

Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo  
ai sensi della Convenzione ISPRA-MITE

Relazione tecnica

# **LA POPOLAZIONE DI LUPO NELLE REGIONI DELL'ITALIA PENINSULARE 2020/2021**

APRILE 2022

Autori della relazione tecnica: Aragno P.<sup>1</sup>, Salvatori V.<sup>2</sup>, Caniglia R.<sup>3</sup>, De Angelis D.<sup>4</sup>, Fabbri E.<sup>3</sup>, Gervasi V.<sup>4</sup>, La Morgia V.<sup>5</sup>, Marucco F.<sup>6</sup>, Mucci N.<sup>3</sup>, Velli E.<sup>3</sup>, Genovesi P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ISPRA – Dipartimento BIO, Area per i pareri tecnici e per le strategie di conservazione e gestione del patrimonio faunistico nazionale e per la mitigazione di danni ed impatti

<sup>2</sup> ISPRA – Dipartimento BIO, Servizio Coordinamento Fauna Selvatica

<sup>3</sup> ISPRA – Dipartimento BIO, Area per la genetica della conservazione

<sup>4</sup> Federparchi (Federazione Italiana dei Parchi e delle Riserve Naturali)

<sup>5</sup> ISPRA – Dipartimento BIO, Area per l'epidemiologia, l'ecologia e la gestione della fauna stanziale e degli habitat

<sup>6</sup> Università degli Studi di Torino – Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi

Il contributo dei diversi autori è stato:

Coordinamento generale: Paola Aragno, Piero Genovesi e Valeria Salvatori

Coordinamento regionale: Paola Aragno, Valentina La Morgia e Valeria Salvatori

Analisi genetiche: Romolo Caniglia, Elena Fabbri, Nadia Mucci ed Edoardo Velli

Gestione del flusso dei dati: Daniele De Angelis

Impostazione del disegno di campionamento: Paola Aragno, Valentina La Morgia e Francesca Marucco

Analisi statistiche: Daniele De Angelis e Vincenzo Gervasi

Stesura dei testi: Paola Aragno, Romolo Caniglia, Daniele De Angelis, Elena Fabbri, Vincenzo Gervasi, Valentina La Morgia e Valeria Salvatori

Coordinatori delle attività di campo:

Alessandro Asprea, Remo Bartolomei, Duccio Berzi, Marco Bonanni, Mia Canestrini, Francesca Ciuti, Enza Fava, Paola Fazzi, Lorenzo Gaudiano, Marco Lucchesi, Sara Marini, Luigi Molinari, Federico Morimando, Tommaso Notomista, Davide Pagliaroli, Davide Palumbo, Milena Provenzano, Gabriella Rizzardini, Carmine Romano, Francesca Silvestri.

***Indicazione per la citazione:***

Aragno P., Salvatori V., Caniglia R., De Angelis D., Fabbri E., Gervasi V., La Morgia V., Marucco F., Mucci N., Velli E., Genovesi P., 2022. La popolazione di lupo nelle regioni dell'Italia peninsulare 2020/2021. Relazione tecnica realizzata nell'ambito della convenzione ISPRA-Ministero della Transizione Ecologica "Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo".

***Con il contributo delle seguenti istituzioni e associazioni:***

Federparchi (Federazione Italiana dei Parchi e delle Riserve Naturali)

Comando Unità Forestali, Ambientali e Agroalimentari dell'Arma dei Carabinieri

Regione Abruzzo, Regione Basilicata, Regione Calabria, Regione Campania, Regione Emilia-Romagna  
Regione Lazio, Regione Marche, Regione Molise, Regione Puglia, Regione Toscana, Regione Umbria  
ARPA Umbria, ASReM Molise, ATC PG1 e PG2

Città Metropolitana di Roma Capitale, D.G. Ambiente della Regione Lazio, Provincia di Taranto,  
Provincia di Viterbo, Ufficio territoriale di Grosseto della Regione Toscana,

Polizia Provinciale di Ancona, Polizia Provinciale di Macerata

Unione Montana Esino Frasassi, Unione Montana Potenza Esino

Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise, Parco Nazionale dell'Alta Murgia, Parco Nazionale dell'Appennino Tosco Emiliano, Parco Nazionale dell'Appennino Lucano Val d'Agri Lagonegrese, Parco Nazionale dell'Aspromonte, Parco Nazionale del Cilento Vallo di Diano e Alburni, Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna, Parco Nazionale del Gargano, Parco Nazionale del Gran Sasso Monti della Laga, Parco Nazionale della Maiella, Parco Nazionale del Pollino, Parco Nazionale della Sila

Parco Naturale Regionale delle Serre, Parco Naturale Regionale Sirente Velino, Riserva Naturale Regionale Monte Genzana Alto Gizio, Riserva Naturali delle Montagne della Duchessa, Navegna-Cervia, Nazzano-Tevere Farfa, Canale Monterano, e ai parchi Regionali del Lamone, Monte Rufeno, Veio, Bracciano - Martignano, Monti Ausoni e Lago di Fondi, Monti Aurunci, Castelli Romani, Parco della Gola della Rossa e di Frasassi, Parco Regionale delle Alpi Apuane, Parco Regionale di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli, Parco Regionale della Maremma, Enti per la Gestione dei Parchi e della Biodiversità Emilia Orientale ed Emilia Centrale, Parco Regionale della Vena del Gesso Romagnola, Parco Regionale Delta del Po

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli "Federico II, Università degli studi del Molise, Università di Teramo, Università di Firenze, Università di Parma, Università di Perugia, Università di Pisa, Università di Roma "La Sapienza"

AIGAE, CAI, Legambiente, LIPU, WWF Italia onlus

Ardea, ARiF Associazione Rilevatori Faunisti, ASNU, Associazione guide ufficiali ed esclusive del parco nazionale dell'appennino lucano Val D'agri - Lagonegrese -ONLUS, Associazione Guide Ufficiali ed esclusive del Parco del Nazionale Pollino, Canislupus Italia, Centro Studi Appennino Lucano, Centro Studi de Romita, Centro Studi per l'Ecologia e la Biodiversità degli Appennini, Cooperativa Serapia, Ecolato, Fare Ambiente, GEV Bo, GEV Faenza, Hystrix, I Dèi Camminanti, Intramontes, IoNonHoPauraDelLupo, K'Nature, NaturOffice APS, Piacenza Wildlife Rescue Center (CRAS), Salviamo l'Orso, Selvatica APS, SOS Natura, STERNA Soc coop arl, Terre del Mediterraneo, Thalassia, Wild Umbria

Guide Ufficiali dei Parchi Nazionali del Pollino, della Sila, dell'Aspromonte, dell'Appennino Lucano Val d'Agri Lagonegrese e dell'Alta Murgia.

***Ringraziamenti:***

*La raccolta dati alla base della presente relazione è il risultato dell'impegno di molti enti, professionisti, tecnici e volontari che hanno fornito un contributo essenziale. Si ringraziano tutti coloro che hanno collaborato al programma di monitoraggio del lupo nel territorio delle regioni peninsulari.*

## Indice

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	6
1 INTRODUZIONE	8
2 METODI DI CAMPIONAMENTO E DI ANALISI DELLO STATUS DELLA POPOLAZIONE DI LUPO NELLE REGIONI DELL'ITALIA PENINSULARE NEL 2020/2021	10
2.1 Il disegno di studio: la strategia di campionamento, i criteri standard ed i metodi applicati	10
2.1.1 Il campionamento estensivo nelle Regioni dell'Italia peninsulare	10
2.1.2 Il campionamento intensivo nelle Regioni dell'Italia peninsulare: aree campione	13
2.1.3 Le modalità di raccolta dei dati	14
2.1.4 Monitoraggio dello sforzo di campionamento e registrazione dei dati	17
2.1.5 Criteri standard per la classificazione e interpretazione dati	18
2.1.6 Criteri per l'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti	20
2.2 Il Network di operatori: la formazione e il coordinamento nelle regioni	21
2.2.1 La creazione e il coordinamento del network	21
2.2.2 La formazione	28
2.2.3 La gestione del flusso dei dati	30
2.3 Le analisi genetiche sui campioni biologici raccolti	31
2.3.1 Raccolta e conservazione dei campioni biologici	32
2.3.2 Estrazione del DNA	32
2.3.3 Determinazione del genotipo <i>multilocus</i> e discriminazione degli individui	33
2.3.4 Identificazione della specie e dei casi di ibridazione	34
2.3.5 Analisi delle relazioni parentali	35
2.4 Analisi dei dati e modellizzazione	35
2.4.1 Modello di occupancy	36
2.4.2 Modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito e modello integrato	41
2.4.3 Simulazioni per la valutazione del design analitico	44
3 LA POPOLAZIONE DI LUPO NELLE REGIONI DELL'ITALIA PENINSULARE NEL 2020/2021	47
3.1 Lo sforzo di campionamento e i dati raccolti	47
3.2 I risultati delle analisi genetiche sui campioni biologici analizzati	51
3.3 La distribuzione della popolazione di lupo nelle regioni dell'Italia peninsulare	57
3.4 La consistenza numerica della popolazione di lupo nelle regioni dell'Italia peninsulare	61
4 CONCLUSIONI	68
5 BIBLIOGRAFIA	69
6 ALLEGATI	74

## RIASSUNTO

L'area interessata dalla presenza del lupo in Italia è ormai ampia e numerose sono le interazioni della specie con le attività umane. Per questo la specie è stata oggetto di progetti e interventi di studio e monitoraggio sviluppati a vario titolo sul territorio peninsulare. Queste iniziative rappresentano però realtà frammentate, limitate nello spazio e nel tempo, e non sono in grado di fornire un'immagine aggiornata dello status della specie a livello nazionale. La mancanza di una stima affidabile e aggiornata della popolazione di lupo emerge come elemento particolarmente critico, che limita l'efficacia della pianificazione e realizzazione di iniziative gestionali.

Per sopperire a tale mancanza, nell'ambito del monitoraggio nazionale del lupo promosso dal Ministero della Transizione Ecologica e coordinato da ISPRA, è stata definita una strategia complessiva volta a produrre, *in primis*, stime di distribuzione e di abbondanza basate su metodi e approcci omogenei e coerenti con quelli adottati nelle regioni alpine.

La stima della distribuzione e abbondanza del lupo per le regioni peninsulari è stata organizzata suddividendo il territorio secondo una griglia costituita da celle di 10x10 km. A differenza di quanto realizzato per le Regioni alpine, in Italia peninsulare non si è potuta prevedere la raccolta dei dati in tutte le celle di presenza nota della specie, in primo luogo a causa della notevole estensione dell'area occupata dalla specie. Pertanto, l'area di studio è stata stratificata sulla base delle informazioni pregresse di presenza della specie, optando poi per l'adozione di un campionamento spazialmente bilanciato, in grado di assicurare una buona rappresentatività del campione.

Il campionamento della specie è avvenuto secondo due modalità complementari: 1) un campionamento estensivo di soli segni di presenza; 2) un campionamento genetico non invasivo di tipo intensivo all'interno di aree campione. Le procedure di stratificazione e selezione hanno portato all'individuazione di 449 celle per il campionamento estensivo, e di 186 celle per quello genetico, suddivise all'interno di 13 aree intensive.

In tutte le celle, sia di campionamento estensivo sia intensivo, la raccolta dei dati è stata condotta tramite la combinazione di un campionamento sistematico (sulla base di percorsi predefiniti e di foto-trappole) e di un campionamento opportunistico (dati ottenuti in modo casuale o sulla base di uscite non programmate spazialmente). È stato, inoltre, realizzato un accurato monitoraggio dello sforzo di campionamento per ogni cella della griglia e per ogni percorso, durante l'intero periodo di raccolta dati.

Ad inizio 2020 ISPRA ha stipulato una convenzione con Federparchi per la collaborazione nella realizzazione della indagine nell'Italia peninsulare, in particolare per la creazione di una squadra di 20 tecnici altamente qualificati incaricati del coordinamento della raccolta dei dati e per la gestione del flusso dei dati. Nel maggio 2020 è stata invece avviata una concreta collaborazione tra ISPRA e il Comando Unità Forestali, Ambientali e Agroalimentari (CUFAA) dell'Arma dei Carabinieri, mentre nei mesi di maggio-luglio 2020 ISPRA ha preso contatto con alcune delle principali associazioni

ambientaliste presenti a scala nazionale, in particolare il WWF Italia Onlus, la LIPU e Legambiente, e altre associazioni di soggetti attivi sul territorio, quali il CAI (Club Alpino Italiano) e l'AIGAE (Associazione Italiana Guide Ambientali Escursionistiche). Inoltre, attraverso i tecnici Federparchi, è avvenuto il coinvolgimento di numerose altre associazioni, Università e soggetti presenti a scala locale. Complessivamente la raccolta dati nella penisola è stata realizzata da un Network composto di 775 operatori (oltre a 725 Carabinieri forestali), 344 dei quali appartenenti ad istituzioni e 431 appartenenti ad associazioni di volontari.

Durante il periodo di campionamento, a cadenza mensile, sono stati acquisiti dai tecnici Federparchi tutti i dati raccolti, è stato effettuato il controllo qualità, la pulizia, si è provveduto all'archiviazione e sono state successivamente realizzate mappe della distribuzione di tutti i segni di presenza di lupo raccolti e report relativi allo sforzo di campionamento realizzato lungo transetti e tramite foto-trappole e alla numerosità dei segni rilevati, al fine di valutare l'andamento della raccolta dei dati.

I campioni biologici non-invasivi (prevalentemente feci) raccolti nell'ambito del progetto sono stati analizzati secondo le metodiche di analisi in uso presso il laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione di ISPRA, che comprendono: l'estrazione del DNA, l'amplificazione dei frammenti genetici di interesse, il loro processamento e l'analisi statistica dei dati ottenuti. I campioni biologici pervenuti sono stati analizzati utilizzando: 1) 12 o 39 *loci* microsatellite autosomici per la determinazione del genotipo individuale e l'assegnazione della specie di appartenenza, rispettivamente per i campioni non-invasivi ed invasivi; 2) 4 *loci* microsatellite localizzati sul cromosoma Y e che sono ereditati solo per via paterna; 3) il sequenziamento di un frammento di 250 paia di basi della regione di controllo del DNA mitocondriale (mtDNA) ereditato solo per via materna; 4) l'analisi di una delezione di 3 paia di basi al gene CBD103 localizzato sul cromosoma 16 dei canidi (*k-locus*), responsabile della colorazione melanica del mantello.

La classificazione degli individui come lupi, ibridi recenti o introgressi è avvenuta sulla base di un valore soglia di assegnazione individuale ( $q$ ) alla popolazione italiana di lupo, che è stato identificato in modo da minimizzare sia il rischio di identificare come lupo un animale ibrido cane x lupo, sia quello di identificare come ibrido un individuo che invece appartiene alla popolazione italiana di lupo. Al fine di identificare i nuclei riproduttivi sui genotipi affidabili identificati è stata inoltre condotta un'analisi delle relazioni parentali. In particolare, tra tutte le coppie di individui identificati è stato calcolato un indice ( $r$ ) di *relatedness* che indica il grado di somiglianza genetica riscontrato tra due genotipi *multilocus* imputabile al fatto che gli individui siano fra loro parenti (discendenti). Inoltre è stato chiesto ai rilevatori di formulare, sulla base dei dati di campo a loro disposizione (siti di marcatura, dati ottenuti dal fototrappolaggio, morfologia del territorio, ecc.), delle ipotesi di appartenenza degli individui (genotipi) allo stesso nucleo familiare. Tali ipotesi sono state verificate sulla base dei risultati dell'analisi di *relatedness* condotta sui genotipi *multilocus* nucleari e sulla base degli altri marcatori genetici.

La strategia generale di analisi dei dati raccolti sul campo e analizzati in laboratorio è stata quella di costruire innanzitutto dei modelli di base, che fossero specifici ed appropriati per i vari tipi di dati

forniti dal campionamento, per poi integrarli in un unico modello generale, che valorizzasse e rendesse complementari le informazioni derivate dall'intero corpus di dati raccolti, producendo simultaneamente delle stime sia di distribuzione sia di abbondanza per il lupo in area appenninica. A tale scopo, è stato costruito un modello di *occupancy* sui dati di sola presenza della specie, che tenesse conto: 1) delle differenze di probabilità di rilevamento della specie tra celle diverse; 2) delle differenze di probabilità di presenza della specie in ogni cella, in funzione di una serie di variabili ambientali ed antropiche; 3) del rischio di erronea attribuzione di escrementi di cane a lupo. Tale modello ha rappresentato la base per la stima della distribuzione della specie nelle regioni peninsulari. Inoltre, sono stati utilizzati i dati genetici per la costruzione di un modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito (SECR), che consentisse di stimare: 1) la probabilità di cattura genetica per ogni individuo nel campione e per ogni cella nell'area di studio; 2) le modalità di uso dello spazio degli individui campionati e i loro effetti sulla probabilità di cattura genetica; 3) la densità media in ognuna delle 13 aree intensive.

Dopo aver costruito i singoli modelli, questi sono stati accoppiati in un unico modello integrato, che ha consentito di stimare simultaneamente la distribuzione e l'abbondanza complessiva della popolazione nell'intera area di studio. Ciò ha richiesto una forte estrapolazione dalle aree sottoposte a campionamento verso le aree non campionate. A tale scopo, è stato quindi utilizzato un doppio approccio di estrapolazione: Il primo approccio è stato quello di inserire una cosiddetta funzione di autocorrelazione spaziale, che consiste nello stimare la distribuzione e abbondanza della specie in una data cella, utilizzando le informazioni disponibili in tutte le celle ad essa adiacenti; il secondo approccio di estrapolazione è stato invece quello di utilizzare delle covariate ambientali e la loro correlazione con abbondanza e distribuzione delle specie.

Infine, sono state costruite delle simulazioni per valutare in che misura le stime ottenute avessero una buona probabilità di avvicinarsi ai valori reali dei parametri oggetto di studio. A tale scopo è stata costruita un'area simulata di 24.000 km<sup>2</sup>, in cui è stata generata una popolazione di circa 400 lupi, con valori di densità locale compresi tra 0 e circa 11 lupi / 100 km<sup>2</sup>. Sono state selezionate casualmente 4 aree intensive di 900 km<sup>2</sup> ciascuna e 38 celle estensive, all'interno delle quali sono stati poi simulati sia un campionamento genetico non invasivo, sia un campionamento di soli segni di presenza della specie. I dati simulati sono stati analizzati con lo stesso modello integrato applicato nel caso reale, in modo da valutare le performance, in termini di bias e precisione, di tale approccio analitico nella stima dei parametri di interesse.

In totale, nelle regioni peninsulari sono stati individuati 2.551 percorsi, corrispondenti ad uno sviluppo lineare complessivo di circa 12.108 km. Di questi, 2.282 percorsi sono stati indagati almeno una volta nell'ambito delle quattro sessioni di campionamento (da Ottobre 2020 ad Aprile 2021). Complessivamente, lo sforzo di campionamento lungo i percorsi è stato di 44.232 km, corrispondente ad una media di 6.319 km percorsi ogni mese ( $\pm 1.612$  SD; intervallo 4.315-8.797). Per l'attività di fototrappolaggio sistematico sono state impiegate in tutto 598 fototrappole. Ogni mese sono state utilizzate in media 247 fototrappole (intervallo 147-320), che sono rimaste attive mediamente 21,5 giorni al mese ( $\pm 0,9$  SD; range 19,7-23,9).



In totale, durante l'intero periodo di monitoraggio nell'area peninsulare sono stati raccolti 15.993 segni della presenza del lupo, rappresentati principalmente da escrementi (n=11.071), avvistamenti fotografici (n=4.285), tracce (n=408), carcasse di ungulati attribuibili ad eventi di predazione e/o consumo da parte del lupo (n=97), lupi morti (n=97), ululati (n=11), campioni di pelo (n=9), campioni di urina con sangue (n=8), campioni di saliva e altri tipi di segno (n=7).

Durante il periodo di indagine sono stati raccolti e indicati come potenzialmente idonei all'analisi genetica 2.801 campioni biologici, I campioni biologici raccolti sono rappresentati principalmente da campioni fecali (n=2.719), di cui 1.319 rinvenuti in celle interessate da campionamento intensivo, 1.254 in celle estensive e 146 al di fuori delle celle di campionamento. dei 1600 campioni non-invasivi analizzati, 1022 (63,9%) hanno restituito un genotipo *multilocus* affidabile per l'assegnazione alla popolazione di riferimento, mentre per 971 campioni (60,7%) è stato possibile anche ricostruire il profilo genetico individuale. In seguito alle analisi di assegnazione Bayesiana per la determinazione della specie di appartenenza e l'individuazione di eventuali segni di ibridazione con il cane domestico, dei 1054 genotipi affidabili, 671 sono stati attribuiti alla popolazione italiana di lupo (*Canis lupus italicus*) e sono risultati corrispondere a 373 individui, pari al 60% dei genotipi individuali identificati (180 femmine, 168 maschi e 25 individui per i quali non è stato determinato il sesso di appartenenza). Altri 133 campioni, corrispondenti a 109 individui (27 femmine, 75 maschi e 7 di incerta attribuzione al sesso) e cioè al 17,5% dei genotipi unici, sono invece stati assegnati al gruppo del cane domestico (*Canis lupus familiaris*). Altri 96 campioni, corrispondenti a 60 individui, di cui 26 femmine, 29 maschi e 5 incerti al sesso, ovvero il 9,6% dei genotipi unici individuali, sono poi stati identificati come ibridi recenti. Infine in 154 campioni corrispondenti a 80 individui (25 femmine, 49 maschi e 6 senza attribuzione del sesso) e al 12,9% dei genotipi unici, sono state rilevate tracce di introgressione canina ad uno o più dei marcatori molecolari analizzati. La maggior parte degli individui sono stati campionati una volta soltanto (62,77%) mentre i genotipi ricampionati da 2 a 3 volte ammontano rispettivamente al 19,10% e 10,33% del totale. Le proporzioni di individui campionati 4 o 5 volte risultano inferiori al 5% e solo pochissimi individui hanno avuto un tasso di ricampionamento superiore.

La modellizzazione dei dati raccolti e analizzati ha messo in evidenza come la probabilità di rilevare segni di presenza di lupo sia stata fortemente influenzata dall'entità dello sforzo prodotto all'interno di ogni cella di campionamento. Ciò è risultato vero sia per i segni individuati lungo i transetti, sia per quelli ottenuti tramite l'uso di fototrappole. Le aree con una maggiore copertura nevosa durante il periodo di campionamento hanno evidenziato una *detection probability* solo marginalmente più alta di quelle con minore presenza di neve. Inoltre, la probabilità di generare false presenze a causa di escrementi di cane erroneamente identificati come di lupo è risultata in media relativamente bassa, pari a 0,048 (95% CIs = 0,002 – 0,084), ma con notevoli differenze tra le varie parti dell'area campionata. La probabilità di presenza della specie è risultata influenzata in modo significativo dall'altitudine media di ogni cella dell'area di studio, dall'estensione della copertura forestale, dal numero di prede selvatiche disponibili, e in modo marginale dalla densità antropica e dalla densità della rete stradale. Nel complesso, il modello ha stimato che dei 146.300 km<sup>2</sup> inclusi nell'area di

studio, il 74,2% (95% CIs = 70,5 – 77,9) fosse occupato dalla specie, per un'**estensione complessiva della distribuzione di 108.534 km<sup>2</sup>** (95% CIs = 103.200 – 114.000). Le probabilità di presenza più elevate sono state riscontrate, come atteso nelle aree montane e collinari della dorsale appenninica e lungo alcuni tratti della costa tirrenica.

Il modello SECR per la stima ha evidenziato come la probabilità di cattura genetica degli individui sia stata influenzata dallo sforzo di campionamento avvenuto all'interno di ogni cella. Come atteso dalla biologia della specie, il sesso è risultato un fattore non significativo nell'interpretare le differenze di probabilità di cattura tra gli individui, con maschi e femmine che hanno evidenziato in media valori simili. Il modello ha invece evidenziato la presenza di due gruppi distinti di individui, uno ad alta e l'altro a bassa probabilità di cattura. Inoltre, è emersa una significativa differenza nelle densità medie stimate in ognuna delle 13 aree a campionamento intensivo, con valori compresi tra un minimo di 1,9 individui / 100 km<sup>2</sup> e un massimo di 10,8 individui / 100 km<sup>2</sup>. L'utilizzo di tutti i dati genetici e dei dati di presenza all'interno del modello integrato ha poi prodotto una stima complessiva di **2.388 lupi per l'intera area appenninica** (SD = 178,9; 95% CIs = 2.020 – 2.645).

I risultati delle simulazioni hanno evidenziato una tendenza media del nostro *design* di campionamento ad una leggera sottostima delle dimensioni reali della popolazione, corrispondente ad un bias medio del -12%. L'analisi della distribuzione di frequenza delle stime simulate consente, tuttavia, di affermare che la stima prodotta abbia il 45% di probabilità di essere associata ad un bias compreso tra -10% e +10%. Inoltre, il design integrato ha evidenziato una copertura degli intervalli di credibilità pari a 0,82. Ciò significa che esiste una probabilità dell'82% che gli intervalli di credibilità prodotti attorno alla stima di popolazione dei lupi in area appenninica contengano il valore reale di abbondanza della popolazione.

Il lavoro svolto rappresenta un risultato senza precedenti per il contesto peninsulare in termini di monitoraggio del lupo o di altre specie di mammiferi distribuiti ampiamente nel Paese, reso possibile dal contributo operativo e professionale di molti soggetti diversi, attentamente coordinato a scala centrale da ISPRA. Un gruppo di tecnici altamente qualificati è stato essenziale per assicurare una raccolta contemporanea di dati, in tutta l'area di campionamento, seguendo protocolli concordati e condivisi. La definizione nel dettaglio della sequenza di attività per la raccolta, il controllo della qualità e corretta archiviazione ed analisi automatizzata dei dati hanno rappresentato ulteriori punti di forza del progetto e hanno permesso, tra l'altro, di mantenere un rigoroso controllo in itinere continuo, in un sistema di gestione adattativa delle attività. Il Network Lupo gestito tramite la struttura di coordinamento rappresenta una risorsa di grande valore, che potrebbe permettere ulteriori attività di larga scala. L'auspicio è che tutto questo lavoro rappresenti la base di partenza per un monitoraggio nel tempo di attributi essenziali come la distribuzione e la consistenza del lupo, in linea con i più elevati standard internazionali e in ottemperanza a quanto richiesto da normative e direttive nazionali ed internazionali, anche valutando la possibilità di estendere l'approccio seguito ad altre specie.

## ABSTRACT

La recente espansione della popolazione di lupo in Italia ha fatto emergere la necessità di realizzare un primo campionamento omogeneo della specie, con l'obiettivo di stimare la consistenza e la distribuzione della popolazione a scala nazionale. Pertanto, tra ottobre 2020 e aprile 2021 si è svolta la prima campagna simultanea di raccolta dati sulla presenza del lupo in Italia, messa in atto suddividendo il territorio nazionale utilizzando una griglia costituita da celle di 10x10 km. Nelle regioni appenniniche, l'impossibilità di condurre la raccolta dati in tutte le celle di potenziale presenza del lupo ha reso necessaria la selezione di un sotto-campione di celle e l'impostazione di un campionamento a due fasi: i) un campionamento estensivo (449 celle) per il reperimento di segni di presenza di lupo lungo transetti e tramite fototrappole, mirato alla stima della distribuzione della popolazione tramite modelli di *occupancy*; ii) un campionamento intensivo (186 celle) lungo transetti per la raccolta di campioni biologici non-invasivi destinati alla determinazione dei genotipi, mirato alla stima della consistenza della popolazione tramite modelli di cattura e ricattura spazialmente espliciti (SECR). Per stimare la distribuzione e l'abbondanza complessiva della popolazione nell'intera area di studio considerando simultaneamente i dati raccolti in entrambe le fasi di campionamento, i singoli modelli sono stati accorpati in un modello integrato sviluppato in contesto bayesiano. Le stime ottenute nelle aree sottoposte a campionamento sono state estrapolate alle aree non campionate sulla base di covariate ambientali e di una funzione di autocorrelazione spaziale. Infine, tramite simulazioni è stata valutata la capacità del design analitico impiegato di produrre stime affidabili dei valori reali dei parametri oggetto di studio. Durante l'intero periodo di monitoraggio nell'area peninsulare sono stati raccolti 15.993 segni della presenza del lupo, rappresentati principalmente da escrementi. Dei 1.600 campioni non-invasivi analizzati per la determinazione del genotipo, 1.054 hanno restituito risultati affidabili e 671 sono stati attribuiti alla popolazione italiana di lupo, corrispondenti a 373 individui (180 femmine, 168 maschi, 25 indeterminati). Il modello di *occupancy* ha stimato che dei 146.300 km<sup>2</sup> inclusi nell'area di studio, il 74,2% (95% CIs = 70,5 – 77,9) fosse **occupato dalla specie, pari ad un'area di 108.534 km<sup>2</sup>** (95% CIs = 103.200 – 114.000), con probabilità di presenza particolarmente elevate nelle aree montane e collinari della dorsale appenninica e in alcuni tratti della costa tirrenica. Il modello integrato ha prodotto una stima complessiva di **2.388 lupi per l'intera area appenninica** (SD = 178,9; 95% CIs = 2.020 – 2.645). Le simulazioni hanno evidenziato una tendenza media del design analitico ad una leggera sottostima delle dimensioni reali della popolazione, indicando comunque una elevata probabilità (=82%) che il valore reale di abbondanza della popolazione di lupo nelle regioni appenniniche nel periodo 2020-2021 ricadesse all'interno degli intervalli di credibilità intorno alla stima prodotta. La stima statisticamente solida della distribuzione e della consistenza del lupo nelle regioni appenniniche presentata in questo lavoro costituisce un elemento conoscitivo di base necessario per gli sforzi futuri di monitoraggio, gestione e conservazione della specie. Il lavoro svolto rappresenta inoltre un esempio importante dei risultati raggiungibili attraverso il coordinamento di una vasta rete di personale competente sul territorio.

## THE WOLF POPULATION IN THE REGIONS OF THE ITALIAN PENINSULA 2020-2021

*The recent expansion of the wolf population in Italy highlighted the need for a first standardized sampling effort to estimate the size and distribution of the population at the national scale. Between October 2020 and April 2021, we carried out the first campaign for the simultaneous collection of wolf presence data in Italy, across a grid of 10x10 km cell size dividing the national territory. For the Apennine regions, as it was not possible to collect wolf presence data in all cells potentially occupied by the species, we selected a sub-sample of cells setting up a two-phases sampling strategy: i) 449 cells were surveyed along line transects and through camera traps to detect wolf signs of presence, aiming at estimating the distribution of the population by means of occupancy models; ii) 186 cells were surveyed more intensively along line transects for the collection of non-invasive biological samples for the determination of genotypes, aimed at estimating wolf population size by means of spatially explicit capture-recapture models (SECR). To estimate the distribution and abundance of the wolf population across the entire study area and considering simultaneously the data collected in both sampling phases, we used a Bayesian framework to merge occupancy and SECR models into a single integrated model. We extrapolated the estimates obtained in the sampled areas to the non-sampled areas based on the basis of both environmental covariates and a spatial autocorrelation function. Finally, we assessed the ability of our analytical design to produce reliable estimates of the real values of the investigated parameters using simulations. Overall, 15.993 signs of wolf presence, mainly represented by wolf scats, were collected in the peninsular area. Of the 1.600 non-invasive samples analyzed for genotype determination, 1.054 gave reliable results and 671 were attributed to the Italian wolf population, corresponding to 373 individuals (180 females, 168 males, 25 indeterminate). The occupancy model estimated that over the 146.300 km<sup>2</sup> constituting the study area, 74,2% (95% CIs = 70,5 - 77,9) were occupied by the species, corresponding to an area of 108.534 km<sup>2</sup> (95 % CIs = 103.200 – 114.000), with particularly high probability of presence in the mountainous and hilly areas of the Apennine ridge and in some traits of the Tyrrhenian coast. Through the integrated model, we estimated 2,388 wolves for the entire Apennine area (SD = 178,9; 95% CIs = 2.020 - 2.645). The simulations showed an average trend of the analytical design to a slight underestimation of the real size of the population, yet indicating a high probability (= 82%) that the real wolf abundance in the Apennine regions in the period 2020-2021 would fall within the credibility intervals of our estimate. The robust estimates of wolf distribution and abundance in the Apennine regions presented in this work represent a necessary base of knowledge to guide future monitoring, management and conservation efforts for the species in Italy. In addition, this work represents an important example of the results that can be achieved through the coordination of a vast network of competent personnel across the national territory.*

## 1 INTRODUZIONE

Il processo di espansione a cui è andata incontro la popolazione peninsulare di lupo ha interessato la totalità delle regioni, le quali, negli ultimi decenni, hanno registrato un aumento delle segnalazioni di presenza e impatti sulle attività zootecniche in gran parte dei loro territori (Gervasi *et al.*, 2021, 2022). Nonostante la presenza del lupo interessi ambiti territoriali di grande ampiezza, e le interazioni che la specie ha con le attività umane siano state oggetto di numerosi progetti di studio e monitoraggio sviluppati a vario titolo sul territorio peninsulare, essi rappresentano realtà frammentate, limitate nello spazio e nel tempo. Manca pertanto un'immagine aggiornata della situazione a livello nazionale (Aragno *et al.*, 2018; 2019) e le stime realizzate negli anni passati a scala peninsulare e nazionale si sono basate su dati raccolti in modo non standardizzato (Galaverni *et al.* 2015, Boitani e Salvatori 2015). Per poter attentamente valutare lo *status* di conservazione e l'efficienza di misure gestionali adeguate, il monitoraggio di alcuni parametri della popolazione (come la distribuzione e l'abbondanza) rappresenta uno strumento essenziale (Nichols e Williams, 2006). La normativa nazionale, d'altro canto, prevede che le azioni di conservazione e gestione del lupo siano delegate agli enti territorialmente competenti, quali Regioni e Province autonome e parchi nazionali. Nell'ambito territoriale appenninico, i Parchi Nazionali rivestono un ruolo fondamentale, in cui la presenza del lupo è stata storicamente sempre rilevata e che hanno rappresentato molto probabilmente le aree di origine del processo di espansione (Zimen e Boitani 1975). Nei territori protetti le attività di monitoraggio e gestione sono state sviluppate negli anni, più recentemente tendendo ad un approccio coordinato e coerente attraverso i progetti di sistema WOLFNET2.0, WOLFNEXT, e "Convivere con il lupo, conoscere, conservare" finanziati dalla direttiva "Biodiversità" del Ministero della Transizione Ecologica. Diversa la situazione in contesti non protetti, in cui le risorse disponibili sono solitamente limitate e le priorità degli enti Regionali e Provinciali di diversa natura. In questi territori, che si estendono su superfici ampie e immerse in un tessuto fortemente antropizzato, le attività di monitoraggio del lupo sono state irregolari e scarsamente coordinate. Di fatto, pertanto, non esiste una stima affidabile (cioè precisa e accurata) e aggiornata della popolazione di lupo del territorio peninsulare. Si tratta di una mancanza che rischia di penalizzare qualsiasi iniziativa gestionale, che deve necessariamente essere applicata a livello locale, ma con un occhio allo stato di conservazione nazionale in cui si trova la specie.

Per sopperire a tale carenza, nell'ambito del monitoraggio nazionale del lupo promosso dal Ministero della Transizione Ecologica e coordinato da ISPRA, è stata definita una strategia complessiva volta a produrre, *in primis*, stime di distribuzione e di abbondanza basate su metodi e approcci omogenei e coerenti con quelli adottati nelle regioni alpine. Attraverso un ingente sforzo iniziale di coordinamento, è stato possibile produrre una stima aggiornata e confrontabile con altre stime a livello internazionale, ottenute con i più aggiornati metodi analitici disponibili (Caniglia *et al.*, 2020; Efford, 2004; Louvrier *et al.*, 2018). Per raggiungere tale obiettivo, inoltre, è stato necessario un notevole sforzo nella raccolta dei dati su un territorio molto ampio. L'obiettivo della indagine svolta nel 2020-21 in Italia peninsulare, pertanto, è stato duplice:

1. attivare un *network* di operatori sul territorio di tutte le regioni coinvolte, inserendoli in un programma di formazione e garantendo un elevato grado di coordinamento e controllo di qualità dei dati raccolti;

2. produrre una stima aggiornata della distribuzione potenziale del lupo e della consistenza della popolazione utilizzando le più avanzate tecniche analitiche disponibili.

La presente relazione riporta i risultati ottenuti e la descrizione del disegno campionario utilizzato, la struttura di gestione necessaria per garantire il corretto flusso dei dati raccolti e i metodi utilizzati per le analisi, e si conclude con una sezione riservata alle considerazioni delle difficoltà che sono state affrontate e che possono essere più facilmente gestite in futuro. I risultati ottenuti, infatti, sono da intendersi come base per lo sviluppo di un vero e proprio monitoraggio della distribuzione e consistenza della specie a livello nazionale.

## **2 METODI DI CAMPIONAMENTO E DI ANALISI DELLO STATUS DELLA POPOLAZIONE DI LUPO NELLE REGIONI DELL'ITALIA PENINSULARE NEL 2020/2021**

### **2.1 Il disegno di studio: la strategia di campionamento, i criteri standard ed i metodi applicati**

La stima della distribuzione e abbondanza del lupo a livello nazionale nel 2020-2021 è stata organizzata suddividendo il territorio secondo una griglia costituita da celle di 10x10 km, usata anche per il Reporting ai sensi della Direttiva 'Habitat' (Direttiva 92/43/CEE) e del relativo DPR di recepimento (DPR 357/97, art. 13, comma 1). Essa è stata quindi ottenuta attraverso una strategia di campionamento articolata in:

- (a) un campionamento estensivo, volto ad accertare e/o stimare la distribuzione della specie a scala nazionale attraverso la raccolta di segni di presenza del lupo;
- (b) un campionamento genetico non invasivo di tipo intensivo, volto ad ottenere una stima della densità di popolazione, applicando tecniche statistiche di cattura-ricattura spazialmente esplicite.

Sia per la raccolta dati estensiva, sia per quella intensiva, sono state condivise, concordate e adottate modalità comuni, a scala nazionale, per la raccolta dei dati sul campo. Tuttavia, la raccolta dei segni di presenza è stata realizzata in tutte le celle di possibile presenza per quanto riguarda le Regioni alpine, ed in un campione di celle di possibile presenza individuate su base probabilistica per quanto riguarda l'Italia peninsulare, dove sono state anche identificate, per la stima della densità, delle aree campione di approfondimento, come di seguito dettagliato.

#### **2.1.1 Il campionamento estensivo nelle Regioni dell'Italia peninsulare**

A differenza di quanto rilevato per le Regioni alpine, in Italia peninsulare non si è potuta prevedere la raccolta dei dati in tutte le celle di presenza nota della specie, in primo luogo a causa della notevole estensione dell'area occupata dalla specie. È stato inoltre necessario definire un campionamento adeguato, che allocasse le unità di campionamento anche considerando che il lupo, come molte specie animali e in particolare come molti carnivori, presenta una distribuzione spaziale non omogenea ma aggregata sul territorio.

Si è pertanto adottato un campionamento stratificato, dove gli strati (raggruppamenti delle unità di campionamento per tipologia) sono stati definiti sulla base di indicazioni pregresse relative alla continuità temporale della presenza della specie, indicazioni che al momento della definizione della strategia di raccolta dei dati rappresentavano il miglior *proxy* disponibile per la densità della specie. La stratificazione è un modo per ottimizzare lo sforzo di campionamento, distribuendolo in ragione della variabilità del parametro di interesse, in questo caso della densità (nota o presunta) (McDonald, 2004).

Sulla base dei dati pregressi (Marucco *et al.*, 2020 - Capitolo 2) si sono perciò identificati tre strati, caratterizzati da diversi livelli di continuità della presenza della specie (A, B, C), ai quali è stato aggiunto uno strato D, costituito dalle celle adiacenti a quelle di presenza nota o presunta. L'inclusione dello strato D è stata realizzata al fine di evidenziare eventuali variabilità nel *range* della specie non precedentemente valutate con i dati pregressi, ma soprattutto per tenere conto, almeno in parte, delle disomogeneità di sforzo di indagine sul territorio.

Sulla base di queste considerazioni, per la selezione delle celle di campionamento in Italia peninsulare si sono quindi considerati i seguenti 4 strati (Figura 1):

- A – Celle con presenza stabile;
- B – Celle con presenza sporadica;
- C – Celle con presenza presunta;
- D – Celle adiacenti a quelle di presenza nota o presunta.

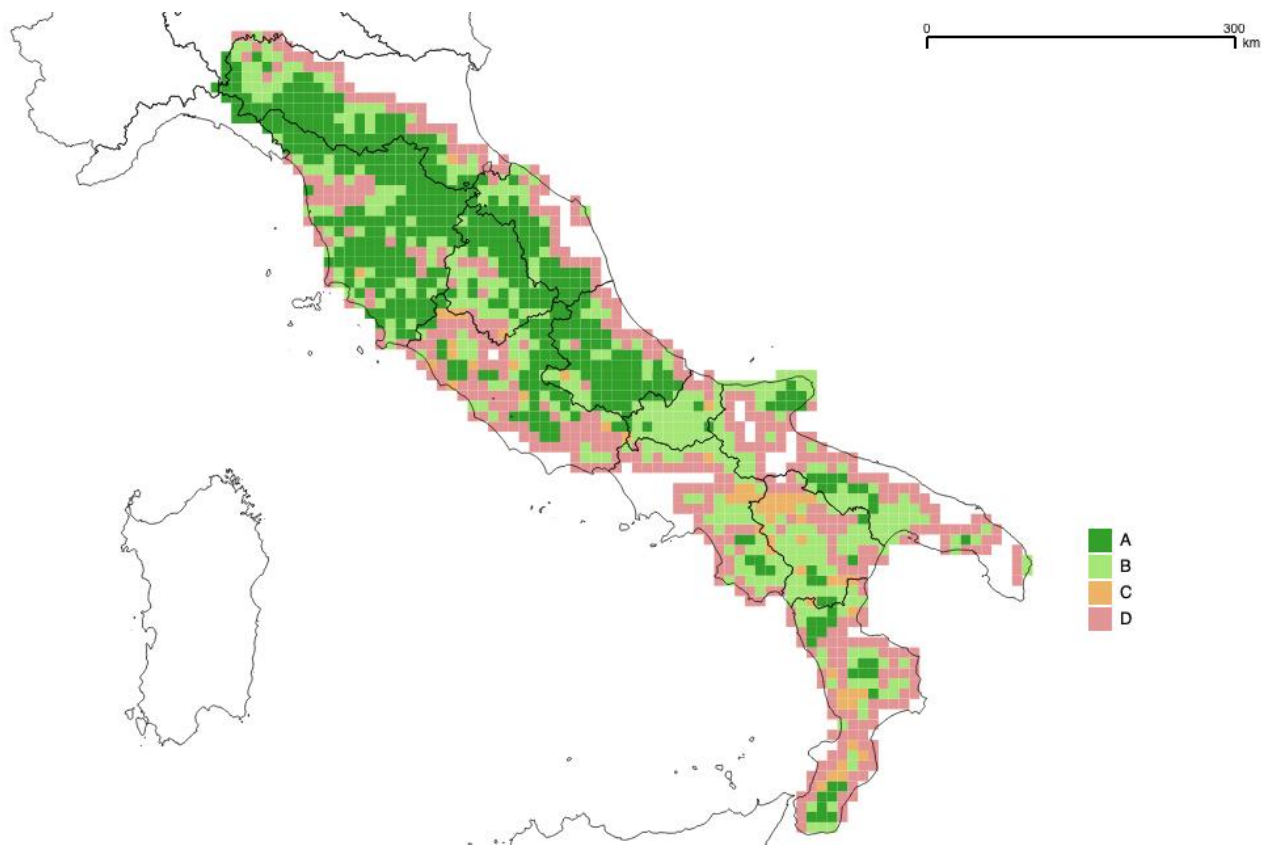


Figura 1. Stratificazione delle celle dell'Italia peninsulare sulla base dei quattro criteri sopra esposti: A = presenza stabile, B = presenza sporadica, C = presenza presunta, D = adiacenti alle precedenti.

Data la stratificazione, si è poi optato per l'adozione di un campionamento spazialmente bilanciato, in grado di assicurare una buona rappresentatività del campione (Stevens e Olsen, 2004; Claire *et al.*, 2019). Nello specifico, è stato adottato uno schema di campionamento GRTS (*Generalized Random Tessellation Stratified*) che sfrutta la suddivisione dell'area di studio in celle di dimensione regolare (area di studio 'tassellata'), in questo caso di 10x10 km. Ad ogni cella della griglia è stato assegnato un identificativo a seconda della sua posizione nello spazio, e l'insieme ordinato delle celle è stato quindi selezionato in modo *random* sistematico. La selezione a partire dall'insieme



ordinato delle celle ha così assicurato il bilanciamento spaziale del campione (le celle campionate riflettono la densità spaziale delle celle disponibili) e nell'ambito del processo è stato possibile assegnare alle singole celle delle differenti probabilità di selezione. Nel nostro caso, la probabilità di selezione è stata diversificata tenendo conto della stratificazione (A, B, C, D) allocando, come anticipato, un campione proporzionalmente maggiore nelle celle dove ci si aspettava maggiore varianza del parametro di interesse, specialmente in relazione alla densità attesa di segni rilevati.

L'applicazione dell'algoritmo GRTS ha prodotto la prima selezione probabilistica delle celle (356 celle, corrispondenti al 25% del totale, cioè della somma delle celle disponibili negli strati A, B, C, D). Nelle regioni del sud Italia (Campania, Puglia, Basilicata, Calabria e Molise), dove è registrata la più alta percentuale di celle D (251 su 768 celle – 33%, rispetto a 227 su 1000 – 23% nell'Italia centrale), si è ritenuto inoltre necessario, per la prima indagine 2020-2021, incrementare il campionamento, includendo il 50% delle celle disponibili. L'incremento dello sforzo di campionamento nell'Italia meridionale è da mettersi in relazione alla mancanza di dati pregressi in queste aree, nelle quali quindi la varianza della densità avrebbe potuto essere maggiore di quella generalmente attesa. Le celle selezionate per le Regioni dell'Italia peninsulare centrale e meridionale sono riportate nella Figura 2.

Il totale delle celle selezionate è stato di 449: 254 ricadenti nello strato A, 153 nel B, 8 nel C e infine 34 nel D.

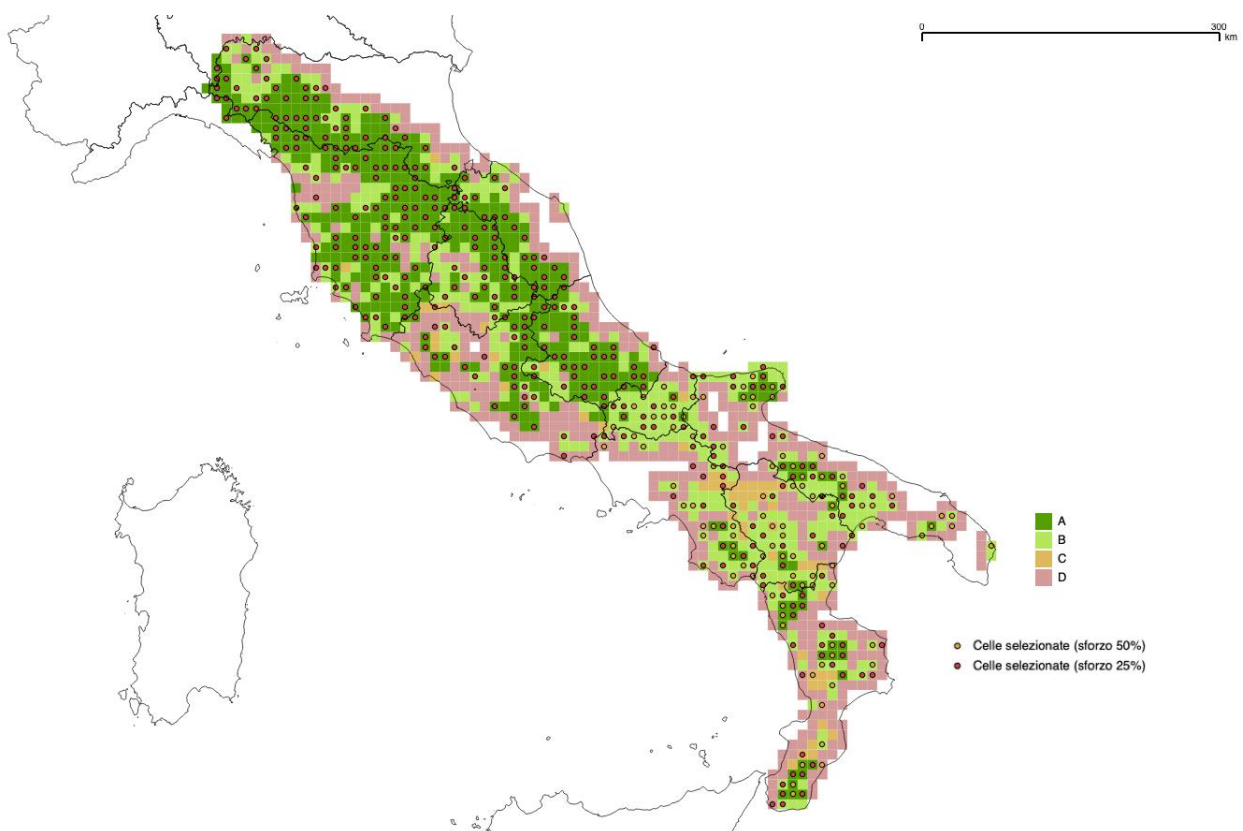


Figura 2. Celle selezionate per il campionamento estensivo in Italia peninsulare.

### **2.1.2 Il campionamento intensivo nelle Regioni dell'Italia peninsulare: aree campione**

L'obiettivo del campionamento intensivo è stato la produzione di una stima dell'abbondanza dell'intera popolazione peninsulare sulla base della stima della densità dei lupi ottenuta in aree campione.

Come già illustrato per il campionamento estensivo, poiché una stima della densità dei lupi non era ricavabile direttamente per tutto il territorio in esame, nell'Italia peninsulare sono state selezionate, anche in questo caso secondo un approccio probabilistico, delle aree campione distribuite sull'intero territorio peninsulare. In queste aree, la raccolta dei segni di presenza è stata seguita dalla selezione di campioni biologici idonei per le analisi genetiche, funzionali ad analisi di cattura-ricattura spazialmente esplicite, volte alla stima locale della densità (per dettagli si rimanda al § 3.4). Per garantire l'attendibilità della stima finale a scala nazionale, era assunto irrinunciabile che queste aree campione fossero individuate in modo da risultare rappresentative della variabilità di condizioni ecologiche e demografiche della popolazione di riferimento (in questo caso la popolazione di lupo nelle Regioni dell'Italia peninsulare).

Per questo motivo, si è optato per l'individuazione di aree distribuite in modo spazialmente bilanciato nell'Italia peninsulare (all'incirca una per ogni regione). Anche in questo caso è stata sfruttata la suddivisione dell'area di studio in celle di 10x10 km (tassellazione) e sono quindi state selezionate, tra quelle già individuate per il campionamento estensivo, 11 celle in modo *random* sistematico, tenendo conto della loro classificazione nelle diverse Regioni amministrative. A partire da queste 11 celle, le aree campione sono quindi state delimitate identificando le 8 celle più vicine, purché rientranti negli strati A, B, C, o D di continuità di presenza. Dato il bilanciamento spaziale del campione, l'effettiva rappresentatività delle aree rispetto alla popolazione di riferimento è dipesa anche dalla dimensione campionaria, fissata in questo caso a 11 quale compromesso tra la necessità di assicurare un campione di dimensioni adeguate per catturare la variabilità del parametro di interesse (abbondanza) e le limitazioni di carattere logistico (sforzo attuabile per la raccolta dati sul campo e per le successive analisi di laboratorio dei campioni biologici raccolti). Queste 11 aree corrispondono a 99 celle, 44 delle quali coincidenti con quelle del campionamento estensivo.

Tuttavia, in seguito ad un'analisi critica della distribuzione delle aree campione e di una valutazione *in itinere* della disponibilità di dati per le analisi genetiche, si è ritenuto di integrare tale selezione con l'individuazione di ulteriori celle, limitrofe alle 11 aree, e di due ulteriori aree intensive, situate nell'area delle Foreste Casentinesi, tra Emilia-Romagna e Toscana, e in Calabria, nell'area dell'Aspromonte, per un totale di 87 celle aggiuntive. I campioni raccolti in queste celle aggiuntive, inizialmente identificate come celle a campionamento estensivo, sono stati in seguito considerati utili per le analisi genetiche e hanno contribuito alla stima di densità ottenuta con le metodologie riportate nel § 3.4. In totale, le celle dalle quali sono stati ottenuti campioni per le analisi genetiche sono rappresentate in Figura 3.

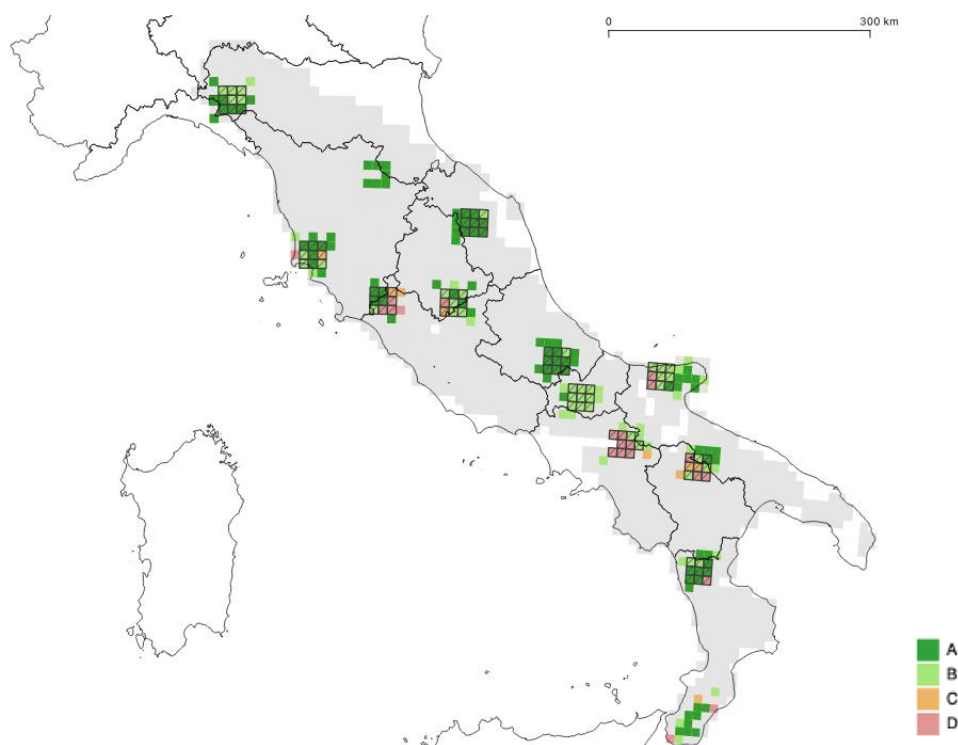


Figura 3. Celle che hanno fornito campioni per le analisi genetiche, classificate in base allo strato di continuità di presenza (A, B, C, D). Le celle inizialmente selezionate per il campionamento intensivo e raggruppate nelle relative 11 aree campione sono evidenziate con una bordatura nera. In grigio tutte le altre celle 10x10 km dell'Italia peninsulare.

### 2.1.3 Le modalità di raccolta dei dati

In tutte le celle, sia di campionamento estensivo sia intensivo, la raccolta dei dati è stata condotta tramite la combinazione di un campionamento sistematico (sulla base di transetti predefiniti, uscite per la raccolta dei dati programmata nel tempo e nello spazio e con una attenta registrazione dello sforzo di campionamento) e di un campionamento opportunistico (dati ottenuti in modo casuale o sulla base di uscite non programmate).

Tale raccolta dati è stata realizzata dal personale del Network Lupo, come descritto nel § 2.2, opportunamente preparato, formato sui criteri e protocolli standardizzati descritti nelle linee guida (Marucco *et al.*, 2020) e adottati nell'ambito del Piano Nazionale.

Il campionamento sistematico è definito come tale in quanto caratterizzato da uno sforzo omogeneo, controllato e quantificato, sia spazialmente sia temporalmente. Dal punto di vista temporale, esso è stato organizzato sulla base di uscite programmate, mentre dal punto di vista spaziale è stato caratterizzato da un esplicito schema che individuasse transetti/punti dove fare i rilievi all'interno delle celle di 10x10 km. In queste ultime, sono stati quindi individuati dai tecnici Federparchi (tecnici altamente specializzati incaricati da Federparchi per la raccolta dei dati nell'Italia peninsulare, si veda in proposito il successivo § 2.2) transetti e/o punti di marcatura da controllare periodicamente e da campionare sulla base dei criteri e protocolli congiunti.

Il campionamento sistematico è stato quindi finalizzato alla raccolta di segni di presenza (escrementi e/o tracce su neve) ottenuti lunghi i percorsi programmati. Nelle celle a campionamento intensivo, come nelle celle aggiuntive identificate *in itinere* e di cui alla precedente Figura 3, gli escrementi sono stati inoltre raccolti e conservati per le analisi genetiche non-invasive.

Hanno contribuito al campionamento di tipo sistematico anche i dati raccolti tramite fototrappolaggio, in quanto l'uso di fototrappole è stato condotto attraverso una distribuzione di fototrappole sul territorio e registrando lo sforzo di campionamento applicato.

Il campionamento opportunistico è svolto invece in maniera non pianificata, e consiste nella raccolta di segni di presenza durante attività sul campo non dedicate allo studio del lupo e/o nella raccolta di dati segnalati da terzi casualmente. Questi dati hanno comunque rappresentato una utile integrazione ai dati raccolti in maniera sistematica, incrementando la qualità e quantità della conoscenza di base sulla distribuzione e presenza del lupo e migliorando la pianificazione del campionamento sia estensivo che intensivo. I dati di natura opportunistica non hanno però contribuito alla quantificazione dello sforzo (*effort*) di campionamento. Ricadono ad esempio in questa categoria le fotografie casuali fatte da terzi e verificate dai tecnici Federparchi, escrementi raccolti casualmente sul territorio e non nell'ambito di transetti sistematici, etc.

I campionamenti sistematico e opportunistico sono stati applicati sia nelle celle estensive, sia in quelle intensive.

Nelle celle estensive, si è applicato un campionamento sistematico di minima con un numero minimo di tre repliche (nei periodi ottobre-novembre, dicembre-gennaio, febbraio-marzo, alle quali si è aggiunta un'ulteriore replica nel mese di aprile). Ciascuna di queste repliche ha previsto, in linea teorica, la perlustrazione di tutti i transetti/punti di marcatura/fototrappole posizionate nelle celle identificate per la raccolta dei dati. Qualsiasi dato opportunistico raccolto sia all'interno delle celle, sia al di fuori delle celle selezionate è stato comunque archiviato per contribuire alla definizione della strategia di monitoraggio a lungo termine.

Le relative attività di campo previste e attuate, secondo i protocolli descritti nelle linee guida (Marucco *et al.*, 2020) per il campionamento estensivo sono quindi state le seguenti:

- percorrenza sistematica dei transetti/punti di marcatura per la raccolta dei segni di presenza, quali principalmente escrementi e più raramente le tracce su neve (Protocollo 6.1 descritto in Marucco *et al.*, 2020);
- fototrappolaggio (Protocollo 6.2);
- raccolta di qualsiasi segno di presenza opportunistico, anche derivato da terzi purché verificato come da protocollo, in particolare per quanto riguarda documentazione fotografica casuale (Protocollo 6.3);
- attività di *snow-tracking* dove attuabile, sia opportunistica che sistematica a partire dalla percorrenza dei transetti (Protocollo 6.4);
- attività di *wolf-howling*, se valutata necessaria per una migliore individuazione di transetti efficienti (Protocollo 6.5);

- archiviazione di dati dei lupi morti rinvenuti (C1) e dei dati di categoria C2/C3 opportunistici.

Nelle celle intensive, la raccolta dei dati è stata condotta in maniera analoga a quanto fatto nelle celle estensive, con un campionamento sistematico coadiuvato da un campionamento opportunistico. In queste celle, tuttavia, la raccolta dei dati è stata effettuata con un maggiore sforzo, sia per maggiore densità di transetti che di repliche. Inoltre, la raccolta di segni di presenza è stata seguita dalla raccolta e conservazione dei campioni biologici ritenuti idonei per le successive analisi genetiche, per ottenere una stima locale della densità della popolazione (per le analisi e i risultati si rimanda ai § 3.2 e § 3.4)

Il campionamento di tipo intensivo è stato quindi condotto nelle 11 aree campione selezionate nelle regioni dell'Italia peninsulare e ha previsto i seguenti obiettivi generali:

- verifica di presenza di un branco / coppia grazie alla combinazione di fototrappolaggio/genotipizzazione degli individui /tracciature su neve dove possibile;
- stima minima del numero dei branchi e stima minima della dimensione del branco, grazie alla combinazione della genotipizzazione degli individui / fototrappolaggio / tracciature su neve dove possibile (il solo fototrappolaggio / *snowtracking* non coadiuvato da analisi genetiche non può portare alla stima minima dei branchi a scala locale);
- raccolta di tutti i segni di presenza sia tramite campionamento sistematico che opportunistico per la valutazione della densità spaziale dei segni, con maggiore sforzo rispetto al campionamento estensivo, ossia con più repliche e con una maggiore densità di transetti;
- campionamento di una frazione dei lupi presenti tramite la raccolta e selezione degli escrementi su cui sono state eseguite le analisi genetiche, sulle base delle informazioni dei branchi acquisite e il campionamento sistematico e opportunistico condotto, privilegiando escrementi contemporanei, per la stima della densità locale.

La definizione delle tempistiche del campionamento sistematico con uscite programmate per la verifica di transetti e/o punti di marcatura è fondamentale per l'applicazione di modelli di SCR (Chandler e Royle, 2013) e per la stima accurata della dimensione di popolazione e della densità (Latham *et al.*, 2014). Infatti, in una stima della popolazione basata su modelli di cattura-ricattura (CR) per modellare adeguatamente l'eterogeneità individuale nella probabilità di ricattura sono richieste più sessioni di cattura e campioni di grandi dimensioni (Otis *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 2002; Cubaynes *et al.*, 2010). Quindi, all'interno di ogni cella selezionata per il campionamento intensivo sono stati predisposti transetti sistematici e/o punti di marcatura con una rete più fitta rispetto al campionamento estensivo e da visitare più frequentemente (con 4-6 repliche in questo caso, quindi idealmente una al mese da ottobre a marzo). Questo disegno di studio, organizzato con repliche successive a breve termine, permette di stimare la densità locale della popolazione tramite applicazione di SCR. Campioni raccolti opportunisticamente nei periodi di campionamento intensivo tra ottobre e marzo sono anche stati inseriti e selezionati per le analisi genetiche.

In conclusione, la raccolta dei dati è stata fortemente standardizzata a scala nazionale, coordinata tra tutte le aree campione e le celle intensive, ed estesa in modo continuativo su due periodi, uno nei primi mesi invernali (da ottobre a dicembre), l'altro negli ultimi mesi invernali (da gennaio a marzo), per un totale di 6 repliche nei mesi di ottobre (O), novembre (N), dicembre (D), gennaio (G), febbraio (F), marzo (M).

I due campionamenti, intensivo e estensivo, sono così risultati abbinati, con 3 delle 6 repliche dell'intensivo che sono andate a coincidere con le 3 preventivate nell'estensivo. Monitorando tutti i transetti con delle repliche da ottobre a marzo, si è così concentrato tutto il monitoraggio sistematico del lupo unicamente nel periodo invernale. L'abbinamento temporale dei due campionamenti consente anche un'ottimizzazione delle attività, considerando la parziale sovrapposizione spaziale del campionamento estensivo e di quello intensivo.

Come già riportato per il campionamento estensivo, anche per il campionamento intensivo, programmata sin dall'inizio del progetto, si è aggiunta una raccolta dati effettuata nel mese di aprile, richiesta dal gruppo di coordinamento a seguito di una revisione critica dei dati disponibili all'inizio del 2021.

Quindi, le attività di campo del campionamento intensivo, realizzati anche in questo caso secondo i protocolli descritti nel Capitolo 6 delle linee guida (Marucco *et al.*, 2020), sono state:

- percorrenza sistematica dei transetti/punti di marcatura per la raccolta dei segni di presenza, quali principalmente escrementi e più raramente le tracce su neve (Protocollo 6.1);
- fototrappolaggio (Protocollo 6.2);
- raccolta di qualsiasi segno di presenza opportunistico, anche derivato da terzi purché verificato come da protocollo, in particolare in relazione alla documentazione fotografica casuale (Protocollo 6.3);
- attività di snow-tracking dove attuabile, sia opportunistica che sistematica a partire dalla percorrenza dei transetti (Protocollo 6.4);
- archiviazione di dati dei lupi morti rinvenuti (C1);
- raccolta di escrementi ed altri campioni biologici, sia tramite l'attività sistematica che opportunistica sopra descritte, e selezione dei campioni su cui svolgere le analisi genetiche per l'identificazione individuale dei lupi e la loro ricattura nei 6 mesi di campionamento (Protocolli 6.8 e 6.9).

#### **2.1.4 Monitoraggio dello sforzo di campionamento e registrazione dei dati**

Nella strategia di campionamento proposta nelle linee guida e sopra descritta, al fine di permettere la successiva analisi dei dati, è stato indispensabile realizzare anche un accurato monitoraggio dello sforzo di campionamento, con una raccolta del dato relativo allo sforzo altamente pianificata e che ha comportato quindi anche la registrazione di ogni dato di "insuccesso". In questo contesto, infatti, il dato di percorrenza di un transetto senza nessun segno raccolto è anch'esso un dato fondamentale, così come la presenza di una fototrappola attiva in un dato giorno che non ha ripreso immagini di lupo. Questi dati, raccolti come dati "0", permettono la stima della probabilità di

contatto (*detection probability*), che a sua volta permette di stimare la dimensione della popolazione e la distribuzione sulla base della probabilità di *occupancy*. È stata perciò necessaria una forte presa di coscienza, da parte di ogni operatore, dell'importanza di registrare precisamente ogni uscita, posizionamento e durata dell'attivazione di una fototrappola e gli eventuali dati "0", oltre che i segni rilevati durante il campionamento.

Questo ha permesso una valutazione e una quantificazione dello sforzo effettivamente applicato per cella della griglia e per transetto, monitorato nel tempo e accuratamente registrato, come anche descritto nel paragrafo relativo al flusso dei dati. Al fine di misurare lo sforzo (*effort*) totale applicato i tecnici e gli operatori in campo hanno quindi dovuto tenere traccia di:

1. numero delle celle della griglia effettivamente interessate dalla raccolta dei dati;
2. per cella: il numero e i km di transetti individuati ed effettivamente percorsi o il numero dei siti di posizionamento delle trappole fotografiche o dei punti di emissioni wolf-howling, se utilizzati, a seconda dell'approccio adottato;
3. il numero di sessioni di campionamento sistematico eseguite (bisogna considerare che le repliche nel tempo sono necessarie per valutare la contattabilità incompleta, tuttavia, se per qualche motivo una replica non viene eseguita, è importante registrarla);
4. per transetto: l'effettiva percorrenza di ogni transetto previsto da parte dell'operatore incaricato, sia che questa abbia portato alla raccolta di qualche segno sia che non sia stato rilevato alcun dato;
5. per trappola fotografica: registrare il giorno di inizio e fine della sessione di fototrappolaggio per ciascuna fototrappola posizionata, indicando eventuali giorni di malfunzionamento, e il numero di contatti (*i.e.*, fotografie o video di lupo).

### **2.1.5 Criteri standard per la classificazione e interpretazione dati**

La maggior parte dei programmi di monitoraggio sui grandi carnivori in Europa (e.g., Kaczensky *et al.*, 2009; Molinari-Jobin *et al.*, 2012; Marucco *et al.*, 2014) utilizzano i criteri "SCALP" per classificare la qualità dei dati raccolti sui grandi carnivori. Lo SCALP (*Status and Conservation of the Alpine Lynx Population*) è un'iniziativa di conservazione della lince sull'arco alpino ([www.kora.ch](http://www.kora.ch)), che per prima ha sviluppato dei criteri standardizzati per l'interpretazione dei dati di monitoraggio della lince. Questi criteri sono stati adattati anche per le altre specie di grandi carnivori, tra cui il lupo (Kaczensky *et al.*, 2009; Marucco *et al.*, 2014; WAG, 2018). Nell'ambito delle linee guida per il monitoraggio nazionale (Marucco *et al.*, 2020) questi criteri sono stati ricondotti a tre categorie (C1, C2 e C3) per essere utilizzati nel monitoraggio del lupo in Italia, come già standardizzati fra i diversi Paesi dell'arco alpino. La lettera "C" corrisponde a "categoria". I numeri 1, 2 e 3 sono utilizzati per indicare il livello di verifica dell'osservazione intrinseco alla tipologia dell'osservazione stessa.

In particolare:

C1: "Hard evidence" = evidenza certa, osservazione che senza ambiguità e con certezza conferma la presenza del lupo (cattura dell'animale vivo, ritrovamento di un lupo morto, prova genetica,

localizzazione telemetrica, fotografia di alta qualità dove si vede con chiarezza l'intero animale ed è riconoscibile, ed è stato verificato con certezza il territorio dove l'animale è stato fotografato, questo anche per escludere fotografie false). Ogni dato deve essere archiviato e/o fotografato per potere essere rivalutato/riconfermato se necessario.

C2: "Confirmed observation" = osservazione confermata, osservazione che con alta probabilità conferma la presenza del lupo (segni indiretti di lupo, quali le tracce sulla neve o fango, e escrementi o *wolf-howling*, confermate da un operatore qualificato). L'operatore qualificato può confermare i segni di presenza direttamente sul campo, o basandosi sulla documentazione fornita. Ogni dato deve essere archiviato e/o fotografato per potere essere rivalutato/riconfermato se necessario.

C3: "Unconfirmed observation" = osservazione non confermata, tutte le osservazioni non confermate da un operatore qualificato, oppure le osservazioni che per loro natura non possono essere confermate. Possono essere ad esempio: tutti gli avvistamenti diretti, i segni di presenza troppo vecchi e non chiari, o non completamente documentati, segni di presenza limitati nel numero per essere interpretati (ad esempio una singola impronta); segni di presenza che per altre ragioni non portano sufficienti informazioni ed infine tutti i segni che non possono essere verificati o validati (es. fotografie dove non è stato possibile verificare direttamente il luogo o la provenienza).

Alcune osservazioni possono poi essere considerate da escludere o false:

- escluse: osservazioni non considerate = ogni osservazione e segno di presenza verificato e non attribuito a lupo, per i quali quindi si può escludere che si tratti di lupo con certezza o con alta probabilità;
- false: osservazioni false = osservazioni eliminate per le quali si è valutata la manomissione delle informazioni, ad esempio fotografie ritoccate o falsificate in quanto a luogo, periodo o specie.

In relazione all'applicazione dei criteri, i segni di presenza del lupo sono generalmente difficili da distinguere dai segni del cane. Questa distinzione diventa molto difficile quando sono presenti cani vaganti sul territorio, con comportamento selvatico, che possono produrre segni di presenza, quali tracce sulla neve ed escrementi, molto simili a quelli prodotti dal lupo. Inoltre, la recente diffusione di cani fenotipicamente simili al lupo, quali ad esempio la razza di cane lupo cecoslovacco, rende la distinzione difficile non solo dai segni indiretti raccolti sul campo, ma anche dalle fotografie o video ripresi direttamente e da animali ritrovati morti o feriti. Quindi, per qualificarsi come prove di presenza di categoria C1, le fotografie di lupo dovrebbero mostrare l'intero animale, comprese tutte le caratteristiche specifiche del lupo ed essere validate da un operatore qualificato sulla base dei protocolli standard (Capitolo 6 delle linee guida Marucco *et al.*, 2020), ed archiviate in caso di successiva rivalutazione, altrimenti diventano prove di presenza di categoria C3. Tracce, escrementi e predazioni di lupo sono anche particolarmente facili da confondere con i corrispondenti segni lasciati da cani con simile comportamento e dimensione, è quindi fondamentale porre particolare attenzione nell'interpretarli e attribuirli al lupo. Per questo motivo è necessario un numero maggiore di osservazioni C2 per confermare la presenza del lupo in un'area rispetto, ad esempio, a



quelli richiesti per documentare la presenza della lince o di un orso (Molinari *et al.*, 2012; Kaczensky *et al.*, 2009). Vengono di seguito dettagliati i criteri sulla base dei quali i segni di presenza raccolti sul lupo in Italia sono stati definiti come C1, C2, e C3 (Tabella 1 in Marucco *et al.*, 2020).

Nell'ambito del piano nazionale, la verifica del dato è stata effettuata dai Tecnici Federparchi, altamente qualificati e adeguatamente formati (si veda il successivo § 2.2).

### 2.1.6 Criteri per l'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti

Il coordinamento e la definizione dei criteri per l'interpretazione dei dati raccolti sono fondamentali per integrare i risultati su scala italiana e creare degli *output* comuni. In quest'ottica è necessaria la definizione dei criteri comuni per l'individuazione sia di un branco sia di una coppia di lupi (Tabella 1), sulla base dei dati raccolti. Sulla base di quanto riportato anche nelle linee guida (Marucco *et al.*, 2020), si sono definiti:

- Branco: un gruppo di più di due lupi documentati muoversi insieme in un territorio stabile tramite dati C1 e C2. Per documentare la presenza del branco è necessario un minimo di una fotografia di branco C1 (in cui appaiono un numero di lupi > 2), oppure di due tracce di branco (> 2 lupi) di categoria C2 documentate in modo indipendente, ed almeno due dati C1 (analisi genetica di un escremento lungo una traccia di più di due animali, fotografia o video di branco). Per definire la dimensione minima del branco sono necessari dati C1 (massimo numero di genotipi individuati, massimo numero di lupi presenti contemporaneamente in un video/fotografia), oppure una traccia su neve con il numero massimo di lupi seguiti in contemporanea, di categoria C2. La riproduzione è documentata tramite un dato C1 che evidenzia la presenza dei cuccioli, oppure tramite *wolf-howling* che abbia confermato la presenza della cucciolata preferibilmente registrato (quindi due dati di *wolf-howling* C2 che evidenzino la presenza dei cuccioli, oppure un dato di *wolf-howling* C2 registrato)
- Coppia stabile: coppia di due lupi di sesso opposto documentati muoversi insieme in un territorio stabile tramite dati C1 e C2. In particolare, è necessario un minimo di due tracce della coppia rilevate insieme, di categoria C2, documentate in modo indipendente, ed almeno due dati C1 che documentino la presenza di due lupi di sesso opposto che si muovono insieme (analisi genetiche su due escrementi lungo una traccia di due animali, fotografia o video della coppia). Per segni C2 "indipendenti" si intende segni indiretti raccolti spazialmente e temporalmente in modo indipendente. Ad esempio, 4 escrementi raccolti tutti nello stesso punto ed allo stesso momento non sono indipendenti.

Anche per la stima della distribuzione è necessaria la definizione di criteri comuni che permettano l'unificazione dei risultati e la comune interpretazione dei dati. In particolare, per la valutazione della distribuzione minima su griglia, ogni cella 10 x 10 km della griglia è da considerarsi occupata per quell'anno di campionamento se è stato raccolto almeno un dato C1, o almeno 3 segni di presenza C2 indipendenti. Per la valutazione della distribuzione dei territori stabili dei branchi, delle coppie e degli individui solitari si fa riferimento a tutti i dati C1 e C2 raccolti ed utilizzati *in primis* per

stabilire la presenza del branco/coppia, utilizzati per definire il relativo territorio minimo quando possibile. Nell'Italia peninsulare, tale territorio è simbolicamente rappresentato da un cerchio di 100 km<sup>2</sup> centrato nel punto di più alta frequenza di dati C1 e C2 raccolti per quel branco/coppia/individuo.

Parametro	Metodo	Criteri standard per l'interpretazione dei dati
Numero di branchi Numero di coppie stabili	Survey degli indici di presenza, analisi genetiche, <i>wolf-howling</i> , <i>snow-tracking</i> , documentazione fotografico / video	La presenza di un branco o di una coppia deve essere confermata tramite dati sia C1 che C2
Dimensione del branco (stima minima)	Analisi genetiche, <i>wolf-howling</i> , <i>snow-tracking</i> , documentazione fotografico / video	La dimensione minima di un branco è documentata tramite dati C1 o minimo due C2 indipendenti
Riproduzione	Analisi genetiche, <i>wolf-howling</i> , <i>snow-tracking</i> , documentazione fotografico / video	La riproduzione è documentata tramite dati C1 o minimo due C2 indipendenti
Distribuzione: minimo <i>range</i> occupato dalla specie	Survey degli indici di presenza	Un dato C1, o almeno 3 segni di presenza C2 indipendenti, per ogni cella 10 x 10 km ed anno
Distribuzione dei territori stabili dei branchi, delle coppie e degli individui solitari	Survey degli indici di presenza, <i>snow-tracking</i> , analisi genetiche, <i>wolf-howling</i> , documentazione fotografico / video	Utilizzo di tutti i dati C1 e C2 raccolti per centrare il territorio nella zona di più alta frequenza di ritrovamenti.
Branchi adiacenti (chiara distinzione di due o più unità)	<i>Dati genetici per identificazione del branco (tramite pedigree), prova simultanea di riproduzione, dati di telemetria</i>	Dati C1 necessari

Tabella 1. Criteri standard per l'interpretazione dei dati (da Kaczensky et al. 2009, Marucco et al. 2014).

## 2.2 Il Network di operatori: la formazione e il coordinamento nelle regioni

### 2.2.1 La creazione e il coordinamento del network

Ad inizio 2020 ISPRA ha stipulato una convenzione con Federparchi per la collaborazione nella realizzazione della indagine nell'Italia peninsulare.

Il coordinamento generale delle attività nelle regioni peninsulari è stato affidato a tre coordinatrici, a ciascuna delle quali è stato assegnato un gruppo di regioni (e parchi nazionali compresi nei loro territori):

- Valentina La Morgia: Emilia-Romagna ed Umbria

- Valeria Salvatori: Toscana, Marche, Lazio ed Abruzzo
- Paola Aragno: Campania, Molise, Puglia, Basilicata e Campania

Per quanto riguarda le Regioni e i Parchi Nazionali, è stato richiesto agli Enti di individuare i referenti e comunicarli ad ISPRA per instaurare un flusso di comunicazione e coordinamento delle attività nei territori di loro competenza. La partecipazione da parte degli Enti territoriali è consistita, a seconda dei contesti e delle possibilità, nel mettere a disposizione conoscenze derivanti da pregresse attività di monitoraggio, nell'adozione dei protocolli proposti nell'ambito di eventuali attività di monitoraggio già in essere, nel contribuire attivamente alla raccolta dei dati tramite proprio personale e nel supportare nella creazione della rete di operatori, anche tramite il coinvolgimento di altri enti od associazioni. Alla raccolta dei dati hanno partecipato attivamente con proprio personale le Regioni: Lazio, Toscana, Umbria, Basilicata e Molise. Analogamente ha contribuito il personale delle seguenti aree protette: Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise, Parco Nazionale del Cilento Vallo di Diano e Alburni, Parco Nazionale del Pollino, Parco Nazionale della Majella, Parco Nazionale dell'Appennino Tosco Emiliano, Parco Nazionale Gran Sasso e Monti della Laga, aree protette della Regione Lazio, Parco Naturale Regionale Sirente Velino, Riserva Naturale Regionale Monte Genzana Alto Gizio, Parco Regionale della Maremma e Parco Regionale della Vena del Gesso Romagnola. Infine altri enti locali hanno contribuito con proprio personale: ARPA Umbria, ASReM Molise, ATC Perugia 1 e 2, città metropolitana di Roma Capitale, Polizia Provinciale di Ancona, Polizia Provinciale di Macerata, Provincia di Viterbo, Provincia di Taranto Guide del Parco Nazionale dell'Alta Murgia, Unione Montana dell'Esino-Frasassi e Unione Montana Potenza Esino Musone. Per il coordinamento dell'attività di campo Federparchi ha individuato una squadra di 20 tecnici altamente qualificati (denominati di seguito "tecnici Federparchi", tabella 2), selezionati sulla base della competenza nel monitoraggio della specie e della conoscenza del territorio dell'Italia peninsulare.

Tecnico Federparchi	Regioni	Parchi	Celle di estensivo	Celle di intensivo
Alessandro Asprea	<u>Abruzzo</u> e Molise	Parco nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise, Parco nazionale della Majella	13	9
Carmine Romano	<u>Umbria</u> e Lazio		15	9
Davide Pagliaroli	<u>Abruzzo</u> , Lazio e Marche	Parco nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise, Parco naturale regionale Sirente – Velino, Parco nazionale dei Monti Sibillini, Parco nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga	29	
Davide Palumbo	Emilia-Romagna		25	
Duccio Berzi	<u>Toscana</u> , Emilia-Romagna e Marche	Parco nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna	30	
Enza Fava	Calabria	Parco nazionale della Sila, Parco nazionale dell'Aspromonte	29	
Federico Morimando	<u>Toscana</u> e Lazio		33	
Francesca Ciuti	<u>Molise</u> , Campania e Puglia		16	9
Francesca Silvestri	Puglia	Parco nazionale dell'Alta Murgia	23	
Gabriella Rizzardini	Basilicata e Puglia	Parco nazionale dell'Alta Murgia	14	7
Lorenzo Gaudiano	Puglia	Parco nazionale del Gargano	13	9
Luigi Molinari	Emilia-Romagna	Parco nazionale dell'Appennino Tosco Emiliano	17	9
Marco Bonanni	<u>Lazio</u> , Abruzzo e Marche	Parco nazionale del Circeo, Parco nazionale dei Monti Sibillini, Parco nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga	33	
Marco Lucchesi	Toscana	Parco Nazionale dell'Appennino Tosco Emiliano	15	9

Tecnico Federparchi	Regioni	Parchi	Celle di estensivo	Celle di intensivo
Mia Canestrini	<u>Campania</u> , Puglia e Molise		11	9
Milena Provenzano	<u>Calabria</u> e Basilicata	Parco nazionale della Sila, Parco nazionale del Pollino	12	9
Paola Fazzi	Toscana e Lazio		12	9
Remo Bartolomei	<u>Basilicata</u> e Puglia	Parco nazionale dell'Appennino Lucano - Val d'Agri – Lagonegrese, Parco nazionale del Pollino	25	2
Sara Marini	<u>Marche</u> e Umbria		17	9
Tommaso Notomista	Campania	Parco nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni	22	
		TOT	404	99

*Tabella 2. Tecnici Federparchi, ambiti territoriali e celle assegnate a ciascuno. La regione sottolineata è quella in cui è ricaduto un numero maggiore di celle sottoposte ad indagine.*

A ciascun tecnico è stata affidata una porzione di territorio compreso all'interno di un numero variabile di celle di campionamento, all'interno delle quali era richiesto di applicare i protocolli di raccolta dei dati. A queste figure è stato, inoltre, affidato il compito di contribuire alla creazione e alla formazione di una rete locale di operatori, in collaborazione con ISPRA e gli Enti locali, e di coordinare e realizzare il campionamento nelle 11 regioni dell'Italia peninsulare. Tali reti locali hanno contribuito alla formazione di una rete nazionale, chiamata *Network Lupo*.

Nei mesi precedenti l'attività di campo e in fase conclusiva, sono state convocate dalle coordinatrici numerose riunioni a scala regionale (tot=40), alle quali hanno partecipato i referenti degli Enti regionali e dei Parchi Nazionali, i referenti dei Carabinieri forestali e i tecnici Federparchi incaricati del coordinamento delle attività di campo in ciascuna regione. Lo scopo delle riunioni è stato quello di illustrare il protocollo, introdurre i tecnici ed illustrare agli Enti come apportare un contributo e valutare la loro effettiva disponibilità, in particolare, nel fornire informazioni utili al disegno della rete dei transetti, nel contribuire con proprio personale alla realizzazione delle attività di campo e nel facilitare la creazione di una rete di operatori. In fase conclusiva si è invece provveduto ad informare gli Enti degli sviluppi successivi e a fornire loro i primi risultati.

Sono inoltre state redatte delle relazioni a scala regionale per informare gli Enti di quanto realizzato a scala locale (allegati 2-12).

Nel maggio 2020 è stata avviata una concreta collaborazione tra ISPRA e il Comando Unità Forestali, Ambientali e Agroalimentari (CUFAA) dell'Arma dei Carabinieri. Il Ten. Col. Giancarlo Papitto ha assunto il ruolo di coordinamento generale della partecipazione del Comando al piano di monitoraggio, avvalendosi della collaborazione del Ten. Col. Marco Panella, per i Parchi Nazionali, e del Ten. Col. Nicolò Giordano per le aree fuori parco e le Riserve Naturali Statali gestite. In data 23 luglio 2020 si è svolta una riunione di coordinamento al fine di individuare le modalità operative per garantire lo sviluppo delle attività nell'ambito di tale collaborazione.

Regione	n. reparti
Toscana	28
Emilia-Romagna	29
Marche	23
Abruzzo e Molise	58
Lazio	17
Umbria	18
Puglia	12
Basilicata	23
Campania	46
Calabria	47

*Tabella 3. Numero di Comandi Stazione e Reparti del CUFAA coinvolti in ciascuna Regione nella raccolta dei dati per il monitoraggio nazionale del Lupo, stagione 2020-2021.*

Nel mese di luglio il CUFAA ha comunicato ad ISPRA i nominativi dei referenti per ciascun Comando Regionale (per le aree fuori parco e le Riserve Naturali Statali gestite) e ciascun Parco Nazionale, che ISPRA ha condiviso con i tecnici incaricati del coordinamento delle attività di campo nei territori dei Parchi e delle Regioni. ISPRA conseguentemente ha provveduto a comunicare ai referenti del CUFAA i nominativi e i contatti delle coordinatrici ISPRA e dei tecnici, dando avvio alla diretta collaborazione. Nell'Italia peninsulare hanno collaborato alla raccolta dei dati 301 reparti dei Carabinieri forestali, suddivisi come riportato nella tabella 3. Complessivamente sono stati coinvolti nella raccolta dei dati dell'Italia peninsulare circa 725 unità dei Carabinieri forestali.

Nei mesi di maggio-luglio 2020 ISPRA ha preso contatto con alcune delle principali associazioni ambientaliste presenti a scala nazionale, in particolare il WWF Italia Onlus, la LIPU e Legambiente, e altre associazioni di soggetti attivi sul territorio, quali il CAI (Club Alpino Italiano) e l'AIGAE (Associazione Italiana Guide Ambientali Escursionistiche). Tutti questi soggetti hanno manifestato un forte interesse a collaborare volontariamente e gratuitamente, coinvolgendo i propri soci e volontari nelle attività previste dal piano di monitoraggio. Con il WWF Italia Onlus, la LIPU e Legambiente, ISPRA ha stipulato degli accordi formali di collaborazione. Inoltre, attraverso i tecnici Federparchi, è avvenuto il coinvolgimento di numerose altre associazioni, Università e soggetti presenti a scala locale. Complessivamente sono state coinvolte 27 associazioni locali, distribuite nelle Regioni così come riportato nella tabella 4. Tutte le associazioni coinvolte nel contesto appenninico hanno garantito una copertura assicurativa contro infortuni e per responsabilità civile ai propri soci e volontari che hanno partecipato alle attività. Diverse riunioni di coordinamento sono state svolte con i referenti delle associazioni nazionali al fine di definire i criteri e le modalità per il reclutamento dei volontari e gestire poi la loro effettiva partecipazione alle attività.

Con il Servizio per la pianificazione e la gestione giuridica del personale e il Servizio di Prevenzione e Protezione di ISPRA è stata inoltre individuata una procedura da seguire per i singoli soggetti che hanno aderito volontariamente. Questo iter ha previsto innanzitutto un corso di formazione tecnica, organizzato a scala locale in remoto o in presenza dai tecnici Federparchi (vedi capitolo 2.2.2), un corso specifico sulla sicurezza (in forma di video reso disponibile online da ISPRA, docente il Ten. Col. Giancarlo Papitto) e una riunione di coordinamento per la sicurezza organizzata a scala locale in remoto dalle coordinatrici ISPRA. In tutto queste riunioni sono state 33.

Hanno inoltre partecipato alla raccolta dati le Università del Molise, di Napoli Federico II, Parma, Perugia, Pisa e Teramo.

Complessivamente la raccolta dati nella penisola è stata realizzata da un Network composto di 775 operatori (esclusi i Carabinieri forestali), 344 dei quali appartenenti ad istituzioni e 431 appartenenti ad associazioni di volontari. La numerosità della rete in ciascuna regione è riportata in tabella 5.

Ambito territoriale	Associazione
Abruzzo	Centro Studi per l'Ecologia e la Biodiversità degli Appennini Associazione guide ufficiali ed esclusive del parco nazionale dell'appennino lucano Val D'agri - Lagonegrese -ONLUS
Basilicata	NaturOffice APS
Basilicata	centro Studi Appennino Lucano
Calabria	Associazione Guide Ufficiali ed esclusive del Parco del Pollino
Campania	Ardea
Campania	ASNU - Associazione Scienze Naturali Unite
Campania	K'Nature
Campania	A.P.S. SOS Natura
Emilia-Romagna	GEV Faenza
Emilia-Romagna	Io non ho paura del lupo
Emilia-Romagna	Piacenza Wildlife Rescue Center (CRAS)
Emilia-Romagna	STERNA Soc coop arl
Emilia-Romagna	ARiF Associazione Rilevatori Faunisti
Emilia-Romagna	GEV Bo
Molise	IntraMontes
Molise	Salviamo l'Orso
Puglia	Terre del Mediterraneo
Puglia	Centro de Romita
Puglia	Thalassia
Puglia	Serapia
Puglia	Fare Ambiente
Toscana	EcoLato-Sportello di agroecologia
Toscana	I Dèi Camminanti
Toscana	Selvatica APS
Toscana	Canislupus Italia Onlus
Umbria	WildUmbria

*Tabella 4. Associazioni locali che hanno aderito alla raccolta dei dati per il monitoraggio nazionale del Lupo, stagione 2020-2021.*



Regione	n. operatori
Abruzzo	29
Basilicata	26
Basilicata/Calabria	1
Basilicata/Puglia	2
Calabria	42
Campania	65
Emilia Romagna	153
Lazio	165
Lazio/Umbria	1
Marche	73
Molise	25
Molise/Toscana	1
Puglia	36
Toscana	93
Toscana/Emilia Romagna	4
Toscana/Molise	1
Umbria	56
Umbria/Marche	1
Campania/Emilia Romagna	1

*Tabella 5. Numero di operatori che in ciascuna Regione hanno contribuito alla raccolta dei dati per il monitoraggio nazionale del Lupo, stagione 2020-2021.*

### **2.2.2 La formazione**

La formazione della rete di operatori è stata assicurata attraverso diversi canali e modalità. Sarebbe stato adeguato offrire la possibilità di svolgere delle sessioni in presenza con esercitazioni pratiche sul campo, ma le limitazioni imposte dall'evento pandemico del 2020-21 hanno fortemente limitato tale attività. Si è perciò proceduto con lo svolgimento di attività di formazione a livello locale e a livello nazionale. A scala locale i tecnici Federparchi, in remoto o in presenza, hanno organizzato numerosi eventi di formazione. Complessivamente sono stati tenuti 106 sessioni formative, delle quali 66 in presenza, distribuite nel territorio della penisola come riportato in tabella 6.

Con l'intento di diffondere la conoscenza sulle caratteristiche biologiche del lupo e sugli aspetti legati alla sua conservazione, e al fine di favorire il processo di standardizzazione nell'applicazione dei protocolli, ISPRA ha predisposto un corso di formazione in modalità e-learning. Il corso è stato composto di 4 moduli per un totale di 13 Unità formative di 20-30 minuti ciascuna, come da programma riportato in allegato 1. Il corso è stato rivolto ai referenti individuati dagli Enti, o ad altro personale da questi indicato, al personale dei Carabinieri forestali e ad operatori appartenenti alle numerose associazioni di volontari che hanno aderito al monitoraggio. Sono state condotte 11 sessioni del corso alle quali hanno avuto accesso complessivamente 685 operatori/personale degli

Enti dell'Italia peninsulare (suddivisi per regione così come indicato in tabella 7), dei quali 513 sono giunti al termine ed hanno ottenuto l'attestato, esprimendo una valutazione positiva del corso.

Regione	Eventi formativi
Abruzzo	8
Basilicata	5
Basilicata/Calabria	1
Calabria	13
Campania	10
Campania/Molise	4
Emilia-Romagna	10
Lazio	9
Lazio/Toscana	1
Marche	11
Molise	4
Puglia	3
Toscana	19
Umbria	8

*Tabella 6. Numero di eventi formativi in ciascuna regione della penisola*

Regione	n. discenti
Abruzzo	37
Appennino	6
Basilicata	51
Calabria	80
Campania	84
Emilia-Romagna	161
Lazio	62
Marche	29
Molise	28
Puglia	55
Toscana	73
Umbria	19

*Tabella 7. Numero di discenti che hanno avuto accesso al corso in ciascuna regione peninsulare*

### 2.2.3 La gestione del flusso dei dati

La Federparchi, tramite procedura comparativa, ha affidato al Dott. Daniele De Angelis un incarico specifico per la gestione del flusso di dati dell'ambito peninsulare. È stato quindi predisposto il database e la struttura analitica necessaria per il suo costante aggiornamento, per i controlli regolari di coerenza dei dati e per la produzione a cadenza mensile di report di sintesi, necessari per la valutazione dell'andamento della raccolta dei dati durante i mesi di attività, prevista nell'ambito della gestione adattativa che è stata adottata dal gruppo di coordinamento.

In particolare:

- Sono stati predisposti: un foglio elettronico per la registrazione dell'impegno profuso ("sforzo") durante il campionamento sistematico lungo i transetti, un foglio elettronico per la registrazione dei periodi di attività e corretto funzionamento delle foto-trappole e un foglio elettronico per l'archiviazione di tutti i dati di presenza del lupo.
- È stata realizzata una guida alla compilazione dei fogli di lavoro per la registrazione dei dati, fornita ai tecnici incaricati da Federparchi.
- Sono stati elaborati i codici R per il controllo della qualità, la pulizia dei dati da eventuali errori accidentali e l'individuazione di incongruenze da chiarire con i tecnici responsabili (es. coordinate errate o mancanti, mancata associazione tra segni di presenza e transetti/fototrappole, ecc.).
- Sono stati elaborati i codici R per la creazione di matrici contenenti lo storico degli avvistamenti/campioni registrati lungo transetto e tramite fototrappole e dello sforzo associato.
- Sono stati elaborati i codici R per lo smistamento dei dati registrati sul campo tramite Applicazione per computer e *smartphone* "Gaia observer" (si veda sotto) ai tecnici Federparchi, per consentirne la validazione e la successiva integrazione nel database.

Durante il periodo di campionamento, a cadenza mensile, sono stati acquisiti dai tecnici Federparchi tutti i dati raccolti, è stato effettuato il controllo qualità, la pulizia, si è provveduto allo stoccaggio nell'archivio e sono state successivamente realizzate mappe della distribuzione di tutti i segni di presenza di lupo raccolti e report relativi allo sforzo di campionamento realizzato lungo transetti e tramite foto-trappole e alla numerosità dei segni rilevati, al fine di valutare l'andamento della raccolta dei dati.

Per facilitare la raccolta dei dati sul campo, la Federparchi, in collaborazione con il progetto LIFE WOLFALPS-EU e la Piattaforma grandi carnivori Grosseto<sup>1</sup>, a seguito di una procedura comparativa, ha incaricato la ditta XValue di realizzare una applicazione per computer e *smartphone* specifica per il monitoraggio nazionale del Lupo. L'applicazione è stata quindi sviluppata all'interno di Gaia observer (<https://www.gaiaobserver.it/>), un prodotto precedentemente sviluppato dalla ditta quale strumento per la raccolta di informazioni georeferenziate multi-ENTE a supporto di progetti per la tutela dell'ambiente. È stato inoltre predisposto un server in cui far confluire i dati registrati tramite l'applicazione.

---

<sup>1</sup> [https://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/carnivores/regional\\_platforms\\_Italy\\_IT.htm](https://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/carnivores/regional_platforms_Italy_IT.htm)

I dati potevano quindi seguire due vie:

- Registrazione tramite applicazione, server, download, validazione da parte dei Tecnici Federparchi e inserimento nel database.
- Registrazione tramite scheda cartacea, invio ai tecnici Federparchi, validazione da parte dei tecnici e inserimento nel database.

### **2.3 Le analisi genetiche sui campioni biologici raccolti**

Grazie ai progressi compiuti nella biologia molecolare negli ultimi dieci anni, è possibile affiancare alle tecniche di indagine tradizionalmente utilizzate per studiare parametri ecologici e demografici del lupo (*snowtracking, radiotracking, wolf-howling*) anche le tecniche bio-molecolari che permettono di ottenere informazioni genetiche dalle tracce biologiche (campioni non-invasivi) che il lupo lascia dietro di sé (feci, peli, urina, saliva, tracce di sangue) senza la necessità della cattura o della manipolazione dell'animale stesso, evitando così qualsiasi disturbo o danno alla popolazione selvatica. Tale capacità nasce appunto dalla possibilità di estrarre sufficiente DNA per le analisi genetiche da svariate tipologie di tracce biologiche che ne contengono minime quantità, anche fortemente degradate. Dal DNA estratto è possibile, infatti, grazie allo sviluppo dell'amplificazione in vitro del DNA (Polymerase Chain Reaction, PCR) e utilizzando opportuni marcatori molecolari, determinare la specie, valutando anche l'esistenza di tracce di ibridazione con il cane domestico, il sesso ed il profilo genetico individuale dell'animale a cui il campione appartiene. In secondo luogo, è possibile valutare anche i rapporti di parentela esistenti tra i genotipi unici identificati, studiare parametri di popolazione (variabilità genetica della popolazione, presenza di popolazioni geneticamente differenziate, storia demografica della popolazione) ed ottenere, utilizzando i genotipi identificati ed i loro ricampionamenti nel tempo come dati di cattura-marcatura-ricattura, stime sulle dimensioni della popolazione e sulla prevalenza dell'ibridazione.

I campioni biologici non-invasivi (prevalentemente feci) raccolti nell'ambito di questo progetto sono stati analizzati secondo le metodiche di analisi in uso presso il laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione che comprendono: l'estrazione del DNA, l'amplificazione dei frammenti genetici di interesse, il loro processamento e l'analisi statistica dei dati ottenuti. Tutte le procedure di analisi applicate sono state largamente utilizzate in diversi progetti di monitoraggio genetico non-invasivo condotti per lo studio delle dinamiche di popolazione del lupo in Italia (Caniglia *et al.* 2013, Caniglia *et al.* 2014, Fabbri *et al.* 2007, Fabbri *et al.* 2018), sottoposti ai controlli previsti dal Sistema di Gestione della Qualità e validati da diverse pubblicazioni scientifiche (Velli *et al.* 2019; Caniglia *et al.* 2020). La manipolazione dei campioni non-invasivi e l'estrazione del DNA in essi contenuto sono state realizzate in appositi locali del laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione, adibiti a questo scopo, al fine di evitare eventuali contaminazioni tra campioni di diverse tipologie e tra campioni biologici e DNA amplificato. Inoltre il Laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione è dotato anche di aree e attrezzature separate per le diverse fasi di analisi (pre-PCR e post-PCR) per evitare ulteriori possibili contaminazioni fra i campioni. In ogni fase di lavoro vengono aggiunti campioni noti (positivi) e campioni privi di matrice biologica (negativi) per tenere sotto controllo eventuali contaminazioni o errori di genotipizzazione. Infine, tutto il flusso di lavoro

è tracciabile poiché ogni operazione, per ogni campione biologico o di DNA, è registrata su appositi “fogli di lavoro”.

### **2.3.1 Raccolta e conservazione dei campioni biologici**

Nell’ambito del progetto di monitoraggio nazionale della presenza del lupo, sono stati conferiti al laboratorio dell’Area per la Genetica della Conservazione di ISPRA campioni biologici non-invasivi di presunto lupo (*C. l. italicus*) rappresentati da tamponi fecali o piccole porzioni di feci conservate in alcool etilico, e campioni di tessuto muscolare prelevati da animali rinvenuti morti (campioni invasivi). In particolare nelle celle intensive è stata utilizzata la tecnica di prelievo tramite l’uso di un *cotton-fioc* che deve essere strofinato sul campione fecale, e successivamente inserito in una provetta all’interno della quale è presente una specifica soluzione conservante (tampone fecale o *faecal swab*). In questo modo la raccolta risulta molto più “pulita”, vi sono meno rischi di contaminazione ed anche meno pericoli per l’operatore che con questa tecnica non deve “maneggiare” materiale biologico potenzialmente infetto. Anche lo stoccaggio risulta più agevole, sia nello zaino, al momento della raccolta, che nel trasporto fino al laboratorio, ma anche nello stoccaggio nei frigoriferi al momento della conservazione a medio e lungo termine (Velli *et al.* 2019). Nelle celle estensive, per ottimizzare i costi, invece si è preferito procedere alla raccolta prelevando un piccolo frammento di materiale fecale (circa 1 cm<sup>3</sup>) da inserire in un flacone contenente etanolo 96%.

Analogamente, in caso di rinvenimento di una carcassa riconducibile a lupo o ad ibrido lupo-cane è stato eseguito un prelievo di tessuto muscolare (circa 1 cm<sup>3</sup>), utilizzando bisturi sterili, da conservare in etanolo 96%.

Particolare attenzione è stata posta alla esclusiva raccolta di campioni fecali “freschi” (non più vecchi di una settimana dalla deposizione stimata) in modo da ottimizzare la resa di analisi. Il DNA contenuto nei campioni fecali infatti si degrada rapidamente a contatto con gli agenti atmosferici e gli organismi decompositori, rendendo vane tutte le procedure di laboratorio. Complessivamente sono stati analizzati 1.402 campioni raccolti con *cotton-fioc*, 190 campioni fecali conservati in etanolo, un campione di saliva, un campione costituito da tracce di sangue, tre campioni di pelo e tre campioni di urina (in totale 1.600 campioni non-invasivi) e 30 campioni di tessuto muscolare, 2 prelievi ematici (in totale 32 campioni invasivi) (Tab. 10). Tutti i campioni biologici pervenuti sono stati numerati utilizzando un codice univoco di laboratorio ed inseriti nel database interno per la loro catalogazione e gestione, associando ogni gruppo di campioni consegnati ad un protocollo in entrata e inviando i risultati delle loro analisi con un protocollo in uscita.

### **2.3.2 Estrazione del DNA**

Al fine di ottimizzare la resa di estrazione del DNA presente nei campioni fecali è stato utilizzato uno specifico kit di estrazione (*Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit*) che permette di ottenere una soluzione “pulita” di DNA e che consente l’automatizzazione del procedimento di estrazione in apposite piastre da 96 campioni su di una piattaforma robotica per la dispensazione dei reagenti (Qiacube HT). Il DNA così estratto è stato conservato a -20°C ed utilizzato per le successive fasi di

analisi che prevedono l'amplificazione ed il processamento nei sequenziatori automatici dei *marker* di interesse amplificati.

### 2.3.3 Determinazione del genotipo *multilocus* e discriminazione degli individui

I campioni biologici pervenuti sono stati analizzati utilizzando i seguenti marcatori molecolari specifici per la specie *Canis lupus*: 12 o 39 *loci* microsatellite autosomici (12-39 STR) per la determinazione del genotipo individuale e l'assegnazione della specie di appartenenza, rispettivamente per i campioni non-invasivi ed invasivi; 4 *loci* microsatellite localizzati sul cromosoma Y (Y-STR) e che sono ereditati solo per via paterna (aplotipo paterno); sequenziamento di un frammento di 250 paia di basi della regione di controllo del DNA mitocondriale (mtDNA) ereditato solo per via materna (aplotipo mitocondriale materno); analisi di una delezione di 3 paia di basi al gene CBD103 localizzato sul cromosoma 16 dei canidi (*k-locus*), responsabile della colorazione melanica del mantello (Caniglia *et al.*, 2013).

Il DNA ricavato dai campioni invasivi è in generale di migliore qualità e consente l'analisi di un maggior numero di *marker*. Pertanto il DNA ottenuto dai campioni invasivi viene genotipizzato utilizzando 39 STR che includono i 12 STR utilizzati per genotipizzare i campioni non-invasivi più altri 27 *loci* microsatellite informativi per la determinazione della specie (Randi *et al.*, 2014).

I 12 STR sono sufficientemente variabili nella popolazione italiana di lupo da consentire di discriminare tra loro gli individui, anche se strettamente imparentati (Caniglia *et al.*, 2014). In questo modo ogni individuo nella popolazione presenta un profilo genetico *multilocus* univoco e questo significa che quando due o più campioni presentano lo stesso profilo genetico appartengono allo stesso animale. Il DNA fecale è spesso frammentato e di conseguenza le amplificazioni che si ottengono possono non essere completamente attendibili. Per ovviare a questo problema è necessario replicare le singole analisi e confrontare fra loro i risultati ottenuti dalle repliche indipendenti (protocollo *multi-tube*). Inoltre, al fine di ottimizzare i tempi di analisi e contenere i costi i campioni sono sottoposti ad una preliminare fase di *screening* di qualità che porta a scartare i campioni il cui DNA è troppo scarso e degradato per consentire una genotipizzazione affidabile a tutti i *marker* necessari per la ricostruzione del profilo genetico individuale. Il protocollo *multi-tube* ISPRA prevede inizialmente l'amplificazione del DNA estratto a tre *loci* STR eseguendo quattro repliche per campione per *locus*. Solo i campioni di DNA il cui esito di amplificazione è superiore al 50% superano la fase di *screening* e proseguono le analisi: amplificazione dei restanti nove *loci* STR e completamento del profilo genetico con amplificazione dell'aplotipo paterno (4 Y-STR) e del *k-locus*. Dalla combinazione e dal confronto delle repliche ottenute viene ricostruito il genotipo *multilocus* di consenso tramite il programma GIMLET v.1.3.3. (Valiere, 2002), considerando definitivi ed affidabili solo i genotipi che rispettano il seguente criterio: un genotipo omozigote deve essere osservato (nelle repliche) almeno quattro volte, mentre un genotipo eterozigote deve essere osservato almeno due volte. I genotipi di consenso sono sottoposti ad una analisi statistica della loro affidabilità confrontando le frequenze alleliche delle 4 repliche ad ogni *locus* utilizzando il software RelioType (Miller *et al.*, 2002). I genotipi che non risultano affidabili ( $R < 95\%$ ) o che hanno una percentuale di dati mancanti superiore a 3 *loci* vengono ulteriormente scartati. I genotipi di

consenso affidabili sono confrontati fra di loro e con la banca dati genetica *Canis* di ISPRA (utilizzando il programma GIMLET e GenAEx 6.5, Peakall and Smouse 2006) identificando in questo modo eventuali *match* o ricampionamenti (cioè campioni che presentano lo stesso profilo genetico e che quindi appartengono allo stesso individuo).

#### 2.3.4 Identificazione della specie e dei casi di ibridazione

Le procedure adottate consentono la ricostruzione del profilo genetico individuale, l'identificazione della specie di appartenenza (cane o lupo) e l'individuazione di possibili casi di ibridazione recente o antica (introgressione) con il cane domestico, attraverso l'utilizzo di un modello Bayesiano (implementato nei programmi STRUCTURE v.2.3.4 e PARALLEL STRUCTURE; Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003; Besnier e Glover, 2013) che assegna la componente genetica di un individuo ai due cluster di riferimento: lupo appenninico o cane domestico. Questi programmi usano i genotipi *multilocus* per evidenziare la presenza di gruppi geneticamente distinti e contemporaneamente assegnare gli individui ai gruppi. Quindi tali software sono utilizzati per assegnare i campioni analizzati ai *loci* microsatellite ai due gruppi: "lupo" o "cane", e, nel caso di individui ibridi, ad entrambi. Questo ultimo passaggio può realizzarsi grazie al fatto che il Laboratorio BIO-CGE di ISPRA dispone di una adeguata e cospicua banca dati genetica relativa alla intera popolazione italiana di lupo e al cane, perché è importante sottolineare che tali metodi di assegnazione statistica sono affidabili solo se le popolazioni di riferimento sono ben caratterizzate geneticamente.

La classificazione degli individui come lupi, ibridi recenti o introgressi avviene sulla base di un valore soglia di assegnazione individuale ( $q$ ) alla popolazione italiana di lupo che è stato identificato in modo da minimizzare sia il rischio di identificare come lupo un animale ibrido sia quello di identificare come ibrido un individuo che invece appartiene alla popolazione italiana di lupo, questo sulla base di 1.200 genotipi simulati (appartenenti alle diverse categorie di ibridi) e attraverso il calcolo di quali soglie siano più adeguate a distinguere fra tali diversi livelli di ibridazione (Caniglia *et al.*, 2020). Inoltre altre informazioni aggiuntive relative all'assegnazione della specie provengono dagli altri marcatori molecolari utilizzati. I marcatori uniparentali permettono infatti di evidenziare tracce di ibridazioni o passate introgressioni lungo la linea materna (attraverso l'analisi del DNA mitocondriale: mtDNA) e paterna (attraverso l'analisi di loci *microsatellite* localizzati sul cromosoma Y: Y-STR). Mentre il *k-locus* permette infine di identificare la colorazione nera del mantello anche in campioni di tipo non-invasivo, quindi anche non disponendo di informazioni fenotipiche circa gli animali cui tali campioni appartengono, carattere che anche in questo caso è di origine canina.

Nel dettaglio, gli individui classificati come "lupo" non presentano tracce di incrocio con il cane a nessuno dei marcatori analizzati (valore  $q_w \geq 0,990$  con 12 STR; valore  $q_w \geq 0,995$  con 39 STR); quelli classificati come "ibrido lupo x cane" presentano ai marcatori autosomici segnali di incrocio con il cane avvenuto approssimativamente nelle ultime due ( $q_w < 0,975$  con 12 STR) o tre ( $q_w < 0,954$  con 39 STR) generazioni; quelli indicati come "lupo con introgressione" presentano anomalie ai marcatori autosomici (12 STR;  $q_w$  compreso tra 0,975 e 0,989 con 12 STR;  $q_w$  compreso tra 0,994 e 0,954 con 39 STR) e/o ai marcatori sul cromosoma Y (Y-STR) e/o al gene CBD103 (*K-locus*) suggerendo tracce di incrocio con il cane avvenuto oltre due/tre generazioni nel passato. Il

numero delle generazioni è dedotto in maniera indiretta dai valori di assegnazione individuale ottenuti dall'analisi Bayesiana (Caniglia *et al.*, 2020).

### 2.3.5 Analisi delle relazioni parentali

Al fine di identificare i nuclei riproduttivi (riportati nella relazione tecnica “La popolazione di lupo delle regioni dell'Italia peninsulare 2020-2021. Relazioni regionali”, Salvatori *et al.*, 2022), sui genotipi affidabili identificati (siano essi risultati appartenere al gruppo dei lupi o a quello degli ibridi lupo-cane) è stata condotta un'analisi delle relazioni parentali. In particolare, tra tutte le coppie di individui identificati è stato calcolato un indice ( $r$ ) di *relatedness* (utilizzando il programma ML-Relate; Kalinowsky *et al.*, 2006) che indica il grado di somiglianza genetica riscontrato tra due genotipi *multilocus* imputabile al fatto che gli individui siano fra loro parenti (discendenti). Per la legge dell'eredità mendeliana degli alleli, fra genitori e figli ci si aspetta un indice  $r$  uguale a 0,5, in quanto genitore e figlio condividono il 50% degli alleli. Fra due fratelli invece l'indice  $r$  atteso è pari a 0,25, e così via. Dato l'elevato numero di individui identificati e dato che è altamente improbabile che due animali geneticamente identificati ad elevata distanza spaziale (>150km) l'uno dall'altro siano fra loro imparentati, si è deciso di svolgere questa analisi solo fra individui campionati all'interno della stessa area e fra aree adiacenti qualora esse risultassero confinanti ed in continuità territoriale. Inoltre è stato chiesto ai rilevatori di formulare, sulla base dei dati di campo a loro disposizione (siti di marcatura, dati ottenuti dal fototrappolaggio, morfologia del territorio, ecc.), delle ipotesi di appartenenza degli individui (genotipi) allo stesso nucleo familiare. Tali ipotesi sono state verificate sulla base dei risultati dell'analisi di *relatedness* condotta sui genotipi *multilocus* nucleari e sulla base degli altri marcatori genetici quali l'aplotipo-Y ed il K-locus.

## 2.4 Analisi dei dati e modellizzazione

I due principali obiettivi analitici del presente programma di campionamento del lupo sono stati quelli di stimare la distribuzione spaziale della popolazione e la sua consistenza numerica complessiva. In letteratura, questi due parametri sono stati tradizionalmente ottenuti facendo uso di tecniche statistiche e modellistiche diverse. In particolare, la stima della distribuzione spaziale e della probabilità di presenza della specie viene solitamente ottenuta tramite l'utilizzo dei cosiddetti *occupancy models* (McKenzie *et al.*, 2002), i quali si rivelano particolarmente adatti nel caso di specie rare o elusive, come il lupo. Per le stime di abbondanza, invece, i modelli più frequentemente applicati sono quelli appartenenti all'ampia famiglia dei *capture-recapture models* a popolazione chiusa (Otis *et al.* 1978), che utilizzano le frequenze di campionamento dei singoli individui all'interno della popolazione, per stimare quale proporzione di individui sia rimasta invisibile al campionamento, consentendo quindi di giungere ad una stima delle dimensioni totali della popolazione.

Nel corso degli ultimi anni, tuttavia, la biostatistica ha sviluppato una serie di modelli integrati, che consentono non solo di utilizzare simultaneamente tipi di dati diversi (quali ad esempio dati generici



di sola presenza della specie, conte numeriche, dati derivati da campionamento genetico, etc.), ma anche di stimare simultaneamente tutti i parametri di interesse, integrando le informazioni contenute in ognuno dei dataset utilizzati e ottenendo così un miglioramento di precisione ed accuratezza delle stime. Tali modelli, che ricadono sotto il nome generico di *integrated population models*, sono una delle frontiere maggiormente in sviluppo della statistica ecologica, e sono stati utilizzati per studi di popolazione su diverse specie di vertebrati, tra le quali la lince (*Lynx lynx*) in Francia (Blanc *et al.*, 2014), il cardellino canadese (*Cardellina canadensis*; Chandler *et al.*, 2018) e il tursiopo (*Tursiops truncatus*) nel Mediterraneo settentrionale (Lauret *et al.*, 2021), solo per citare alcuni esempi.

Pertanto, in linea con i più recenti sviluppi delle metodologie di analisi, e data la natura eterogenea del dataset a nostra disposizione, la strategia generale di analisi dei dati raccolti sul campo è stata quella di costruire innanzitutto dei modelli di base, che fossero specifici ed appropriati per i vari tipi di dati forniti dal campionamento, per poi integrarli in un unico modello generale, che valorizzasse e rendesse complementari le informazioni derivate dall'intero corpus di dati raccolti, producendo simultaneamente delle stime sia di distribuzione sia di abbondanza per il lupo in area appenninica.

#### 2.4.1 Modello di occupancy

Come accennato sopra, per la stima della distribuzione spaziale della specie è stato costruito ed analizzato un modello appartenente alla famiglia degli *occupancy models* (McKenzie *et al.* 2002), adattato alle specifiche caratteristiche della specie oggetto di studio e delle nostre condizioni di campionamento. I modelli di *occupancy* consentono di stimare la proporzione di casi in cui la specie oggetto di un monitoraggio, pur essendo presente in una determinata località o unità spaziale, non è stata rilevata ed è quindi rimasta invisibile al campionamento. Questi modelli si basano quindi sull'assunto che la cosiddetta *detection probability* (probabilità di rilevare la specie) sia inferiore al 100% e che la distribuzione dei segni di presenza rilevati durante il campionamento sia sempre una sottostima della distribuzione reale della specie. Attraverso la stima della *detection probability*, i modelli di *occupancy* consentono quindi di stimare anche un ulteriore parametro, detto *occupancy probability*, che rappresenta la probabilità che una data unità spaziale (ad esempio una cella di una griglia di campionamento) sia occupata ed utilizzata dalla specie. La stima dell'*occupancy probability* corrisponde proprio alla stima della distribuzione della specie, inserita come uno dei due obiettivi prioritari del programma di campionamento del lupo.

Per la costruzione del dataset di input del modello di *occupancy* sono stati utilizzati i soli dati di presenza appartenenti alle categorie di qualità C1 o C2, definite in base al criterio SCALP (*Status and Conservation of the Alpine Lynx Population*; vedi paragrafo 2.1). Questi includevano principalmente escrementi, immagini fornite dalle fototrappole dislocate nell'area di studio, con l'aggiunta marginale di altri tipi di dati, quali tracce, segni di predazione, ululati, etc. Unicamente per la fase analitica, si è deciso di escludere le carcasse di lupo come dati di input del modello di *occupancy* e del modello integrato. Poiché, infatti, i dati di presenza influenzano la stima della densità locale all'interno del modello di popolazione integrato, l'inclusione delle carcasse avrebbe erroneamente

indicato la presenza di lupi vivi in una determinata cella di campionamento, a fronte di un dato di campo che invece rappresenta unicamente l'evidenza di un evento di mortalità.

Per ognuna delle celle di campionamento sono state individuate 3 sessioni bimestrali (ottobre-novembre, dicembre-gennaio, febbraio-marzo) ed un'ultima sessione mensile corrispondente al mese di aprile, per un totale di 4 sessioni, rispettando così la scansione temporale utilizzata durante la raccolta dati. Per ogni cella ed ogni sessione si è quindi indicato, in via preliminare, se il campionamento avesse (1) o meno (0) fornito uno o più segni di presenza della specie, producendo così una matrice binaria riassuntiva di tutte le presenze accertate, di dimensioni  $N \times T$ , in cui  $N$  rappresenta il totale delle celle incluse nell'area di studio e  $T$  il numero di sessioni di campionamento. Sono state prodotte due matrici separate, ma complementari, per i segni raccolti lungo i transetti di campionamento e per quelli derivati dalle fototrappole.

Il caso particolare del campionamento di escrementi di lupo lungo i transetti, tuttavia, presentava un'ulteriore peculiarità, rappresentata dal rischio che uno o più segni di presenza derivati da escrementi di cane potessero essere erroneamente attribuiti a lupo, generando così delle false presenze della specie nel dataset. Per tenere conto di tale rischio e stimarne l'incidenza potenziale sulle stime, l'iniziale modello di *occupancy* è stato modificato, espandendolo fino a farlo diventare un *multi-event occupancy model* (Louvrier *et al.* 2018), il quale consente di includere nel *design* analitico la possibilità di una errata attribuzione di presenza della specie in una o più delle celle sottoposte a campionamento. Per adattare il dataset a questo diverso tipo di modello, abbiamo trasformato la matrice binaria relativa ai segni raccolti lungo i transetti, includendo non più due, ma quattro diversi tipi di *detections* nella matrice. I tipi di *detections* sono illustrati in Tab. 8.

Indice	Raccolta campioni valutati come lupo	Invio al lab genetica	Risultato analisi genetiche	Tipo di cella	Significato
0	No	-		Intensiva & estensiva	Possibile assenza della specie
1	Sì	Sì	Lupo	Intensiva	Presenza accertata della specie
2	Sì	Sì	Cane	Intensiva	Errore di classificazione
3	Sì	No	-	Intensiva & Estensiva	Possibile presenza della specie

Tab. 8 – Tipi di *detections* attribuite ad ogni cella in ogni sessione di campionamento, in funzione degli eventuali campioni raccolti e valutati sul campo e delle successive risultanze delle analisi genetiche di laboratorio.

Successivamente, per la stima di tutti i parametri del modello, abbiamo costruito una matrice che riassume la probabilità legata ad ognuno dei quattro diversi tipi di *detections*, in funzione dello

stato di ogni cella. La matrice aveva dimensioni 2x4, poiché due erano i possibili stati di ogni cella (occupata dal lupo / non occupata dal lupo) e quattro erano i tipi di detection (Tab. 8).

$$\begin{bmatrix} & \text{Nessuna detection (0)} & \text{Lupo (1)} & \text{Cane (2)} & \text{Sconosciuto (3)} \\ \text{occupata (0)} & \psi_x * (1 - P_{1,x,t}) & 0 & \psi_x * P_{1,x,t} * G_x & \psi_x * P_{1,x,t} * (1 - G_x) \\ \text{Non occupata (1)} & (1 - \psi_x) * (1 - P_{2,x,t}) & (1 - \psi_x) * G_x * (1 - M_x) & (1 - \psi_x) * G_x * M_x & (1 - \psi_x) * (1 - G_x) \end{bmatrix}$$

Nella matrice,  $\psi_x$  rappresentava la probabilità di *occupancy* della cella  $x$ ,  $P_{1,x,t}$  era la probabilità di raccogliere escrementi nella cella  $x$  occupata dal lupo durante la sessione  $t$ , mentre  $P_{2,x,t}$  era la probabilità di raccogliere escrementi nella cella  $x$  non occupata dal lupo durante la sessione  $t$ . Il parametro  $G_x$  rappresentava invece la probabilità che i campioni raccolti nella cella  $x$  fossero inviati al laboratorio di genetica per le analisi. Si tratta di un parametro puramente tecnico, finalizzato a separare le celle delle aree intensive, per le quali tale parametro è stato stimato nel modello, dalle celle delle aree estensive, per cui invece il parametro è stato posto a priori uguale a zero. Infine, il parametro  $M_x$  rappresentava la probabilità di erronea attribuzione di specie all'interno della cella  $x$ , ovvero che un campione di cane fosse erroneamente attribuito a lupo sul campo. In sostanza, il modello così parametrizzato ha utilizzato la proporzione di escrementi analizzati geneticamente e risultati appartenenti a cane in ognuna delle 13 aree intensive, per produrre delle stime spazialmente esplicite della probabilità di falsa attribuzione di presenza. Tali stime hanno consentito di correggere le stime di distribuzione, tenendo conto proprio del rischio di false presenze.

Per ciò che riguarda, invece, i dati relativi alle fototrappole, in questo caso non è stato considerato alcun rischio di erronea identificazione, dando per assodato che tutti gli operatori fossero in grado di distinguere visivamente eventuali foto di cani da foto di lupi. Pertanto, la matrice di parametrizzazione del modello ha mantenuto la sua originale struttura 2x2, risultante da due possibili stati di ogni cella (occupata o non occupata) e due soli tipi di *detection* (foto di lupo o nessuna foto di lupo).

$$\begin{bmatrix} & \text{Nessuna detection (0)} & \text{Lupo (1)} \\ \text{Cella occupata (0)} & \psi_x * (1 - P_{3,x,t}) & \psi_x * P_{3,x,t} \\ \text{Cella non occupata (1)} & (1 - \psi_x) & 0 \end{bmatrix}$$

Nella matrice relativa ai dati delle fototrappole,  $\psi_x$  aveva lo stesso significato della matrice precedente, ovvero rappresentava la probabilità di *occupancy* della cella  $x$ , mentre  $P_{3,x,t}$  era la probabilità di ottenere foto di lupo nella cella  $x$  occupata dal lupo durante la sessione  $t$ . Il design analitico complessivo è illustrato graficamente in Fig. 4.

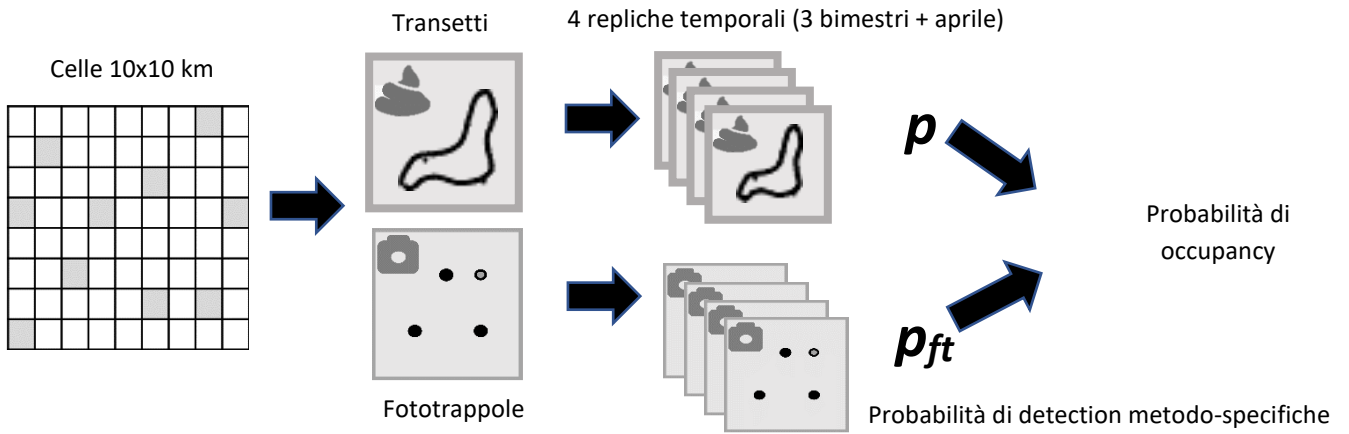


Fig. 4 – Illustrazione del design analitico adottato nella costruzione del modello di occupancy per la stima della distribuzione del lupo (adattata da Barry et al. 2021).

A livello operativo, pertanto, la stima complessiva del modello di *occupancy* ha richiesto di stimare ognuno dei parametri inclusi nelle due matrici sopra esposte. Nello specifico, per la stima della *detection probability* di ognuna delle celle di campionamento (parametri  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ ) abbiamo trattato tali parametri come variabili bernoulliane:

$$Y_{x,t,transetti} | Z_x \sim \text{Bernoulli}(Z_x, P_{1,x,t}, P_{2,x,t}, M_x)$$

$$Y_{x,t,fototrappole} | Z_x \sim \text{Bernoulli}(Z_x, P_{3,x,t})$$

In cui  $Y_{x,t}$  è la porzione di matrice di dati (metodo-specifica) relativa alla cella  $x$  durante la sessione  $t$ , mentre  $Z_x$  rappresenta l'effettivo stato di presenza/assenza della specie nella cella  $x$ .

Allo scopo di descrivere le variazioni spaziali e temporali della probabilità di *detection*, abbiamo poi utilizzato come covariate lo sforzo di campionamento (misurato come numero totale di chilometri percorsi all'interno di ogni cella in ogni sessione di campionamento e come numero di notti di attività di ogni fototrappola) e la stima della copertura nevosa (derivata dal dataset reanalysis ERA5-Land), alle quali abbiamo aggiunto una covariata fattoriale per distinguere le diverse sessioni di campionamento, ed una coppia di coefficienti di regressione, resi alternativi dal parametro binario  $w_{h,x}$ , che consentissero di intercettare le residue differenze tra celle ad alta e celle a bassa probabilità di detection, utilizzando l'approccio dei *finite-mixtures* (Pledger 2005). La parametrizzazione delle variabili legate alla *detection probability* è illustrata nell'esempio sottostante, per il caso del parametro  $P_1$ , ma è del tutto analoga per i parametri  $P_2$  e  $P_3$ .

$$\text{Logit}(P_{1,x,t}) = \theta_0 + \theta_1 * \text{Sforzo} + \theta_2 * \text{Bimestre1} + \theta_3 * \text{Bimestre2} + \theta_4 * \text{Bimestre3} + \theta_5 * \text{Neve} + w_{h,x} * \theta_6 + (1 - w_{h,x}) * \theta_7$$

Per ciò che riguarda, invece, la stima della probabilità di *occupancy*, ovvero della distribuzione della specie, anche in questo caso lo stato di ogni cella (occupato / non occupato) è stato trattato come una variabile bernoulliana, determinata dal parametro  $\psi_x$ :

$$Z_x \sim \text{Bernoulli}(\psi_x)$$

Poiché, però, il campionamento dei segni di presenza è avvenuto in circa il 40% delle celle dell'area di studio, per il restante 60% delle celle non erano disponibili informazioni dirette e di campo per la stima della distribuzione della specie. Allo scopo di ottenere delle stime della variabile  $\psi$  per ognuna delle celle di campionamento, abbiamo quindi utilizzato un doppio approccio di estrapolazione dalle celle campionate verso celle non sottoposte a campionamento. Il primo approccio per realizzare la necessaria estrapolazione è stato quello di inserire una cosiddetta funzione di autocorrelazione spaziale. Essa consiste nello stimare la distribuzione della specie in una data cella, utilizzando le informazioni disponibili in tutte le celle ad essa adiacenti. Ciò consente di propagare le informazioni derivate dai dati raccolti sul campo, utilizzandole per stimare la distribuzione della specie anche in celle adiacenti, seppure non sottoposte a campionamento. Il secondo approccio di estrapolazione è stato invece quello di utilizzare delle covariate ambientali e la loro correlazione con la probabilità di *occupancy*. In particolare, abbiamo utilizzato come covariate l'altitudine media di ogni cella, la proporzione dell'area complessiva della cella coperta da boschi, la proporzione di area urbanizzata, la lunghezza complessiva delle strade primarie e secondarie, la proporzione di area agricola e di area agricola naturale, la densità umana, l'indice di complessità orografica (*ruggedness*) e il numero complessivo di specie preda selvatiche presenti nella cella, oltre ad un effetto random individuale, che inglobasse le residue differenze individuali nella probabilità di *occupancy* tra celle. Le variabili orografiche sono state derivate dal modello digitale di altitudine (EU-DEM v1.1, Copernicus Land Monitoring Service, EEA), utilizzando il software QGIS 3.10. (QGIS Development Team, 2021). Le variabili di uso del suolo sono state ottenute dal Corine Land Cover (2018, Copernicus Land Monitoring Service 2018, EEA), la stima del numero di prede selvatiche per cella è stata ottenuta da Linnell *et al.* (2019), mentre per i dati stradali sono state considerate le classi *motorway trunk, primary, secondary, tertiary, unclassified* della base dati di OpenStreetMap (OpenStreetMap contributors 2021). La variazione spaziale della probabilità di presenza della specie è stata quindi espressa come segue:

$$\text{Logit}(\psi_x) = \beta_0 + \beta_1 * \text{Foresta} + \beta_2 * \text{Altitudine} + \beta_3 * \text{Aree Urbane} + \beta_4 * \text{Strade} + \beta_5 * \text{Aree Agricole} + \beta_6 * \text{Aree Agricole Naturali} + \beta_7 * \text{Densità Antropica} + \beta_8 * \text{Ruggedness} + \beta_9 * \text{Prede Selvatiche} + \pi_x$$

Il termine  $\pi_x$  esprime proprio la funzione di autocorrelazione spaziale tra le celle adiacenti. Esso è costruito come un effetto random con media = 0 e varianza definita come  $\tau^2 * (D - \varphi W)$ , in cui  $\tau$  corrisponde alla deviazione standard,  $W$  è una matrice binaria di adiacenza, che definisce quali siano le celle adiacenti di ogni cella nell'area di studio,  $D$  è la matrice diagonale di  $W$ , mentre  $\varphi$  rappresenta l'intensità del processo di autocorrelazione. Attraverso l'introduzione di tale funzione,

la probabilità di *occupancy* di ogni cella è influenzata dal valore del parametro  $\psi$  nelle celle ad essa immediatamente adiacenti.

#### 2.4.2 Modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito e modello integrato

Per la stima delle dimensioni della popolazione abbiamo utilizzato in modo prioritario i dati derivati dal campionamento genetico non invasivo nelle 13 aree intensive, definite dalle linee guida per il campionamento e dalle integrazioni successive. I dati forniti da questo tipo di campionamento ci hanno consentito di identificare in modo univoco tutti i lupi campionati durante i 7 mesi di raccolta dati. Per ogni individuo, quindi, erano disponibili il numero di catture genetiche, le date di tali catture e le coordinate geografiche dei punti di raccolta degli escrementi. A partire da questi dati abbiamo costruito la matrice riassuntiva completa, da analizzare e da cui estrarre le stime dei parametri di interesse.

I dati del campionamento genetico non invasivo sono stati analizzati utilizzando un modello appartenente alla famiglia degli *Spatially-Explicit Capture-Recapture Models* (SECR, Efford 2004). Tali modelli consentono di utilizzare sia il numero di catture genetiche, sia la posizione nello spazio di tali catture, per stimare la probabilità di ogni individuo di essere campionato, estrarre informazioni sulle modalità di uso dello spazio, e infine stimare la densità di popolazione. I modelli SECR si basano sul rapporto probabilistico tra la distribuzione spaziale degli individui di una popolazione animale, rappresentata dalla distribuzione dei centri di attività individuali, e una rete di cosiddetti *detectors*, ovvero punti di potenziale campionamento degli individui. L'assunto principale del modello SECR, illustrato in Fig. 5, è che esista per ogni individuo una probabilità di cattura massima, che si verifica quando uno dei punti di campionamento (*detectors*) coincide con il centro di attività dell'individuo stesso. Tale valore viene indicato come  $P_0$  (Fig. 5). Man mano che i punti di campionamento si allontanano dal centro di attività dell'individuo, tale valore massimo diminuisce, solitamente secondo una funzione semi-normale, fino a raggiungere lo zero quando la distanza tende ad infinito (Fig. 5). La distanza alla quale il valore di probabilità di cattura è uguale a  $P_0/2$  viene definito dal parametro  $\sigma$ , il quale a sua volta è influenzato dalle dimensioni dell'home range individuale e, più genericamente, dalle modalità di uso dello spazio della specie oggetto di studio. L'analisi del modello SECR passa quindi per il tentativo di stimare i due parametri che controllano la probabilità di cattura, ovvero  $P_0$  e  $\sigma$ , i quali a loro volta consentono di produrre una stima del numero di centri di attività presenti nell'area di studio, ovvero una stima della densità (e abbondanza) di popolazione.

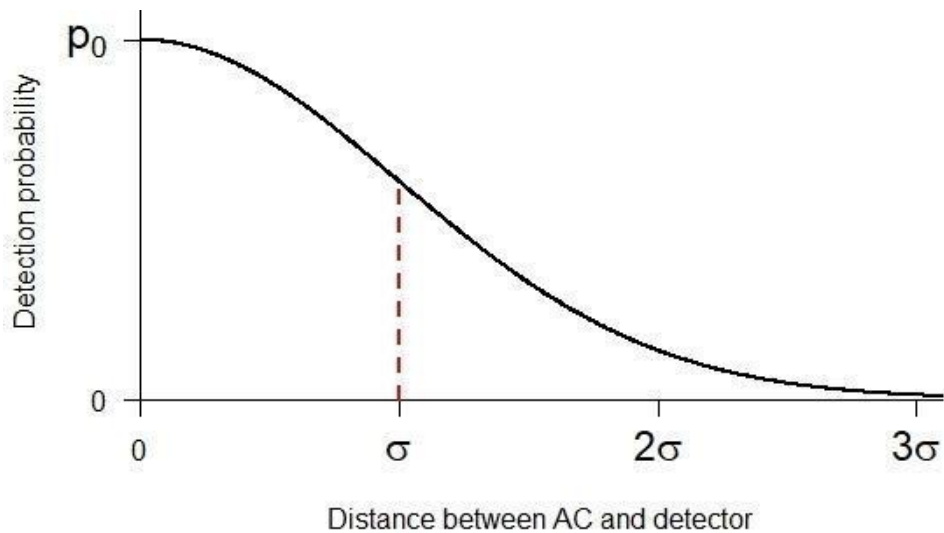


Fig. 5 – Grafico descrittivo della variazione nella probabilità di cattura individuale, in funzione della distanza tra il centro di attività di un individuo e la localizzazione dei punti di campionamento (detectors), utilizzata nell'analisi dei modelli SECR. La curva si riferisce ad una distribuzione semi-normale della probabilità di cattura.

Nel caso specifico del lupo, per costruire ed analizzare il modello abbiamo posto un teorico *detector* al centro di ogni cella di campionamento. Successivamente, abbiamo suddiviso ogni cella di campionamento in 100 sub-celle di 1x1 km, e posto al centro di ognuna delle sub-celle un cosiddetto *sub-detector*. Ciò ha generato una struttura gerarchica nei dati, poiché ognuno dei *detectors* nell'area di studio comprendeva al suo interno 100 *sub-detectors*. Successivamente, abbiamo sovrapposto alla griglia di celle, *detectors* e *sub-detectors* il tracciato di tutti i transesti utilizzati durante il campionamento e la localizzazione di tutti i campioni genetici raccolti ed analizzati (Fig. 6). Ogni campione genetico è poi stato attribuito al più vicino *sub-detector* e al corrispondente *detector* all'interno della cella di riferimento. Per il modello SECR abbiamo unito i dati dell'intero periodo di campionamento in un'unica sessione, poiché la variazione temporale della probabilità di cattura è stata incorporata all'interno della variazione spaziale. In altri termini, tutte le catture genetiche di uno stesso individuo sono state raggruppate in un'unica sessione di campionamento (a differenza di quanto fatto per il modello di occupancy), mentre ogni cattura genetica è stata attribuita al più vicino sub-detector. Il numero di sub-detectors ai quali ogni lupo è stato campionato (e non più il numero di sessioni) è diventato quindi il metro di misura delle differenze individuali nella probabilità di cattura genetica. L'esclusione della componente temporale dal modello ha consentito, quindi, di aumentare la velocità di calcolo senza ridurre le prestazioni di stima.

Detectors 10x10 km – Sub-detectors 1x1 km

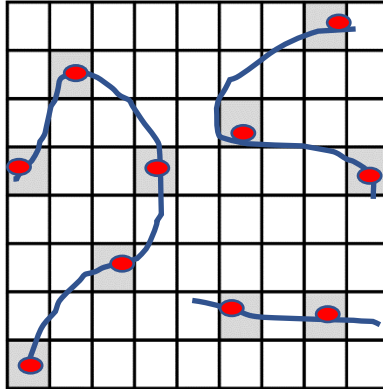


Fig. 6 – Suddivisione di una cella di campionamento (10x10km di lato) in 100 sub-detectors di 1x1 km di lato, e attribuzione di tutti i campioni genetici raccolti al più vicino sub-detector.

Per la stima della probabilità di cattura individuale massima  $P_0$  e della distanza di attenuazione  $\sigma$ , abbiamo considerato la matrice di dati  $Y_{i,x,genetica}$  come risultante da una distribuzione binomiale:

$$Y_{i,x,genetica} \sim \text{Binomiale}(100, p_{i,x})$$

in cui il numero di catture genetiche dell'individuo  $i$  al *detector*  $x$  è controllato dal parametro  $p_{i,x}$  fino ad un massimo di 100 catture potenziali, corrispondenti ai 100 *sub-detectors* di ogni *detector*.

A sua volta, il valore di  $p_{i,x}$  è stato posto funzione della seguente relazione:

$$p_{i,x} = P_{0,i,x} * \exp\left(-\frac{d_{i,x}^2}{2\sigma^2}\right)$$

che rappresenta la codifica matematica della funzione semi-normale illustrata in Fig. 5, poiché  $P_0$  è il valore di probabilità di cattura massima,  $d$  è la distanza euclidea tra il centro di attività dell'individuo  $i$  e il *detector*  $x$ , mentre  $\sigma$  è la distanza di dimezzamento di  $P_0$  illustrata sopra.

Per analizzare le variazioni individuali e spaziali della probabilità di cattura massima  $P_0$ , per ogni individuo  $i$  e ogni cella  $k$ , abbiamo utilizzato come covariate lo sforzo di campionamento (definito come al paragrafo 2.4.1), la copertura nevosa, il sesso dell'individuo campionato, un effetto random specifico per ognuna delle 13 aree intensive e una coppia di coefficienti di regressione alternativi, simili al metodo dei *finite-mixtures* utilizzato per il modello di *occupancy*, adatti a verificare se esistesse una differenza residua tra lupi ad alta e lupi a bassa probabilità di cattura:

$$\text{Logit}(P_{0,i,k}) = \alpha_{0[\text{area}]} + \alpha_1 * \text{Sforzo} + \alpha_2 * \text{Sesso} + \alpha_3 * \text{Neve} + q_{h,i} * \alpha_4 + (1 - q_{h,i}) * \alpha_5$$



Per la stima del parametro  $\sigma$ , abbiamo invece testato una relazione di densità-dipendenza inversa, in base all'ipotesi che una maggiore densità di lupi producesse una riduzione delle dimensioni dell'home range. Inoltre, abbiamo inserito un effetto random individuale con una struttura di autocorrelazione spaziale (in modo analogo a quanto illustrato per il modello di *occupancy*) per tenere conto di tale autocorrelazione nei pattern di uso dello spazio:

$$\text{Log}(\sigma_x) = \gamma_0 + \gamma_1 * N_x + \lambda_x$$

In cui  $N_x$  rappresenta il numero di centri di attività individuali che ricadono all'interno della cella di campionamento  $x$ , ed è quindi una misura della densità di lupi in ogni cella, mentre  $\lambda_x$  è proprio il fattore di autocorrelazione spaziale.

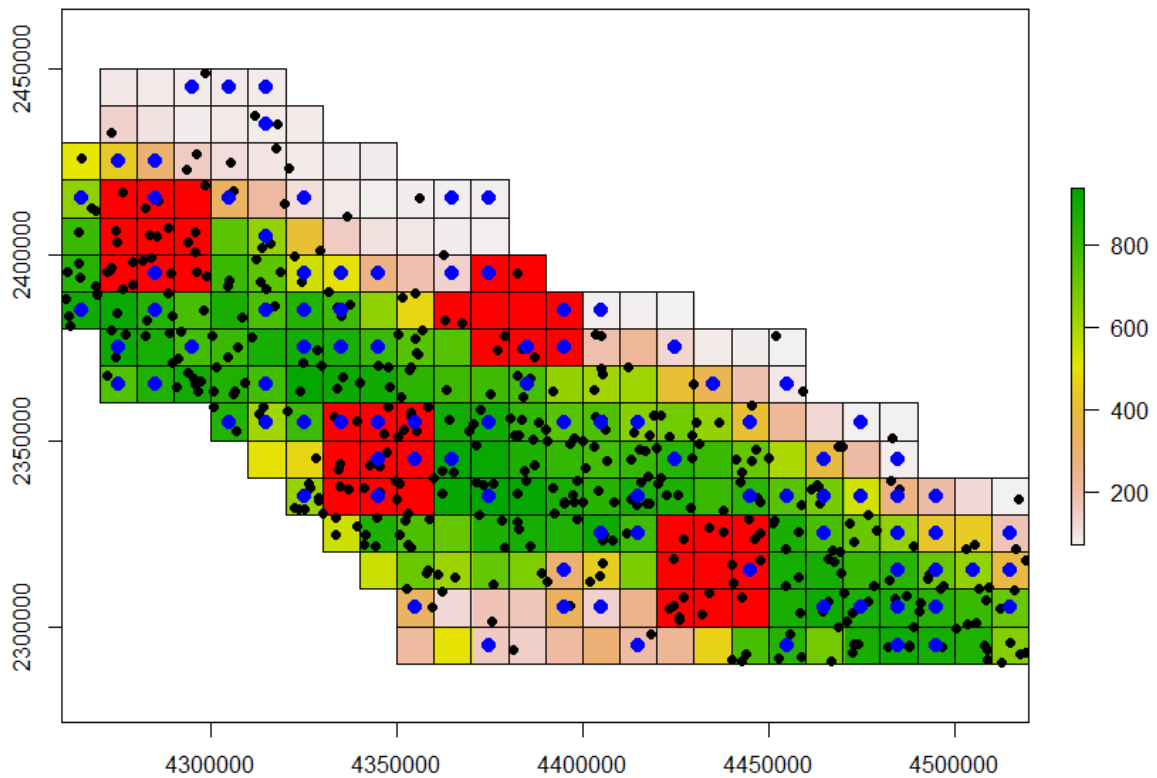
Infine, per la stima della densità e delle dimensioni di popolazione, abbiamo dovuto superare gli stessi limiti potenziali, legati alla presenza di aree con diversi regimi di campionamento e di aree non soggette a campionamento. Ciò ha richiesto quindi un processo di forte estrapolazione spaziale. Anche in questo caso, analogamente a quanto fatto per la stima di distribuzione, abbiamo estrapolato le stime di densità utilizzando una funzione di autocorrelazione spaziale, ma soprattutto integrando le informazioni provenienti dal modello SECR con quelle derivate dal modello di *occupancy*. A tale scopo, abbiamo definito la densità di lupi all'interno di ogni cella in funzione delle stesse covariate utilizzate per la probabilità di *occupancy*, aggiungendo anche in questo caso una funzione di autocorrelazione spaziale, ma incorporando l'intera espressione all'interno di un fattore moltiplicativo che imponesse all'abbondanza locale di essere maggiore di zero nel caso in cui la probabilità di *occupancy* fosse maggiore di zero, e viceversa. È necessario sottolineare, tuttavia, che questo tipo di estrapolazione, nel contesto del presente sforzo di stima, può essere considerato valido e robusto unicamente nel produrre una stima complessiva di abbondanza per l'intera area di studio, ma non per produrre stime di densità spazialmente esplicite, soprattutto per le aree non sottoposte a campionamento genetico non invasivo.

Il modello integrato così costruito è stato poi analizzato in un contesto bayesiano utilizzando il software R 4.1.2 (R Core Team 2019) e il pacchetto NIMBLE (NIMBLE Development Team 2020), riassumendo i risultati di due Markov chains da 20.000 iterazioni l'una, con un *burn-in* iniziale di 10.000 iterazioni. Le stime dei parametri sono state valutate utilizzando l'indice *R-hat*.

### 2.4.3 Simulazioni per la valutazione del design analitico

Dopo aver prodotto le stime di distribuzione ed abbondanza per la popolazione di lupi in area appenninica, abbiamo costruito un design di simulazione, che consentisse di valutare se e in quale misura le stime ottenute avessero una buona probabilità di avvicinarsi ai valori reali dei parametri oggetto di studio. A tale scopo è stata costruita un'area simulata di 24.000 km<sup>2</sup>, corrispondente all'incirca al 15% della superficie dell'area di studio reale. Tale riduzione dell'area simulata rispetto all'area reale è dovuta ai lunghi tempi di esecuzione dei modelli SECR, che altrimenti non avrebbero consentito la realizzazione delle simulazioni per un appropriato numero di iterazioni. L'area simulata è stata suddivisa in 240 celle di 10x10 km, e a tale griglia è stato sovrapposto un *raster* di idoneità simulato, con un alto livello di autocorrelazione spaziale (Fig. 7). Successivamente, in tale ambiente

simulato è stata generata una popolazione di lupi con una densità media di 1,6 lupi / 100 km<sup>2</sup> e una variazione locale di densità che fosse funzione del valore di idoneità ambientale di ogni cella nell'area di studio. Ciò ha prodotto una popolazione complessiva di circa 400 lupi, con una distribuzione disomogenea e spazialmente autocorrelata dei centri di attività, e con valori di densità locale compresi tra 0 e circa 11 lupi / 100 km<sup>2</sup> (Fig. 7).



*Fig. 7 – Rappresentazione spaziale del design di simulazione utilizzato per valutare le performance del design analitico integrato nella stima della distribuzione e abbondanza del lupo in area appenninica. L'area simulata è suddivisa in celle di 10x10km. Il colore delle celle rappresenta il grado di idoneità ambientale simulata per il lupo (verde più idoneo, giallo e arancione meno idoneo). I punti indicati in nero rappresentano i centri di attività simulati dei lupi, le celle indicate in rosso sono quelle in cui è stato simulato in campionamento genetico intensivo, mentre i punti indicati in blu identificano le celle in cui è stato simulato il campionamento estensivo dei soli segni di presenza.*

Dopo aver generato la popolazione simulata di lupi, sono state selezionate casualmente 4 aree intensive di 900 km<sup>2</sup> ciascuna, che costituiscono circa il 14% della superficie totale, in modo analogo a quanto avvenuto durante l'effettivo campionamento della popolazione. All'interno di queste aree è stato poi simulato un campionamento genetico non invasivo, in cui la probabilità di cattura per ogni cella fosse funzione di un valore simulato di sforzo di campionamento (generato in modo

casuale all'interno di ogni cella), mentre la popolazione di lupi è stata suddivisa in due gruppi, uno ad alta ed uno a bassa probabilità di cattura. Tutti i parametri utilizzati per simulare il campionamento sono stati definiti in base ai valori prodotti dal modello integrato sui dati reali, in modo da ottenere condizioni di campionamento il più possibile simili a quelle dell'effettivo campionamento della popolazione.

In aggiunta, abbiamo selezionato casualmente un ulteriore 28% delle celle, all'interno delle quali è stato simulato un campionamento di soli segni di presenza della specie, senza identificazione individuale. Tali celle corrispondevano anche come estensione relativa, a quelle incluse nel campionamento estensivo della popolazione di lupi. Anche in questo caso, la probabilità di *detection* è stata posta funzione di uno sforzo simulato e di un valore di eterogeneità individuale tra celle.

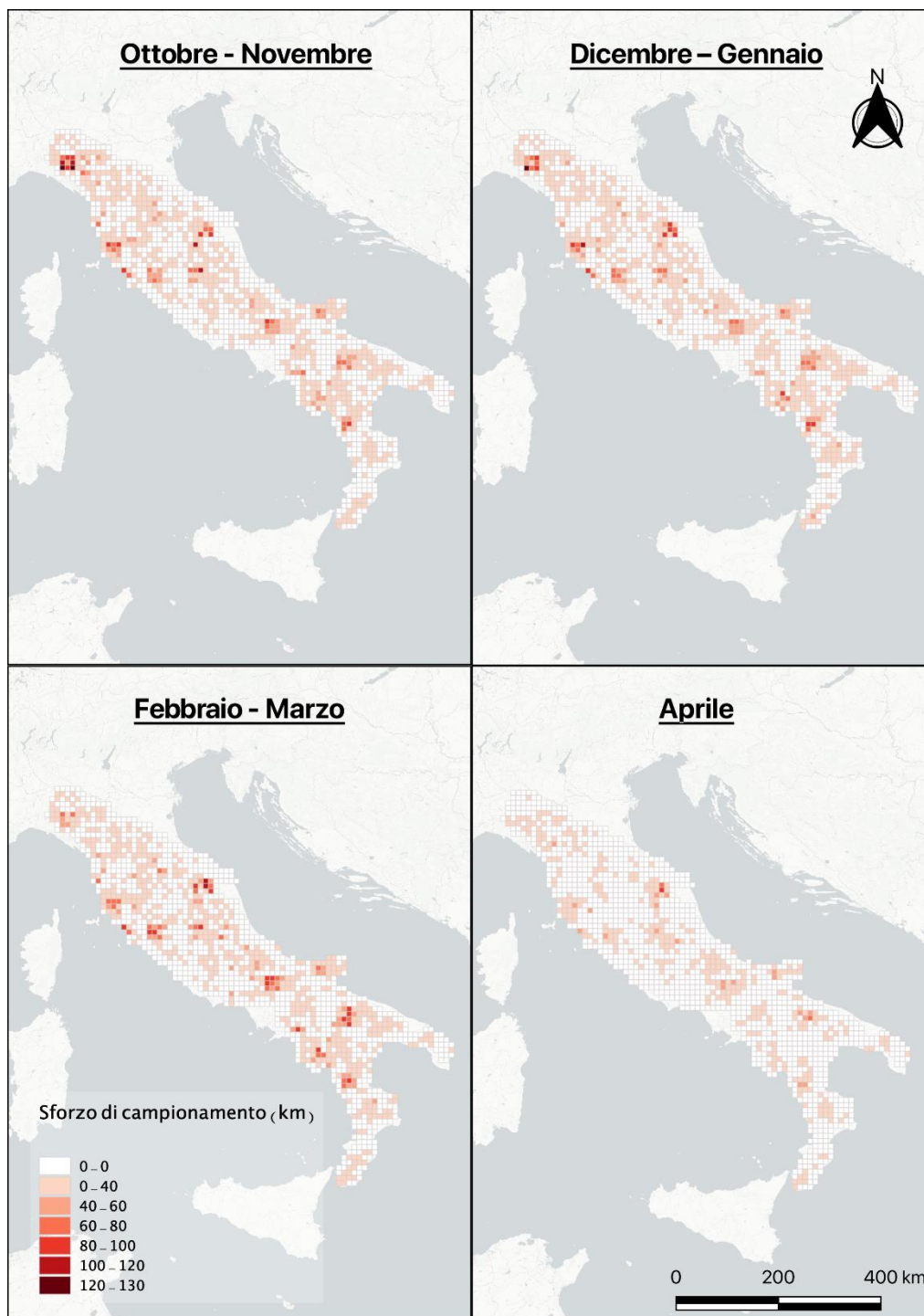
I due tipi di campionamento simulati (genetico e di segni di presenza) hanno prodotto delle matrici di dati del tutto simili a quelle utilizzate per l'analisi dei dati reali. A questo punto, i dati simulati sono stati analizzati con quattro diversi tipi di modelli. Innanzitutto sono stati analizzati i dati con il modello integrato applicato nel caso reale, in modo da valutare le performance, in termini di bias e precisione, di tale approccio analitico nella stima dei parametri di interesse. Successivamente, sono stati analizzati gli stessi dataset simulati con tre modelli progressivamente più semplici: nel primo caso è stata eliminata l'integrazione tra il modello SECR e quello di *occupancy*, ed sono state quindi prodotte delle stime di distribuzione e densità usando unicamente i dataset separati; nel secondo caso sono state anche eliminate tutte le funzioni di autocorrelazione spaziale presenti nei due modelli; nel terzo caso sono state eliminate anche tutte le covariate che descrivevano le variazioni nello sforzo di campionamento tra le varie celle. In questo modo è stato possibile anche valutare in che modo ognuno di questi accorgimenti analitici abbia contribuito a migliorare le performance del modello, e quale sarebbe stato l'errore associato alle stime se non si fosse fatto uso di questi strumenti di analisi.

Le simulazioni sono state condotte su un totale di 100 iterazioni, e le performance di ogni modello sono state valutate sia per l'*occupancy* che per l'abbondanza in termini di *bias* relativo, di precisione espressa come coefficiente di variazione e di copertura degli intervalli di credibilità.

### **3 LA POPOLAZIONE DI LUPO NELLE REGIONI DELL'ITALIA PENINSULARE NEL 2020/2021**

#### **3.1 Lo sforzo di campionamento e i dati raccolti**

In totale, nelle regioni peninsulari sono stati individuati 2.551 percorsi (di seguito denominati *transetti* pur non rispettando la rigorosa definizione statistica di tali elementi), corrispondenti ad uno sviluppo lineare complessivo di circa 12.108 km. Di questi, 2.282 transetti sono stati percorsi almeno una volta nell'ambito delle quattro sessioni di campionamento (da Ottobre 2020 ad Aprile 2021). Alcuni dei transetti individuati sono stati scartati opportunisticamente in corso d'opera per ragioni legate alla loro difficile percorribilità e nell'intento di concentrare lo sforzo su transetti ritenuti più promettenti. Complessivamente, lo sforzo di campionamento lungo i transetti è stato di 44.232 km, corrispondente ad una media di 6.319 km percorsi ogni mese ( $\pm 1.612$  SD; intervallo 4.315-8.797). La distribuzione dello sforzo di campionamento lungo i transetti per ciascuna cella della griglia, e durante ciascuna sessione di campionamento, è rappresentata in Fig. 8.



*Fig. 8 – Distribuzione dello sforzo di campionamento allocato tramite la percorrenza di transetti sistematici, in ciascuna sessione di campionamento.*

Per l'attività di fototrappolaggio sistematico sono state impiegate in tutto 598 fototrappole. Di queste, 37 sono state rubate nel corso del monitoraggio. Dove possibile, per le fototrappole rubate sono stati comunque considerati gli avvistamenti acquisiti durante il periodo di attività della fototrappola, dalla data di prima attivazione del dispositivo fino alla data dell'ultimo controllo. Ogni mese sono state utilizzate in media 247 fototrappole (intervallo 147-320), che sono rimaste attive

mediamente 21,5 giorni al mese ( $\pm 0,9$  SD; range 19,7-23,9; Tab. 9). La distribuzione dello sforzo di campionamento tramite fototrappole, dato dalla somma dei giorni in cui ciascuna fototrappola è rimasta attiva in ogni cella, è rappresentata in Fig. 9.

Mese	N. fototrappole	N. giorni attivazione	N. medio giorni/fototrappola
ottobre	162	3.191	19,7
novembre	254	5.221	20,6
dicembre	285	6.326	22,2
gennaio	320	7.062	22,1
febbraio	306	6.098	19,9
marzo	255	6.083	23,9
aprile	147	3.128	21,3

*Tab. 9 – Distribuzione temporale dello sforzo di campionamento relativo all'uso di fototrappole durante il periodo ottobre 2020 – aprile 2021.*

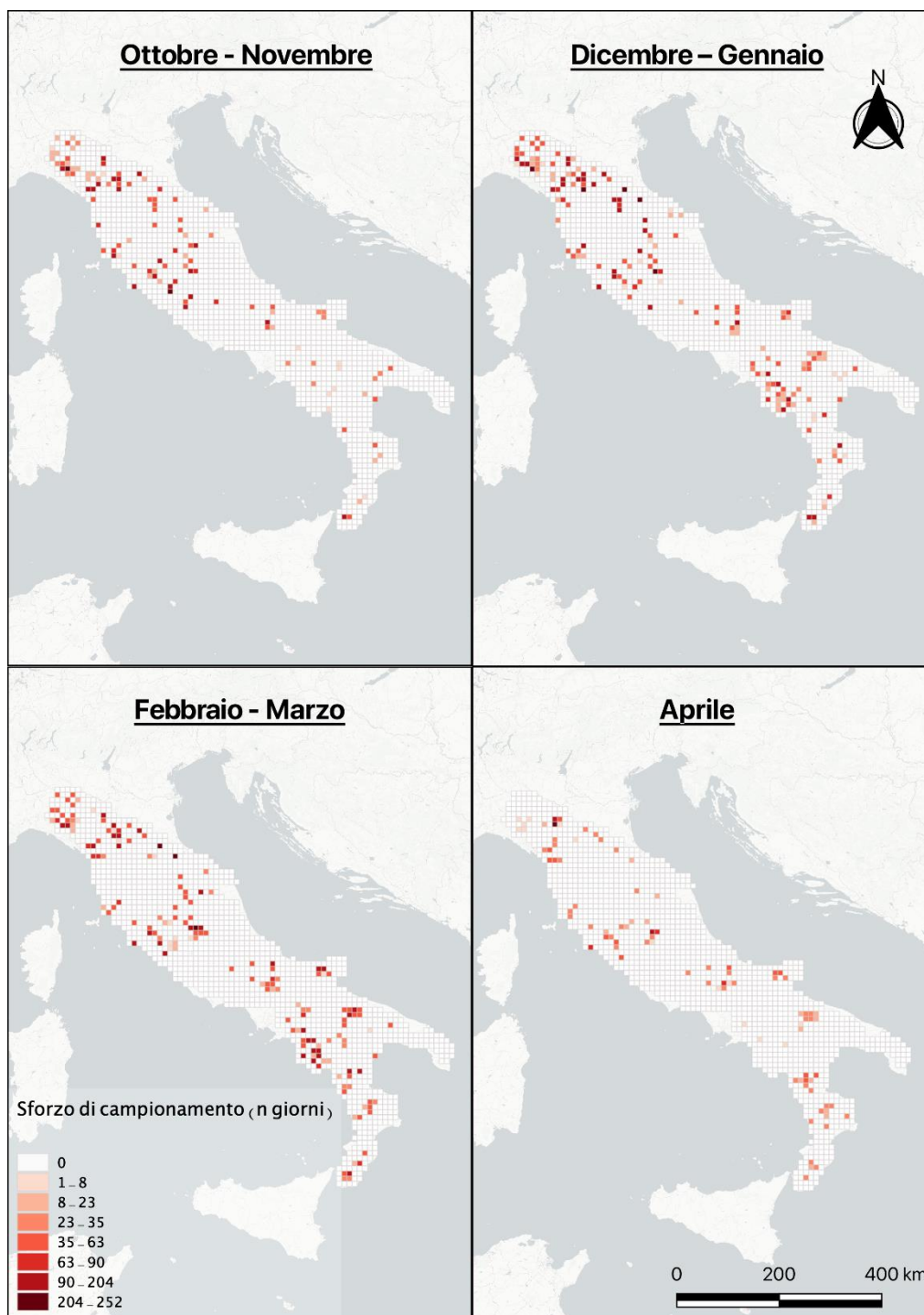


Fig. 9. – Distribuzione dello sforzo di campionamento tramite fototrappole in ciascuna sessione di campionamento.

In totale, durante l'intero periodo di monitoraggio nell'area peninsulare sono stati raccolti 15.993 segni della presenza del lupo, rappresentati principalmente da escrementi (n=11.071), avvistamenti fotografici (n=4.285), tracce (n=408), carcasse di ungulati attribuibili ad eventi di predazione e/o consumo da parte del lupo (n=97), lupi morti (n=97), ululati (n=11), campioni di pelo (n=9), campioni di urina con sangue (n=8), campioni di saliva e altri tipi di segno (n=7). La ripartizione dei suddetti

segni di presenza nelle categorie attendibilità definite secondo il criterio SCALP (Marucco *et al.* 2014), è illustrata nella Tab. 10.

Tipo di dato	C1	C2	C3	Totale
Escremento	886	10.185	-	11.071
Avvistamento Fotografico	4.165	-	120	4.285
Traccia Di Lupo	31	322	55	408
Carcassa Ungulato	-	2	95	97
Lupo Morto	97	-	-	97
Ululato	-	9	2	11
Campione Pelo	-	-	9	9
Campione Saliva	1	-	1	2
Campione Urina Con Sangue	1	-	7	8
Altro	-	-	5	5
<b>Totale</b>	<b>5.181</b>	<b>10.518</b>	<b>294</b>	<b>15.993</b>

*Tab. 10 – Conta dei segni di presenza di lupo raccolti per ciascuna tipologia e categoria di attendibilità definito in base al criterio SCALP.*

### **3.2 I risultati delle analisi genetiche sui campioni biologici analizzati**

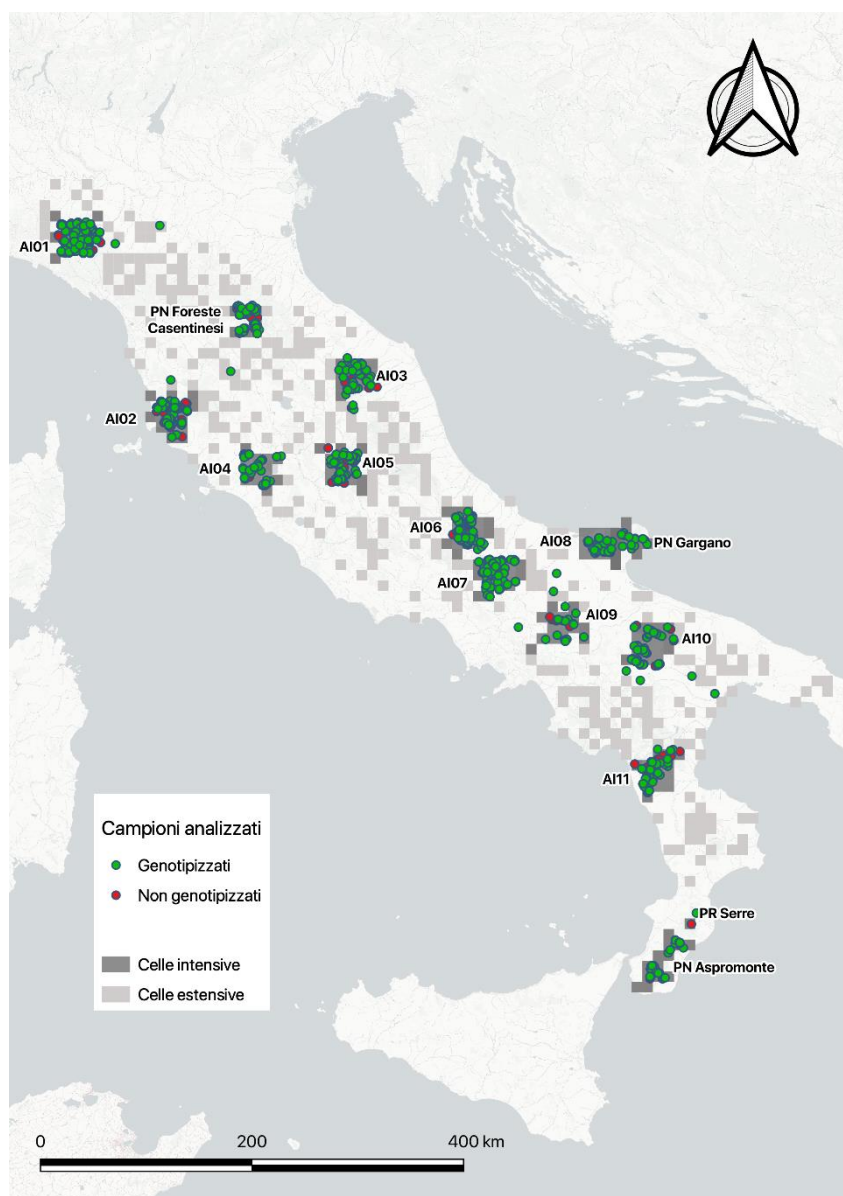
Durante il periodo del monitoraggio sono stati raccolti e indicati come potenzialmente idonei all'analisi genetica 2.801 campioni biologici, rinvenuti principalmente in celle intensive o estensive (incluse 86 celle estensive successivamente trattate come intensive), e in minor parte al di fuori delle celle campionate (Tab. 11).



Tipo di cella	N. totale campioni raccolti	N. campioni fecali raccolti	N. campioni analizzati
Intensive	1.350	1319	1.304
Estensive	1.268	1254	265
Celle non sottoposte a campionamento	183	146	63
Totale	2801	2719	1632

Tab. 11. *Conteggio dei campioni biologici raccolti suddivisi in a) campioni totali considerati idonei alle analisi genetiche, b) campioni fecali raccolti e c) campioni fecali effettivamente analizzati dal laboratorio di genetica di ISPRA.*

I campioni biologici raccolti sono rappresentati principalmente da campioni fecali (n=2.719), di cui 1.319 rinvenuti in celle interessate da campionamento intensivo, 1.254 in celle estensive e 146 al di fuori delle celle di campionamento. Dei campioni fecali raccolti, 1.592 sono stati analizzati dal laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione per la determinazione del genotipo individuale. Sono stati inoltre raccolti ed analizzati 3 campioni di pelo, 3 campioni di urina con sangue, un campione di saliva, un campione non-invasivo di sangue, 30 campioni muscolari prelevati da carcasse di lupo e 2 campioni ematici provenienti da altrettante catture. La distribuzione dei campioni biologici raccolti è mostrata nella Fig. 10.



*Fig. 10. – Distribuzione dei campioni biologici analizzati dal laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione di ISPRA*

Il DNA contenuto nei campioni di tipo non-invasivo può risultare degradato e frammentato a causa degli stress fisico-ambientali a cui è sottoposto il campione stesso. Inoltre, i campioni di tipo non-invasivo contengono DNA presente solo nelle cellule di sfaldamento dell'epitelio intestinale. Ciò porta sia ad un aumento del rischio di insuccesso di genotipizzazione che ad un incremento degli errori ad esso associati. Per cui non è possibile ottenere un dato affidabile da tutti i campioni raccolti ed analizzati, e in alcuni casi potrebbe essere possibile ottenere informazioni affidabili solo relativamente alla specie (cane o lupo) e non al profilo genetico individuale completo (che consente una diagnosi più precisa a livello tassonomico).

In questo progetto è stata riscontrata una resa complessiva di genotipizzazione superiore a quella riportata in bibliografia ed osservata in analoghi progetti di tipizzazione genetica di campioni non-invasivi condotti da ISPRA. Infatti, dei 1600 campioni non-invasivi analizzati (che includono escrementi campioni fecali, peli e tracce di saliva, sangue o urina), 1022 (63,9%) hanno restituito un genotipo *multilocus* affidabile per l'assegnazione alla popolazione di riferimento ( $R > 95\%$ ) mentre per 971 campioni (60,7%) è stato possibile anche ricostruire il profilo genetico individuale. Diversamente dai campioni di origine non-invasiva, il DNA estratto da tessuti provenienti da biopsie o da prelievi di sangue risulta di ottima qualità sia per le caratteristiche stesse del campione biologico sia per il fatto di non essere sottoposto ad agenti ambientali né a contaminanti, in quanto in genere prelevato immediatamente. Infatti, dei 32 campioni biologici invasivi raccolti ed analizzati tutti hanno restituito un genotipo completo ed affidabile. Pertanto, il totale di campioni genotipizzati con successo ammonta a 1054 i quali sono stati ricondotti, in base alle analisi di *match* e ricampionamento, a 622 genotipi unici individuali.

In seguito alle analisi di assegnazione Bayesiana per la determinazione della specie di appartenenza e l'individuazione di eventuali segni di ibridazione con il cane domestico, dei 1054 genotipi affidabili, 671 sono stati attribuiti alla popolazione italiana di lupo (*Canis lupus italicus*) e sono risultati corrispondere a 373 individui, pari al 60% dei genotipi individuali identificati (180 femmine, 168 maschi e 25 individui per i quali non è stato determinato il sesso di appartenenza). Altri 133 campioni, corrispondenti a 109 individui (27 femmine, 75 maschi e 7 di incerta attribuzione al sesso) e cioè al 17,5% dei genotipi unici, sono invece stati assegnati al gruppo del cane domestico (*Canis lupus familiaris*). Altri 96 campioni, corrispondenti a 60 individui, di cui 26 femmine, 29 maschi e 5 incerti al sesso, ovvero il 9,6% dei genotipi unici individuali, sono poi stati identificati come ibridi recenti. Infine in 154 campioni corrispondenti a 80 individui (25 femmine, 49 maschi e 6 senza attribuzione del sesso) e al 12,9% dei genotipi unici, sono state rilevate tracce di introgressione canina ad uno o più dei marcatori molecolari analizzati (Tabella 12). In particolare, in 54 degli 80 individui risultati introgressi (71,3% degli introgressi) è stata rilevata una introgressione ai soli *loci* autosomici nucleari (valori di assegnazione  $q$  compresi tra 0.990 e 0.975), che segnalano un probabile evento di ibridazione più antico di 3 generazioni nel passato. In 16 (20%) campioni è stata invece rilevata una introgressione ai soli *loci* localizzati sul cromosoma Y, indicando tracce di genoma domestico sulla linea paterna derivanti da un evento di ibridazione con un cane maschio che può essere avvenuto anche diverse generazioni nel passato. Inoltre, 6 individui (7,5%) presentavano la delezione al *K-locus*, di antica origine canina, che determina la colorazione melanica del mantello. Infine, in 4 individui (5%) introgressi è stata rilevata la presenza contemporanea di due o più anomalie genetiche ai marcatori molecolari analizzati (Tabella 14).

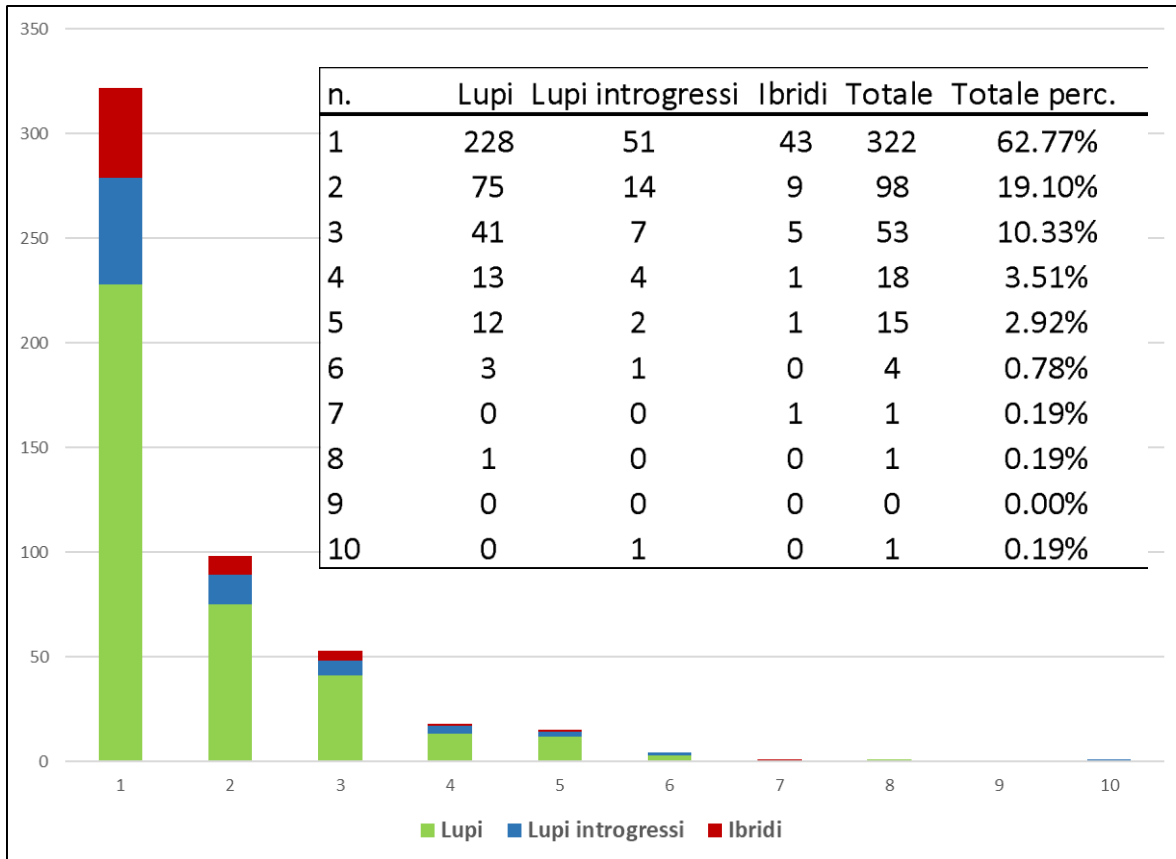
In Tabella 13 è riportato il numero dei campioni non-invasivi analizzati e genotipizzati ripartiti per area intensiva di raccolta.

Confrontando fra loro i genotipi *multilocus* ottenuti dai campioni è possibile identificare gli individui campionati più di una volta (ricattura) durante il periodo di durata del progetto, ottenendo i tassi di ricattura globali o per area. Dalla figura 11 è possibile evincere come la maggior parte degli individui (escludendo da questo conteggio i cani che non rappresentano una popolazione selvatica) siano

stati campionati una volta soltanto (62,77%) mentre i genotipi ricampionati da 2 a 3 volte ammontano rispettivamente al 19,10% e 10,33% del totale. Le proporzioni di individui campionati 4 o 5 volte risultano inferiori al 5% e solo pochissimi individui hanno avuto un tasso di ricampionamento superiore.

Tipo di campione	Esito Analisi				
	Lupo	Ibrido	Lupo introgresso	Cane	Non rilevabile
	(Nc/Ni)	(Nc/Ni)	(Nc/Ni)	(Nc/Ni)	
Escremento	644/347	94/58	148/74	133/109	573
Carcassa	23/23	2/2	5/5	-	-
Prelievo Sangue	2/2	-	-	-	-
Campione Pelo	-	-	-	-	3
Campione Urina Con Sangue	1/-	-	-	-	2
Campione Saliva	1/1	-	-	-	-
Campione di sangue	-	-	1	-	-
<b>Totale</b>	<b>671/373</b>	<b>96/60</b>	<b>154/80</b>	<b>133/109</b>	<b>578</b>

*Tabella 12 – Risultati delle analisi genetiche effettuate sulle diverse tipologie di campioni biologici raccolti differenziando gli esiti sia per tipologia di campione che in base all’assegnazione Bayesiana alla popolazione di appartenenza (lupo, lupo introgresso, ibrido o cane). Nc = numero di campioni genotipizzati. Ni = numero di individui identificati.*



*Figura 11 – Istogramma rappresentante i tassi di ricampionamento globali riscontrati per i genotipi unici identificati. Sull’asse delle x è riportato il numero di campionamenti per ciascun genotipo identificato durante il progetto, sull’asse delle y è riportato il numero di genotipi individuali. Le diverse categorie di assegnazione “lupo”, “ibrido lupo-cane”, “lupo con introgressione” sono rappresentate con colori diversi. Nella tabella sono riportati i dettagli numerici e le proporzioni percentuali.*

Aree campionate per analisi genetiche	Esito Analisi				
	Lupo	Ibrido	Lupo introgresso	Cane	Non rilevabile
	(Nc/Ni)	(Nc/Ni)	(Nc/Ni)	(Nc/Ni)	(Nc)
AI01	101/53	20/18	25/17	12/9	108
AI02	42/23	6/3	29/13	1/1	92
AI03	77/44	1/-	8/2	8/7	67
AI04	18/8	19/7	9/3	7/7	37
AI05	51/28	7/3	10/6	1/1	40
AI06	94/48	4/2	17/9	9/7	50
AI07	54/31	20/12	15/6	21/14	28
AI08	13/6	5/3	4/3	35/28	10
AI09	3/3	-/-	2/2	9/8	8
AI10	52/29	3/3	19/7	14/12	30
AI11	60/29	-/-	5/2	9/8	56
PN Gargano	9/7	1/1	3/2	4/4	5
PN Aspromonte	33/13	7/5	1/1	3/3	29
PN Foreste Casentinesi	38/26	1/1	2/2	-/-	17
PR Serre	1/-	-/-	-/-	-/-	1
Totale	646/348	94/58	149/75	133/109	578

Tabella 13 – Risultati delle analisi genetiche effettuate sui campioni biologici non-invasivi raccolti differenziando gli esiti per area di raccolta ed in base all'assegnazione Bayesiana alla popolazione di appartenenza (lupo, lupo introgresso, ibrido o cane). Nc = numero di campioni genotipizzati. Ni = numero di individui identificati.

Tipo di campione	Esito Analisi				
	W_n	W_y	W_kb	W_n_y	W_n_kb
Campioni fecali	50	16	4	3	1
Carcasse	3		2		
Campione Urina Con Sangue	1				
Totale	54	16	6	3	1

Tabella 14 – Dettaglio relativo agli individui risultati introgressi ad uno o più marcatori. W\_n = individui introgressi ai loci autosomici nucleari; W\_y = individui introgressi ai loci del cromosoma Y; W\_kb = individui introgressi al K-locus (delezione che determina melanismo); W\_n\_y = individui introgressi ai loci autosomici nucleari e ai loci del cromosoma Y; W\_n\_kb = individui introgressi ai loci autosomici nucleari e al K-locus.

### 3.3 La distribuzione della popolazione di lupo nelle regioni dell'Italia peninsulare

I risultati del modello di stima della distribuzione della specie (*occupancy*), all'interno del modello integrato, hanno messo in evidenza come la probabilità di rilevare segni di presenza di lupo sia stata

fortemente influenzata dall'entità dello sforzo prodotto all'interno di ogni cella di campionamento. Ciò è risultato vero sia per i segni individuati lungo i transetti ( $\beta = 2,71$ , 95% CIs = 2,49 – 2,93) sia per quelli ottenuti tramite l'uso di fototrappole ( $\beta = 1,81$ , 95% CIs = 1,62 – 1,99). Le aree con una maggiore copertura nevosa durante il periodo di campionamento hanno evidenziato una *detection probability* solo marginalmente più alta di quelle con minore presenza di neve ( $\beta = 0,09$ , 95% CIs = -0,03 – 0,22). Inoltre, la probabilità di generare false presenze a causa di escrementi di cane erroneamente identificati come di lupo è risultata in media relativamente bassa, pari a 0,048 (95% CIs = 0,002 – 0,084), ma con notevoli differenze tra le varie parti dell'area campionata.

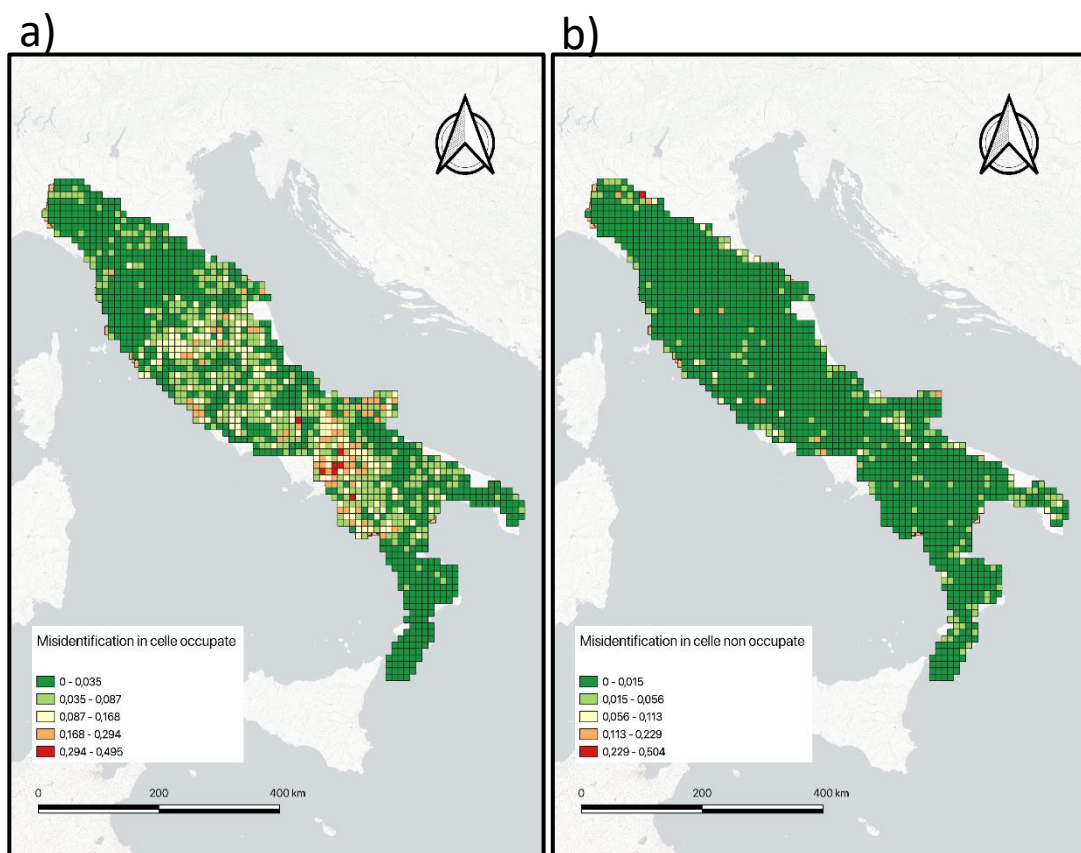


Fig. 12 – Distribuzione spaziale della probabilità di erronea classificazione della presenza del lupo in celle occupate dalla specie (a) e in celle non occupate dalla specie (b).

In particolare, è risultata relativamente elevata la probabilità di erronea attribuzione di escrementi di cane nelle celle comunque occupate dal lupo (Fig. 12a), soprattutto nelle regioni dell'Appennino centro-meridionale. Tale probabilità di erronea attribuzione era controllata dal parametro  $M$  all'interno della matrice di identificazione del modello di *occupancy* (vedi Paragrafo 2.4.1). Essa non rappresenta la probabilità di introduzione di false presenze nel dataset, ma semplicemente il caso in cui la presenza effettiva del lupo sia erroneamente attribuita attraverso un escremento di cane, piuttosto che attraverso un escremento di lupo. Il risultato di tale tipo di errore è un aumento artificioso della probabilità di *detection*, ma senza che eventuali celle non occupate siano

erroneamente identificate come frequentate dal lupo. L'effettiva probabilità di introduzione di false presenze, controllata dal parametro  $P_1$  nella matrice descritta al Paragrafo 2.4.1, è risultata invece molto bassa praticamente sull'intero territorio nazionale (Fig. 12b). È da notare, tuttavia, che la potenza statistica del modello nella stima di questo parametro era probabilmente più bassa che nel caso precedente, poiché la maggior parte delle celle sottoposte a campionamento genetico non invasivo erano appartenenti al gruppo di quelle effettivamente occupate dal lupo.

Per quanto riguarda invece la probabilità di presenza della specie (*occupancy*), essa è risultata influenzata in modo significativo dall'altitudine media di ogni cella dell'area di studio ( $\beta = 1,14$ , 95% CIs = 0,51 – 1,79), dall'estensione della copertura forestale ( $\beta = 0,71$ , 95% CIs = 0,06 – 1,40), dal numero di prede selvatiche disponibili ( $\beta = 0,93$ , 95% CIs = 0,37 – 1,53), e in modo marginale dalla densità antropica ( $\beta = -0,40$ , 95% CIs = -0,93 – 0,05) e dalla densità della rete stradale ( $\beta = 0,34$ , 95% CIs = -0,89 – 0,08). Nel complesso, quindi, il modello ha stimato che dei 146.300 km<sup>2</sup> inclusi nell'area di studio, il 74,2% (95% CIs = 70,5 – 77,9) fosse occupato dalla specie, per un'estensione complessiva della distribuzione di 108.534 km<sup>2</sup> (95% CIs = 103.200 – 114.000). Le probabilità di presenza più elevate sono state riscontrate, come atteso nelle aree montane e collinari della dorsale appenninica e lungo alcuni tratti della costa tirrenica (Fig. 13 a sinistra).

La Fig. 13 a destra, inoltre, mette in evidenza come la precisione delle stime di *occupancy* non sia stata la stessa nelle varie zone della griglia di campionamento, ma abbia invece mostrato delle differenze sostanziali. In particolare, la precisione delle stime è risultata maggiore, con valori del coefficiente di variazione spesso inferiori a 0,2, nelle zone ad alta probabilità di presenza e in quelle più vicine alle aree campionate in modo intensivo; al contrario, le stime di *occupancy* nelle aree marginali della distribuzione, soprattutto se lontane dalle aree sottoposte a campionamento intensivo, sono risultate in media poco precise, con valori del coefficiente di variazione superiori a 1,0 (Fig. 13 a destra).



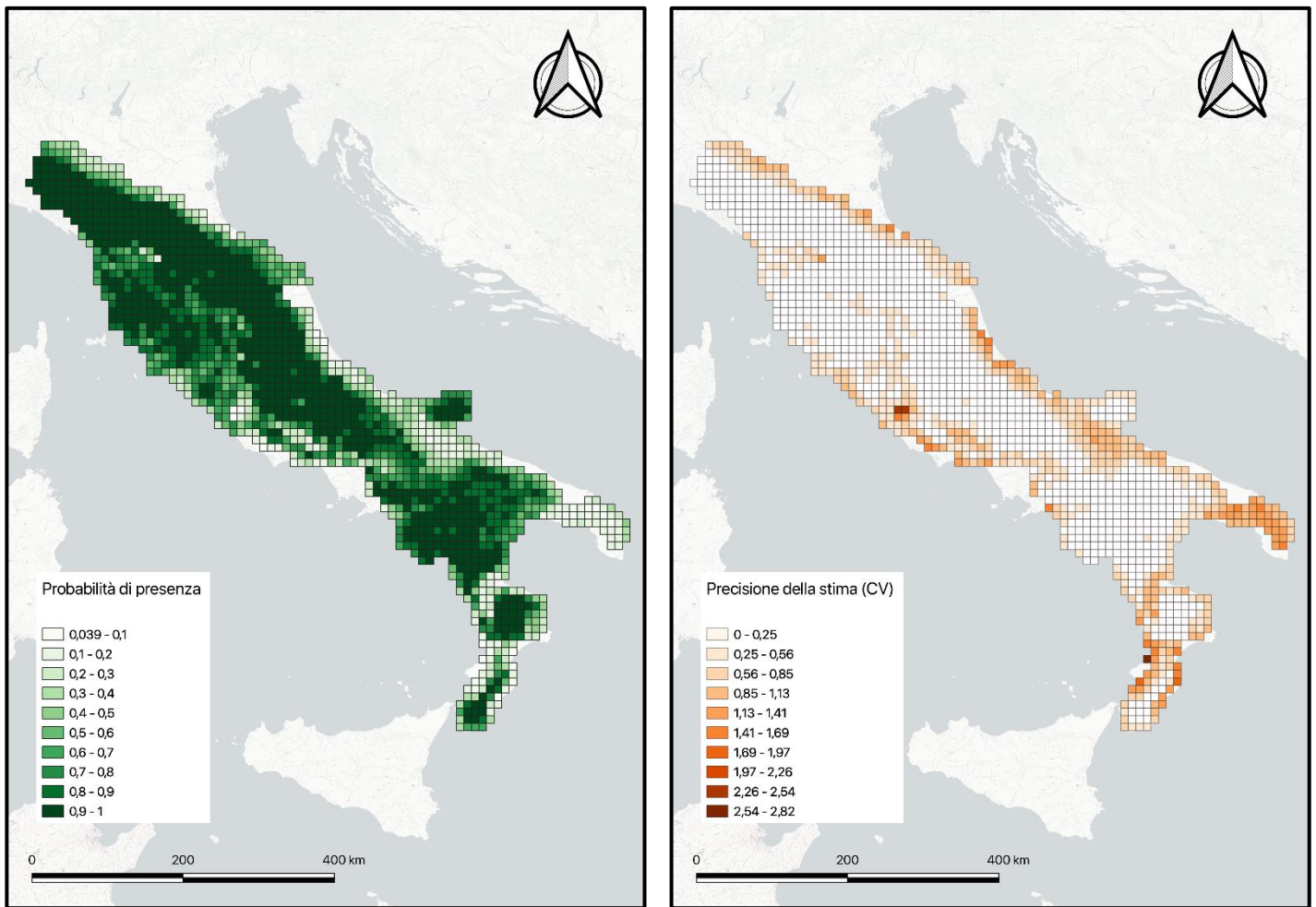


Fig. 13 – Distribuzione spaziale della probabilità di presenza del lupo in area appenninica (a sinistra), e della relativa precisione nella stima, espressa come coefficiente di variazione della stessa (a destra).

Al fine di rappresentare la distribuzione spaziale della specie nell'Italia peninsulare, anche tenendo conto della stima di distribuzione minima disponibile per la zona alpina (si veda in proposito la relazione tecnica 'La popolazione di lupo nelle regioni alpine Italiane 2020-2021', Marucco *et al.*, 2022), alla stima della probabilità di presenza derivante dall'analisi di *occupancy* è stata anche sovrapposta l'informazione relativa alle celle di presenza direttamente documentata della specie, identificate secondo i criteri definiti dalle linee guida (celle contenenti almeno un segno di presenza del lupo di categoria C1 o C2). La sovrapposizione dei *layer* informativi ha portato alla mappa rappresentata in Fig. 14.

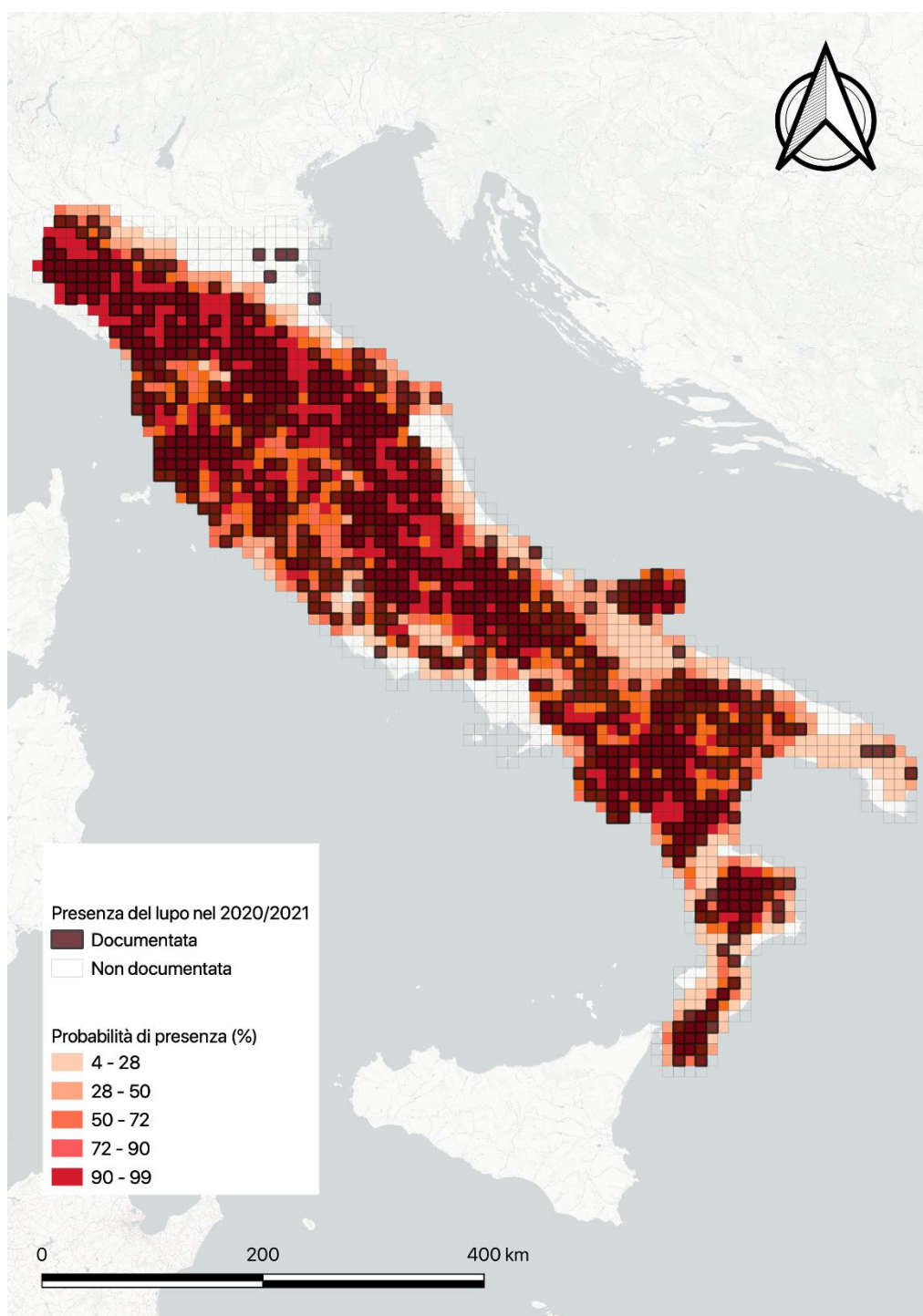


Fig. 14 – Mappa della distribuzione spaziale (basata su presenza minima documentata e stima della probabilità di presenza) del lupo nell’Italia peninsulare nel 2020-2021.

### 3.4 La consistenza numerica della popolazione di lupo nelle regioni dell’Italia peninsulare

Il modello SECR per la stima della densità e delle dimensioni di popolazione ha evidenziato come la probabilità di cattura genetica degli individui sia stata influenzata dallo sforzo di campionamento

avvenuto all'interno di ogni cella ( $\beta = 0,51$ , 95% CIs = 0,40 – 0,63), ma non dalla copertura nevosa media ( $\beta = 0,04$ , 95% CIs = -0,08 – 0,09). Come atteso dalla biologia della specie, anche il sesso è risultato un fattore non significativo nell'interpretare le differenze di probabilità di cattura tra gli individui, con maschi e femmine che hanno evidenziato in media valori simili. Il modello ha invece evidenziato la presenza di due gruppi distinti di individui, uno ad alta e l'altro a bassa probabilità di cattura. In particolare, la maggioranza dei lupi campionati, pari a circa l'87% del totale, è risultata appartenere al gruppo a bassa probabilità di cattura ( $p = 0,007$ , 95% CIs = 0,004 – 0,014), mentre una minoranza di circa il 13% è stato incluso nel gruppo ad alta probabilità di cattura ( $p = 0,044$ , 95% CIs = 0,026 – 0,094). Anche se le ragioni di tali differenze tra i due gruppi non sono state esplicitamente fornite dal modello, è ragionevole supporre che una parte della differenza osservata possa essere dovuta alla presenza di individui di rango diverso nell'organizzazione sociale dei branchi di lupo, e quindi con una diversa propensione alla marcatura del territorio tramite urine ed escrementi.

Per quanto riguarda le stime del parametro  $\sigma$ , ovvero della distanza dal centro dell'home range alla quale la probabilità di cattura si dimezza, questa è risultata inversamente correlata alla densità dei lupi ( $\beta = -0,03$ , 95% CIs = -0,05 – -0,014). Il parametro è risultato pari a 4,3 km per una densità di 1,0 lupi / 100 km<sup>2</sup>, 3,9 km per una densità di 5 lupi / 100 km<sup>2</sup>, per scendere fino a 3,3 km per una densità di 10 lupi / 100 km<sup>2</sup>. Risulta invece arduo convertire tali stime in dimensioni assolute di home range. Esistono in letteratura formule di conversione, ma il particolare comportamento di marcatura dei lupi rende tali formule difficilmente applicabili, poiché nei lupi l'area periferica dell'home range è anche una delle aree con la maggiore frequenza di marcatura del territorio.

La densità dei lupi in ogni cella di campionamento è risultata invece funzione dell'altitudine ( $\beta = 1,46$ , 95% CIs = 0,04 – 2,94), della copertura forestale ( $\beta = 0,36$ , 95% CIs = 0,06 – 0,69), della densità antropica ( $\beta = -0,84$ , 95% CIs = -1,44 – -0,22), dell'estensione di aree agricole frammiste a vegetazione naturale ( $\beta = 0,24$ , 95% CIs = 0,03 – 0,46) e della densità delle strade primarie e secondarie ( $\beta = -0,22$ , 95% CIs = -0,44 – -0,06), con una forte autocorrelazione spaziale nella densità di celle adiacenti. Inoltre, è emersa una significativa differenza nelle densità medie stimate in ognuna delle 11 aree a campionamento intensivo, con valori compresi tra un minimo di 1,9 individui / 100 km<sup>2</sup> e un massimo di 10,8 individui / 100 km<sup>2</sup>. Le stime di densità media nelle singole aree intensive sono illustrate in Tab. 15. L'utilizzo di tutti i dati genetici e dei dati di presenza all'interno del modello integrato ha poi prodotto una stima complessiva di 2.388 lupi per l'intera area appenninica (SD = 178,9; 95% CIs = 2.020 – 2.645), corrispondente ad un coefficiente di variazione di 0,075.

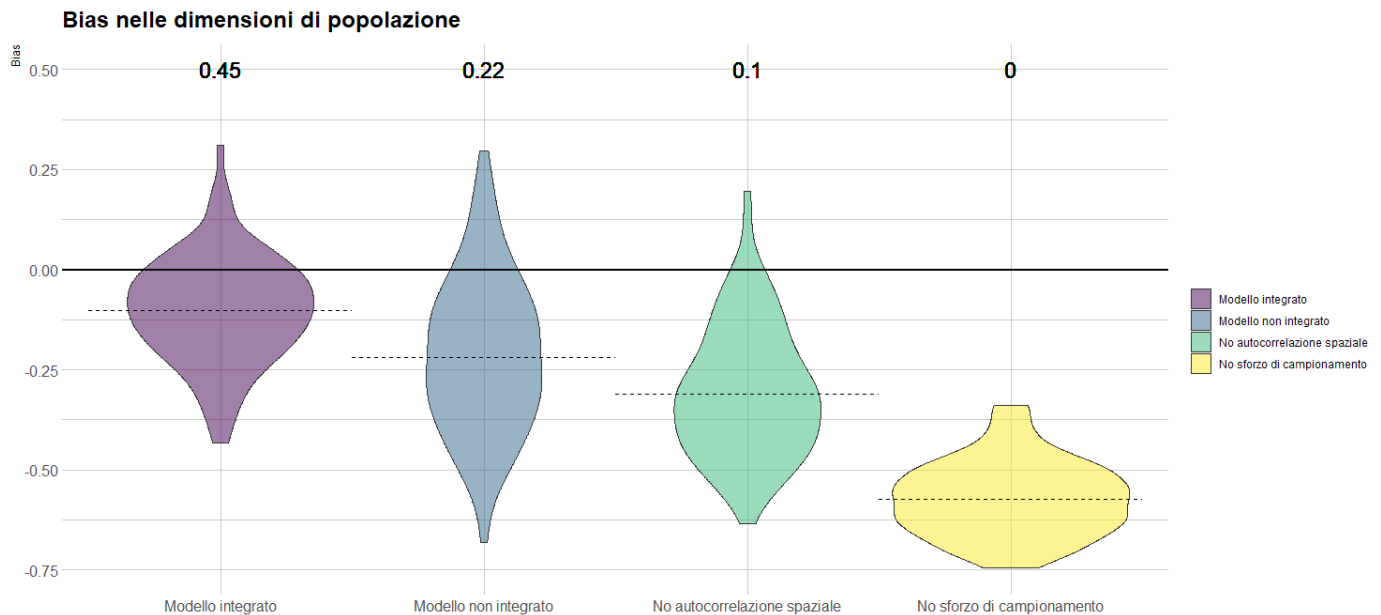
N. Area	Regioni (Province)	Densità (lupi / 100 km <sup>2</sup> )		
		Media	95% LCI	95%UCI
1	Emilia Romagna (Parma - Piacenza)	10,8	9,6	13,2
2	Toscana (Grosseto – Livorno - Pisa)	6,8	4,9	9,3
3	Marche (Macerata – Ancona)	6,1	5,1	7,7
4	Toscana - Lazio (Grosseto - Viterbo)	4,7	3,3	6,4
5	Umbria – Lazio (Perugia – Terni - Rieti)	5,9	4,4	7,8
6	Abruzzo (L’Aquila – Chieti – Pescara)	7,9	6,1	10,3
7	Molise (Campobasso – Isernia)	7,5	5,6	9,8
8	Puglia (Foggia)	3,9	2,6	5,9
9	Campania (Benevento -Avellino)	1,9	1,1	3,0
10	Puglia – Basilicata (Taranto – Bari – Matera – Barletta Andria Trani)	3,9	3,0	5,2
11	Calabria ( <i>Cosenza</i> )	6,7	5,0	9,1
12	Toscana – Emilia Romagna (Arezzo – Firenze – Forlì Cesena)	8,8	6,7	10,1
13	Calabria (Reggio Calabria)	4,5	3,1	6,3

*Tab. 15 – Stime della densità media di lupi in ciascuna delle 13 aree soggette a campionamento genetico non invasivo.*

I risultati delle simulazioni hanno evidenziato una tendenza media del nostro *design* di campionamento ad una leggera sottostima delle dimensioni reali della popolazione (Fig. 15). L’analisi dei dati simulati con il modello integrato (lo stesso da noi usato per la stima di popolazione dei lupi in area appenninica) ha prodotto infatti un bias medio del -12%. Come illustrato dal grafico a violini di Fig. 15, tuttavia, esiste una variazione abbastanza ampia attorno a tale valore medio, che non consente di stimare quale sia l’effettivo bias associato alla nostra stima di popolazione. L’analisi della distribuzione di frequenza delle stime simulate consente, tuttavia, di affermare che la stima da noi prodotta ha il 45% di probabilità di essere associata ad un bias compreso tra -10% e +10%.

Il confronto con le stime prodotte dagli altri modelli ha, inoltre, messo in luce il contributo positivo fornito dai diversi strumenti analitici adottati per stimare la popolazione di lupi: se i modelli SECR e di *occupancy* fossero stati eseguiti separatamente, senza ricorrere all’integrazione, il bias medio associato alla stima sarebbe aumentato al 23%, con una probabilità del 22% di ottenere un bias assoluto < 10%; se non avessimo fatto uso delle funzioni di autocorrelazione spaziale nella densità e nell’occupancy, il bias medio sarebbe salito al 31%, con il 10% di probabilità di avere un bias <

10%; infine, se non avessimo tenuto conto delle differenze nello sforzo di campionamento tra le diverse celle, il bias medio sarebbe stato del 59%, con una probabilità del 100% di avere un bias assoluto > 10% sulla singola stima (Fig. 15).



*Fig. 15 – Distribuzione dei valori di bias relativo nella stima delle dimensioni di popolazione, risultanti da un design di campionamento simulato su una popolazione di circa 400 lupi, i cui dati sono stati analizzati con quattro tipi di modelli di complessità progressivamente decrescente. I numeri in neretto in testa al grafico indicato la probabilità che il bias assoluto associato ad ogni tipo di modello fosse < 10%.*

Per quanto riguarda la precisione delle stime simulate, nel caso del modello integrato questa è risultata in media pari ad un coefficiente di variazione di 0,11. Inoltre, il design integrato ha evidenziato una copertura degli intervalli di credibilità pari a 0,82. Ciò significa che esiste una probabilità dell'82% che gli intervalli di credibilità da noi prodotti attorno alla stima di popolazione dei lupi in area appenninica contengano il valore reale di abbondanza della popolazione (Fig. 16). Nel caso della precisione delle stime, le simulazioni hanno evidenziato che un modello non integrato avrebbe prodotto risultati con precisione e copertura degli intervalli di credibilità sostanzialmente identici (Fig. 16). Ciò è probabilmente dovuto al fatto che nella maggior parte dei casi non c'è stata sovrapposizione spaziale tra i dati genetici e quelli di presenza. Ciò ha fatto sì che il contributo del modello di *occupancy*, all'interno del modello integrato, non sia stato tanto quello di aggiungere precisione ad un'informazione di densità già presente, ma di incrementare l'accuratezza di una stima che altrimenti sarebbe stata basata unicamente su un'estrapolazione, e quindi suscettibile di un certo rischio di inaccuratezza. Anche nel caso della precisione, il modello privo di

autocorrelazione spaziale e quello privo di una stima dello sforzo di campionamento hanno mostrato performance decisamente meno soddisfacenti rispetto al modello integrato (Fig. 16).

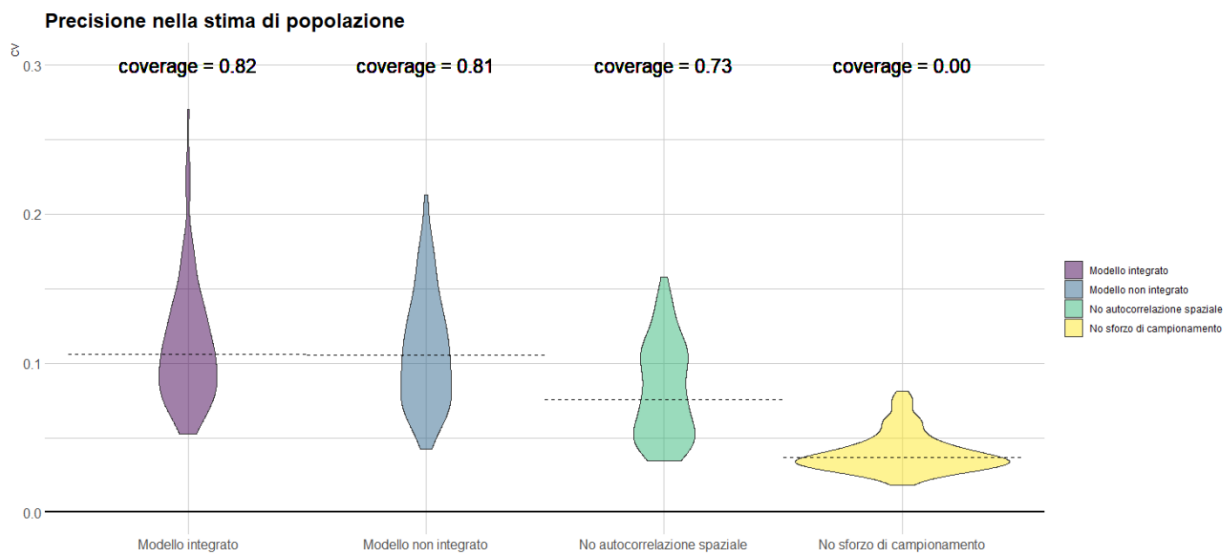


Fig. 16 – Distribuzione dei valori di precisione della stima di popolazione (espressa come coefficiente di variazione) risultanti da un design di campionamento simulato su una popolazione di circa 400 lupi, i cui dati sono stati analizzati con quattro tipi di modelli di complessità progressivamente decrescente. I numeri in neretto in testa al grafico indicano la copertura degli intervalli di credibilità associata ad ogni tipo di modello.

I risultati delle simulazioni relativi all'accuratezza e precisione delle stime di distribuzione, hanno evidenziato dei pattern simili a quelli già messi in evidenza per la stima delle dimensioni di popolazione, ma con una tendenza generale a delle migliori performance medie, soprattutto del modello integrato. Infatti, il bias medio associato alle stime di *occupancy* del modello integrato è risultato pari al 7%, con l'81% di probabilità che il bias assoluto della nostra stima puntuale di *occupancy* fosse inferiore al 10% (Fig. 17). Il confronto con i modelli semplificati ha evidenziato che la stima di distribuzione ha beneficiato in misura minore dell'integrazione con i dati genetici e dell'uso delle funzioni di autocorrelazione spaziale, ma che l'inclusione di un fattore di correzione relativo allo sforzo di campionamento è stata decisiva nel prevenire una forte sottostima dell'area occupata dalla specie (Fig. 17).

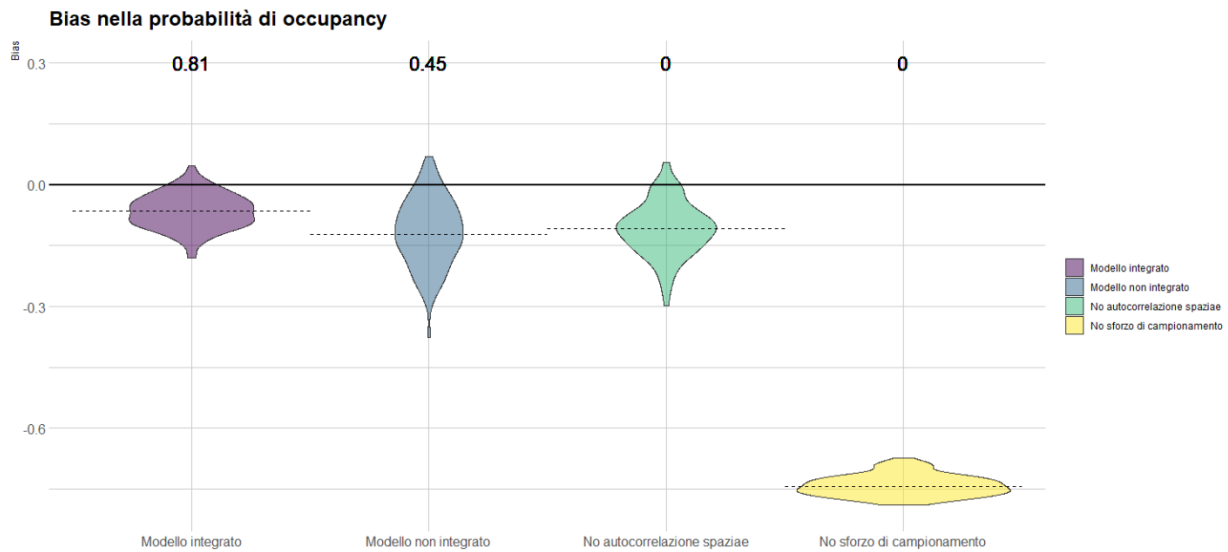
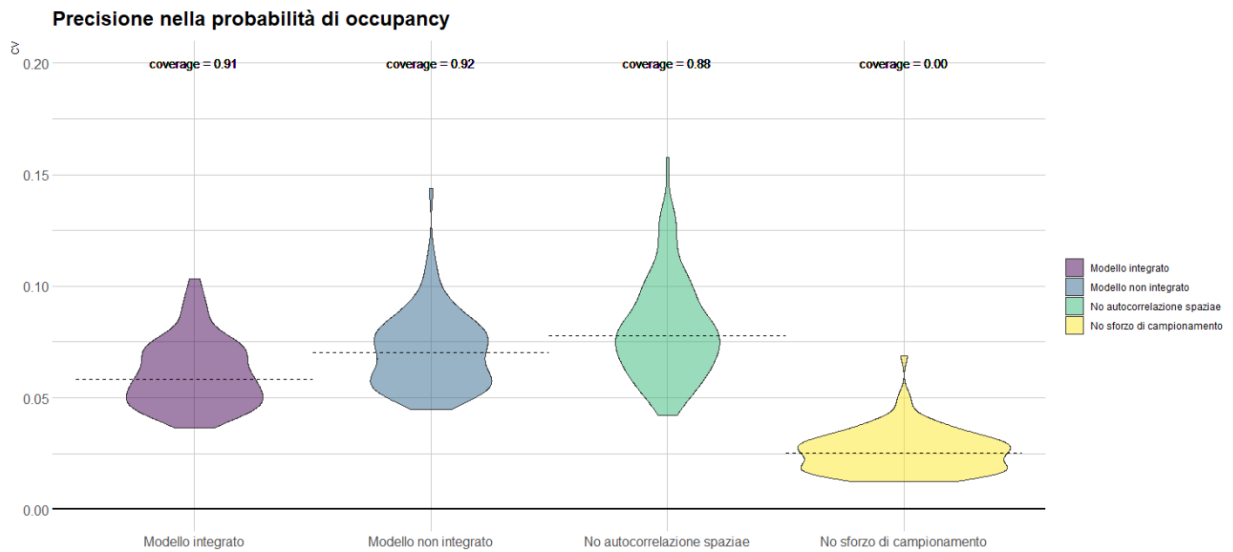


Fig. 17 – Distribuzione dei valori di bias relativo nella stima della distribuzione (occupancy), risultanti da un design di campionamento simulato su una popolazione di circa 400 lupi, i cui dati sono stati analizzati con quattro tipi di modelli di complessità progressivamente decrescente. I numeri in neretto in testa al grafico indicano la probabilità che il bias assoluto associato ad ogni tipo di modello fosse < 10%.

Anche la precisione media associata al modello integrato è risultata in media soddisfacente, pari al 6%, con una copertura degli intervalli di credibilità pari a 0,91, prossima al valore nominale di 0,95. Inoltre, le simulazioni hanno evidenziato che i modelli semplificati avrebbero prodotto stime leggermente meno precise, con l’eccezione del modello privo di stima dello sforzo campionamento, che avrebbe invece prodotto stime molto precise (CV medio = 2,5%), ma molto lontane dal valore reale (bias relativo = -0,74; Fig. 18).



*Fig. 18 – Distribuzione dei valori di precisione della stima occupancy (espressa come coefficiente di variazione) risultanti da un design di campionamento simulato su una popolazione di circa 400 lupi, i cui dati sono stati analizzati con quattro tipi di modelli di complessità progressivamente decrescente. I numeri in neretto in testa al grafico indicano la copertura degli intervalli di credibilità associata ad ogni tipo di modello.*



## 4 CONCLUSIONI

Il notevole sforzo di coordinamento, che è stato alla base della realizzazione di questa prima indagine nazionale, ha permesso il raggiungimento di un obiettivo senza precedenti per il nostro Paese. Per la prima volta è stata realizzata un'indagine contemporanea, volta al rilevamento di attributi descrittivi della presenza di una specie ampiamente diffusa sul territorio, attraverso l'applicazione di protocolli standardizzati e secondo uno schema di campionamento definito alla scala nazionale. Per l'ambito alpino, per quanto riguarda il lupo, la frammentazione amministrativa era stata già superata grazie alla realizzazione dei progetti LIFE WOLFALPS e WOLFALPS-EU che hanno permesso di monitorare l'espansione della specie in questo contesto. Per quanto riguarda l'ambito peninsulare si è trattato della prima esperienza in cui si è raggiunto un elevato livello di coordinamento e standardizzazione, che hanno permesso il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Tutto quanto è stato possibile grazie alla creazione di una rete composta da figure di coordinamento, tecnici altamente qualificati e calati nel loro territorio di indagine, rappresentanti degli Enti territoriali (Regioni e Parchi), personale dei Carabinieri forestali, volontari aderenti a numerose associazioni nazionali o locali. La partecipazione dei diversi soggetti è stata eterogenea nei diversi settori della penisola. Complessivamente, tuttavia, la risposta è stata positiva e ha permesso la creazione di un esteso Network lupo che rappresenta di per sé una risorsa per il futuro. Il lavoro è stato svolto anche affrontando diverse sfide, anche di carattere straordinario, come ad esempio l'avvento della pandemia da Covid-19, e le straordinarie precipitazioni nevose durante i mesi di gennaio e febbraio. L'impossibilità di andare sul campo da parte dei numerosi volontari, a causa delle limitazioni imposte dall'evento pandemico, ha rappresentato un notevole impedimento, che è stato tuttavia possibile superare soprattutto grazie alla disponibilità del corpo dei Carabinieri forestali. Alcune inevitabili procedure amministrative hanno poi determinato ritardi nella tempistica prevista, che hanno ridotto il tempo disponibile per lo svolgimento di alcune fasi, quali l'individuazione e verifica dei transetti sul territorio e la creazione e la formazione della rete. Di fatto alcune fasi che inizialmente erano state previste della durata di 3-4 mesi sono state comprese in 1 mese, e il buon esito è stato comunque raggiunto grazie alla professionalità e all'impegno dei tecnici Federparchi.

Una sfida è stata anche quella di individuare una impostazione analitica che tenesse conto dell'impossibilità di campionare l'intero territorio della penisola. Tale obiettivo è stato raggiunto attraverso una strategia di campionamento a due fasi e la creazione di modelli integrati, che hanno permesso la stima di distribuzione e consistenza della specie alla scala peninsulare, a partire dal campionamento di una porzione rappresentativa del territorio. È questa una metodologia in linea con i più recenti sviluppi delle tecniche di analisi, ed è stata il frutto del lavoro di figure altamente qualificate che hanno operato in costante contatto con esperti internazionali.

Quanto è stato realizzato rappresenta quindi un solido punto di partenza, sia per quanto riguarda la stima di attributi descrittivi della presenza della specie nella penisola, che possano rappresentare una baseline conoscitiva per qualsiasi futura strategia di conservazione e gestione, e utili a valutare, attraverso la realizzazione di successive indagini, l'andamento della popolazione, sia per quanto riguarda la presenza sul territorio della penisola di una vasta rete di persone competenti.

## 5 BIBLIOGRAFIA

Aragno, P., La Morgia, V., Genovesi P., Caniglia, R., Fabbri, E., Mucci, N., 2018. Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo. Prima relazione. Ottobre 2018. Convenzione ISPRA-MATTM.

Aragno, P., La Morgia, V., Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Mucci, N., Genovesi P., 2019. Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo. Seconda relazione. Aprile 2019. Convenzione ISPRA-MATTM.

Besnier, F. e Glover, K. A., 2013. Parallel Structure: a R package to distribute parallel runs of the population genetics program Structure on multi-core computers. *PLoS One* 8, e70651 (2013).

Blanc, L., Marboutin, E., Gatti, S., Zimmermann, F., & Gimenez, O. (2014). Improving abundance estimation by combining capture–recapture and occupancy data: Example with a large carnivore. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1733–1739.

Barry, B. R., Moriarty, K., Green, D., Hutchinson, R. A., and Levi, T., 2021. Integrating multi-method surveys and recovery trajectories into occupancy models. *Ecosphere* 12(12):e03886. [10.1002/ecs2.3886](https://doi.org/10.1002/ecs2.3886)

Boitani, L., Salvatori, V., 2015. Piano di conservazione e gestione del lupo in Italia. Rapporto realizzato da Unione Zoologica Italiana, su incarico Min. Ambiente, Roma.

Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Galaverni, M., Manghi, L., Boitani, L., Sforzi, A., Randi, E., 2013. Black coats in an admixed wolf x dog pack. A contribution to understand the origin of melanism in wolves. *European journal of Wildlife Research*, 59: 543-555.

Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Randi, E., 2014. Pack structure and dynamics in an expanding wolf population. *Journal of mammalogy*, 95(1):41–59.

Caniglia, R., Galaverni, M., Velli, E., Mattucci, F., Canu, A., Apollonio, M., Mucci, N., Scandura, M., Fabbri, E., 2020. A standardized approach to empirically define reliable assignment thresholds and appropriate management categories in deeply introgressed populations. *Scientific Reports* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59521>.

Chandler, R.B., and Clark, J.D., 2014. Spatially explicit integrated population models. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 1351–1360.

Chandler, R.B., Hepinstall-Cymerman, J., Merker, S., Abernathy-Conners, H., Cooper, R.J., 2018. Characterizing spatio-temporal variation in survival and recruitment with integrated population models. *The Auk* 135, 409-426.

Chandler, R.B., Royle, J.A., 2013. Spatially explicit models for inference about density in unmarked or partially marked populations. *Ann. Appl. Stat.* 7, 936–954. doi:10.1214/12-AOAS610

Claire, K., Nathalie, C.-M., Noëlle, B., Frank, D., 2019. Optimizing cost-efficiency of long term monitoring programs by using spatially balanced sampling designs: The case of manila clams in Arcachon bay. *Ecological Informatics* 49, 32–39. doi:10.1016/j.ecoinf.2018.11.005

Cubaynes, S., Pradel, R., Choquet, R., Duchamp, C., Gaillard, J., Lebreton, J.M., Marboutin, E., Miquel, C., Reboulet, A., Poillot, C., Taberlet, P., e Gimenez, O., 2010. Importance of Accounting for Detection Heterogeneity When Estimating Abundance: the Case of French Wolves. *Conservation Biology* 24:621-626.

Efford, M. G., 2004. Density estimation in live-trapping studies. *Oikos* 106:598–610.

Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J.-M., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P. and Randi E., 2007. From the Apennines to the Alps: Colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology* 16, 1661-1771.

Fabbri, E., Velli, E., D'Amico, F., Galaverni, M., Mastrogiuseppe, L., Mattucci, F., Caniglia, R., 2018. From predation to management: monitoring wolf distribution and understanding depredation patterns from attacks on livestock. *Hystrix, It.J Mamm.* <https://doi.org/10.4404/hystrix-00070-2018>.

Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

Kaczensky, P., Kluth, G., Knauer, F., Rauer, G., Reinhardt, I., e Wotschikowsky, U., 2009. Monitoring of large carnivores in Germany. *BfN-Skripten* 251.

Galaverni, M., Caniglia, R., Fabbri, E., Milanesi, P., Randi, E., 2016. One, no one, or one hundred thousand: how many wolves are there currently in Italy? *Mammal Research*, 61, 13–24.

Kaczensky, P., Kluth, G., Knauer, F., Rauer, G., Reinhardt, I., e Wotschikowsky, U., 2009. Monitoring of large carnivores in Germany. *BfN-Skripten* 251. <https://doi.org/10.1111/cobi.1268>

Kalinowski, S.T., Wagner, A.P., Taper, M.L., 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.

Latham, M.C., Latham, A.D.M., Webb, N.F., Mccutchen, N.A., Boutin, S., 2014. Can Occupancy–Abundance Models Be Used to Monitor Wolf Abundance? *PLoS ONE* 9, e102982–9. doi:10.1371/journal.pone.0102982

Lauret, V., Labach, H, Authier, M., Gimenez, O. 2021. Using single visits into integrated occupancy models to make the most of existing monitoring programs. *Ecology* 102, e03535.

Linnell, J. D. C., Cretois, B., Nilsen, E. B., Rolandsen, C. M., Solberg, E. J., Veiberg, V., ...Kaltenborn, B. (2019). The challenges and opportunities of coexisting with wild ungulates in the human-dominated landscapes of Europe's Anthropocene. <https://doi.org/10.31219/osf.io/2heqx>

Louvrier, J., Chambert, T., Marboutin, E., Gimenez, O. 2018. Accounting for misidentification and heterogeneity in occupancy studies using hidden Markov models. *Ecological Modelling* 387, 61-69.

MacKenzie, D.I., Nichols, J.D., Lachman, G.B., Droege, S., Andrew Royle, J. & Langtimm, C.A. (2002) Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology*, 83, 2248–2255.

Marucco, F., Avanzinelli, E., Boiani, M. V., Menzano, A., Perrone, S., Dupont, P., Bischof, R., Milleret, C., von Hardenberg, A., Pilgrim, K., Bisi, F., Bombieri, G., Calderola, S., Carolfi, S., Chioso, C., Fattori, U., Ferrari, P., Pedrotti, L., Righetti, D., Tomasella, M., Truc, F., Aragno, P., La Morgia, V., Genovesi, P., 2022. La popolazione di lupo nelle regioni alpine Italiane 2020-2021. Relazione tecnica dell'Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo ai sensi della Convenzione ISPRAMITE e nell'ambito del Progetto LIFE 18 NAT/IT/000972 WOLFALPS EU.

Marucco, F., La Morgia, V., Aragno, P., Salvatori, V., Caniglia, R., Fabbri, E., Mucci, N. e P. Genovesi., 2020. Linee guida e protocolli per il monitoraggio nazionale del lupo in Italia. Realizzate nell'ambito della convenzione ISPRA-Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare per "Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo".

Marucco, F., Mattei, L., Papitto, G., Bionda, R., Ramassa, E., Avanzinelli, E., Pedrini, P., Bragalanti, N., Martinelli, L., Canavese, G., Sigaud, D., Pedrotti, L., Righetti, D., Bassano, B., Agreiter, A., Stadler, M., Groff, C., Fattori, U., Tironi, E., Malenotti, E., Calderola, S., Potocnik, H., Skrbinek, T., 2014. Strategia, metodi e criteri per il monitoraggio dello stato di conservazione della popolazione di lupo sulle Alpi italiane. Progetto LIFE WOLFALPS, Azione A2.

McDonald, L.L., 2004. Sampling rare populations. In W.L. Thompson (Ed.), *Sampling rare and elusive species*. Island Press, Washington, DC, pp. 11-42.

Miller, C., Joyce, P., Waits, L.P., 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160:357–366.

Molinari-Jobin, A., Kéry, M., Marboutin, E., Molinari, P., Koren, I., Fuxjäger, C., Breitenmoser-Würsten, C., Wölfl, S., Fasel, M., Kos, I., Wölfl, M., Breitenmoser, U., 2012. Monitoring in the presence of species misidentification: the case of the Eurasian lynx in the Alps. *Animal Conservation* (early view) doi:10.1111/j.1469-1795.2011.00511.x

Nichols, J. D., and B.K. Williams, 2006. Monitoring for conservation. *Trends in Ecology e Evolution* 21:668-673.

NIMBLE Development Team, NIMBLE: MCMC, particle filtering, and programmable hierarchical modeling. <https://cran.r-project.org/package=nimble>. Accessed 5 August 2020.

Otis, D.L., Burnham, K.P., White G.C., Anderson, D.R., 1978. Statistical inference from captured dates on closed animal populations. *Wildlife Monographs* 62, 3-135.

Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.

Pledger, S., 2005. The performance of mixture models in heterogeneous closed population capture–recapture. *Biometrics* 61, 868-873.

R Core Team, R: A language and environment for statistical computing (R Version 3.6.1). <https://www.r-project.org/>. Accessed 27 November 2019.

Randi, E., Hulva, P., Fabbri, E., Galaverni, M., Galov, A., Kusak, J., Bigi, D., Bolfikova, BC., Smetanova M., Caniglia, R., 2014. Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. *PLoSOne* 9:e86409.

Salvatori, V., Aragno, P., La Morgia, V., Genovesi P. 2022. La popolazione di lupo (*Canis lupus*) nelle regioni dell'Italia peninsulare 2020-2021. *Relazioni Regionali*. Realizzata nell'ambito della convenzione ISPRA-Ministero della Transizione Ecologica per "Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo".

Stevens, D.L., Jr., Olsen, A.R., 2004. Spatially Balanced Sampling of Natural Resources. *Journal of the American Statistical Association* 99, 262–278. doi:10.1198/016214504000000250

Valière, N., 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377-379.

Velli, E., Fabbri, E., Galaverni, M., Mattucci, F., Mattioli, L., Molinari, L., Caniglia, R., 2019. Ethanol versus swabs: what is a better tool to preserve faecal samples for non invasive genetic analyses? *Hystrix It.J Mamm.* 30(1):24-29.

WAG (Wolf Alpine Group), 2018. Wolf population status in the Alps: pack distribution e trend in 2015-2016. Available at <http://www.lcie.org>

Williams, B.K., Nichols, J.D., Conroy, M. J., 2002. Analysis and management of animal populations. Academic Press, San Francisco.

Zimen, E., Boitani, L., 1975. Number and distribution of wolves in Italy. Zeitchrift für Säugetierkunde, 40:102–112.

**6 ALLEGATI**

## 1 Programma del corso e-learning

### **CORSO DI FORMAZIONE E-LEARNING**

#### **Corso di formazione per operatore monitoraggio nazionale del lupo**

**(luglio-settembre 2020)**

#### **MODULO 1 - Il progetto**

**UF 1** Inquadramento del progetto nel contesto storico italiano, Piero Genovesi, ISPRA

**UF 2** Le fasi del progetto, Paola Aragno, ISPRA

#### **Test di autovalutazione Modulo 1**

\*\*\*

#### **MODULO 2 – Il lupo in Italia**

**UF 1** La biologia della specie. Luigi Boitani. Università di Roma La Sapienza

**UF 2** Le minacce alla conservazione della specie e l'interazione con le attività umane. Valeria Salvatori, Collaboratore esterno ISPRA

#### **Test di autovalutazione Modulo 2**

\*\*\*

#### **MODULO 3 – Il monitoraggio della distribuzione e consistenza della popolazione di lupo in Italia**

**UF 1** Il monitoraggio della distribuzione e consistenza della popolazione di lupo in Italia: disegno di campionamento. Valentina La Morgia, ISPRA

**UF 2** Il monitoraggio della distribuzione e consistenza della popolazione di lupo in Italia: monitoraggio estensivo - intensivo, e criteri standard per la classificazione e interpretazione dei dati. Francesca Marucco, Collaboratore esterno ISPRA

**UF 3** Le tecniche di campo per il monitoraggio della popolazione con segni indiretti: protocollo per transetti e punti di marcatura per il rilevamento di escrementi, tracce



(scat trails e snow-tracking) e ululati (wolf-howling). Il riconoscimento dei segni di presenza del lupo. Simone Ricci, Regione Umbria

- UF 4** Le tecniche di campo per il monitoraggio della popolazione con immagini: fototrappolaggio e raccolta/verifica di fotografie dirette fatte da terzi. Elisa Avanzinelli, Centro per la conservazione e la gestione dei Grandi Carnivori - Ente di gestione Aree Protette Alpi Marittime
- UF 5** Il monitoraggio intensivo locale realizzato tramite le analisi genetiche dei campioni non-invasivi. Protocollo per la raccolta dei campioni non-invasivi utili per le analisi genetiche. Romolo Caniglia o Elena Fabbri, ISPRA
- UF 6** Analisi del fenomeno dell'ibridazione antropogenica. Romolo Caniglia o Elena Fabbri, ISPRA
- UF 7** Il monitoraggio degli impatti e loro mitigazione. Valeria Salvatori, Collaboratore esterno ISPRA

### **Test di autovalutazione Modulo 3**

\*\*\*

### **MODULO 4 – Realizzazione operativa della *survey***

- UF 1** Il campionamento sistematico e opportunistico: individuazione di transetti/punti di marcatura, programmazione delle uscite, modalità di registrazione del dato e dello sforzo, raccolta e invio dei campioni, archiviazione, APP e flusso dei dati, referenti per la validazione del dato. Francesca Marucco, Collaboratore esterno ISPRA
- UF 2** Norme e comportamenti per la sicurezza durante le attività di campionamento dei segni di presenza del lupo. Rischio generico di movimentazione in ambiente montano innevato. Rischio biologico da Echinococcosi. Giancarlo Papitto, CUFAA

### **Test di autovalutazione Modulo 4**

\*\*\*