1 (2018): 61-67.
  115. Masin S., Bonardi A., Padoa-Schioppa E., Bottoni L. & Ficetola G. F., 2014 - *Risk of invasion by frequently traded freshwater turtles*. *Biological Invasions*, 16: 217-231.
  116. Mc Arthur S., Wilkinson R., Meyer J., 2004 - *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Blackwell Publishing Ltd.
  117. Mader D.R., 2006 - *Reptile medicine and surgery*. 2nd ed. Saunders-Elsevier: 564-568.
  118. Malcevschi S., 1991 – *Qualità ed impatto ambientale. Teoria e strumenti della valutazione d'impatto*. Etas libri
  119. Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M., 1998 - *Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations*. *Molecular Ecology* 7:639-655.
  120. Martin D.R., 1972 - *Distribution of helminth parasites in turtles native to Southern Illinois* *Trans. Ill. Acad. Sci* 65: 1-67.
  121. Mazzotti, S., Montanari, F., Greggio, N., Barocci, M., 2007 - *La popolazione della testuggine palustre (Emys orbicularis) del Bosco della Mesola*. *Quad. Staz. Ecol. civ. Mus. St. nat. Ferrara* 17: 117-123.
  122. Mihalca A. D., 2007 - *Parasitic fauna of free-ranging European pond turtle (Emys orbicularis), sand lizard (Lacerta agilis) and grass snake (Natrix natrix) in Romania*. PhD thesis, Romania, Cluj-Napoca: University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine.
  123. Nagano N., Oana S., Nagano Y. et al., 2006 - *A severe Salmonella enterica serotype Paratyphi B infection in a child related to a pet turtle, Trachemys scripta elegans*. *Jpn J Infect Dis*. 2006; 4: 59:132.
  124. Mihalca AD., Racka K., Gherman C., Ionescu, D.T., 2007 - *Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from Romania*. *Parasitol Res*.
  125. Miller P.S., 2007 - *Tools and techniques for disease risk assessment in threatened wildlife conservation programmes*. *Int. Zoo.Yb* 41:38-51.
  126. Mishra G.S., Gonzalez J.P., 1978 - *Les parasites des tortues d'eau douce en Tunisie*. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 55 (3): 303-26.
  127. Murray, N., Macdiarmid S. C., Wooldridge M., Gummow B., Morley R. S., Weber S. E., Giovannini A., Wilson D., 2004 - *Handbook on import risk analysis for animals and animal products*. Office of International Epizootics (OIE), Paris [http://www.oie.int/doc/en\\_document.php?numrec=1048503](http://www.oie.int/doc/en_document.php?numrec=1048503).



128. Nagano N., Shinji O., Nagano Y. and Arakawa Y. , 2006 - *A severe Salmonella enterica Serotyphi B Infection in a Child Related to a Pet Turtle, Trachemys scripta elegans*. Jpn. Infect. Dis., 59: 132-134.
129. National Geographic Society, 1987 - *Field guide to the birds of North America*. The society, Washington, D.C.
130. Nei M., 1987 - *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
131. Nei M., Kumar S., 2000 - *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY.
132. Nielsen N.O., 1992 - *Ecosystem health and veterinary medicine*. Can. Vet. J. 33: 23-26.
133. Nielsen N.O., 1995 - *Ecosystem in Health: Application of the concept and wildlife as indicators*. Proct. Joint. Conf. Am. Assoc. Zoo. Vet. Wild. Dis. Assoc. Am. Assoc. Wildl. Vet., Lansing, Minch: 6-11.
134. Office International des Epizooties (OIE), 2001 - *Risk analysis*. Section 1.3. In: *International animal health code: mammals, birds and bees*. 10<sup>th</sup> edition, OIE, Paris: 21-35.
135. O’Keeffe S., 2009 - *The practicalities of eradicating red-eared slider turtles (Trachemys scripta elegans)*. Aliens: The Invasive Species Bulletin: 28, 19-25.
136. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA), 1997: *Risk assessment frameworks: a general framework for animal health risk assessment*. OMAFRA, Toronto (<http://www.omafra.gov.on.ca/english/environment/bmp/series.htm>).
137. Ottonello D., D’Angelo S., Oneto F., Malavasi S., Zuffi M.A.L., 2016 - *Feeding ecology of the Sicilian pond turtle Emys trinacris (Testudines, Emydidae) influenced by seasons and invasive aliens species*. Ecological Research.
138. Ottonello, D., D’Angelo, S., Marrone, F., Oneto, F., Spadola, F., Zuffi, M.A.L., Fritz, U., 2021 - *Emys trinacris Fritz, Fattizzo, Guicking, Tripepi, Pennisi, Lenk, Joger, and Wink 2005 – Sicilian Pond Turtle, Testuggine Palustre Siciliana*. In: *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., van Dijk, P.P., Stanford, C.B., Goode, E.V., Buhlmann, K.A., Mittermeier, R.A., Eds, Chelon. Res. Monographs 5: 112.1–13.
139. Ottonello, D., D’Angelo, S., Oneto, F., Malavasi, S., Zuffi, M.A.L., 2017 - *Feeding ecology of the Sicilian pond turtle (Emys trinacris) influenced by seasons and invasive aliens species*. Ecol. Res. 32: 71-80.
140. Ottonello, D., D’Angelo, S., Oneto, F., Malavasi S., Zuffi, M.A.L., Spadola, F. , 2021 - *So close so different: what makes the difference?* Acta Herpetol. 16: 89-98.
141. Ottonello, D., Salvidio, S., Rosecchi, E., 2005 - *Feeding habits of the European pond terrapin Emys orbicularis in Camargue (Rhône delta, Southern France)*. Amphibia-Reptilia 26: 562–565.
142. Ovezmukhammedov A., 1978 - *Coccidiofauna of Emys orbicularis Linnaeus in Turkmenistan*. Izvestiia Akademii Nauk Turkmenia SSR seriya. Biologischeskikh Nauk, 1: 83-86.
143. Patrick M.E., Gilbert M.J., Blaser J.M., Tauxe R.V., Wagenaar J.A., Fitzgerald C., 2013: *Human Infections with New Subspecies of Campylobacter fetus*. Emerging Infectious Diseases • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). , 9 (10).
144. Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C., 1995 - *Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears*. Molecular Ecology, 4:347-354.

145. Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A., 2004 - *Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power*. *Molecular Ecology* 13:55-65.
146. Page R.D.M., Holmes E.C., 1998 - *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell, Oxford.
147. Pauwels O. S. G. and Pantchev N., 2018 - *Risks for human health related to invasive alien reptiles and amphibians*. CABI Invasives Series. CABI. doi: 10.1079/9781786390981.0108.
148. Pearson S. H., Avery H. W. & Spotila J. R., 2015 - *Juvenile invasive red-eared slider turtles negatively impact the growth of native turtles: Implications for global freshwater turtle populations*. *Biological Conservation*, 186: 15-121.
149. Pedall I., Schäfer H., Fritz U., Wink M., 2009 - *Isolation of microsatellite markers in the *Emys orbicularis* complex and development of multiplex PCR amplification*. *Conservation Genetics* 10:725-727.
150. Perez-Santigosa N., Díaz-Paniagua C. & Hidalgo-Vila J., 2008 - *The reproductive ecology of exotic *Trachemys scripta elegans* in an invaded area of southern Europe*.
151. Pérez-Santigosa N., Florencio M., Hidalgo-Vila J. & Díaz-Paniagua C., 2011 - *Does the exotic invader turtle, *Trachemys scripta elegans*, compete for food with coexisting native turtles?* *Amphibia-Reptilia*, 32(2); 167-175.
152. Perry G., Owen J.L., Petrovic C., Lazell J. and Egelhoff J., 2007: *The red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*, in the British Virgin Islands*. *Applied Herpetology* 4: 88–89.
153. Pimentel D., Zuniga R. & Morrison D., 2005 - *Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States*. *Ecological Economics*, 52: 273–288.
154. Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A., 2004 - *GENECLASS2: A Software for genetic assignment and first-generation migrant detection*. *Journal of Heredity* 95: 536-539.
155. Pizzi, R., 2009 - *Veterinarians and taxonomic chauvinism: the dilemma of parasite conservation*. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18: 279–282.
156. Pleguezuelos J.M., 2004 - *Las especies introducidas de anfibios y reptiles*. In *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. in Pleguezuelos J.M., Marquez R., Lizana M. (eds). *Dirección General de la Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española* (3a impresión): Madrid: 501–532.
157. Plowright W., 1982 - *The effect of rinderpest and rinderpest control on wildlife in Africa*. *Symposium of the Zoological society of London* 50: 1-28.
158. Polo-Cavia N., Gonzalo A., López P. & Martín J., 2010 - *Predator recognition of native but not invasive turtle predators by naïve anuran tadpoles*. *Animal Behaviour*, 80(3): 461-466.
159. Polo-Cavia N., López P. & Martín J., 2011 - *Aggressive interactions during feeding between native and invasive freshwater turtles*. *Biological Invasions*, 13: 1387-1396.
160. Polo-Cavia N., López P. & Martín, J., 2014 - *Interference competition between native Iberian turtles and the exotic *Trachemys scripta**. *Basic and Applied Herpetology*, 28: 5-20.
161. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000 - *Inference of population structure using multilocus genotype data*. *Genetics* 155: 945-959.

162. Pupiņš M., Pupiņa A., 2007° - *European pond turtle Emys orbicularis (Linnaeus, 1758) and its conservation in Latvia*. Latgales ekoloģiskā biedrība: 1-162 (in Latvian).
163. Pupiņš M., Pupiņa A., 2007b - *Plan of conservation of the species European pond turtle Emys orbicularis (Linnaeus, 1758) in Latvia*. Dabas aizsardzības pārvalde, Rīga: 1- 04 (in Latvian).
164. Pyšek P. and Richardson D., 2010 - *Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health*. Annual Review of Environment and Resources, 35: 25–55.
165. Reed R. N. and J. W. Gibbons, 2003 - *Conservation status of live US nonmarine turtles in domestic and international trade*. Report to U. S. Department of the Interior, U. S. Fish and Wildlife Service: 1-92.
166. Reshetnikov A.N., Zibrova M.G., Ayaz D., Bhattarai S., Borodin O.V., Borzée A., Brejcha J., Çiçek K., Dimaki M., Doronin I.V., Drobenkov S.M., Gichikhanova U.A., Gladkova A.Y., Gordeev D.A., Ioannidis Y., Ilyukh M.P., Interesova E.A., Jadhav T.D., Karabanov D.P., Khabibullin V.F., Khabilov T.K., Khan M.M.H., Kidov A.A., Klimov A.S., Kochetkov D.N., Kolbintsev V.G., Kuzmin S.L., Lotiev K.Y., Louppova N.E., Lvov V.D., Lyapkov S.M., Martynenko I.M., Maslova I.V., Masroor R., Mazanaeva L.F., Milko D.A., Milto K.D., Mozaffari O., Nguyen T.Q., Novitsky R.V., Petrovskiy A.B., Prelovskiy V.A., Serbin V.V., Shi H.t., Skalon N.V., Struijk R.P.J.H., Taniguchi M., Tarkhnishvili D., Tsurkan V.F., Tyutenkov O.Y., Ushakov M.V., Vekhov D.A., Xiao F., Yakimov A.V., Yakovleva T.I., Yang P., Zeleev D.F., Petrosyan V.G., 2023 - *Rarely naturalized, but widespread and even invasive: the paradox of a popular pet terrapin expansion in Eurasia*. NeoBiota 81: 91–127. <https://doi.org/10.3897/neobiota.81.90473>.
167. Raymond M., Rousset F., 1995- *An exact test for population differentiation*. Evolution 49: 1280-1283
168. Ramsay E.C., Montali M.J., Orley M., Stephensen C.B., Holmes K.V., 1989 - *Callitrichid hepatitis: epizootiology of a fatal hepatitis in zoo tamarins and marmosets*. Journal Zoo Wildlife Medicine 20: 178-183.
169. Rapport D.J., 1989 - *What constitutes ecosystem helth*. Perspect. Biol. Med. 33: 120-132.
170. Regolamento (CE) n. 1/2005 del Consiglio del 22 dicembre 2004 “*Sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate che modifica le direttive 64/432/CEE e 93/119/CE e il regolamento (CE) n. 1255/97*” Gazzetta ufficiale n. L 003 del 05/01/2005: 0001 – 0037
171. Reichenow E., 1921 - *Die Coccidian. Handbuch der Pathogenen Protozoen*. Von Provazek, S.J.M. Editor Johann Ambrosius Barth, Leipzig.:1136-1277.
172. Ribble C.S., 1995 - *Applying the concept of ecosystem health within the veterinary curriculum*. Proceedings joint conference AAZV, WDA, AAWV, Saskatoon.
173. Riley J.L., Litzgus J.D., 2013 - *Evaluation of predator-exclusion cages used in turtle conservation: cost analysis and effects on nest environment and proxies of hatchling fitness*. Wildlife Research, - CSIRO Publishing
174. Rödder D., Kwet A. & Lötters S., 2009 - *Translating natural history into geographic space: a macroecological perspective on the North American Slider, Trachemys scripta (Reptilia, Cryptodira, Emydidae)*. Journal of Natural History, 43:39-40, 2525-2536, DOI: 10.1080/00222930903100550.

175. Sainsbury A.W., Armstrong D.P., Ewen J.G., 2011 - *Methods of disease risk analysis for reintroduction programs*.
176. Sainsbury A.W., Vaughan-Higgins R.J., 2012 - *Analyzing disease risks associated with translocations*. Conservation Biology 26 (3): 442-452.
177. Sancho Alcayde V., Lacomba Andueza J. I., Bataller Gimeno J. V., Pradillo Carrasco A., (2015 - *Manual para el Control y Erradicación de Galápagos Invasores*. Colección Manuales Técnicos de Biodiversidad, 6. Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic Desenvolupament Rural. Generalitat Valenciana. Valencia.
178. Scalera R., 2007 - *Virtues and shortcomings of EU legal provisions for managing NIS: Rana catesbeiana and Trachemys scripta elegans as case studies*. in F. Gherardi (ed) *Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution, and Threats*. Springer, Dordrecht: 669–678.
179. Schaeffer D.J., Herricks E., Kester H., 1988 - *Ecosystem health: I. Measuring ecosystem health*. Environ. Mgmt. 12: 445-455.
180. Schaffer G.D., Davison W.R., Nettles V.F., Roller E.A., 1981 - *Helminth parasites of translocated raccoons (Procyon lotor) in the Southeastern United States*. J. Wildl. Dis. 17: 217-227.
181. Schindler S., Staska B., Adam M., Rabitsch W. & Essl F., 2015 - *Alien species and public health impacts in Europe: A literature review*. NeoBiota. 27. 1-23. 10.3897/neobiota.27.5007.
182. Schopler R.L., Hall A.J., Cowen P., 2005 - *Survey of wildlife rehabilitators regarding rabies vector species*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227: 568-1572.
183. Seebens H., Blackburn T.M., Dyer E.E., Genovesi P., Hulme P.E., Jeschke J.M., Pagad S., Pyšek P., Winter M., Arianoutsou M., Bacher S., Blasius B., Brundu G., Capinha C., Celesti-Grapow L., Dawson W., Dullinger S., Fuentes N., Jäger H., Kartesz J., Kenis M., Kreft H., Kühn I., Lenzen B., Liebhold A., Mosena A., Moser D., Nishino M., Pearman D., Pergl J., Rabitsch W., Rojas Sandoval J., Roques A., Rorke S., Rossinelli S., Roy H.E., Scalera R., Schindler S., Štajerová K., Tokarska-Guzik B., van Kleunen M., Walker K., Weigelt P., Yamanaka T., Essl F., 2017 - *No saturation in the accumulation of alien species worldwide*. Nature Communications 8: 1–9, <https://doi.org/10.1038/ncomms14435>.
184. Segade P., Crespo C., Ayres C., Cordero A., Arias M.C., García-Estévez J.M., Iglesias Blanco R., 2006 - *Eimeria species from the European pond turtle, Emys orbicularis (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species*. J Parasitol.: 69-72.
185. Seglie, D., 2015 - *Abbondanza di popolazione e conservazione della testuggine palustre europea (Emys orbicularis) nella Palude di San Genuario*. In: Atti X Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica, (Genova, 15-18 ottobre 2014), Doria, G., Poggi, R., Salvidio, S., Tavano, M., Eds, Ianieri Edizioni, Pescara, pp. 429-436.
186. Sharma V. K., Kaura Y. K., Singh I. P., 1974 - *Frogs as carriers of Salmonella and Edwardsiella*. Antonie van Leeuwenhoek, 40 (1): 171-175.
187. Shen L., Shi H., Wang R., Liu D., & Pang X., 2011 - *An invasive species red-eared slider (Trachemys scripta elegans) carrying Salmonella pathogens in Hainan Island*. Molecular Pathogens, 2 (4).
188. Sillero, N., Campos, J., Bonardi, A., Corti, C., Creemers, R., Crochet, P.-A., Crnobrnja Isailović, J., Denoël, M., Ficetola, G.F., Gonçalves, J., Kuzmin, S., Lymberakis, P., de Pous, P., Rodríguez, A., Sindaco, R., Speybroeck, J., Toxopeus, B., Vieites, D.R., Vences, M., 2014 - *Updated*

- distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe*. *Amphibia-Reptilia* 35: 1-31.
189. Sindaco R., Doria G., Razzetti E. & Bernini E. (Eds.), 2006 – *Atlante degli anfibi e rettili d'Italia/Atlas of Italian amphibians and reptiles*. Societas Herpetologica Italica. Ed. Polistampa, Firenze: 236-239.
  190. Sindaco, R., Venchi, A., Grieco, C., 2013 - *The reptiles of the Western Palearctic. 2. Annotated checklist and distributional atlas of the snakes of Europe, North Africa, Middle East and Central Asia, with an update to the vol. 1*. Monografie della Societas Herpetologica Italica - II. Edizioni Belvedere, Latina (Italy); 1-543.
  191. Sleeman J.M., Clark E.E., 2003 - *Clinical wildlife medicine: a new paradigm for a new century*. *J. Avian. Med. Surg.* 17: 33-37.
  192. Soccini C., Ferri V., 2004 - *Bacteriological screening of Trachemys scripta elegans and Emys orbicularis in the Po plain (Italy)*. *Biologia, Bratislava*, 59/Suppl. 14: 201–207.
  193. Soccini C. & Ferri V., 2004 - *Bacteriological screening of Trachemys scripta elegans and Emys orbicularis in the Po Plain (Italy)*. *Biologia*, 14: 201-207.
  194. Spear M.J., 2018 - *Current and Projected Distribution of the Red-Eared Slider Turtle, Trachemys scripta elegans, in the Great Lakes Basin*. *The American Midland Naturalist*, 179 (2):191-221.
  195. Standfuss B., Lipovšek G., Fritz U., & Vamberger M., 2016 - *Threat or fiction: is the pond slider (Trachemys scripta) really invasive in Central Europe? A case study from Slovenia*.
  196. Tajima F., Nei M., 1984 - *Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences*. *Molecular Biology and Evolution* 1: 269-285.
  197. *Conservation Genetics*, 17: 557-563.
  198. Tamura K., 1992 - *Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases*. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.
  199. Tamura K., Nei M., 1993 - *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526
  200. Telford S.R., 1971 - *Parasitic diseases of reptiles*. *Javma* 159:1644-1652.
  201. Telecky T.M., 2001 - *United States import and export of live turtles and tortoises*. *Turtle and Tortoise Newsletter* 4: 8–13.
  202. Tzoras E., Chiras G., Lozano A., Maluquer-Margalef J., 2018 - *On a reproductive population of Trachemys scripta (Schoepff, 1792) at Kaiafa Lake in Western Peloponnese, Greece*. 26: 28-32.
  203. Uetz P., Freed P., Aguilar R., Hošek J. (eds.), 2022 - *The Reptile Database*. <http://www.reptile-database.org>. Accessed on: 2023-11-05.
  204. Ultsch G. R., 2006 - *The ecology of over wintering among turtles: where turtles over winter and its consequences*. *Biological Reviews* 81: 339–367.
  205. Verneau O., Palacios P., Alday M., Billard E., Allienne J.F, Basso C., Du Preez L.H., 2011 - *Invasive species threat: parasite phylogenetics reveals patterns and processes of host-switching between non-native and native captive freshwater turtles*. *Parasitology Cambridge University Press* doi:10.1017/S003118(2011) 000333.

206. Valdeón A., Crespo-Diaz A., Egaña-Callejo A. & Gosá A., 2010 - *Update of the pond slider Trachemys scripta (Schoepff, 1972) records in Navarre (northern Spain), and presentation of the Aranzadi turtle trap for its population control*. Aquatic Invasions 5: 297–302.
207. Van Dijk P. P., 2000 - *The status of turtles in Asia*. Chelonian Research Monographs, 2(804): 15-23.
208. Van Riemsdijk I., Struijk R., Pel E., Janssen I. & Wielstra B., 2020 - *Hybridisation complicates the conservation of Natrix snakes in the Netherlands*. Salamandra. Virginia Department of Game and Island Fisheries, (2002). 56: 78-82.
209. Vodrážková M., Šetlíková I., Berec M., 2020 - *Chemical cues of an invasive turtle reduce development time and size at metamorphosis in the common frog*. Scientific Reports 10(7978): 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64899-0>.
210. Yildirimhan H.S., Sahin R., 2005 - *The helminth fauna of Emys orbicularis (European pond turtle - Linnaeus, 1758) living in freshwater*. Turkiye Parazitolojisi Dergisi;29 (1): 56-62.
211. Warner R.E., 1968 - *The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna*. Condor 70: 101-120.
212. Wendell M., Sleeman J.M., Kratz G., 2002 - *Retrospective review of morbidity and mortality of raptors admitted to Colorado State University, Veterinary Teaching Hospital, J. Wildl. Wildl. U.K., and the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Switzerland, Dis. 38: 101106*.
213. Woodford, M.H., 2000 - *Quarantine and Health Screening Protocols for Wildlife prior to Translocation and Release into the Wild*. IUCN Species Survival Commission's Veterinary Specialist Group, Gland, Switzerland, the Office International des Epizooties (OIE), Paris, France.
214. Wyneken J., Epperly S.P., Growder L.B., Vaughan J. & Esper K.B., 2007 - *Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics*. Herpetologica 63(1): 19-30.
215. Zheng-Chao Tu, Zeitlin C., Gagner J.P., Keo T., Hanna B., Blaser M., 2004 - *Campylobacter fetus* of Reptile Origin as a Human Pathogen. 42 (9): 4405. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4405-4407.
216. Zuffi, M.A.L., Celani, A., Foschi, E., Tripepi, S., 2007 - *Reproductive strategies and body shape in the European pond turtle (Emys orbicularis) from contrasting habitats in Italy*. J. Zool., Lnd. 271: 218–224.
217. Zuffi, M.A.L., Odetti, F., 1998 - *Double egg deposition in the European pond turtle, Emys orbicularis, from central Italy*. Ital. J. Zool. 65: 187-189.
218. Zuffi, M.A.L., Odetti, F., Meozzi, P., 1999 - *Body-size and clutch-size in the European pond turtle, Emys orbicularis, from central Italy*. J. Zool., Lnd. 247: 139-143.
219. Zuffi M.A.L., Spinelli A., IkoVIC V., Mangiacotti M., Sacchi R., Scali S., 2020 - *Population size and density in two European pond turtle populations of central Italy*. Amphibia-Reptilia 41 (2020): 461-467.

ALLEGATO 1.  
PROTOCOLLO VETERINARIO



Cofinanziato  
dall'Unione europea



PROTOCOLLO  
VETERINARIO



Coordinatore  
beneficiario



Beneficiari  
associati





LIFE21-NAT-IT-LIFE URCA PROEMYS

LIFE URCA PROEMYS

URgent Conservation Actions pro *Emys orbicularis* in Italy and Slovenia

## PROTOCOLLO VETERINARIO

<b>Data di invio</b>	24 luglio 2023
<b>Versione</b>	1
<b>Autori</b>	Gaia Pesce; Eva Alvares Figueras; Nicola Pussini*; Riccardo Jesu; Guido Gnone  <i>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta</i>
<b>Deliverable Azione</b>	WP2
<b>Responsabile dell'azione/task</b>	Costa Edutainment
<b>Parole chiave</b>	Diagnostica, patogeni, analisi di rischio



Il presente documento costituisce il protocollo veterinario preliminare del progetto Life URCA, che verrà utilizzato nella gestione delle testuggini autoctone e alloctone. Il documento potrà essere modificato e aggiornato nel corso del progetto sulla base dell'esperienza maturata e dei risultati delle analisi diagnostiche.

Il documento nasce dall'elaborazione del testo:  
*LIFEEMYS Ligurian Invasive Fauna Eradication pro indigenous Emys orbicularis restocking Disease Risk Analysis report (DRA)*

## 1 Abstract

The objective of the LIFE URCA PROEMYS project is the conservation of the European pond terrapin, *Emys orbicularis*, in Italy and Slovenia, through actions of removal of allochthonous terrapins, environmental restoration and the release of individuals of *Emys orbicularis* reproduced ex situ.

Restocking actions involving the release of individuals reproduced ex situ, entail the risk of introducing into the wild, together with the released individuals, potentially dangerous pathogens that could spread in the wild population. Restocking actions must therefore include, in their planning, health procedures aimed at mitigating this risk.

At the same time, management procedures must ensure the welfare of the animals at all stages of the project and the good health of the individuals intended for release in order to optimise their survival in the restocking sites.

Starting from the Disease Risk Analysis Report elaborated during the LIFEEMYS project (Ligurian Invasive Fauna Eradication pro indigenous *Emys orbicularis* restocking - LIFE 12NAT/IT/0000395), this document illustrates the sanitary procedures that will be adopted by the LIFE URCA project in order to minimise the sanitary risks connected to restocking actions. The document also contains some procedures for the management of allochthonous terrapins captured during the reclamation activities and destined to the recovery and permanent holding centres.

The analyses foreseen by the protocol will be carried out by *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta* (Experimental Zooprophyllactic Institute of Piedmont, Liguria and Valle d'Aosta), which collaborated in the drafting of this document and with which a collaboration agreement has been established.

This protocol must be considered a preliminary document, which may be modified and updated during the course of the project, on the basis of the experience gained and the results of the analyses carried out.

## 2 Introduzione

Il progetto LIFE URCA PROEMYS ha come obiettivo la conservazione della testuggine palustre europea, *Emys orbicularis*, sul territorio italiano e sloveno, attraverso interventi di rimozione delle testuggini alloctone (con particolare riferimento alle testuggini del genere *Trachemys*), che competono con le testuggini autoctone negli habitat originari, il ripristino ambientale e il rilascio di individui di *Emys orbicularis* riprodotti ex situ.

Le azioni di ripopolamento che prevedono il rilascio di individui riprodotti ex situ, comportano il rischio di introdurre in natura, assieme agli individui rilasciati, agenti patogeni potenzialmente pericolosi, che potrebbero diffondersi nella popolazione selvatica. Le azioni di ripopolamento devono quindi includere, nella propria pianificazione, delle procedure sanitarie specifiche atte a mitigare tale rischio. Tali procedure devono inoltre minimizzare il rischio di zoonosi per gli operatori che vengono in contatto con gli animali.

Allo stesso tempo, le procedure di gestione devono garantire il benessere degli animali in tutte le fasi del progetto e la buona salute degli individui destinati alla liberazione, al fine di ottimizzare la loro sopravvivenza nei siti di ripopolamento.

Secondo il DRA (*Disease Risk Analysis*) elaborato nel corso del progetto LIFEEMYS (LIFE 12NAT/IT/0000395, 2014-2016), nel caso dei testudinati d'acqua dolce la profilassi veterinaria deve prevenire la diffusione di patogeni specifici (vedi di seguito), considerati a rischio medioalto per il potenziale di diffusione tra gli individui selvatici e/o tra gli operatori che vengono in contatto con animali infetti.

Partendo dal DRA elaborato nel corso del progetto LIFEEMYS, il documento presente illustra le procedure sanitarie che saranno adottate dal progetto LIFE URCA al fine di minimizzare i rischi sanitari collegati alle azioni di ripopolamento. Il documento contiene altresì alcune procedure per la gestione degli individui di testuggini alloctone catturate durante le attività di bonifica e destinate ai centri di recupero e detenzione permanente.

Le analisi previste da protocollo saranno effettuate dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV) che ha collaborato alla stesura del presente documento e con il quale Costa Edutainment ha stabilito un accordo di collaborazione.

Il presente protocollo deve essere considerato come un documento preliminare, che potrà essere modificato e aggiornato nel corso del progetto, sulla base dell'esperienza maturata e dei risultati delle analisi effettuate.

### **Sintesi degli obiettivi del Protocollo Veterinario:**

1. Garantire il benessere degli animali durante tutte le fasi del progetto.
2. Minimizzare il rischio di introdurre in ambiente naturale agenti patogeni provenienti dall'ambiente controllato, potenzialmente pericolosi per le popolazioni selvatiche.
3. Garantire la buona salute degli individui di *Emys orbicularis* destinati al rilascio per massimizzare la loro probabilità di sopravvivenza nei siti di ripopolamento.
4. Minimizzare il rischio di zoonosi per gli operatori che vengono in contatto con gli animali.

## 3 Benessere degli animali

Il rispetto del benessere degli animali è un requisito fondamentale del progetto LIFE URCA, sia per questioni etiche, sia per raggiungere gli obiettivi di progetto; condizioni di scarso benessere possono

infatti favorire malattie e aumentare la mortalità. Vengono di seguito illustrate alcuni requisiti minimi necessari per le strutture adibite alla riproduzione e mantenimento delle testuggini e le procedure per la manipolazione e il trasporto degli animali.

### 3.1 Caratteristiche dei centri di riproduzione e allevamento (requisiti minimi)

---

Al fine di garantire il benessere degli animali, tutti i centri di riproduzione e allevamento devono rispettare gli standard minimi di mantenimento e gestione. I centri devono avere uno stabulario outdoor, con condizioni ambientali seminaturali, e uno stabulario indoor, con condizioni ambientali controllate.

- Stabulario outdoor o Lo stabulario outdoor dovrà essere costituito da un minimo di tre vasche: una per riproduttori, una per immaturi, una per animali sotto trattamento. Le vasche dovranno ospitare un numero di animali compatibile con le dimensioni delle vasche stesse, evitando situazioni di sovraffollamento che potrebbero causare stress agli animali e non consentire di mantenere un'adeguata qualità dell'acqua. Il rapporto può essere considerato idoneo quando ogni individuo adulto disponga di 2 mq di superficie; per le testuggini subadulte ed i giovani di
    - 1-3 anni la superficie minima richiesta scende rispettivamente a 1 mq e 0,5 mq. o Le vasche devono prevedere aree idonee per il *basking*, la deposizione delle uova e l'ibernazione, tenendo conto del numero di individui ospitati.
  - Le strutture devono prevedere delle recinzioni e copertura di rete metallica adeguate a evitare la fuga delle testuggini e l'ingresso di predatori.
  - Le vasche devono essere munite di impianti di ricircolo e depurazione dell'acqua, con filtri meccanici e/o di fitodepurazione e/o sistema di ricambio periodico dell'acqua.
  - Le strutture devono essere dotate di impianto di videosorveglianza.
- Stabulario indoor o Lo stabulario indoor deve essere costituito da almeno una vasca per ospitare gli individui neonati, munita di impianto di illuminazione a lampade infrarossi e UVB, con fotoperiodo simile a quello naturale. o Lo stabulario indoor deve prevedere inoltre una incubatrice artificiale, che potrà essere utilizzata per migliorare il successo riproduttivo delle testuggini e/o per controllare il rapporto dei sessi (regolando la temperatura di incubazione delle uova).

### 3.2 Manipolazione degli animali

---

La manipolazione degli animali può essere causa di stress e deve essere limitata quanto possibile. Sarà comunque necessario isolare e manipolare gli animali per le visite veterinarie (valutazione dello stato di salute di base), tamponi, prelievi di sangue, applicazione di microchip e marcaggio su carapace. La manipolazione deve sempre essere svolta da personale esperto, utilizzando le necessarie precauzioni per evitare che gli animali possano ferirsi o ferire l'operatore (vedi 6.1). Quando possibile è sempre preferibile svolgere più operazioni nella stessa occasione per evitare di dover isolare e manipolare l'animale più volte.

### 3.2.1 Valutazione dello stato di salute di base

La valutazione dello stato di salute di base deve essere effettuata da un veterinario esperto che, sulla base delle evidenze, deciderà se procedere con ulteriori indagini. Tale valutazione richiede un'attenta osservazione dell'animale sotto diversi punti di vista ad esempio:

- comportamento
- rapporto lunghezza/peso
- integrità carapace/piastrone, della cute e degli arti
- stato delle mucose
- nelle femmine eventuale presenza di uova già calcificate (tramite palpazione)

### 3.2.2 Tampone orale

Il tampone orale verrà utilizzato per la ricerca di patogeni (Herpesvirus, vedi 4.1, 4.2) nelle testuggini autoctone (*Emys orbicularis*). Tale operazione deve essere effettuata da personale esperto (veterinari o biologi autorizzati alla manipolazione degli animali). L'animale deve essere contenuto in modo che non possa ferire se stesso o l'operatore (vedi anche capitolo 6). Il tampone scelto deve essere di dimensioni adeguate e va sfregato sulle mucose della cavità orale (lingua/palato/guance) (vedi Manuale ISPRA).

### 3.2.3 Prelievo di sangue

Il prelievo di sangue verrà utilizzato per ottenere campioni ematici per l'analisi genetica delle testuggini autoctone (*Emys orbicularis*). Il prelievo di sangue deve essere effettuato da personale veterinario esperto. Il volume massimo di prelievo consigliato non deve superare il 0,4-05 % del peso corporeo dell'animale (vedi Manuale ISPRA).

### 3.2.4 Applicazione di microchip

L'applicazione del microchip deve essere effettuata da un veterinario esperto. Il microchip non può essere applicato su individui troppo giovani (lunghezza inferiore a circa 5-6 cm) o in condizioni di salute precaria (vedi 3.2.1) a discrezione del veterinario.

### 3.2.5 Marcaggio sul carapace

Il marcaggio sul carapace verrà utilizzato principalmente sugli individui selvatici di *Emys orbicularis* catturati durante le attività di monitoraggio e sulle testuggini alloctone catturate durante le attività di bonifica e destinate ai centri di recupero. Il marcaggio sul carapace deve essere effettuato da personale esperto e autorizzato, per evitare di provocare lesioni agli animali, e non può essere praticato ad animali molto giovani (peso minimo intorno ai 50 g). Il numero di marcatura viene attribuito praticando piccoli tagli sulle placche marginali del carapace, mediante un codice che consente di marcare fino a 1.500 animali con un massimo di 8 tagli: per questo scopo viene utilizzato un seghetto ben affilato e disinfettato. Il taglio dovrà interessare la parte cheratinica dello scudo e soprattutto negli individui giovani, dovrà essere poco profondo. In seguito al marcaggio si procederà alla disinfezione dei tagli, a scopo profilattico.

## 3.3 Trasporto degli animali

---

Il trasporto degli animali può essere causa di stress per gli animali e deve quindi essere limitato quanto possibile nella durata ed effettuato in modo corretto per minimizzare lo stress. Al fine di mantenere le testuggini in condizioni ottimali d'umidità, esse vanno poste singolarmente o in piccoli gruppi all'interno di robusti sacchi di juta (o altri tessuti simili) bagnati, i quali saranno sistemati all'interno di contenitori termoisolanti (igloo, scatole di polistirolo). L'aria all'interno dei contenitori dovrà essere cambiata a intervalli regolari.

## 4 Gestione sanitaria delle testuggini autoctone (*Emys orbicularis*)

Il DRA elaborato nel corso del progetto LIFEEMYS (vedi Introduzione) identifica i seguenti organismi come potenziali patogeni per *Emys orbicularis* a rischio medio/alto: Herpesvirus, *Mycobacterium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Salmonella spp.*. Gli stessi organismi costituiscono un potenziale infettivo per gli operatori che dovessero venire a contatto con animali infetti.

Il protocollo veterinario di LIFE URCA PROEMYS prevede quindi una caratterizzazione preliminare dello stato sanitario di ciascun centro di riproduzione, in riferimento ai patogeni sopra menzionati, analizzando tutti gli individui già presenti nei diversi centri e i nuovi animali in ingresso.

Il contingente di testuggini palustri presente in ciascun centro di riproduzione deve essere mantenuto in condizioni di isolamento, evitando, per quanto possibile, contatti diretti con animali estranei della medesima specie e/o di specie diverse.

### 4.1 Gestione sanitaria degli individui di *Emys orbicularis* già presenti nei centri di riproduzione (riproduttori) e degli animali in ingresso

Per una caratterizzazione preliminare dello stato sanitario di ciascun centro di riproduzione, le seguenti analisi dovranno essere effettuate su tutti gli individui già presenti nei diversi centri e sui nuovi animali in ingresso:

- visita medica per valutazione dello stato di salute di base;
- coltura fecale per ricerca di *Salmonella spp.* su campione fecale (anche su pool di feci, max 10 individui);
- coltura fecale per la ricerca di *Mycobacterium spp.* su campione fecale (anche su pool di feci, max 10 individui);
- esame fecale per la ricerca di protozoi ed elminti (inclusa *Entamoeba spp.*) (anche su pool di feci, max 10 individui);
- tampone orale per la ricerca di Herpesvirus;
- applicazione di microchip di riconoscimento.

In caso di risultati positivi nelle analisi di screening, sarà necessario attuare delle procedure per limitare quanto possibile la diffusione di patogeni all'interno del centro:

- isolamento degli individui potenzialmente infetti e trattamento secondo le indicazioni del veterinario competente;
- quarantena e monitoraggio degli individui presenti nella stessa vasca (solo in caso di patologia potenzialmente infettiva).

### 4.2 Gestione sanitaria degli individui di *Emys orbicularis* riprodotti ex situ e destinati a ripopolamento

Se le indagini preliminari descritte al punto precedente non rilevano particolari situazioni di criticità, gli individui riprodotti ex situ nei rispettivi centri e destinati al rilascio dovranno essere sottoposti alle seguenti analisi:

- visita medica per valutazione stato di salute di base;
- coltura fecale per *Salmonella spp.* su pool di feci (max 10 individui);
- coltura fecale per la ricerca di *Mycobacterium spp.* su pool di feci (max 10 individui);
- esame fecale per la ricerca di protozoi ed elminti (inclusa *Entamoeba spp.*) su pool di feci (max 10 individui);
- tamponi orali per la ricerca di Herpesvirus (a campione su 20 % degli individui);
- applicazione di microchip di riconoscimento.

In caso di risultati positivi nelle analisi di screening, sarà necessario attuare delle procedure per limitare quanto possibile la diffusione di patogeni all'interno del centro:

- isolamento degli individui potenzialmente infetti e trattamento secondo le indicazioni del veterinario competente;
- quarantena e monitoraggio degli individui presenti nella stessa vasca (solo in caso di patologia potenzialmente infettiva). Gli individui non potranno essere liberati prima di un'analisi di controllo da effettuarsi al termine del periodo di quarantena.

#### **4.3 Gestione sanitaria degli individui di *Emys orbicularis* catturati durante le attività di bonifica e di monitoraggio nei siti di ripopolamento**

Per quanto riguarda gli individui di *Emys orbicularis* catturati nel corso delle attività di bonifica (cattura e rimozione delle testuggini alloctone) e di monitoraggio nei siti di ripopolamento, il protocollo veterinario non prevede analisi specifiche.

Sono comunque previste le seguenti operazioni:

- raccolta dati morfometrici per valutazione stato di salute (body condition score) e sessaggio;
- marcatura su carapace

#### **4.4 Gestione sanitaria degli individui di *Emys orbicularis* deceduti**

Tutti gli individui di *Emys orbicularis* deceduti dovranno essere sottoposti a necropsopia. L'esame necroscopico verrà effettuato da IZSPLV.

## **5 Gestione sanitaria testuggini alloctone**

In questa sezione vengono descritte le procedure sanitarie per la gestione delle testuggini alloctone che saranno catturate nei siti di ripopolamento durante le attività di bonifica.

### **5.1 Gestione sanitaria testuggini alloctone destinate ai centri di detenzione**

Per quanto riguarda le testuggini alloctone destinate ai centri di detenzione, il protocollo veterinario non prevede analisi specifiche. Dal momento che gli animali sono destinati alla detenzione permanente, dovranno essere gli stessi centri di recupero, assieme al proprio veterinario di

riferimento, a effettuare eventuali analisi sanitarie in base alle proprie procedure di profilassi e alla legislatura vigente.

Di seguito le procedure di gestione previste dal progetto:

- visita medica per valutare lo stato di salute di base<sup>1</sup>;
- marcaggio su carapace, in luogo del chip originariamente previsto, rispettando le procedure di manipolazione previste (vedi 3.2.5) e utilizzando il codice identificativo del progetto LIFE URCA (vedi allegato 1);
- registrazione di tutti gli individui in ingresso al centro e in uscita (in caso di decesso o trasferimento ad altro centro di detenzione).

<sup>1</sup>La struttura di destinazione, in accordo con il proprio veterinario di riferimento, potrà eventualmente valutare la necessità di analisi diagnostiche, quarantena, terapia, eutanasia.

## 5.2 Gestione sanitaria delle testuggini alloctone decedute

---

Le testuggini alloctone decedute dovranno essere smaltite secondo le procedure previste dalle rispettive Aziende Sanitarie Locali (inceneritore).

## 6 Procedure per la protezione individuale e per la disinfezione degli ambienti

Dal momento che i testudinati possono ospitare agenti patogeni potenzialmente infettivi per gli operatori che ne dovessero venire a contatto, è opportuno adottare misure di prevenzione, sia per la protezione individuale durante la manipolazione degli animali, sia per la sanificazione degli ambienti.

### 6.1 Procedure sanitarie per la protezione individuale

---

Di seguito vengono elencate le misure di protezione individuale minime necessarie per gli operatori che vengono in contatto con gli animali:

- la manipolazione delle testuggini (autoctone e alloctone) deve sempre prevedere l'utilizzo di guanti protettivi per prevenire lesioni e infezioni;
- in caso di animali con malattia zoonotica (anche sospetta) utilizzare, in aggiunta ai guanti, mascherina igienica per coprire naso e bocca;
- al termine di ogni operazione lavare sempre le mani con acqua e sapone e/o gel igienizzante.

### 6.2 Procedure sanitarie per la disinfezione degli ambienti

---

Tutti gli elementi venuti in contatto con gli animali (testuggini autoctone e alloctone) devono essere lavati e disinfettati dopo ogni utilizzo con prodotti igienizzanti non tossici. Tale procedura riguarda in particolar modo gli strumenti e le strutture utilizzati per il controllo e l'ispezione degli animali (bilancia, strumenti di misurazione, banchi di appoggio, etc.), i contenitori per il trasporto e per la stabulazione temporanea degli animali.



## 7 Bibliografia di riferimento

1. Aguirre A.A., Ostfeld R.S., Tabor G.M. (2002). Conservation medicine: ecological health in practice. Oxford University Press, Oxford.
2. Armstrong, D., Jakob-Hoff R., Seal U. S. (2003). Animal movements and disease risk – a workbook. Conservation Breeding Specialist Group (SSC/IUCN). Apple Valley, Minnesota.
3. AVMA (2013). Guidelines for the Euthanasia of Animals Edition
4. Bailey R. (1993). The False Prophets of Environmental Apocalypse. San Martin's Press, New York, 226.
5. Ballou J.D. (1993) Assessing the risks of infectious diseases in captive breeding and reintroduction programs *J zoo and wildfile Med* 24 (3) 327-335
6. Barnard S. M., Upton S.J. (1994). A Veterinary guide to the parasites of reptiles. ISBN 0-89464-832-2.
7. Brown J.D., Sleeman J.M. (2002). Morbidity and mortality of reptiles admitted to the Wildlife Centre of Virginia. *J. Wild. Dis.* 38, 699-705.
8. Burke R. (1991). Relocations, repatriations, and translocations of amphibians and reptiles: taking a broader view. *Herpetologica* 47, 350-357.
9. Camin J.H., Moss W.W., Oliver J.H. (1967). Cloacaridae, a new family of cheyletoids mites from the cloaca of aquatic turtles. *J. Med Entomology* 4, pag. 261-272.
10. Canadian Cooperative. (2001). Wildlife Health Centre.
11. Cherry S. (2005). A clean bill of health: practice hygiene. *In Practice* 27, 548-551.
12. Cooper J.E., Jackson O.F. (1981). Disease of Reptilia. vol. 1 & 2, Accademic Press, New York.
13. Cunningham A.A. (1996). Disease Risks of wildlife translocations. *Cons. Biol.* 10, 349-353.
14. Davidson W.R., Nettles V.F. (1992). Relocation of wildlife: identifying and evaluation disease risks. *Trans. N. am. Wild: Nat. Resour. Conf.* 57, 466-473.
15. Davidson W.R., Nettles V.R. (1997). Field manual of wildlife disease in the southeastern United States. Southeastern Cooperative Wildlife Disease Study, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens.
16. Deem S.L., Terell S.P., Forrester D.J. (1998). A retrospective study of morbidity and mortality of raptors in Florida. *J. Zoo. Wild. Med.* 29, 160-164.
17. Dodd, C.K., Seigel R.A. (1991) Relocation, repatriation and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work? *Herpetologica* 47 (3) 336-350.
18. Duszynski D.W., Upton S.J., Couch L. (2000). Coccidia (Eimeria and Isospora) of Chelonia. NSF-PEET DEB 9521687.
19. Ewen J.G., Armstrong D.P., Parker K.A., Seddon P.J. (2011). Reintroduction Biology : integrating science and management. Ed Wiley-Blackwell pg 337-359.
20. Fowler M.E., Miller R.E. (1999). Zoo and wild animal medicine: current therapy 4. Saunders company pag 240.
21. Fox G.A. (2001). Wildlife and sentinels of human health effects in the Great Lakes- St. Lawrence Basin. *Environ. Health Perspect.* 109, 853-861.0
22. Frank W. (1981). Endoparasites in disease of the reptilian. Vol 1 Ed. J.A Cooper and O.F. Jackson Academic Press London.

23. Freitas Raso T.D., Godoy S.N., Milanelo L. (2004). An outbreak of Chlamydia in captive blue-fronted Amazon parrots (*Amazona festiva*) in Brazil. *J. Zoo. Wild. Med.* 35, 94-96.
24. Gartrell B.D., Kirk E.J. (2005). Euthanasia of Reptiles in New Zealand: Current Issues and Methods *Kokako* 12 (1) 12-15.
25. Gibbs J.P., Shriver W.G. (2002). Estimating the effects of road mortality on turtle populations. *Con. Biol.* 16, 1647-1652.
26. Goldstein T., Mazzei J.A.K., Gulland F.M.D. (2004). The transmission of phocine herpesvirus-1 in rehabilitating and free-ranging Pacific harbor seals (*Phoca vitulina*) in California. *Vet. Microbiol.* 103, 131-141.
28. Harwood V.J., Butler J., Parrish D., Wagner V. (1998). Isolation of Fecal Coliform Bacteria from the Diamondback Terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). Department of Natural Sciences, University of North Florida, Jacksonville, Florida 32224-2645.
29. Hidalgo-Vila J., Diaz-Paniagua C., De Frutos-Escobar C., Jimenez-Martinez C., Perez-Santigosa N. (2007). Salmonella in free living terrestrial and aquatic turtles *Veterinary Microbiology* 119 311–315.
30. Hidalgo-Vila J., Martinez-Silvestre A., Ribas A., Casanova J.C., Santigosa, Diaz-Paniagua C. (2010). Pancreatitis Associated with the Helminth *Serpinema microcephalus* (Nematoda: Camallanidae) in Exotic Red-Eared Slider Turtles (*Trachemys scripta elegans*).
31. Honigberg B.M. (1950). Intestinal flagellates of amphibians and reptiles. Doctoral dissertation, University of California, Berkeley, CA.
32. Holladay S.D., Wolf J.C., Smith S.A. (2001). Aural abscess in wild-caught box turtles (*Terrapene carolina*): possible role of organochlorine-induced hypovitaminosis A. *Ecotox. Environ. Safety* 48, 99-106.
33. ISPRA (2022). Manuale operativo per il prelievo di campioni biologici finalizzato alle analisi genetiche nell'ambito della Convenzione di Washington (CITES).
3. Jacobson E.R., Gaskin J.M., Brown M.B. (1991). Chronic respiratory tract disease of free-ranging desert tortoise (*Xerobates agassizii*). *J. Wildl. Dis.* 27, 296-316.
34. Jacobson, E.R. (1993). Implications of infectious diseases for captive propagation and introduction programs of threatened/ endangered reptiles *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24 (3): 245-255
35. Jacobson E.R., Schumacher J., Green M.E. (1992). Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematological and plasma biochemical determinations in the desert tortoise (*Xerobates agassizii*). *Copeia*, 237-241.
36. Jacobson E. R., Behrer J.L., Jarchow J. L. (1999). Health assessment of chelonians and release into the wild. *Zoo and wild animal medicine: current therapy*, 4 chapter 30, pag. 232-241. W.B. Saunders & Co., Philadelphia.
37. Jenkins M.D. (1995). Tortoises and freshwater turtles: the trade in Southeast Asia. International, United Kingdom.
38. Jenkins S.R., Perry D.B., Winkler W.G. (1988). The ecology and epidemiology of raccoon rabies *Review of infectious diseases* 10: S620-625.
39. Jenkins S.R., Winkler W.R. (1987). Descriptive epidemiology from an epizootic of raccoon rabies in the middle Atlantic states. *Am. J. Epidemiol.* 126, 429-437.
40. Jesu R., Mamone A., Lamagni L., Ortale S. (2000). Nuovi dati sulla presenza del Pelodite punteggiato (*Pelodytes punctatus*) e della Testuggine palustre europea (*Emys orbicularis*) in Liguria.
41. Giacoma C. (2000). *Atti I Congr. Naz. Società Herpetologica Italiana*. Mus. Reg. Sc., 611–618, Torino.

42. Jesu R., Salvidio S., Lamagni L., Ortale S., Piombo R., Mattioli F., Mamone A., Mulattiero F. (2000). The European Pond Terrapin in Liguria (NW Italy) status and conservation measures undertaken. Proceedings 2nd Symposium on *Emys orbicularis*, 123–126, Gonfaron.
43. Johnson C.A., Griffith J.W., Tenorio P., Hytrek S., Lang C.M. (1998). Fatal trematodiasis in research turtles. *Lab Anim Sci* 48, 340-343.
44. Karesh W.R. (1995). Wildlife rehabilitation: additional considerations for developing countries. *J. Zoo. Wildl. Med.* 26, 2-9.
45. Kolluru R.V. (1996). Risk assessment and management: an unified approach. In Kolluru R.V., Bartel S., Pitblado R., Stricoff S. (eds.): Risk assessment and management handbook for environmental, health and safety professionals. McGraw-Hill, New York, 1.3-1.41.
46. Kovačević A.S., Ozvegy J., Krstić N., Rusvai M., Jakab C., Stanimirović Z., Becskei Z. (2013). Skin and skeletal system lesions of european pond turtles (*Emys orbicularis*) from natural habitats. *Acta Vet Hung* 11:1-14.
47. Labbe A. (1893). *Coccidium delagei* coccidie nouvelle parasite des tortues d'eau douce. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 1: pag. 267-280.
48. Le Dien D., Broad S. (1995). Investigations into Tortoise and Freshwater Turtle Trade in Vietnam. IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland and Cambridge, U.K., IUCN, 34-40.
49. Leighon F.A. (2002). Health risk assessment of the translocation of wild animals. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 21 187-195.
50. Mc Arthur S., Wilkinson R., Meyer J. (2004). *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Blackwell Publishing Ltd.
51. Mader D.R. (2006). *Reptile medicine and surgery*. 2nd ed Saunders-Elsevier pag. 564-568.
53. Martin D.R. (1972). Distribution of helminth parasites in turtles native to Southern Illinois *Trans. Ill. Acad. Sci* 65, 1-67.
54. Mihalca AD., Racka K., Gherman C., Ionescu, D.T. (2007). Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from Romania. *Parasitol Res.*
55. Miller P.S. (2007). Tools and techniques for disease risk assessment in threatened wildlife conservation programmes. *Int.Zoo.Yb* 41:38-51.
56. Mishra G.S., Gonzalez J.P. (1978). Les parasites des tortues d'eau douce en Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 55 (3): 303-26.
57. Murray, N., Macdiarmid S. C., Wooldridge M., Gummow B., Morley R. S., Weber S. E., Giovannini A., Wilson D. (2004). Handbook on import risk analysis for animals and animal products. Office of International Epizootics (OIE), Paris [http://www.oie.int/doc/en\\_document.php?numrec=1048503](http://www.oie.int/doc/en_document.php?numrec=1048503).
58. Nagano N., Shinji O., Nagano Y. and Arakawa Y. (2006). A severe *Salmonella enterica* Serotyphi B Infection in a Child Related to a Pet Turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Jpn. Infect. Dis.*, 59, 132-134.
59. National Geographic Society (1987). *Field guide to the birds oh North America*. The society, Washington, D.C.
60. Nielsen N.O. (1992). Ecosystem health and veterinary medicine. *Can. Vet. J.* 33, 23-26.
61. Nielsen N.O. (1995). Ecosystem in Health: Application of the concept and wildlife as indicators. *Proct. Joint. Conf. Am. Assoc. Zoo. Vet. Wild. Dis. Assoc. Am. Assoc. Wildl. Vet.*, Lansing, Minch, 6-11.
62. Office International des Epizooties (OIE). (2001). Risk analysis, section 1.3. In: international animal health code: mammals, birds and bees, 10<sup>th</sup>edition, OIE, Paris, 21-35.

63. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA). (1997). Risk assessment frameworks: a general framework for animal health risk assessment. OMAFRA, Toronto (<http://www.omafra.gov.on.ca/english/environment/bmp/series.htm>).
64. Ovezmukhammedov A. (1978). Coccidiofauna of *Emys orbicularis* Linnaeus in Turkmenistan. Izvestia Akademii Nauk Turkmenia SSR seriya Biologicheskikh Nauk (No.1): pag. 83-86.
65. Patrick M.E., Gilbert M.J., Blaser J.M., Tauxe R.V., Wagenaar J.A., Fitzgerald C. (2013). Human Infections with New Subspecies of *Campylobacter fetus*. Emerging Infectious Diseases • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 19, No. 10.
66. Pizzi, R. (2009). Veterinarians and taxonomic chauvinism: the dilemma of parasite conservation. Journal of Exotic Pet Medicine 18:279–282.
67. Plowright W. (1982). The effect of rinderpest and rinderpest control on wildlife in Africa. Symposium of the Zoological society of London 50: 1-28.
68. Ramsay E.C., Montali M.J., Orley M., Stephensen C.B., Holmes K.V. (1989). Callitrichid hepatitis: epizootiology of a fatal hepatitis in zoo tamarins and marmosets. Journal Zoo Wildlife Medicine 20, 178-183.
69. Rapport D.J. (1989). What constitutes ecosystem health. Perspect. Biol. Med. 33, 120-132.
70. Regolamento (CE) n. 1/2005 del Consiglio del 22 dicembre 2004 “sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate che modifica le direttive 64/432/CEE e 93/119/CE e il regolamento (CE) n. 1255/97” Gazzetta ufficiale n. L 003 del 05/01/2005 pag. 0001 – 0037
71. Ribble C.S. (1995). Applying the concept of ecosystem health within the veterinary curriculum. Proceedings joint conference AAZV, WDA, AAWV, Saskatoon.
72. Reichenow E. (1921). Die Coccidian. Handbuch der Pathogenen Protozoen. Von Provazek, S.J.M. Editor Johann Ambrosius Barth, Leipzig. pp. 1136-1277.
73. Sainsbury A.W., Armstrong D.P., Ewen J.G. (2011). Methods of disease risk analysis for reintroduction programs.
75. Sainsbury A.W., Vaughan-Higgins R.J. (2012). Analyzing disease risks associated with translocations. Conservation Biology 26 (3) 442-452.
76. Sancho Alcayde V., Lacomba Andueza J. I., Bataller Gimeno J. V., Pradillo Carrasco A., 2015 - *Manual para el Control y Erradicación de Galápagos Invasores*. . Colección Manuales Técnicos de Biodiversidad, 6. Conselleria d’Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic Desenvolupament Rural. Generalitat Valenciana. Valencia.
77. Schaeffer D.J., Herricks E., Kester H. (1988). Ecosystem health: I. Measuring ecosystem health. Environ. Mgmt. 12, 445-455.
78. Schaffer G.D., Davison W.R., Nettles V.F., Roller E.A. (1981). Helminth parasites of translocated raccoons (*Procyon lotor*) in the Southeastern United States. J. Wildl. Dis. 17, 217-227.
79. Schopler R.L., Hall A.J., Cowen P. (2005). Survey of wildlife rehabilitators regarding rabies vector species. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 1568-1572.
80. Segade P., Crespo C., Ayres C., Cordero A., Arias M.C., García-Estévez J.M., Iglesias Blanco R. (2006). Eimeria species from the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species. J Parasitol.: pag. 69-72.
81. Sharma V. K., Kaura Y. K., Singh I. P. (1974). Frogs as carriers of Salmonella and Edwardsiella. Antonie van Leeuwenhoek Volume 40, Issue 1, pp 171-175.

82. Sleeman J.M., Clark E.E. (2003). Clinical wildlife medicine: a new paradigm for a new century. *J. Avian. Med. Surg.* 17, 33-37.
83. Soccini C., Ferri V. (2004). Bacteriological screening of *Trachemys scripta elegans* and *Emys orbicularis* in the Po plain (Italy) *Biologia, Bratislava*, 59/Suppl. 14: 201—207.
84. Telford S.R. (1971). Parasitic diseases of reptiles. *Javma* 159:1644-1652.
85. Verneau O., Palacios P., Alday M., Billard E., Allienne J.F, Basso C., Du Preez L.H. (2011). Invasive species threat: parasite phylogenetics reveals patterns and processes of host-switching between non-native and native captive freshwater turtles. *Parasitology Cambridge University Press* doi:10.1017/S003118(2011)000333.
86. Virginia Department of Game and Island Fisheries, (2002).
87. Warner R.E. (1968). The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *Condor* 70, 101-120.
88. Wendell M., Sleeman J.M., Kratz G. (2002). Retrospective review of morbidity and mortality of raptors admitted to Colorado State University, Veterinary Teaching Hospital, *J. Wildl. Dis.* 38, 101106.
89. Woodford, M.H. (2000). Quarantine and Health Screening Protocols for Wildlife prior to Translocation and Release into the Wild. IUCN Species Survival Commission's Veterinary Specialist Group, Gland, Switzerland, the Office International des Epizooties (OIE), Paris, France, Care for the Wild, U.K., and the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Switzerland.
90. Yildirimhan H.S., Sahin R. (2005). The helminth fauna of *Emys orbicularis* (European pond turtle - Linnaeus, 1758) living in freshwater. *Turkiye Parazitol Derg.*;29(1):56-62.
91. Zheng-Chao Tu, Zeitlin C., Gagner J.P., Keo T., Hanna B., Blaser M. (2004). *Campylobacter fetus* of Reptile Origin as a Human Pathogen. 42(9):4405. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4405-4407.

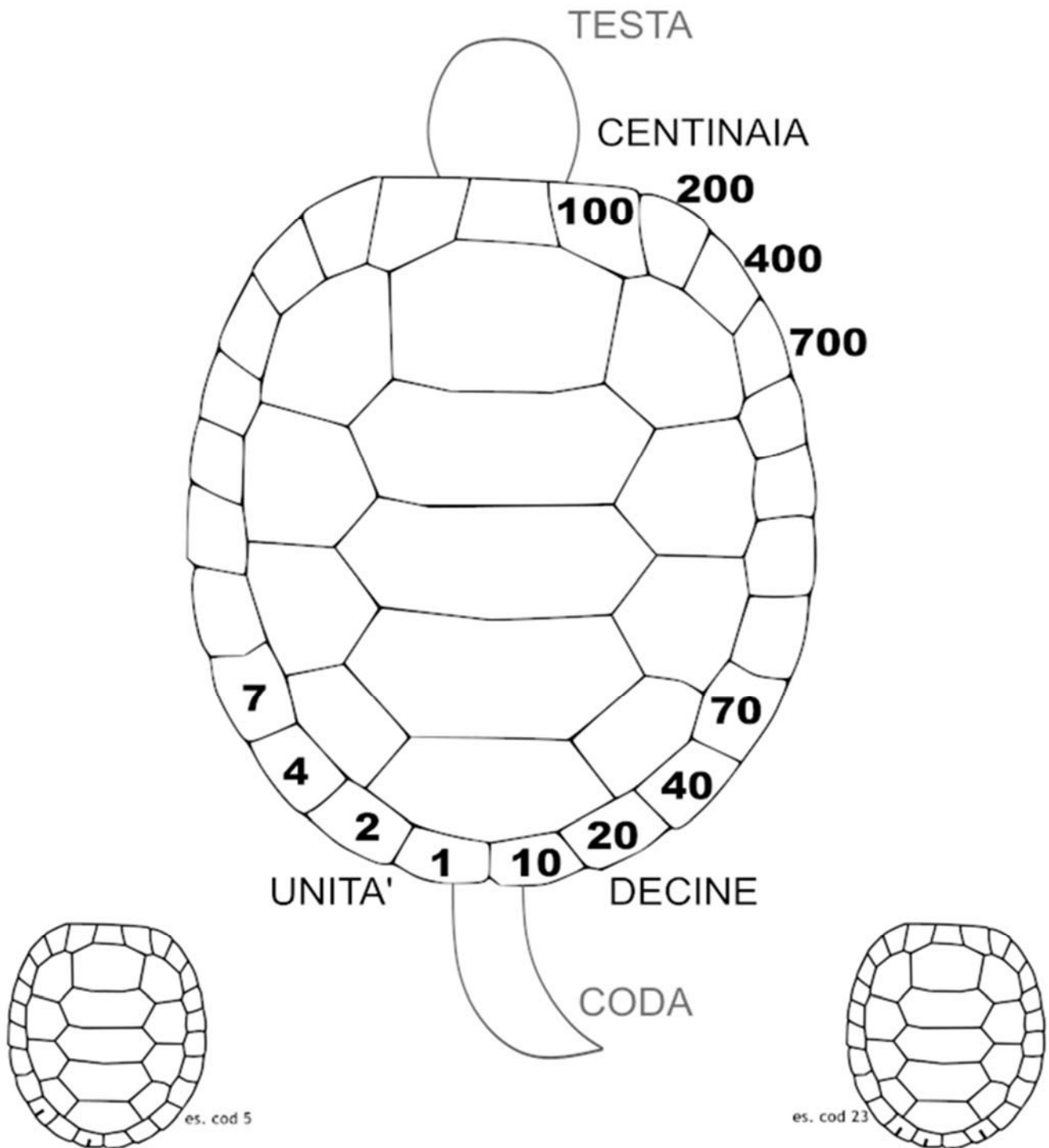
MARCATURA CODICE SITO  
*Trachemys spp.* SU PIASTRONE

TESTA



# MARCATURA PROGRESSIVA ESEMPLARI

## *Trachemys spp.* SU CARAPACE



<b>Regione</b>	<b>SITO</b>	<b>AREA</b>	<b>Cod. Piastrone Trachemys</b>
Abruzzo	IT7140215	Serranella	<b>1</b>
Basilicata	IT9210142	Lago Pantano di Pignola	<b>2</b>
Basilicata	IT9220055	Costa Ionica Foce Sinni	<b>3</b>
Basilicata	IT9220080	Costa Ionica Foce Agri	<b>4</b>
Campania	IT8050021	Medio corso del Fiume Sele - Persano	<b>5</b>
Emilia- Romagna	IT4020003	Torrente Stirone	<b>6</b>
Emilia- Romagna	IT4020006	Monte Pinzera	<b>7</b>
Emilia- Romagna	IT4020017	Aree delle risorgive di Viarolo, Bacini di Torrile, Fascia golenale del Po	<b>8</b>
Emilia- Romagna	IT4020021	Medio Taro	<b>9</b>
Emilia- Romagna	IT4020025	Parma Morta	<b>10</b>
Emilia- Romagna	IT4030007	Fontanili Corte Valle Re	<b>11</b>
Emilia- Romagna	IT4030011	Casse di espansione del Secchia	<b>12</b>
Emilia- Romagna	IT4040007	Salse di Nirano	<b>13</b>
Emilia- Romagna	IT4040015	Valle di Gruppo	<b>14</b>
Emilia- Romagna	IT4050001	Gessi Bolognesi	<b>15</b>
Emilia- Romagna	IT4050019	La Bora	<b>16</b>
Emilia- Romagna	IT4060015	Bosco della Mesola, Bosco Panfilia, Bosco di Santa Giustina, Valle Falce, La Goara	<b>17</b>
Emilia- Romagna	IT4070006	Pialassa dei piomboni, Pineta di Punta Marina	<b>18</b>
Emilia- Romagna	IT4070011	Vena del Gesso Romagnola	<b>19</b>
Emilia- Romagna	IT4070021	Biotopi di Alfonsine e Fiume Reno	<b>20</b>
Emilia- Romagna	IT4090002	Torriana, Montebello, Fiume Marecchia	<b>21</b>
Lazio	IT6030023	Macchia Grande di Focene e Macchia dello Stagneto	<b>22</b>
Liguria	IT1324896	Lerrone - Valloni	<b>23</b>
Liguria	IT1324909	Torrenti Arroscia e Centa	<b>24</b>
Lombardia	IT2050005	Boschi della Fagiana	<b>25</b>
Lombardia	IT2050006	Bosco Vanzago	<b>26</b>
Lombardia	IT2080002	Basso Corso del Ticino	<b>27</b>
Marche	IT5310022	Fiume Metauro da Piano di Zucca alla foce	<b>28</b>
Marche	IT5340001	Litorale Porto d'Ascoli	<b>29</b>
Piemonte	IT1120007	Palude di San Genuario	<b>30</b>
Piemonte	IT1180005	Ghiaia Grande	<b>31</b>



Puglia	IT9140005	Torre Guaceto	<b>32</b>
Toscana	IT5170002	Selva Pisana - Cornacchiaia	<b>33</b>
Veneto	IT3220005	Ex Cave di Casale - Vicenza	<b>34</b>
Veneto	IT3250017	Cave Noale	<b>35</b>
Veneto	IT3250023	Lido di Venezia biotopi litoranei	<b>36</b>
Veneto	IT3250030	Laguna medio-inferiore di Venezia	<b>37</b>
Veneto	IT3250032	Bosco Nordio	<b>38</b>
Veneto	IT3270007	Gorghi Trecenta	<b>39</b>

**ALLEGATO 3.**  
**Richiesta di parere per controllo Trachemys**

Alla cortese attenzione di:

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

c/o

Regione

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

PEC

**RICHIESTA DI PARERE ALLO SVOLGIMENTO DI ATTIVITÀ DI CONTROLLO DI CUI AL D.lgs. 230 DEL 15 DICEMBRE 2017 S.M.I. E "PIANO NAZIONALE DI GESTIONE DELLA TESTUGGINE PALUSTRE AMERICANA (TRACHEMYS SCRIPTA)"**

*Richiedente* \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*Codice Fiscale e Partita IVA* \_\_\_\_\_

*Indirizzo* \_\_\_\_\_

*Telefono* \_\_\_\_\_ *E-mail* \_\_\_\_\_

*Responsabile scientifico (se diverso dal richiedente)* \_\_\_\_\_

*Ente di appartenenza* \_\_\_\_\_

*Telefono* \_\_\_\_\_ *E-mail* \_\_\_\_\_

## PREMESSA

### Inquadramento del progetto nell'ambito delle problematiche nazionali e/o internazionali di ricerca e conservazione inerenti la specie

#### - Riferimenti alla normativa nazionale e internazionale in materia

*E. orbicularis* è una specie protetta, inclusa negli Allegati II e IV della Direttiva Habitat 92/43/CEE, e il suo commercio è proibito dalla Convenzione di Berna del 1979. Secondo il più recente rapporto disponibile per l'Italia, (Art. 17 della Direttiva Habitat report 2013-2018) *E. orbicularis* presenta uno stato di conservazione sfavorevole inadeguato o cattivo (U1 e U2, per Slovenia e Italia, rispettivamente) nelle principali aree biogeografiche in cui è presente, ed in particolare nell'aree di pertinenza del presente progetto (area biogeografica "continentale" e "mediterranea") con popolazioni considerate in "diminuzione". Questo è in linea col fatto che nell'ultimo secolo la specie ha affrontato un drastico declino dovuto all'estensivo prosciugamento e bonifica delle aree umide. La Lista Rossa Europea classifica *E. orbicularis* come quasi minacciata (NT): la valutazione è stata effettuata però nel 2004 e appare del tutto anacronistica rispetto al crollo che la specie ha registrato all'interno dell'areale europeo, e come anche evidenziato nella stessa Lista Rossa necessita urgentemente di un aggiornamento (<https://www.iucnredlist.org/species/7717/97292665>). La Lista Rossa Italiana considera la specie in pericolo (EN) (<http://www.iucn.it/scheda.php?id=1273952988>, dati del 2013),

La testuggine palustre americana *Trachemys scripta* (in particolare la sottospecie *T. s. elegans*), è stata inclusa dal Gruppo specialistico sulle specie invasive dell'IUCN (IUCN SSC Invasive Species Specialist Group) tra le 100 peggiori specie invasive al mondo (Lowe et al., 2000).

Attualmente *Trachemys scripta* è presente in tutta Italia, comprese le isole maggiori. La specie risulta maggiormente diffusa soprattutto nel nord Italia, ma anche nel centro Italia, con particolare riferimento a Toscana e Lazio, mentre la distribuzione nel sud Italia e nelle isole risulta più localizzata e puntiforme. *Trachemys scripta* è stata fin da subito inclusa nel primo elenco di specie esotiche invasive di rilevanza unionale del 2016, adottato dal Regolamento di esecuzione n. 2016/1141, recepito anche a livello nazionale dal DLgs n. 230/2017 di adeguamento al regolamento europeo precedentemente citato. Ai sensi dell'art. 6 di tale decreto le specie di rilevanza unionale non possono essere:

- introdotte o fatte transitare nel territorio nazionale, anche sotto sorveglianza doganale;
- detenute, anche in confinamento, tranne nei casi in cui la detenzione avvenga nel contesto di misure di gestione o di eradicazione disposte ai sensi del suddetto decreto; · allevate o coltivate, anche in confinamento;
- trasportate o fatte trasportare nel territorio nazionale, tranne nei casi in cui il trasporto avvenga nel contesto di misure di gestione o di eradicazione disposte ai sensi del suddetto decreto;
- vendute o immesse sul mercato;
- utilizzate, cedute a titolo gratuito o scambiate;
- poste in condizioni di riprodursi o crescere spontaneamente, anche in confinamento;
- rilasciate nell'ambiente.

Sono previste deroghe ai divieti sopra richiamati (art. 8) solo per autorizzazioni che abilitano istituti a svolgere attività di ricerca o conservazione ex situ oppure, in relazione alla salute umana, per la produzione scientifica e il conseguente uso medico di prodotti derivati da specie di rilevanza unionale.

Il D.Lgs 230/2017 prevede agli artt. 19 e 22 che le Regioni, le Province autonome di Trento e Bolzano e gli enti gestori delle aree protette nazionali applichino le misure di eradicazione rapida (Art. 19) e di gestione (art. 22). Tali Autorità competenti applicano le misure di eradicazione e di gestione avvalendosi, se del caso, della collaborazione di altre amministrazioni, che devono svolgere le attività con le risorse disponibili a legislazione vigente nei propri bilanci, o di soggetti privati. Dell'applicazione delle misure e dei risultati conseguiti nel corso delle attività è informato il Ministero.

Il "*Piano nazionale di gestione della testuggine palustre americana (Trachemys scripta)*" redatto da ISPRA e pubblicato a giugno 2022, approvato con DM 370 del 28\_09\_2022, prevede che "*Gli interventi di gestione*

*della specie esotica saranno condotti da personale appositamente formato e specificatamente autorizzato dalla Regione, Provincia Autonoma o Area protetta territorialmente competente.”*

- **Azioni previste dal progetto**
  
- **Metodologie applicate**

Considerato quanto in premessa il Progetto .....

**CHIEDE**

Parere rispetto allo svolgimento delle attività di gestione delle testuggini alloctone nelle ZSC e nei siti indicati per l'intera durata del progetto.



**ALLEGATO 5.**  
**Modulo di consegna Centri**



**MODULO di CONSEGNA**  
**di ESEMPLARE di TESTUGGINE ALLOCTONA**

NOME del CENTRO \_\_\_\_\_

NOME e COGNOME del RICEVENTE \_\_\_\_\_

NOME e COGNOME di chi CONSEGNA \_\_\_\_\_

DATA CATTURA \_\_\_\_\_ CODICE SITO N2K \_\_\_\_\_

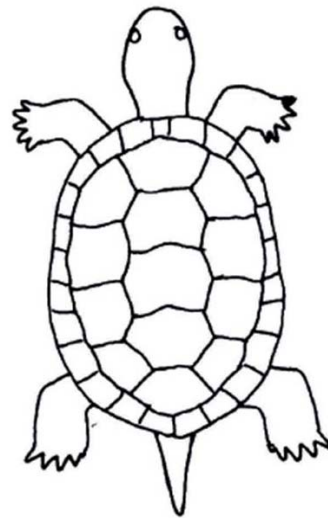
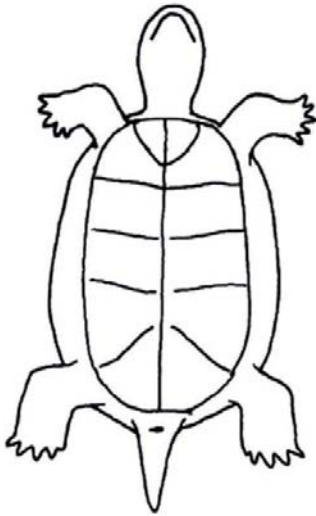
COORDINATE PUNTO CATTURA \_\_\_\_\_

SPECIE \_\_\_\_\_ SESSO \_\_\_\_\_

LUNGHEZZA CARAPACE (cm) \_\_\_\_\_ LARGHEZZA CARAPACE(cm) \_\_\_\_\_ PESO (g) \_\_\_\_\_

CODICE AREA \_\_\_\_\_ (piastrone)

CODICE INDIVIDUO \_\_\_\_\_ (carapace)



NOTE \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Luogo \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Firma della persona che consegna

Coordinatori beneficiario Beneficiari associati