

Piano di gestione nazionale per la rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*)



Agosto 2021

A cura di:

Silvia Macchi¹, Stefano Scali²

¹ *Università degli Studi dell'Insubria*

² *Museo Civico di Storia Naturale di Milano*

Con il supporto di:

Francesco Bisi e Adriano Martinoli (*Dipartimento di Scienze teoriche e Applicate – Università degli Studi dell'Insubria*)

Revisione dei testi:

Franco Andreone (*Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino*); Lucilla Carnevali (*ISPRA - Dipartimento per il Monitoraggio e la Tutela dell'Ambiente e per la Conservazione della Biodiversità. Area BIO CFN*), Eugenio Dupré, Marco Valentini (*MiTE – Direzione per il Patrimonio naturalistico*), Ernesto Filippi (*Sogesid – MiTE – Direzione per il Patrimonio naturalistico*).

Coordinamento:

Lucilla Carnevali e Piero Genovesi (*ISPRA - Dipartimento per il Monitoraggio e la Tutela dell'Ambiente e per la Conservazione della Biodiversità. Servizio BIO CFS*)

Foto di copertina: Franco Andreone

INDICE

Sommario.....	4
1 Caratteristiche della specie	5
2 Distribuzione in Italia.....	6
3 Vie di introduzione e possibilità di espansione	8
4 Impatti.....	9
5 Aspetti normativi.....	12
6 Obiettivi del Piano.....	14
6.1 Obiettivo nazionale.....	14
6.2 Obiettivi regionali	14
7 Modalità di intervento	17
7.1 Prevenzione	17
7.1.1 Prevenzione di introduzioni accidentali.....	17
7.1.2 Prevenzione di espansione secondaria.....	17
7.1.3 Prevenzione attraverso controllo di attività commerciali.....	17
7.2 Gestione.....	18
7.2.1 Eradicazione rapida per nuove introduzioni	18
7.2.2 Controllo in caso di presenza diffusa.....	18
7.2.3 Gestione degli esemplari da compagnia detenuti da privati cittadini.....	19
7.2.4 Metodi di intervento	19
7.3 Trattamento delle carcasse.....	25
7.4 Personale coinvolto.....	26
8 Tecniche di monitoraggio	26
8.1 Misure di sorveglianza e rilevamento precoce	26
8.2 Monitoraggio presenza.....	27
8.3 Monitoraggio dell'efficacia degli interventi.....	29
Bibliografia	29

Sommario

La rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) è una specie inclusa nelle liste di specie esotiche invasive di rilevanza unionale del Regolamento (UE) 1143/2014, recepito in Italia con D. lgs.230/2017, in quanto sono stati ritenuti soddisfatti i criteri concordati a livello Unionale per l'inserimento nella lista. Tale normativa impone l'eradicazione rapida o il controllo delle specie esotiche invasive inserite nell'elenco.

La specie era stata in precedenza 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).

In Italia la specie è stata introdotta negli anni '30 del secolo scorso in provincia di Mantova, subendo un'espansione dovuta anche a successive traslocazioni ad opera di allevatori e agricoltori motivate dalla volontà di sfruttarla per scopi alimentari, viste le notevoli dimensioni che gli individui adulti possono raggiungere, soprattutto se paragonate a quelle delle specie di rane autoctone.

Attualmente la diffusione di *Lithobates catesbeianus* sul territorio nazionale sembra essere limitata ad alcune regioni, quali Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna, Veneto, Toscana, Lazio e Basilicata. La specie risulta maggiormente diffusa soprattutto nel nord Italia, mentre nel centro e sud Italia la distribuzione è più localizzata e puntiforme.

Come dettagliato nel presente Piano e come confermato dai risultati dell'analisi di rischio condotta a scala dell'Unione Europea, è ormai accertato che la specie possa causare rilevanti impatti alla biodiversità della regione, rappresentando una seria minaccia per la conservazione della biodiversità, sia direttamente, attraverso la predazione di una grande varietà di specie animali, tra cui anche altre specie di anfibi, sia indirettamente, in quanto vettore della chitridiomicosi, una patologia fungina annoverata tra le principali cause del declino degli anfibi a livello mondiale (Fisher et al., 2020).

Vista la disomogeneità nella distribuzione della specie sul territorio nazionale, non è possibile individuare un'unica strategia gestionale, ma gli obiettivi da perseguire per adempiere alla normativa vigente potranno essere l'eradicazione, nelle regioni in cui la specie risulti essere localizzata, o il controllo con eventuali aree di eradicazione locale nelle regioni in cui la specie è maggiormente diffusa.

1 Caratteristiche della specie

Originaria dell'America settentrionale, ad est delle Montagne Rocciose, dal Canada alla Florida, *Lithobates catesbeianus* (in precedenza nota come *Rana catesbeiana*, denominazione nuovamente suggerita come valida da Yuan et al., 2016) è la specie di rana maggiori dimensioni presente in Europa: gli adulti possono raggiungere 20 cm di lunghezza e fino a 1600 gr di peso (Lanza, 1983; Di Nicola et al., 2019).

Si distingue abbastanza facilmente dalle altre specie di rane presenti in Italia per le dimensioni del timpano, grande almeno quanto l'occhio (nei maschi fino al doppio del diametro dell'occhio) e per l'assenza delle pliche latero-dorsali del tronco.

La colorazione delle parti superiori varia dal verde olivastro al bruno, spesso con il capo verde chiaro e con macchie o reticolature più scure sul dorso e sugli arti, mentre le parti ventrali sono bianco-giallastre con maculature grigie. I maschi presentano generalmente una colorazione più uniforme e hanno arti anteriori più robusti, con il primo dito ingrossato alla base e ricoperto di escrescenze cornee durante il periodo riproduttivo (Lanza et al., 2007).

La specie è legata principalmente ad ambienti umidi perenni di grande dimensioni e buona profondità, con abbondante vegetazione sulle rive, ma anche a corsi d'acqua a lento scorrimento (Di Nicola et al., 2019).

Diversi autori sono concordi nel ritenere che la specie possa avere preferenza, soprattutto nelle popolazioni alloctone, verso ambienti parzialmente o completamente artificiali (Scalera et al., 2018).

Alle nostre latitudini la riproduzione ha luogo nei mesi tardo primaverili-estivi; si tratta di una specie estremamente prolificata, in quanto le femmine possono arrivare a deporre fino a 10000-20000 uova, che schiudono dopo pochi giorni. Lo sviluppo larvale è estremamente prolungato, fino a 3 anni dalla schiusa.

I maschi nel periodo riproduttivo emettono un caratteristico canto, basso e vibrante, simile a un muggito, udibile a grande distanza; anche le femmine possono cantare, ma con forza minore rispetto ai maschi (Lanza, 1983).

Specie prevalentemente attiva nelle ore notturne, *Lithobates catesbeianus* è strettamente legata all'acqua, dalla quale si allontana raramente, coprendo al massimo 1 km di distanza quando le condizioni meteorologiche sono favorevoli (con pioggia o elevata umidità relativa). Durante la stagione invernale trascorre un periodo di latenza infossata nei

sedimenti sul fondo dei corpi idrici, o interrata lungo le rive a breve distanza dall'acqua. La longevità accertata in cattività è di 16 anni (Lanza et al., 2007), riducendosi a circa la metà in natura (Tessa et al., 2016).

La rana toro americana è stata introdotta in diversi paesi europei nel corso del ventesimo secolo, principalmente per scopi alimentari, amatoriali o ornamentali (Ficetola et al., 2007).

La crescente diffusione nell'ambiente e i conseguenti danni e rischi per la conservazione delle specie autoctone hanno determinato la necessità di intervenire. La Commissione Europea, con il Regolamento n. 2551/97, ha sospeso l'introduzione nella Comunità Europea di *Lithobates (Rana) catesbeianus*. Il 18 dicembre 2000 la specie è stata inserita nell'allegato B del Regolamento CE n. 338/97 e ss.mm.ii.; infine, con il Regolamento CE n. 2087/2001, ne è stata definitivamente vietata l'importazione.

Successivamente, 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 e i servizi ecosistemici causati dall'introduzione e dalla diffusione, sia deliberata che accidentale, delle specie esotiche invasive all'interno dell'Unione, con particolare riferimento a quelle inserite nella lista di specie di rilevanza unionale (tra cui *Lithobates catesbeianus*) e per le quali sono previsti particolari divieti e specifici interventi gestionali.

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.

2 Distribuzione in Italia

In Italia la specie è stata introdotta negli anni '30 del secolo scorso in provincia di Mantova (Albertini, 1970; Albertini & Lanza, 1987; Andreone et al., 1987; Di Nicola et al., 2019) subendo un'espansione in parte spontanea, da parte delle popolazioni naturalizzate, ma in larga parte dovuta anche a successive traslocazioni ad opera di allevatori e agricoltori motivate dalla volontà di sfruttarla per scopi alimentari, viste le notevoli dimensioni che gli individui adulti possono raggiungere, soprattutto se paragonate a quelle delle specie di rane autoctone.

Attualmente la diffusione nota di *Lithobates catesbeianus* sul territorio nazionale è limitata ad alcune regioni, quali Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna, Veneto, Toscana, Lazio e Basilicata.

Sicuramente in passato la specie è stata introdotta anche nel Friuli, ma l'ultima cattura in questa regione risale al 1962 (Lapini et al., 1999), e non sono riportate segnalazioni per la specie nella banca dati nazionale della *Societas Herpetologica Italica* (www.ornitho.it).

Similmente è avvenuto in Campania, dove negli anni '90 vennero avviati diversi impianti di allevamento di rana toro a scopo alimentare, che ebbero scarso successo e vennero rapidamente abbandonati (Picariello, 1993; Ferri, 2006), motivo per cui la presenza della specie rimane non confermata nell'atlante erpetologico campano (Guarino et al., 2012).

La specie risulta maggiormente diffusa soprattutto nel nord Italia, mentre nel centro e sud Italia la distribuzione è più localizzata e puntiforme (Tsiamis et al., 2019; <https://easin.jrc.ec.europa.eu/easin/Documentation/Baseline>). In Figura 1 è riportata la mappa di distribuzione (su celle 10x10 km) aggiornata a giugno del 2019 per la rendicontazione ai sensi dell'art.24 del Reg. UE 1143/14 e trasmessa ufficialmente alla CE (Alonzi et al., 2020).

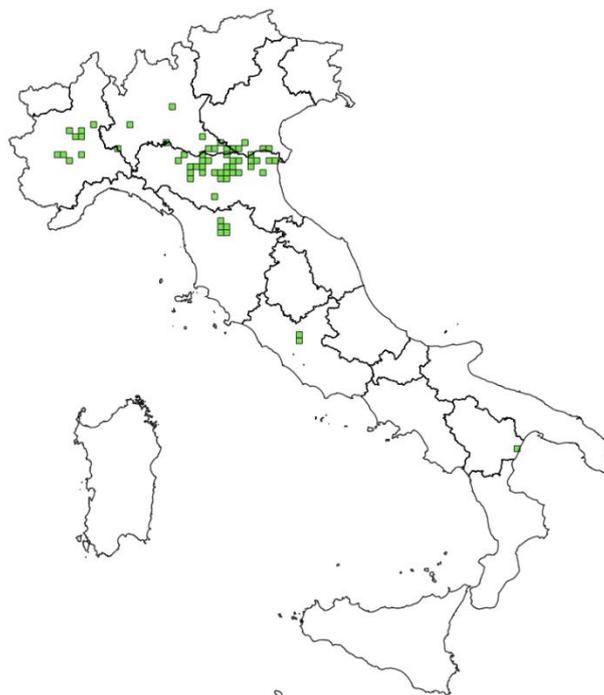


Figura 1 – Distribuzione di *Lithobates catesbeianus* su celle 10x10 kmq (giugno 2019).

I record storici (Lanza, 1970), avvalorati da dati molecolari, dimostrano che le popolazioni italiane derivano dall'introduzione di un numero molto basso di fondatori (Ficetola et al.,

2008), pertanto le popolazioni italiane sono caratterizzate da una scarsa variabilità genetica, il che potrebbe renderle maggiormente vulnerabili al rischio di estinzione spontanea nel lungo periodo.

3 Vie di introduzione e possibilità di espansione

La rana toro americana è stata introdotta in circa una quarantina di paesi nel mondo in tutti i continenti ad eccezione dell’Africa (Scalera et al., 2018) e, per ovvi motivi, dell’Antartide. Le ragioni dell’introduzione sono diverse: è soprattutto sfruttata come fonte alimentare, ma è anche considerata una specie modello per indagini biologiche (Bury & Whelan, 1985). Inoltre, è frequentemente utilizzata come animale da terraristica e, soprattutto nei paesi del nord, viene talvolta immessa negli stagni di giardini privati a scopo ornamentale (Scalera et al., 2018).

Nel nostro paese è stata introdotta per la prima volta ormai quasi novant’anni fa, principalmente per sfruttarla a scopo alimentare, vista la consolidata tradizione gastronomica di consumare carne di rana di alcune zone, in particolare della Pianura Padana (Di Cerbo & Razzetti, 2004).

Successivamente, la specie ha subito un’espansione in parte spontanea dei nuclei introdotti che hanno formato popolazioni naturalizzate, ma ci sono stati molti altri episodi di introduzione volontaria, soprattutto a cavallo tra gli anni ‘60 e ‘80 del secolo scorso, sicuramente non tutti ben documentati (Lanza et al., 2007).

Non tutti questi episodi hanno però avuto successo: condizioni climatiche sfavorevoli (in particolare gli inverni rigidi), temporaneità dei corpi idrici (come, ad esempio, nelle risaie del Novarese: Andreone & Marocco, 1999), specialmente durante la fase larvale (Lanza et al., 2007) e un’elevata pressione venatoria (Di Cerbo & Razzetti, 2004) sono alcune tra le cause che hanno determinato la mancata acclimatazione o l’estinzione della specie in molte delle località di introduzione.

Talvolta anche nelle strutture di allevamento avviate a scopo alimentare i risultati sono stati spesso insoddisfacenti, con elevate morie di girini e tassi di crescita molto bassi, motivo per cui nel giro di pochi anni molti allevamenti sono stati abbandonati, con il possibile rilascio di individui in natura (Picariello, 1993).

A differenza di molti altri paesi, dove la specie nel giro di poco tempo si è espansa notevolmente dal punto di vista numerico e spaziale (Lever, 2003; Ficetola et al., 2007),

in Italia, pur tenendo conto delle numerose introduzioni effettuate, si può ritenere che le popolazioni, anche nelle aree ad essa più favorevoli dal punto di vista ecologico, a parte locali espansioni, come nel Lazio (<http://www.csmon-life.eu>; <https://specieinvasive.it/index.php/it/specie-aliene-invasive/2-le-specie-invasive/43-specie-20>), siano rimaste complessivamente abbastanza stabili o abbiano fatto registrare dei regressi rispetto alla situazione rilevata negli anni '80 (Ficetola et al., 2007; Lanza et al., 2007) e predetta per il 2020 da modelli basati sull'evoluzione dell'uso del suolo sviluppati nel primo decennio degli anni 2000 (Ficetola et al., 2010). La frammentazione degli habitat potrebbe essere la causa limitante l'espansione della specie nel nostro territorio (Ficetola et al., 2010).

Conoscere le cause e comprendere i meccanismi che determinano la mancata acclimatazione/naturalizzazione di una specie alloctona possono essere fattori chiave nella pianificazione di strategie di gestione della specie stessa, in un'ottica di eradicazione/controllo.

Tra le possibili vie di diffusione della specie, oltre alle traslocazioni volontarie, vi è il trasporto passivo da parte dell'uomo, ad esempio a seguito di ripopolamenti ittici con materiale contaminato (Scalera et al., 2018).

Inoltre, anche se l'importazione della specie è proibita ormai da parecchi anni, nonostante i divieti è possibile che si trovi comunque in commercio presso negozi di animali acquatici come animale da compagnia (Manenti et al., 2018).

4 Impatti

Lithobates catesbeianus può arrecare danni alle singole specie, ma anche agli interi ecosistemi, attraverso diversi meccanismi, che vanno dalla predazione, alla competizione, alla trasmissione di patogeni.

Gli adulti di rana toro sono predatori opportunisti e possono nutrirsi pressoché di qualsiasi preda che abbia dimensioni adatte, compresi invertebrati terrestri ed acquatici e piccoli vertebrati (pesci, anfibi, rettili, piccoli uccelli e mammiferi) (Lanza, 1983); sono inoltre presenti evidenze di cannibalismo (Schwalbe & Rosen 1988; Groffen et al., 2019). Diversi studi suggeriscono che la rana toro possa rappresentare la specie di anuro dominante laddove introdotta, a causa delle maggiori dimensioni rispetto alle specie native sia degli adulti sia delle larve, (Kupferberg, 1997; Werner et al., 1995).

Alle nostre latitudini può rappresentare un competitore per le specie che mostrano la stessa predilezione per aree umide permanenti e di buone dimensioni e profondità, come il rospo comune (*Bufo bufo*) e le rane verdi (*Pelophylax* sp.) (Louette & Bauwens, 2013). L'impatto da competizione è particolarmente ben documentato in ambienti modificati dall'uomo, con reti trofiche semplificate, in cui la presenza di girini di rana toro induce modifiche nella sopravvivenza e nella grandezza alla metamorfosi di specie autoctone (Kiesecker et al., 2001). Sembra inoltre che questa specie possa avere ulteriori vantaggi competitivi in caso di introduzione di pesci predatori, da cui viene evitata a causa della scarsa appetibilità di uova e girini (Hecnar & M'Closkey, 1997a; Adams et al., 2003).

In California, dove *Lithobates catesbeianus* è alloctona, e in una zona dell'Ontario, dove la specie è considerata localmente estinta, è stato dimostrato come, attraverso meccanismi predatori, la rana toro sia capace di modificare gli equilibri ecologici e sbilanciare le densità delle specie di anfibi nativi (Hecnar & M'Closkey, 1997b; D'Amore et al., 2009). Si presume che tale tipologia d'impatto possa verificarsi anche nelle aree di invasione italiane (Andreone e Marocco, 1999). Diversi studi hanno dimostrato che i girini di rana toro sono capaci di alterare la biomassa, la struttura e la composizione delle comunità algali. Inoltre, l'elevato consumo di cibo, unito a elevate densità di popolazione (fino a migliaia di individui per m²), possono avere effetti negativi sul ciclo dei nutrienti e sulla produzione primaria degli ecosistemi di acqua dolce (Pryor, 2003).

Uno degli impatti più gravi che la specie può arrecare alle altre specie di anfibi è la trasmissione di patogeni; in particolare *Lithobates catesbeianus* è un importante vettore della chitridiomicosi, un'infezione fungina causata dal fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Berger et al., 1998), che è stata addotta come una delle cause più rilevanti del declino globale degli anfibi a livello mondiale, il cosiddetto GAD (*Global Amphibian Decline*) (Beebee, 1996; Houalahan et al., 2000; Reaser, 2000).

Nel 2005, in occasione del summit generale sulla conservazione degli anfibi della *Species Survival Commission* della IUCN, la chitridiomicosi è stata definita come "la peggiore malattia infettiva mai registrata tra i vertebrati, in termini di numero di specie colpite e di tendenza a condurre all'estinzione". Nonostante la scoperta relativamente recente (il primo caso accertato risale a poco prima della metà del secolo scorso), è stato ipotizzato che la diffusione della patologia potrebbe portare all'estinzione di metà delle specie di anfibi sul pianeta, andando a provocare seri impatti sugli ecosistemi e sulla società umana (Gascon et al., 2007).

La patologia causa ipercheratosi, ossia un'eccessiva cheratinizzazione delle parti boccali delle larve e delle cellule epiteliali dei metamorfosati, che impedisce l'alimentazione nei primi e riduce gli scambi gassosi e di nutrienti con l'ambiente circostante nei secondi, e può alterare l'equilibrio elettrolitico causando danni cardiaci che portano alla morte (Barringer, 2019).

Lithobates catesbeianus è una delle poche specie che, pur venendo a contatto con il fungo anche allo stadio larvale, ne è pressoché immune, perché il ricambio dello strato epidermico è più veloce di quanto la malattia possa diffondersi sulla pelle (Gervasi et al. 2013; Van Rooij et al. 2015).

In compenso, pur non fungendo da vettore della malattia per un lungo periodo, dato che il carico infettivo diminuisce col tempo, la specie può comunque diffondere la malattia ad altre specie di anfibi più suscettibili all'infezione (Gervasi et al., 2013).

La chitridiomicosi non è l'unica patologia potenzialmente trasmissibile dalla rana toro americana: la specie è infatti anche portatrice di almeno un *Ranavirus* fatale, che provoca mortalità potenzialmente in tutti gli stadi di sviluppo causando lesioni al fegato, alla milza e ai reni. Anche in questo caso la patologia costituisce una seria minaccia per la conservazione delle altre specie di anfibi, ma la rana toro stessa ne è soggetta (IUCN, 2007; Adriaens et al., 2013).

Anche se non ancora riportato per l'Europa, la specie potrebbe avere effetti negativi sulla pesca commerciale e le attività di acquacoltura per la diffusione di patogeni e la predazione (Manenti et al., 2018; Scalera et al., 2018).

In allevamenti di pesci rossi del Missouri la presenza di rane toro ha provocato in passato gravi danni, con la predazione di ingenti quantitativi di pesce e perdite economiche rilevanti (Corse & Metter, 1980).

Al riguardo si è stimato che se la specie si fosse diffusa nella intera Germania i danni economici sarebbero stati di circa 4 miliardi di Euro (Reinhardt et al., 2003). Anche i costi di gestione della specie per gli interventi di eradicazione/controllo in natura possono essere molto elevati e per tale motivo è opportuno intervenire tempestivamente: in letteratura sono disponibili molti esempi, e mediamente si parla di cifre nell'ordine delle decine di migliaia di euro per singolo stagno (Reinhardt et al., 2003; Orchard, 2011; Scalera et al., 2018).

Per quanto riguarda l'Europa, solo a titolo esemplificativo, in Germania la rimozione della specie da 5 stagni è costata 270000 € nei primi anni 2000 (Reinhardt et al., 2003).

5 Aspetti normativi

La Commissione Europea, con il Regolamento (UE) n. 1143/2014, ha stabilito 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. L'art.4 del Regolamento (UE) 1143/2014 definisce l'“*Elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale*”, ossia di quelle specie esotiche invasive, animali o vegetali, i cui effetti negativi sull'ambiente e la biodiversità, la salute umana o l'economia, accertati secondo una valutazione dei rischi obbligatoria e standardizzata, sono così gravi da richiedere un intervento concertato da parte degli stati membri dell'Unione Europea. Tale elenco, di natura dinamica, viene periodicamente aggiornato alla luce delle nuove informazioni disponibili sulla base di una specifica valutazione del rischio (<https://circabc.europa.eu>).

Lithobates catesbeianus 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 D. Lgs 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. Dall'art. 18 all'art. 23 vengono invece riportate le disposizioni relative al sistema di sorveglianza (i.e. monitoraggio), misure di rilevamento precoce e di eradicazione rapida o, per le specie già ampiamente diffuse, misure di gestione finalizzate a contenerne gli impatti. Tali misure rivestono quindi carattere obbligatorio, devono assicurare adeguata efficacia in termini di eliminazione completa e permanente della popolazione oggetto di intervento o di contenimento, risparmiando agli animali dolore e sofferenze evitabili senza compromettere l'efficacia delle misure di gestione.

6 Obiettivi del Piano

6.1 Obiettivo nazionale

Data la distribuzione della specie sull'intero territorio nazionale, l'obiettivo generale del presente 'Piano' è quello di stabilire misure di gestione di *Lithobates catesbeianus* che minimizzino gli impatti negativi che la specie può arrecare alla biodiversità, ai servizi ecosistemici collegati e all'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.

6.2 Obiettivi regionali

La distribuzione della specie sul territorio nazionale è particolarmente disomogenea, pertanto non è possibile individuare una strategia gestionale per tutto il territorio nazionale. Conseguentemente gli obiettivi da perseguire per adempiere alla normativa vigente sono l'eradicazione nelle regioni in cui la specie risulti essere localizzata, o il controllo, nelle regioni in cui la diffusione della specie sia tale da non poter più prevedere l'eradicazione.

Si precisa comunque che, indipendentemente dalla strategia generale adottata a livello regionale, a livello locale, in caso di nuclei isolati e numericamente ridotti o di nuove segnalazioni in aree ecologicamente rilevanti in seguito alle attività di sorveglianza e monitoraggio intraprese, l'eradicazione deve essere prevista come azione prioritaria, soprattutto nei casi di sintopia con altre specie di anfibii rare e/o minacciate.

Nella tabella seguente, redatta facendo riferimento al quadro distributivo della specie prodotto per la rendicontazione prevista ai sensi del Reg.1143/14 nel 2019 (Alonzi et al., 2020), per ognuna delle regioni interessate vengono riportate le azioni gestionali previste.

Per le regioni in cui la specie risulta presente ma con pochi nuclei di limitata estensione (Basilicata, Lazio, Toscana e Veneto), l'obiettivo gestionale è quello dell'eradicazione completa dall'intero territorio di competenza.

Nel caso di Piemonte, Emilia-Romagna e Lombardia, la distribuzione della specie è tale da ritenere ormai non più perseguibile l'obiettivo dell'eradicazione e si deve quindi procedere con il controllo/contenimento delle popolazioni.

Nelle regioni in cui la specie risulta assente (Valle d'Aosta, Liguria, P.A. di Bolzano, P.A. di Trento, Friuli-Venezia-Giulia, Umbria, Marche, Abruzzo, Molise, Calabria, Campania, Puglia, Sardegna, Sicilia), la comparsa di rana toro deve essere rilevata rapidamente e comunicata senza indugi al MiTE (ai sensi dell'art. 19 del D.Lgs. 230/2017). Le Regioni e Province autonome sono quindi responsabili dell'immediata attuazione delle misure di eradicazione rapida di cui al presente 'Piano', finalizzate ad assicurare l'eliminazione completa e permanente della specie esotica invasiva dall'ambiente naturale..

In Tabella 6.1 è riportata la sintesi delle azioni gestionali previste suddivise per Regioni e Province autonome. Si ricorda che il monitoraggio è obbligatorio in tutte le regioni e province autonome ai sensi dell'art.18 del D.Lgs. 230/17; la risposta rapida consiste nell'eradicazione rapida disposta ai sensi dell'art.19 del D.lgs. 230/17 a seguito della prima segnalazione sul territorio regionale o provinciale della specie; l'eradicazione è un'attività disposta ai sensi dell'art.22 del D.Lgs.230/17 nel caso di una specie già presente sul territorio regionale o provinciale.

Tabella 6.1. Azioni gestionali previste per *Lithobates catesbeianus* sul territorio nazionale.

Regione	Azioni				
	Prevenzione	Eradicazione (Art.22)	Controllo/ Contenimento (Art.22)	Risposta rapida (eradicazione art.19)	Monitoraggio
Abruzzo	X			X	X
Basilicata	X	X			X
Bolzano	X			X	X

Regione	<i>Azioni</i>				
	Prevenzione	Eradicazione (Art.22)	Controllo/ Contenimento (Art.22)	Risposta rapida (eradicazione art.19)	Monitoraggio
Calabria	X			X	X
Campania	X			X	X
Emilia Romagna	X		X		X
Friuli Venezia Giulia	X			X	X
Lazio	X	X			X
Liguria	X			X	X
Lombardia	X		X		X
Marche	X			X	X
Molise	X			X	X
Piemonte	X		X		X
Puglia	X			X	X
Sardegna	X			X	X
Sicilia	X			X	X
Toscana	X	X			X
Trento	X			X	X
Umbria	X			X	X
Valle d'Aosta	X			X	X
Veneto	X	X		X	X

7 Modalità di intervento

7.1 Prevenzione

7.1.1 Prevenzione di introduzioni accidentali

La prevenzione dell'introduzione volontaria di *Lithobates catesbeianus* è garantita dalla vigente normativa a livello europeo e nazionale descritta nel Capitolo 5 del presente documento per cui è vietato il commercio della specie. Eventuali nuove introduzioni accidentali della specie potrebbero verificarsi a causa di ripopolamenti ittici con materiale contaminato (Scalera et al., 2018), pertanto le Regioni e le Province autonome promuovono delle attività di informazione e sensibilizzazione sul riconoscimento della specie e i potenziali impatti negativi che potrebbero derivare dalla sua introduzione - sebbene involontaria - negli ambienti acquatici, affinché venga prestata la massima attenzione durante l'effettuazione delle attività di ripopolamento ittico da parte dei soggetti responsabili e non solo.

7.1.2 Prevenzione di espansione secondaria

I fenomeni di espansione secondaria devono essere evitati mediante azioni di contenimento tempestivo, volte a limitare l'incremento della popolazione e la conseguente diffusione della specie in altri territori. Per questo, tutte le segnalazioni provenienti dal territorio devono essere verificate il più rapidamente possibile. Tali segnalazioni possono provenire anche da personale non esperto (previa successiva verifica) pertanto le attività di informazione e sensibilizzazione già citate saranno indirizzate anche ai cittadini per incentivare le segnalazioni sul territorio. .

7.1.3 Prevenzione attraverso controllo di attività commerciali

Nonostante il divieto di commercio in Italia, non si esclude che sia possibile trovare la specie ancora in vendita *online*, oppure sia scambiata tra appassionati. Come suggerito per tutte le specie esotiche che condividono la medesima problematica (ad esempio la testuggine palustre *Trachemys scripta*), è pertanto indispensabile che per i prossimi anni si proceda ad un controllo regolare di tali canali di distribuzione.

7.2 Gestione

7.2.1 Eradicazione rapida per nuove introduzioni

L'eradicazione della specie esotica invasiva è l'obiettivo da perseguire laddove la presenza di *Lithobates catesbeianus* venga segnalata per la prima volta a livello regionale (obbligo sancito dall'art.19 del D.Lgs.230/17) e laddove la presenza della specie esotica sia circoscritta, come nei casi elencati in tabella 6.1, ovvero quando lo sforzo di campionamento sia ancora sufficientemente basso da poter intervenire rapidamente con risultati efficaci. I metodi di intervento sono descritti in dettaglio nel paragrafo 7.2.4.

Come già accennato, nel caso di prima segnalazione sul territorio regionale, la Regione o la Provincia autonoma è tenuta a comunicare senza indugio il rilevamento precoce della specie e attuare le misure di eradicazione rapida di cui al presente Piano.

L'eradicazione delle popolazioni è inoltre raccomandata prioritariamente nei siti con presenza riconosciuta e significativa di altre specie di anfibi autoctoni rari e/o minacciati e, a seguire, nei siti a maggiore biodiversità dulciacquicola della Rete Natura 2000 e nelle aree protette ai sensi della normativa nazionale (L. 394/1991).

7.2.2 Controllo in caso di presenza diffusa

Nei casi, indicati in tabella 6.1, in cui la presenza della specie risulti così diffusa da rendere l'eradicazione non praticabile o non fattibile, e in considerazione delle difficoltà di cattura determinate anche dalle caratteristiche ambientali del sito di intervento, la specie esotica deve essere soggetta a misure di contenimento al fine di contrastarne l'espansione e limitarne gli effetti negativi sulla biodiversità.

Per calibrare lo sforzo necessario al raggiungimento dell'obiettivo è necessaria una fase preliminare di raccolta delle informazioni sulla distribuzione della popolazione sul territorio. Si deve pertanto procedere con il vaglio di tutte le segnalazioni disponibili, provenienti da soggetti pubblici (enti locali, soggetti competenti in materia ambientale, forze dell'ordine), *stakeholders* (veterinari, cacciatori, professionisti, faunisti, pescatori, ecc.), e dei dati raccolti dai cittadini con *citizen science*, che possono risultare determinanti nel rilevamento precoce della specie.

Il controllo in natura, con particolare riferimento a popolazioni che vivono in sintopia con altre specie di anfibi rare o minacciate all'interno di siti ad elevata biodiversità della Rete

Natura 2000 o di altre aree protette, potrà essere effettuato con le tecniche descritte nel paragrafo 7.2.4, cercando di rimuovere il maggior numero possibile di individui dalla popolazione.

7.2.3 Gestione degli esemplari da compagnia detenuti da privati cittadini

Nella finestra temporale utile per la denuncia del possesso di specie esotiche invasive di rilevanza unionale (artt.26 e 27 del D. Lgs 230/2017), sono pervenute al MiTE poche denunce da parte di privati cittadini, per un numero complessivo di rane toro assai esiguo. Coloro che detengono uno o più esemplari di *Lithobates catesbeianus* non possono rilasciarli nell'ambiente, devono evitare che si riproducano e devono tenerli in condizioni in cui sia impossibile la fuga.

Non occorrono autorizzazioni per fornire al proprio animale l'assistenza veterinaria necessaria, mentre il decesso va notificato al MiTE mediante un'autodichiarazione su carta semplice, nella quale fare riferimento alla denuncia di possesso presentata.

7.2.4 Metodi di intervento

Sono molteplici le metodiche sperimentate e utilizzate per il controllo della rana toro, in particolare per quanto riguarda le modalità di cattura nelle differenti fasi vitali della specie.

Ovviamente, a seconda dei diversi contesti territoriali, sarà necessario operare una scelta dei metodi da utilizzare, sia per la cattura che per la soppressione, sulla base di un'attenta analisi costi/benefici che tenga conto anche dei seguenti fattori:

- Stima dell'ordine di grandezza delle rimozioni/soppressioni da effettuare;
- disponibilità di personale da formare/adequatamente formato che possa operare sul campo;
- costi per l'acquisto dei materiali e costi orari/giornalieri del personale necessario;
- eventuali impatti sull'ambiente e sulle specie non destinatarie di misure e i loro habitat,
- metodi in grado di assicurare che agli individui di rana toro siano risparmiati dolore, angoscia o sofferenza evitabili
- possibili ricadute sulla componente sociale.

In riferimento a quest'ultimo aspetto, è importante che venga preliminarmente effettuata una corretta campagna informativa che raggiunga tutti i soggetti interessati, anche al fine

di evitare azioni di boicottaggio delle catture (es. distruzione delle trappole o rimozione degli individui catturati dalle stesse), che vanificherebbero gli sforzi compiuti, con un conseguente aumento dei costi delle operazioni.

7.2.4.1 Cattura con nasse da pesca a doppio invito

Alla luce dei dati disponibili in letteratura, per le larve è risultato particolarmente efficace il trappolaggio mediante l'utilizzo di nasse da pesca a doppio invito (Detaint & Coïc, 2006; Berroneau et al., 2008; Adriaens et al., 2013; Louette et al., 2013; Groffen et al., 2019; Kamoroff et al., 2019).

Tali nasse, normalmente in commercio nei negozi di articoli da pesca, andranno posizionate parallelamente a circa 2 m dalla riva, avendo cura di lasciare una bottiglia di plastica che ne favorisca il galleggiamento, in modo da evitare il rischio di annegamento di altre specie catturate involontariamente. Le nasse andranno ispezionate quotidianamente, liberando eventuali altri animali rimasti intrappolati (Kamoroff et al., 2020).

Per aree umide di dimensioni modeste e poco profonde (intorno a 1500 m² e profondità massima di 150 cm), Louette et al. (2013) raccomandano l'uso simultaneo di 8 nasse, laddove venga stimata la presenza di un elevato numero di larve (~5000), e di 5 nasse, in caso di basse numerosità (~1000), per massimizzare il rapporto efficienza/costi.

Al fine di evitare la potenziale diffusione di patogeni da un sito di cattura all'altro, tutta la strumentazione utilizzata, oltre che gli stivali indossati dagli operatori, dovranno essere accuratamente puliti e sterilizzati con soluzioni alcoliche o a base di cloro dopo ogni uscita sul campo, come raccomandato dalla IUCN (Gascon et al., 2005).

7.2.4.2 Cattura con trappole-rifugio

Sugli adulti e sui neometamorfosati sono state sperimentate con successo anche trappole-rifugio, che consistono in contenitori di legno di circa 80 cm x 80 cm x 20 cm h, aperti dal lato che viene posizionato verso il corpo idrico (Detaint & Coïc, 2006).

Per facilitare le catture, sia manuali che con l'uso di trappole-rifugio, può risultare inoltre utile limitare le possibilità di spostamento degli animali, collocando delle barriere interrato attorno ai corpi idrici, ed eventualmente sistemando ad intervalli regolari delle trappole a caduta o *pitfall traps*, costituite da secchi a forma di cilindro o di tronco di cono, che vengono interrati alla base delle barriere (Adriaens et al., 2013; Groffen et al., 2019).

Dato che possono catturare anche altre animali, oltre a quelli di interesse, sarà opportuno forare il fondo dei secchi per evitare l'annegamento in caso di pioggia, tuttavia, per evitare il problema opposto, cioè la disidratazione, può essere utile mettere nei secchi una spugna umida, oppure delle foglie che permettano agli animali di ripararsi dai raggi del sole. È necessario che le *pitfall* vengano ispezionate almeno quotidianamente, anche perché possono attirare potenziali predatori che vadano a colpire specie non bersaglio rimaste eventualmente intrappolate (Heyer et al., 1994).

Per la cattura degli adulti si può procedere anche a mano o con l'ausilio di reti, ispezionando le aree di interesse nelle prime ore notturne con l'aiuto di torce.

7.2.4.3 Cattura con elettrostorditore

Larve, giovani e adulti possono essere catturati anche mediante l'utilizzo di elettrostorditori, simili a quelli usati per i pesci, ma di minor potenza (Orchard, 2011; Kamoroff et al., 2020). Tali apparecchi rilasciano una forte scossa elettrica che stordisce gli animali e li immobilizza per un breve lasso di tempo, sufficiente perché l'operatore possa catturarli. L'efficienza del metodo dipende da una serie di fattori, tra cui la dimensione e la profondità del corpo idrico; pertanto, nella pianificazione di eventuali attività di elettropesca sulla specie esotica, sarà necessario affidarsi a personale esperto. Inoltre, deve essere opportunamente valutata in fase di programmazione la presenza e la eventuale sensibilità al metodo di specie non bersaglio, in particolare quelle di interesse conservazionistico. In Italia, infatti, questo tipo di operazioni può essere svolto solo da addetti qualificati e muniti di uno speciale patentino che consente l'uso dell'attrezzatura. Gli strumenti per la cattura sopradescritti non sono selettivi; è quindi possibile che vengano catturate accidentalmente altre specie di anfibi inserite in allegato II e IV della Direttiva Habitat (92/43/CEE), pertanto si ribadisce l'assoluta necessità di un controllo almeno quotidiano delle trappole al fine di provvedere al rilascio di tutti gli animali non bersaglio eventualmente catturati. Nel caso in cui si operi in aree di presenza nota e diffusa di tali specie protette, dovrà essere richiesta al MiTE una autorizzazione in deroga al DPR 357/97 per tutto il personale coinvolto.

Considerato che l'art. 7, comma 1h, del Regolamento UE n. 1143/2014 vieta il rilascio nell'ambiente di specie esotiche invasive di rilevanza unionale, nel caso siano catturati esemplari di queste specie (riportate nel Regolamento di esecuzione (UE) 2016/1141 della Commissione del 13 luglio 2016 e successivi aggiornamenti dell'elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale), una volta catturati gli esemplari devono essere

soppressi. In casi limitati e con numeri contenuti può essere considerata l'opzione del mantenimento in cattività presso i centri di detenzione così come definiti nel D.Lgs.230/17, secondo le disposizioni specificate dalle Autorità responsabili dell'attuazione delle misure di gestione.

7.2.4.4. Abbattimento diretto

In diversi paesi europei ed extraeuropei è stato sperimentato con successo lo sparo su adulti e giovani di grandi dimensioni tramite l'uso di armi a pallini e di piccolo calibro (Berroneau et al., 2008; Adriaens et al., 2013; Kamoroff et al., 2020). Questo metodo viene normalmente utilizzato in caso di ambienti particolarmente complessi e con conseguente difficoltà a raggiungere gli individui, e necessita di operatori dotati di porto d'armi adeguatamente formati. Ulteriori indicazioni circa la metodologia e gli strumenti utilizzabili saranno fornite da ISPRA in una specifica nota, a cui si rimanda.

7.2.4.5. Rimozione delle uova

Di fondamentale importanza è anche la rimozione delle uova, che potranno essere raccolte tramite retini da pesca e lasciate sulle rive dei corpi idrici a seccare (Berroneau et al., 2008; Kamoroff et al., 2020), oppure rimosse per essere smaltite. Per la rimozione delle uova sarà opportuno ispezionare le aree umide quotidianamente per tutta la durata del periodo riproduttivo (indicativamente tra maggio e settembre alle nostre latitudini) e intervenire tempestivamente, dato che dalla deposizione alla schiusa intercorrono dai 2 ai 4 giorni (Adriaens et al., 2013).

Naturalmente, gli operatori dovranno essere opportunamente formati per imparare a riconoscere le ovature di rana toro sul campo, evitando di raccogliere per errore ovature deposte da altre specie di anfibi.

7.2.4.6. Modifiche negli habitat

Un ulteriore sistema per la gestione della specie esotica sul territorio consiste nell'apportare modifiche agli ambienti dove la specie è già presente, in modo da renderli meno adatti alla sua presenza e a favorire una naturale estinzione dei nuclei/popolazioni. Il controllo degli habitat consiste principalmente nel trasformare ambienti acquatici permanenti in ambienti a carattere temporaneo, quindi non adatti alla riproduzione della rana toro, che necessita di un lungo periodo di sviluppo larvale.

In alcuni casi può essere previsto il completo prosciugamento di pozze o stagni o, viceversa, il parziale riempimento degli stessi per favorirne il prosciugamento estivo, o addirittura, come misura di emergenza, la totale conversione dell'ambiente acquatico in uno terrestre (Adriaens et al., 2013). Si tratta ovviamente di misure di gestione con pesanti effetti sull'ambiente e sulle altre specie naturalmente presenti. Inoltre, quando il regime idrico viene ad essere modificato, è necessario tenere in considerazione l'intero mosaico di ambienti umidi potenzialmente idonei per la specie nelle immediate vicinanze, dato che tali misure indurranno la dispersione dei giovani e degli adulti verso ambienti alternativi. Nel caso di prosciugamento di pozze o stagni sarà opportuno recintare l'area umida per intercettare gli individui in dispersione. Per quanto riguarda le tempistiche, occorrerà operare tra il periodo della metamorfosi e l'inizio della nuova stagione riproduttiva delle altre specie native (potenzialmente) presenti. L'impatto di tali interventi sugli anfibi che trascorrono il periodo invernale infossati nel fango sulle rive o nei fondali è sconosciuto (Adriaens et al., 2013); inoltre, insieme agli anfibi, non vanno dimenticate neanche le altre componenti della biocenosi che verrebbero interessate dagli interventi a diversi livelli.

Per tutti questi motivi occorre prestare particolare cautela nella pianificazione di simili iniziative, che risultano essere invece più facilmente attuabili nel caso di ambienti già artificializzati, come ad esempio ex ambienti temporanei trasformati dall'uomo in ambienti permanenti. In ogni caso è fondamentale che tali interventi non compromettano la conservazione di specie autoctone particolarmente sensibili.

7.2.4.7. Rilascio di animali sterili

Un recente studio pilota ha proposto, come strumento di controllo, il rilascio in natura di maschi sterili creati in laboratorio, per andare a diminuire progressivamente il successo riproduttivo della specie (Descamps & De Vocht, 2017). Considerata l'indisponibilità attuale di dati che supportino la validità del metodo e il generale divieto di rilascio in

natura di una specie esotica invasiva **non si ritiene tale alternativa gestionale al momento applicabile.**

7.2.4.8. Utilizzo di sostanze chimiche

Il controllo chimico è stato sperimentato per ridurre le popolazioni di altre specie di rane invasive (Campbell & Kraus, 2002). Il rotenone, ad esempio, viene usato con successo per l'eliminazione della fauna ittica e potenzialmente anche per la rana toro (Finlayson et al., 2000; Rayner & Creese, 2006). Il diossido di carbonio può essere usato per sopprimere le larve di rana toro, ma non è efficace sugli adulti (Abbey-Lambertz et al., 2014).

Un recente studio (Witmer et al., 2015) ha evidenziato come l'utilizzo di cloroxilenolo (5%), o caffeina (10%), o l'uso combinato di rotenone (1%) e permetrina (4.6%), spruzzati direttamente sulla cute di metamorfosati, induca una rapida morte degli individui. Concretamente, il metodo viene proposto in abbinamento ad azioni di modifica degli ambienti acquatici, come ad esempio il prosciugamento dei corpi idrici fino a un livello accettabile perché la nebulizzazione dei composti chimici possa raggiungere efficacemente il maggior numero di individui possibile. Non si tratta tuttavia di un metodo applicabile in qualunque contesto, a meno che l'obiettivo generale non sia il completo ripristino del corpo idrico interessato, a causa del peggioramento della qualità delle acque dovuto alla presenza di tali sostanze e dei probabili impatti sulle specie acquatiche autoctone.

Gli stessi autori riconoscono infatti che prima di poter utilizzare simili composti chimici per il controllo della rana toro sia necessario effettuare ulteriori ricerche sui potenziali effetti di queste sostanze, che potrebbero coinvolgere numerose componenti faunistiche autoctone (invertebrati e vertebrati) con gravi danni sugli ecosistemi.

Per le ragioni sopra-evidenziate, il controllo della rana toro attraverso l'uso di sostanze chimiche **non è una alternativa gestionale applicabile in Italia**, anche considerando il fatto che attualmente non esistono sostanze chimiche registrate per il controllo specifico della specie.

7.2.4.9. Soppressione eutanasica

Ai sensi della vigente normativa europea e nazionale, gli individui catturati con i metodi sopra descritti non potranno essere rilasciati, ma dovranno essere trattenuti per essere destinati alla soppressione eutanasica, attuata con metodi atti a risparmiare agli animali dolore, angoscia o sofferenza evitabili.

Tra i metodi comunemente utilizzati, che incontrano anche il benessere degli organismi internazionali di riferimento per il benessere animale, come l'AVMA (*American Veterinary Medical Association*) vi è l'utilizzo di sostanze chimiche che vadano a causare una morte rapida e indolore, senza conseguenze per l'ambiente.

In particolare, per la soppressione degli anfibi, viene raccomandato l'utilizzo in soluzione di anestetici in sovraddosaggio, quali tricaina metan sulfonato (MS 222) e cloridrato di benzocaina (Close et al., 1996a; Close et al., 1996b; AVMA, 2020).

La facilità di applicazione e la sicurezza per gli operatori e l'ambiente rappresentano i principali vantaggi di questo metodo; in ogni caso le operazioni devono essere effettuate all'interno di contenitori chiusi per evitare ogni rilascio di sostanze chimiche nell'ambiente (Adriaens et al., 2013) e sempre sotto la responsabilità di un medico veterinario.

Il congelamento può essere utilizzato solo su animali precedentemente anestetizzati (da un medico veterinario, perché la formazione di cristalli di ghiaccio nei tessuti corporei può essere estremamente dolorosa (Close et al., 1996b; AVMA, 2020).

Altri metodi di soppressione sperimentati sulla rana toro quali l'enervazione o *pithing*, (Close et al., 1996b) e la concussione cerebrale (Kamoroff et al., 2020) sono proibiti in base alla normativa nazionale pertanto non utilizzabili.

7.3 Trattamento delle carcasse

L'eliminazione delle carcasse degli animali sottoposti a soppressione eutanasica deve avvenire 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), con particolare riferimento alla presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis* o di *Ranavirus* trasmissibili ad altre specie di anfibi. È possibile prevedere anche il conferimento di esemplari a istituti di ricerca o musei che ne facciano esplicita richiesta, ai sensi del D. Lgs 230/2017.

Saranno concordate con le autorità sanitarie competenti per territorio 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.

7.4 Personale coinvolto

Gli interventi di gestione della specie esotica dovranno essere condotti da personale appositamente formato e specificatamente autorizzato dalla Regione, Provincia Autonoma o Area protetta territorialmente competente. Il personale adibito alle operazioni deve essere formato nelle diverse procedure che prevedono cattura, manipolazione e soppressione degli animali.

Da non trascurare gli aspetti comunicativi, al fine di sensibilizzare la popolazione al problema e coinvolgerla attivamente nel monitoraggio della specie esotica invasiva sul territorio: in tal senso è possibile prendere a riferimento, adattandole a ciascun contesto locale, le buone pratiche sviluppate da altri progetti LIFE con la finalità di trattare efficacemente il problema delle specie alloctone invasive, come ad esempio il LIFE + CSMON-LIFE (<http://www.csmon-life.eu/>), il LIFE ASAP (<https://lifeasap.eu/index.php/it/>) e, in Francia, il progetto LIFE CROAA (*Control strategies Of Alien invasive Amphibians*, www.life-croaa.eu), attualmente in corso, volto alla conservazione delle specie di anfibi autoctone tramite il controllo della diffusione delle due specie alloctone *Lithobates catesbeianus* e *Xenopus laevis*.

8 Tecniche di monitoraggio

8.1 Misure di sorveglianza e rilevamento precoce

La presenza di una specie alloctona invasiva rappresenta sempre un potenziale rischio con impatti a più livelli; per questo è importante non sottovalutare le eventuali segnalazioni provenienti dal territorio. È quindi fondamentale verificare tutte le nuove segnalazioni relative ad aree in cui la specie risultava assente. In questo senso, devono essere contattati in primo luogo i referenti delle varie segnalazioni, avendo maggiori dettagli riguardo le circostanze dell'avvistamento; in secondo luogo devono essere contattati tutti gli enti coinvolti sul territorio, come ad es. Comuni, Uffici Territoriali Regionali (UTR), personale dei Parchi, GEV, Polizia Provinciale, associazioni venatorie e di pesca, ecc., al fine di ottenere un quadro più completo della situazione a livello locale e

allo stesso tempo creando una rete di contatti che possa fornire attivamente informazioni circa la segnalazione sul territorio di ulteriori avvistamenti.

Le attività di sorveglianza vanno inoltre concentrate sui potenziali punti di ingresso della specie: come già riportato nei paragrafi 3 e 7.1.1, particolare attenzione dovrà essere prestata alle operazioni di ripopolamento ittico, per evitare rilasci involontari della specie esotica.

La verifica della presenza della specie potrà essere effettuata anche tramite il rilevamento del DNA ambientale (Ficetola et al., 2008). Il metodo consiste nel campionare una piccola quantità di acqua dai corpi idrici dove si suppone la presenza della specie, e nell'estrarre e amplificare il DNA presente. Tale metodo è stato positivamente sperimentato in diversi paesi (Ficetola et al., 2008; Dejean et al., 2012; Kamoroff et al., 2020 e risulta particolarmente utile per individuare aree di recente colonizzazione e permettere la cattura degli animali prima che formino popolazioni abbondanti, di difficile (Ficetola et al., 2008), oppure per verificare la sussistenza della specie in aree in cui si ritiene estinta per mancanza di segnalazioni recenti.

Nel caso di conferma della comparsa della specie sul territorio regionale o della ricomparsa a seguito di un'operazione di eradicazione, le Regioni e le Province autonome devono notificare al MiTE e all'ISPRA il rilevamento e applicare le misure di eradicazione rapida ai sensi del presente piano per assicurare l'eliminazione completa e permanente della popolazione della specie dal territorio regionale o provinciale.

8.2 Monitoraggio presenza

Ai sensi dell'art. 18 del D. Lgs. 230/17, le attività di monitoraggio sono volte all'aggiornamento della situazione distributiva della specie, nelle Regioni in cui risulta essere già presente, e a rilevare tempestivamente nuovi nuclei di presenza, al fine di assicurare una rapida risposta.

La più semplice tecnica di monitoraggio per verificare la presenza della specie è rappresentata dal *Visual Encounter Survey* (VES), cioè dall'osservazione diretta delle ovature, delle larve e dei metamorfosati nelle località indagate, lungo transetti o in aree note, soprattutto in siti con difficile accesso al corpo idrico ma con buona visibilità delle sponde anche a distanza (Heyer et al., 1994).

Oltre ai transetti visivi, potranno essere effettuati anche punti di ascolto – *Audio strip transects* (AST), dato che, come in molte altre specie di anfibii, i maschi della rana toro, in periodo riproduttivo, emettono potenti e inconfondibili vocalizzazioni per richiamare le femmine e scoraggiare potenziali rivali (Heyer et al., 1994).

Entrambi questi metodi, oltre al semplice dato di presenza, forniscono stime di abbondanza relativa della specie nel territorio indagato.

Per la stima delle densità di larve, utile per stabilire il numero di nasse ottimale per la rimozione delle stesse, potranno essere effettuate pescate campione tramite retino.

Il protocollo di monitoraggio potrà essere stabilito sulla base di protocolli già esistenti per specie con simile fenologia e preferenze ambientali, come ad esempio le rane verdi appartenenti al genere *Pelophylax* (Bellati & Razzetti, 2016).

Le stazioni di campionamento sono da individuarsi all'interno di un congruo numero di celle 10×10 km in cui è nota la presenza della specie, concentrandosi principalmente nelle aree al margine della distribuzione nota, per verificare se la specie si sia ulteriormente diffusa, e nelle aree protette ai sensi delle vigenti normative comunitarie e nazionali, per determinare se la specie esotica sia entrata in sintopia con specie autoctone protette. I rilevatori, che opereranno dopo il tramonto, dovranno conteggiare gli individui presenti nella zona umida cercando di percorrerne completamente le sponde, mentre, in caso di corsi d'acqua a lento scorrimento, effettueranno transetti lineari di 250 m.

I rilevatori dovranno inoltre effettuare punti di ascolto della durata di 10 minuti, riportando il numero massimo degli individui in canto (o la classe di abbondanza in caso di incertezza). In caso di assenza di individui in canto si suggerisce la stimolazione riproducendo il canto della specie con un registratore.

Il periodo di maggiore attività della specie è compreso tra aprile e giugno, evitando giorni ventosi e con pioggia intensa (Ficetola et al., 2007).

Per ogni anno di monitoraggio è opportuno effettuare almeno tre uscite per sito nel periodo indicato, possibilmente distribuite in visite equidistanti, al fine di rilevare i diversi stadi vitali della specie (ovature, larve, neometamorfosati e adulti).

Per realizzare il monitoraggio è sufficiente la presenza di una persona; tuttavia, dal momento che al rilevamento della specie dovrà seguire la cattura per la rimozione degli individui e la successiva soppressione eutanasica, è consigliabile l'impiego di un secondo operatore, anche per motivi di sicurezza.

Tutti i siti prescelti saranno schedati e i transetti o i punti di osservazione/cattura cartografati per permettere ripetizioni standardizzate negli anni, che dovranno essere

effettuate a cadenza annuale, al fine di verificare l'efficacia delle attività di eradicazione/controllo intraprese. 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.

Il monitoraggio della presenza della specie potrà essere effettuato anche tramite il rilevamento del DNA ambientale (Ficetola et al., 2008), come riportato nel paragrafo precedente.

8.3 Monitoraggio dell'efficacia degli interventi

Il monitoraggio, esplicitamente previsto dalle norme sopra richiamate, è anche finalizzato a verificare l'efficacia degli interventi gestionali effettuati, determinando l'andamento delle diverse popolazioni di rana toro (in diminuzione, stabile, in aumento). A tale scopo, dovrà essere privilegiato l'utilizzo di tecniche di monitoraggio in grado di fornire indici di abbondanza relativa o di stimare la densità (vedasi paragrafo 8.2). Nel caso in cui si utilizzino le catture per il controllo o l'eradicazione delle popolazioni, gli andamenti delle popolazioni saranno determinati tramite un'analisi della frequenza di cattura, che dovrebbe progressivamente calare, fino ad annullarsi, in caso di successo completo dell'eradicazione.

Con cadenza annuale sono valutati e rendicontati al MiTE i risultati degli interventi effettuati secondo quanto previsto dall'art.18, comma 5 del D.Lgs 230/2017.

Bibliografia

ABBEY-LAMBERTZ, M., RAY, A., LAYHEE, M., DENSMORE, C., SEPULVEDA, A., GROSS, J., WATTEN, B., 2014. Suppressing bullfrog larvae with carbon dioxide. *Journal of Herpetology* 48: 59–66.

ADAMS, M.J., PEARL, C.A., BURY, R.B., 2003. Indirect facilitation of an anuran invasion by non-native fishes. *Ecology Letters* 6: 343–351.

- ADRIAENS, T., DEVISSCHER, S., LOUETTE, G., 2013. Risk analysis of American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. Risk analysis report of non-native organisms in Belgium, 57 pp.
- ALBERTINI, G., 1970. Sulla diffusione della rana toro (*Rana catesbeiana* Shaw) importata nel mantovano. Atti e memorie della accademia di Agricoltura, Scienze e Lettere Di Verona, 20 (1968–69): 67–106.
- ALBERTINI, G., LANZA, B., 1987. *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 in Italy. *Alytes*, 6: 117–129.
- Alonzi A, Aragno P, Carnevali L, Grignetti A, Genovesi P, 2020. Prima rendicontazione nazionale ai sensi dell'art.24 del Reg. (UE) n. 1143/2014 sulle specie esotiche invasive (2016-2018). Rapporto tecnico.
- Andreone, F., Castellano, S., Garabello, M., 1987. Sulla *Rana catesbeiana* Shaw 1802. *Rivista Piemontese di Storia Naturale* 8: 265-267.
- ANDREONE, F., MAROCCO, R., 1999. *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). In: Andreone, F. & Sindaco, R. (eds): *Erpetologia del Piemonte e della Valle d'Aosta. Atlante degli Anfibi e dei Rettili*, Monografie XXVI (1998), Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino: 192-193.
- AVMA, 2020. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition, 121 pp.
- BARRINGER, T., 2019. Seasonal prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in central Massachusetts *Lithobates catesbeianus* tadpoles. Honors Theses, 48 pp.
- BEEBEE, T.J.C., 1996. *Ecology and Conservation of Amphibians*. Conservation Biology Series, Chapman & Hall, 214 pp.
- BELLATI, A., RAZZETTI, E., 2016. *Pelophylax lessonae* – *Pelophylax kl. esculentus* – *Pelophylax ridibundus*. In: Stoch, F., Genovesi, P. (ed.), *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: 238-241.
- BERGER, L., SPEARE, R., DAZSAK, P., GREEN, D.E., CUNNINGHAM, A.A., GOGGIN, C.L., SLOCOMB, R., RAGAN, M.A., HYATT, A.D., MCDONALD, K.R., HINES, H.B., LIPS, K.R., MARANTELLI, G., PARKES, H., 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *P Natl Acad Sci-Biol*. 95(15): 9031-9036.
- BERRONEAU, M., DETAINT, M., COÏC, C., 2008. Bilan du programme de mise en place d'une stratégie d'eradication de la grenouille taureau *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) en

Aquitaine (2003- 2007) et perspectives. Bulletin de la Société Herpétologique Française 127: 35-45.

BURY, R.B., WHELAN, J.A., 1985. Ecology and management of the bullfrog. US Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service Ed., USA.

CAMPBELL, E., III, KRAUS, F., 2002. Neotropical frogs in Hawaii: status and management options for an unusual introduced pest. Proceedings of Vertebrate Pest Conference 20:316–318.

CLOSE, B., BANISTER, K., BAUMANS, V., BERNOTH, E., BROMAGE, N., BUNYAN, J., ERHARDT, W., FLECKNELL, P., GREGORY, N., HACKBARTH, H., MORTON, D., WARWICK, C., 1996a. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. Parks Road, Oxford OX1 3PT, UK: University of Oxford V.s., c/o University Laboratory of Physiology. 294-316.

CLOSE, B., BANISTER, K., BAUMANS, V., BERNOTH, E., BROMAGE, N., BUNYAN, J., ERHARDT, W., FLECKNELL, P., GREGORY, N., HACKBARTH, H., MORTON, D., WARWICK, C., 1996b. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. Parks Road, Oxford OXI 3PT, UK: University of Oxford V.S., c/o University Laboratory of Physiology, 33 pp.

CORSE, W.A., METTER, D.E., 1980. Economics, adult feeding and larval growth of *Rana catesbeiana* on a fish hatchery. Journal of Herpetology 14: 231–238.

D'AMORE, A., KIRBY, E., McNICHOLAS, M., 2009. Invasive species shifts ontogenetic resource partitioning and microhabitat use of a threatened native amphibian. Aquatic Conservation: Marine And Freshwater Ecosystems 19(5): 534-541.

DEJEAN, T., VALENTINI, A., MIQUEL, C., TABERLET, P., BELLEMAIN, E., MIAUD, C., 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* Journal of Applied Ecology. 49(4): 953-959.

DESCAMPS, S., DE VOCHT, A. 2017. The sterile male release approach as a method to control invasive amphibian populations: a preliminary study on *Lithobates catesbeianus*. Management of Biological Invasions 8: 361–370.

- DETAINT, M., COIČ, C., 2006. La Grenouille Taureau *Rana catesbeiana* dans le sud-ouest de la France. Premiers résultats du programme de lutte. Bulletin de la Société Herpétologique de France 117: 41-56.
- DI CERBO, A. R., & RAZZETTI, E., 2004. Erpetofauna alloctona presente in Lombardia. Atlante degli Anfibi e dei Rettili della Lombardia, 171-172.
- DI NICOLA, M, CAVIGIOLI, L, LUISELLI, L., ANDREONE, F., 2019. Anfibi e rettili d'Italia. Edizioni Belvedere, Latina.
- FERRI, V., 2006. *Rana catesbeiana* Shaw, 1802.330-333. In: Sindaco, R., Doria, G., Razzetti, E. & Bernini, F. (Eds). Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia / Atlas of Italian Amphibians and Reptiles. Societas Herpetologica Italica – Edizioni Polistampa, Firenze, 330-333.
- FICETOLA, G.F., COIČ, C., DETAINT, M., BERRONEAU, M., LORVELEC, O., MIAUD, C., 2007. Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. Biological Invasions, 9, 767–772.
- FICETOLA, G.F., MIAUD, C., POMPANON, F., TABERLET, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters 4(4): 423-425.
- FICETOLA, G.F., MAIORANO, L., FALCUCCI, A., DENDONCKER, N., BOITANI, L., PADOA-SCHIOPPA, E., MIAUD, C., THUILLER, W., 2010. Knowing the past to predict the future: land-use change and the distribution of invasive Bullfrogs. Global Change Biology 16: 528–537.
- FINLAYSON, B., SCHNICK, R., CAILTEUX, R., DEMONG, L., HORTON, W., MCCLAY, W., THOMPSON, C., TICHACEK, G., 2000. Rotenone use in fisheries management. American Fisheries Society, Bethesda
- Fisher, M., Garner, T., Walker, S.F. 2020. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian Chytridiomycosis in space, time, and host. Ann Rev Microbiol 63: 291-310.
- GASCON, C., COLLINS, J., MOORE, R., CHURCH, D., MCKAY, J. MENDELSON III, J., (2007). Amphibian Conservation Action Plan Proceedings: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005, 62 pp.

- GERVASI, S.S., URBINA, J., HUA, J., CHESTNUT, T.A., RELYEA, R.R., BLAUSTEIN, A., 2013. Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 10(2):172.
- GROFFEN, J., KONG, S., YIKWEON, J., BORZÉE, A., 2019. The invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in the Republic of Korea: history and recommendations for population control 10:517-535.
- GUARINO, F.M., APREA, G., CAPUTO, V., MAIO, G., ODIERNA, G., PICARIELLO, O., 2012. Atlante degli anfibi e dei rettili della Campania. Massa editore, Napoli, 344 pp.
- HEYER, W.R., DONNELLY, M.A., MCDIARMID, R.W., HAYEK, L.A.C., FOSTER, M.S., 1994. Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for Amphibians. Smithsonian Institution, U.S.A., 364 pp.
- HECNAR, S. J., M'CLOSKEY, R.T., 1997a. The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution. *Biological Conservation* 79: 123–131.
- HECNAR, S. J., M'CLOSKEY, R. T., 1997b. Changes in the composition of a Ranid frog community following Bullfrog extinction. *The American Midland Naturalist*, 137(1):145-150.
- HOUALAHAN, J.E., SCOTT FINDLAY, C., SCHMIDT, B.R., MEYER, A.H., KUZMIN ,S.L., 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404: 752-755.
- KAMOROFF, C., DANIELE, N., GRASSO, R., RISING, R., ESPINOZA, T., GOLDBERG, C., 2020. Effective removal of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) on a landscape level: long term monitoring and removal efforts in Yosemite Valley, Yosemite National Park. *Biological Invasions*. 22 (2):617-626.
- KIESECKER, J.M, BLAUSTEIN, A.R, MILLER, C.L., 2001 Potential mechanisms underlying the displacement of native red-legged frogs by introduced bullfrogs. *Ecology* 82:1964–1970.
- KUPFERBERG, S.J., 1997. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: the role of larval competition. *Ecology* 78:1736–1751.
- LANZA, B., 1983. Anfibi e rettili. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. 27 Anfibi, Rettili (Amphibia, Reptilia) [Collana del progetto

finalizzato “Promozione della qualità dell’ambiente” AQ/1/205]. Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 196 pp.

LANZA, B., ANDREONE, F., BOLOGNA, M.A., CORTI, C., RAZZETTI, E., 2007. Fauna d'Italia, Amphibia, Calderini, Bologna, 537 pp.

LAPINI, L., DALL’ASTA, A., BRESSI N., DOLCE, S., PELLARINI, P., 1999. Atlante corologico degli Anfibi e dei Rettili del Friuli-Venezia Giulia. Comune di Udine, edizioni del Museo Friulano di Storia Naturale, 149 pp.

LEVER, C., 2003. Naturalized reptiles and amphibians of the world. Oxford University Press, New York, NY, 318 pp

LOUETTE, G., BAUWENS, D., 2013. Amphibian declines and conservation in Belgium. In: Amphibian biology. Status of conservation and decline of amphibians: eastern hemisphere – Western Europe: 66-73.

LOUETTE, G., DEVISSCHER, S., ADRIAENS, T., 2013. Control of invasive American bullfrog *Lithobates catesbeianus* in shallow water bodies. European Journal of Wildlife Research 59:105–114.

LOWE, S., BROWNE, M., BOUDJELAS, S., DE POORTER, M., 2000. 100 of the World’s Worst Invasive Alien Species - A selection from the Global Invasive Species Database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) - a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12pp.

MANENTI, R., CARDARELLI, E., RUBOLINI, D., FICETOLA, F., BOGLIANI, G., 2018. *Lithobates catesbeianus*. In: Bisi, F., Montagnani, C., Cardarelli, E., Manenti, R., Trasforini, S., Gentili, R., Ardenghi N.M.G., Citterio S., Bogliani G., Ficetola F., Rubolini D., Puzzi C., Scelsi F., Rampa A., Rossi, E., Mazzamuto M.V., Wauters, L.A., Martinoli, A.(eds.). Strategia di azione e degli interventi per il controllo e la gestione delle specie alloctone in Regione Lombardia.

ORCHARD, S.A., 2011. Removal of the American bullfrog *Rana* (*Lithobates*) *catesbeiana* from a pond and a lake on Vancouver Island, British Columbia, Canada In: Veitch, C.R.; Clout, M.N. and Towns, D. R. (eds.). Island invasives: eradication and management. IUCN, Gland, Switzerland: 217-221.

- PICARIELLO, O., 1993. Dati preliminari riguardanti l'impatto delle captazioni idriche e la batracofauna alloctona sulle popolazioni di anfibi in Campania. Quaderni civica Stazione Idrobiologica Milano, 20: 95-100.
- PRYOR, G., 2009. Growth rates and digestive abilities of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) fed algal diets. *Journal of Herpetology* 37: 560-566.
- RAYNER, T.S., CREESE, R.G., 2006. A review of rotenone use for the control of non-indigenous fish in Australian fresh waters, and an attempted eradication of the noxious fish, *Phalloceros caudimaculatus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 42: 477-486.
- REASER, J.K., 2000. Amphibian declines: an issue overview. Federal Taskforce on Amphibian Declines and Deformities., Washington D. C., 34 pp.
- REINHARDT, F., HERLE, M., BASTIANSEN, F., STREIT, B.. 2003. Economic impact of the spread of alien species in Germany. Umweltbundesamt Berlin.
- SCALERA, R., BEVILACQUA, G., CARNEVALI, L., GENOVESI, P (a cura di), 2018. Le specie esotiche invasive: andamenti, impatti e possibili risposte. ISPRA, 121 pp.
- SCHWALBE, C., ROSEN, P., 1988. Preliminary report on effect of bullfrogs in wetland herpetofaunas in southeastern Arizona. Proceedings of the Symposium on Management of Amphibians, Reptiles, and Small Mammals in North America, General Technical Report RM, 166.
- TESSA, G., DELFORNO, C., Govindarajulu, P., TISSOT, N., MIAUD, C., ANDREONE, F., 2016. Age and body size in four introduced populations of the American bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Ranidae). *Italian Journal of Zoology* 83 (4): 497-502.
- TSIAMIS, K., GERVASINI, E.; DERIU, I.; CARDOSO, A. C., 2019. Updates on the baseline distribution of Invasive Alien Species of Union concern. Publications Office of the European Union; 2019, EUR 29726 EN, doi:10.2760/28412
- VAN ROOIJ, P., MARTEL, A., HAESBROUCK, F., PASMANS, F., 2015. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research* 46: 137.
- WERNER, E., WELLBORN, G., MCPEEK, M., 1995. Diet composition in postmetamorphic bullfrogs and green Frogs: implications for interspecific predation and competition. *Journal of Herpetology*, 29(4): 600-607.

WITMER, G.W., SNOW, N.P. MOULTON, R.S., 2015. Efficacy of potential chemical control compounds for removing invasive American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). SpringerPlus 4, 497. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1319-6>

YUAN, Z.-Y., ZHOU, W.-W., CHEN, X., POYARKOV, N., CHEN, H., JANG-LIAW, N.-H., CHOU, W.-H., MATZKE, N., IIZUKA, K., MIN, M.-S., KUZMIN, S., ZHANG, Y.-P., CANNATELLA, D., HILLIS, D., CHE, J., 2016. Spatiotemporal diversification of the true Frogs (Genus *Rana*): a historical framework for a widely studied group of model organisms. Systematic Biology. 65: 1-19.