



# ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

040433

Prot. n.

/a 4 c

del 25 SET. 2009

Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi  
Monte Falterona e Campigna  
VIA NEFETTI 3  
47018 SANTA SOFIA FC  
nevio.agostini@parcoforestecasentinesi.it

**Oggetto:** Monitoraggio della presenza del lupo nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna tramite analisi genetiche di campioni non-invasivi. Convenzione tra l'Ente Parco e l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA, ex INFS). Relazione conclusiva sull'attività svolta 2002 - 2009.

Si invia in allegato la relazione conclusiva relativa alla convenzione in oggetto. Con il 2008-2009 si è concluso il secondo ciclo triennale del programma di monitoraggio genetico della popolazione di lupo presente in Emilia-Romagna e nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi. Il principale obiettivo del progetto, la costituzione di una banca dati informatizzata a disposizione della pubblica amministrazione ed in particolare di tutti gli enti (Regione, province, enti parco) che hanno aderito al progetto, è stato ampiamente raggiunto. La grande quantità di informazioni raccolte nella banca dati consente di identificare con certezza le aree di presenza del lupo, di localizzare i branchi, individuare animali in dispersione ed analizzare con precisione gli eventi di ibridazione con cani vaganti. Le identificazioni genetiche sono utilizzate dagli enti che partecipano al progetto anche per indirizzare altre attività di monitoraggio, quali il wolf-howling, e per completare la banca dei genotipi con informazioni di altro tipo (per es., predazioni). La popolazione di lupo presente in Emilia-Romagna è tuttora in fase di espansione e sta colonizzando aree di bassa collina talvolta in prossimità di zone antropizzate e di centri abitati. Diventa quindi sempre più necessario seguire la dinamica espansiva della popolazione di lupo, in modo tale da poter delineare ed attuare tempestive misure di conservazione e riduzione dei conflitti originati dalla presenza del predatore. Il successo di questo progetto suggerisce di valutare la possibilità di un suo proseguimento nel triennio 2009-2012. La Regione Emilia-Romagna ha già deliberato il proseguimento del progetto nel triennio 2009-2012.

In questo contesto si propone di proseguire il progetto nei prossimi tre anni nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, rafforzando lo schema di collaborazione con gli enti territoriali e con il personale strutturato e volontario che opera sul campo nelle varie province, parchi regionali e nazionali, al fine di raggiungere i seguenti obiettivi:

- 1) La ulteriore implementazione della banca dei genotipi, proseguendo l'analisi dei campioni biologici raccolti sul campo mediante metodi genetici non-invasivi che consentono di identificare, per ogni campione georeferenziato, specie, individuo e sesso;
- 2) Lo sviluppo di un Sistema Informativo Geografico in collaborazione con le regioni che aderiscono al progetto (Emilia-Romagna, Liguria ed Umbria), che consenta la diffusione ed un rapido accesso alle informazioni prodotte dal progetto;
- 3) La stesura di un documento di sintesi sulla evoluzione delle popolazioni di lupo in Emilia-Romagna e nell'Appennino settentrionale, che sia in grado di delineare le problematiche di conservazione e gestione della specie, con particolare riferimento ai problemi della prevenzione e compensazione dei danni;
- 4) La istituzione di un gruppo di contatto permanente fra enti territoriali attivi in Regione Emilia-Romagna, e fra le regioni che aderiscono al progetto, finalizzato ad identificare e realizzare strategie condivise per la conservazione del lupo e la mitigazione dei conflitti.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

In attesa di un cortese riscontro, rimango a disposizione per fornire ogni necessario chiarimento.

Distinti saluti.

IL DIRIGENTE RESPONSABILE

Dott. Ettore Randi

n. 1 allegato

/ms

cod. 44400



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

04 0433

25 SET. 2009

ALLEGATO AL PROT. N...../a 4 c DEL

## **PROGETTO**

**Monitoraggio della presenza del lupo nel Parco Nazionale delle  
Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna tramite analisi  
genetiche di campioni non-invasivi.**

**Convenzione tra l'Ente Parco e l'Istituto Superiore per la Protezione e la  
Ricerca Ambientale (ISPRA, ex INFS).**

*Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale  
Laboratorio di genetica della conservazione*

**Relazione conclusiva sull'attività svolta  
2002 - 2009**



## **Indice**

### **(I) Introduzione**

- (a) Status della popolazione di lupo in Italia e inquadramento del progetto di ricerca regionale*
- (b) I metodi della genetica non-invasiva*
- (c) Procedure di raccolta e conservazione dei campioni*

### **(II) Materiali e Metodi Genetici e di Campo**

- (a) Metodi di analisi di laboratorio*
- (b) Determinazione del genotipo individuale: analisi di sei loci microsatellite*
- (c) Determinazione della specie: analisi del DNA mitocondriale e del DNA nucleare*
- (d) Determinazione del sesso: analisi del gene ZFX/ZFY*
- (e) Analisi dell'affidabilità dei genotipi multilocus e protocollo di controllo della qualità dei dati*
- (f) Analisi di confronto tra i genotipi ottenuti, aggiornamento database complessivo e invio dei risultati*
- (g) Determinazione delle parentele: analisi di 12 loci microsatellite*
- (h) Determinazione del fenotipo melanico*
- (i) Wolf-howling*

### **(III) Risultati**

- (a) Numero di campioni analizzati e resa di genotipizzazione*
- (b) Determinazione della specie e test di assegnazione*
- (c) Determinazione del sesso e distribuzione temporale dei genotipi*
- (d) Analisi dei possibili eventi di dispersione*
- (e) Analisi della mutazione legata al manto nero*
- (f) Analisi delle parentele ed individuazione degli ambiti territoriali*
- (g) Individuazione dei nuclei familiari con la tecnica del wolf-howling*



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## **(I) Introduzione**

### ***(a) Status della popolazione di lupo in Italia e inquadramento del progetto di ricerca regionale***

Negli ultimi due secoli, la popolazione di lupo in Italia ha subito una progressiva riduzione in termini di consistenza numerica e di distribuzione sul territorio. Tale fenomeno è da imputarsi in massima parte a motivi antropici che, direttamente e indirettamente, hanno portato il lupo quasi alla soglia dell'estinzione attorno agli anni '70, quando la popolazione relitta risultava frammentata in poche aree dell'Italia centro-meridionale (Zimen e Boitani, 1975). A partire dai primi anni '80 l'areale distributivo della popolazione si è naturalmente riesteso fino ad interessare nuovamente la dorsale appenninica settentrionale (Emilia Romagna, Toscana, Marche) ed arrivando fino alle Alpi Occidentali (Liguria, Piemonte, Valle d'Aosta), in Lombardia, in Francia e in Svizzera.

Le ragioni di questa espansione sono senza dubbio molteplici, alcune di carattere strettamente antropico (protezione legale accordata alla specie, spopolamento delle zone montuose, incremento delle popolazioni di ungulati selvatici, sia naturali che a seguito di ripopolamenti e reintroduzioni), altre sono dovute alle caratteristiche biologiche ed ecologiche della specie, capace di grande adattabilità all'ambiente, mobilità ed elusività. Il ritorno del lupo in aree dove da decenni era scomparso ripropone inevitabilmente complesse problematiche gestionali, legate fondamentalmente ai possibili conflitti con le attività zootecniche e venatorie. Ciò che si spera è che, alla luce di maggiori informazioni biologiche sulla specie, di mirate ed efficaci politiche gestionali e di una nuova consapevolezza dell'ambiente naturale, si possano eliminare definitivamente tutte quelle "incrostazioni culturali" che vedono nel lupo l'animale "nocivo" da eliminare, per percepirlo finalmente come risorsa del patrimonio faunistico del nostro paese.

Consapevoli che qualsiasi programma gestionale debba inevitabilmente partire da adeguate conoscenze biologiche della specie, l'Ente Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna ha proposto un programma di monitoraggio della presenza del lupo nel proprio territorio, sulla base di indagini genetiche su campioni non-invasivi, in collaborazione con il personale del Laboratorio di Genetica della conservazione dell'ex Istituto Nazionale per la Fauna



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

Selvatica (INFS, ora Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale o ISPRA), e coordinato con l'analogo programma avviato dalla Regione Emilia-Romagna.

Il progetto, dal titolo "Monitoraggio della presenza del lupo nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna tramite analisi genetiche di campioni non-invasivi", è stato avviato mediante una convenzione tra l'Ente Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna e l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. La convenzione stipulata con l'Ente aderente al progetto di ricerca è ufficialmente iniziata nel 2002, anche se il personale addetto dell'Ente Parco aveva avviato l'attività di campionamento già a partire dai primi mesi del 2000. Tale convenzione prevede, da parte del personale del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (ex INFS), la produzione di un protocollo di raccolta intensiva dei campioni fecali di presunto lupo nell'area di studio, la fornitura dei flaconi contenenti etanolo per la loro conservazione e la realizzazione delle loro analisi genetiche al fine di:

- tipizzare il genotipo dei lupi presenti nell'area di studio in base ai campioni raccolti;
- determinare il sesso dei lupi presenti nell'area di studio;
- stimare l'organizzazione in branchi all'interno dell'area di studio, la composizione di ciascun nucleo familiare e le relazioni parentali tra i suoi membri;
- georeferenziare i genotipi individuati e stimare la localizzazione degli ambiti territoriali di ciascun nucleo familiare, attraverso la sovrapposizione dei dati alla cartografia digitale;
- identificare eventuali casi di dispersione di lupi in ambito regionale;
- identificare la presenza di eventuali ibridi lupo-cane nella popolazione.

#### ***(b) I metodi della genetica non-invasiva***

Lo studio in vivo delle popolazioni selvatiche di carnivori, teso ad un approfondimento della biologia delle singole specie, è sempre stato tradizionalmente molto difficile a causa della scarsa contattabilità di questi animali, estremamente elusivi nei confronti dell'uomo. Questo è vero anche per il lupo, specie la cui biologia rimane ancora per tanti aspetti poco conosciuta. Il suo comportamento estremamente schivo, la bassa densità di popolazione e la capacità dei singoli animali di compiere lunghi spostamenti in tempi anche molto brevi rendono la sua osservazione diretta ed il suo studio in natura estremamente complesso.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

Grazie ai progressi compiuti nella biologia molecolare negli ultimi anni, è possibile affiancare alle tecniche di studio più tradizionali (*snow-tracking*, *radio-tracking*, *wolf-howling*) tecniche molecolari capaci di ricavare informazioni genetiche partendo da tracce biologiche 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. Tale capacità nasce appunto dalla possibilità di estrarre sufficiente DNA per le analisi genetiche da tracce biologiche che ne contengono minime quantità, anche fortemente degradate. Dal DNA estratto è possibile, grazie allo sviluppo dell'amplificazione in vitro del DNA (PCR) e utilizzando opportuni marcatori molecolari, determinare con certezza la specie, il sesso ed il profilo genetico individuale dell'animale a cui il campione appartiene; in secondo luogo, è possibile valutare anche rapporti di parentela esistenti tra i genotipi unici identificati. Nel caso del lupo, i campioni non-invasivi che vengono raccolti sono soprattutto di natura fecale. Le feci, infatti, possono essere trovate abbastanza agevolmente in quanto molto spesso utilizzate dal lupo per la marcatura del territorio e quindi deposte in luoghi relativamente facili da individuare (sentieri, punti di passo, valichi) e con una certa periodicità. Il DNA estratto dai campioni fecali proviene dalle cellule di sfaldamento dell'endotelio intestinale che restano nel campione a seguito della peristalsi del bolo alimentare.

L'informazione genetica ottenuta dall'analisi in laboratorio può essere integrata da tutte le informazioni relative all'attività di raccolta sul campo: data di raccolta, georeferenziazione, identificazione dei transetti o delle tracciatore su neve, identificazione dei *resting-site*, dei resti di predazione, degli eventi di riproduzione, etc. L'integrazione di tutte le informazioni di natura genetica con quelle provenienti dalle attività di campo va a costituire una banca dati preziosissima per migliorare le conoscenze sulla biologia del lupo. Da queste informazioni, infatti, è possibile determinare la distribuzione della specie nell'area di studio, di censirla, valutare gli ambiti territoriali dei branchi, nonché la dispersione dei singoli individui, stimarne il rapporto sessi. E' possibile anche caratterizzarne i branchi ed il *turn-over* degli stessi, nonché monitorare in tempo reale eventuali casi di ibridazione del lupo con il suo corrispettivo domestico, il cane. Accanto allo studio della dinamica attuale e dell'ecologia delle popolazioni selvatiche, l'indagine genetica non-invasiva consente, inoltre, di accumulare dati sulla variabilità genetica e sulla storia demografica passata a cui queste popolazioni sono andate soggette.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

### *(c) Procedure di raccolta e conservazione dei campioni*

La fase della raccolta dei campioni è certamente determinante per la riuscita delle successive analisi genetiche. Per garantire la corretta raccolta dei campioni all'interno del proprio territorio di competenza, l'Ente Parco ha individuato un responsabile faunistico a cui ha fatto riferimento tutto il personale logistico strutturato (Personale Tecnico della Polizia Provinciale, del Corpo Forestale dello Stato) o volontario (Guardie Ecologiche Volontarie e studenti) coinvolto nel progetto.

Il protocollo predisposto dall'ISPRA per la raccolta dei campioni da utilizzare per le analisi genetiche prevede che i campioni non siano più vecchi di due settimane, privilegiando comunque quelli di pochi giorni. La raccolta deve avvenire utilizzando guanti monouso per evitare contaminazioni tra campioni successivi, conservando una piccola aliquota di campione (circa 2-3 cm di lunghezza) in un barattolo contenente etanolo 95%. L'etanolo, che deve essere presente in un rapporto in volume almeno 3:1 con il campione, ha la funzione di estrarre l'acqua contenuta nel campione e prevenire l'azione degli enzimi degradativi che danneggerebbero il DNA presente. Il campione a questo punto, previa etichettatura, viene posto appena possibile in congelatore fino all'invio al Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (ex INFS).

Unitamente alla raccolta del campione è prevista la compilazione di una scheda contenente dati di campo quali: il codice identificativo univoco, la data di raccolta, le coordinate geografiche del punto di raccolta ed altre informazioni (tracciatore su neve, freschezza del campione, ...) essenziali per le successive interpretazioni dei risultati ottenuti dalle analisi genetiche. Per standardizzare il metodo di raccolta e concordare un database comune di scambio dei dati si sono tenuti all'ISPRA (ex INFS) vari incontri con i responsabili logistici di coordinamento ed il personale addetto all'attività di campionamento dell'Ente Parco.

La strategia di raccolta dei campioni fecali di lupo può cambiare a seconda del periodo dell'anno, delle condizioni atmosferiche e ovviamente dello sforzo logistico e organizzativo disponibile per effettuare il campionamento. La raccolta è stata effettuata lungo transetti o circuiti di ricognizione, scelti opportunisticamente per massimizzare il grado di penetrabilità dell'area indagata; durante il periodo invernale, con presenza di neve, ogni circuito veniva abbandonato qualora fosse individuata



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

una pista di lupi: e in quel caso le tracce degli animali sulla neve sono state seguite il più possibile, anche per più giorni consecutivi.

Il campionamento lungo la tracciatura sulla neve è molto importante in quanto permette di associare una serie di informazioni di campo ai dati genetici. Ad esempio, è possibile associare tra loro genotipi (quindi individui) diversi campionati sulla stessa tracciatura, riuscendo pertanto ad identificare gruppi di animali che si muovono insieme. Inoltre, seguendo le tracce sulla neve è possibile stimare il numero minimo di animali che hanno percorso la tracciatura, fornendo in tal modo una stima della dimensione del branco. Un altro aspetto importante del campionamento invernale su neve è che vengono potenzialmente campionati tutti gli esemplari: sulla neve, infatti, è più facile scorgere i campioni, mentre lungo i transetti si tende a raccogliere prevalentemente nei punti di marcatura, dove solo alcuni esemplari, di norma i dominanti, lasciano le loro tracce. La qualità dei campioni invernali è solitamente migliore di quella estiva, in quanto le temperature sono più basse e quindi è più lenta la degradazione del DNA. Inoltre, l'età del campione è facilmente stimabile in relazione alla data dell'ultima nevicata, garantendo pertanto la raccolta di campioni freschi.

## **(II) Materiali e Metodi Genetici e di Campo**

### ***(a) Metodi di analisi di laboratorio***

Il DNA presente nelle feci è scarso, degradato e può contenere inibitori, che impediscono le successive analisi, o DNA contaminante come, ad esempio, il DNA delle prede. Queste condizioni rendono le analisi genetiche dei campioni fecali molto complesse e con percentuali di successo inferiori rispetto ai campioni invasivi, che tuttavia necessitano della cattura dell'animale per effettuare prelievi di sangue o di tessuto muscolare, o il rinvenimento di carcasse. Le ricerche condotte presso il Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (ex INFS) hanno permesso di mettere a punto una serie di protocolli di genetica non-invasiva specifici per il lupo, in grado di garantire dati affidabili.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

**Estrazione del DNA.** Il DNA totale (di lupo e prede) viene estratto dalle feci utilizzando un protocollo in grado di eliminare gran parte degli inibitori presenti e di recuperare anche tracce minime di DNA. Il protocollo si basa sul metodo della guanidina-tiocianato e diatomee (Gerloff *et al.* 1995) che lega selettivamente il DNA ad una matrice silicea e permette di eliminare le proteine ed altre sostanze inibitrici mediante successivi cicli di lavaggio. L'estrazione del DNA può essere effettuata sia manualmente che in maniera automatizzata. Dal 2005 infatti il personale del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (ex INFS) ha messo a punto una modalità di estrazione automatizzata utilizzando un kit di estrazione in commercio (Tissue Kit Quiagen) che prevede l'ausilio di un braccio meccanico (*MultiPROBE II<sup>EX</sup> Robotic Liquid Handling System*) per effettuare i cicli di lavaggi, minimizzando così possibili contaminazioni tra i campioni.

**Analisi del DNA.** Grazie allo sviluppo della reazione a catena della polimerasi (PCR), che consente di produrre un grande numero di copie di una specifica sequenza di DNA, è possibile lavorare anche con campioni che contengono DNA molto diluito, come le feci, nonché di isolare dalla miscela di DNA solo quello del lupo, in particolare il tratto di DNA che si vuole analizzare. La scelta della porzione di DNA che si vuole analizzare (detta marcatore molecolare) dipende dalle informazioni che si vogliono ottenere tramite la genetica. In questo studio si sono scelti dei marcatori molecolari che per le loro particolari caratteristiche hanno permesso di identificare la specie di appartenenza del campione (lupo, cane o altra specie), il sesso dell'animale e di ricostruire un profilo genetico che sia unico, in modo da identificare tutti gli individui campionati, ed infine determinare le relazioni parentali esistenti tra essi.

Prima di procedere all'analisi dei campioni viene effettuato uno *screening* di controllo della qualità del DNA estratto, con lo scopo di escludere quei campioni che non contengono DNA a sufficienza per poter effettuare le successive analisi genetiche. Per tale *screening* vengono analizzati due marcatori, scelti tra i sei che sono utilizzati per la tipizzazione genetica individuale (vedi seguito), per i quali vengono effettuate quattro repliche di amplificazione, per un totale quindi di otto repliche per ogni campione testato. I campioni per i quali si ottengono almeno cinque repliche positive su otto vengono portati avanti nell'analisi, gli altri vengono scartati.

**(b) Determinazione del genotipo individuale: analisi di sei loci microsatellite**

Dal DNA estratto da un campione fecale è possibile ottenere il profilo genetico dell'individuo (DNA *fingerprinting*) utilizzando i *loci* microsatellite, che sono marcatori genetici nucleari e come tali ereditati in modo biparentale. Col termine microsatellite si indicano particolari sequenze di DNA nucleare non codificante che sono caratterizzate da un breve motivo di non più di sei basi, ripetuto in tandem molte volte. In un *locus* microsatellite un allele differisce dall'altro per il numero di ripetizioni del motivo (allele = variante di un dato *locus*). La caratteristica dei *loci* microsatellite è quella di essere molto variabili (polimorfici), cioè presentare tanti alleli in ogni popolazione. Ogni individuo ad un singolo *locus* può possedere soltanto due alleli, ciascuno ereditato da uno dei due genitori. Se entrambi gli alleli sono uguali si dice che il *locus* è omozigote, altrimenti, nel caso siano diversi, il *locus* viene detto eterozigote. L'insieme degli alleli di più *loci* microsatellite crea una combinazione unica che viene indicata come profilo genetico individuale o genotipo *multilocus* individuale (DNA *fingerprinting*). L'identificazione di campioni non-invasivi lasciati dallo stesso animale viene pertanto fatta confrontando il profilo genetico di ciascuno dei campioni fecali, identificando cioè le coppie alleliche trovate ad ognuno dei *loci* microsatellite scelti.

La possibilità di stabilire se due profili genetici uguali appartengano effettivamente allo stesso esemplare dipende dalla probabilità di identità della combinazione dei *loci* utilizzati per le analisi. La probabilità di identità (PID) è la probabilità che due differenti individui nella popolazione abbiano casualmente lo stesso genotipo *multilocus*, cioè la stessa combinazione di alleli. Questa probabilità dipende da quanti alleli ha ciascun *locus*, dalla loro frequenza e da quanti *loci* polimorfici si utilizzano per ricostruire i DNA *fingerprinting* degli individui. Nella scelta dei *loci* microsatellite usati per l'identificazione dell'individuo occorre quindi tenere conto della loro variabilità per avere una probabilità di identità sufficientemente bassa da non commettere l'errore di considerare come campioni appartenenti allo stesso individuo campioni che in realtà appartengono ad individui diversi e quindi sottostimare il numero di individui. Nel caso del lupo, che spesso si muove in gruppi familiari, bisogna tenere conto anche della possibilità di campionare esemplari tra loro imparentati e quindi geneticamente più simili tra loro rispetto ad esemplari non imparentati. Pertanto è necessario calcolare anche la probabilità di identità fra fratelli (PID<sub>sib</sub>) o fra parenti associata ai loci scelti, per essere sicuri che essi siano sufficienti alla discriminazione di tutti gli individui della popolazione.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

Il protocollo di analisi del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA prevede l'utilizzo di sei *loci* microsatellite, in grado di garantire una PID<sub>sib</sub> inferiore all' 1% (software Gimlet v.1.3.2, Valière; 2002). Considerando la densità della popolazione di lupo nell'Appennino settentrionale, questo livello di probabilità fornisce una buona capacità di discriminazione ed un basso livello di errore nell'assegnazione dei campioni analizzati.

***(c) Determinazione della specie: analisi del DNA mitocondriale e del DNA nucleare***

Il DNA mitocondriale (mtDNA) si trova nei mitocondri, organuli cellulari presenti nelle cellule animali e vegetali. La peculiarità del DNA mitocondriale degli organismi pluricellulari, come la semplicità della sua struttura, le piccole dimensioni, l'alto tasso di mutazione e le modalità con cui viene ereditato (essenzialmente uniparentale), lo rendono il marcatore più utilizzato negli studi di genetica delle popolazioni. I mitocondri, e quindi il mtDNA, sono trasmessi dagli oociti allo zigote al momento della fecondazione, e vengono quindi ereditati esclusivamente per via materna. Da precedenti analisi condotte presso il Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (Randi *et al.*; 2000) è risultato che in tutta la popolazione Italiana di lupo è presente un solo aplotipo mitocondriale che non è condiviso con nessun'altra popolazione di lupi e di cani. L'unicità dell'aplotipo mitocondriale della popolazione Italiana di lupo lo rende un tipo di marcatore estremamente efficace per ottenere informazioni riguardo alla specie di appartenenza di un dato campione. La determinazione della specie a partire da residui fecali avviene pertanto mediante l'amplificazione e successivo sequenziamento di un frammento del mtDNA. Se dall'analisi della sequenza del mtDNA risulta che il campione ha l'aplotipo unico della popolazione italiana di lupo, allora il campione appartiene alla specie *Canis lupus* e in particolare alla popolazione italiana.

Lo studio del DNA mitocondriale fornisce tuttavia informazioni relative solo alla linea materna dell'individuo o della popolazione. Questo limite diventa determinante nell'uso dei campioni non-invasivi perché non si hanno informazioni dirette sul fenotipo dell'animale che ha lasciato la traccia. Per ottenere informazioni più complete e per monitorare eventuali casi di ibridazione lupo-cane, uno degli scopi del progetto, occorre quindi analizzare anche il DNA nucleare che viene ereditato da entrambi i genitori. A questo scopo vengono condotte analisi statistiche in grado di assegnare i singoli genotipi *multilocus* microsatellite nucleari ad un determinato gruppo sulla base del genotipo individuale e delle frequenze alleliche delle popolazioni di origine. Per effettuare



queste analisi di assegnazione sono disponibili diversi programmi tra i quali i più recenti e utilizzati sono Structure v.2.2 (Pritchard *et al.*; 2002) e NewHybrids v.1.2.2 (Anderson e Thompson; 2002). Per ottenere informazioni ulteriori, in particolare sulla linea paterna, sono stati analizzati altri 3 loci microsatellite presenti unicamente sul cromosoma sessuale Y: MSY34A, MSY34B, MSY41B (Sundqvist *et al.*; 2001). Dalla loro combinazione è stato quindi possibile ricavare una serie di aplotipi Y, la cui frequenza varia tra la popolazione italiana di lupo e quella di cane.

***(d) Determinazione del sesso: analisi del gene ZFX/ZFY***

Nei mammiferi, e quindi anche nel lupo, la determinazione del sesso è controllata dalla segregazione dei cromosomi sessuali X e Y. Le femmine hanno cariotipi con due cromosomi sessuali identici (XX), mentre i maschi, che hanno ereditato un cromosoma X dalla madre ed uno Y dal padre, sono XY. Il protocollo di identificazione del sesso messo a punto presso il Laboratorio di Genetica dell'ISPRA utilizza l'analisi delle sequenze del DNA di un gene associato ai cromosomi sessuali (ZFX/ZFY). Questo gene presenta delle differenze nella sequenza nucleotidica tra l'X e l'Y, che è possibile determinare mediante l'uso di enzimi di restrizione e la separazione dei frammenti amplificati mediante elettroforesi (Lucchini *et al.*; 2002).

***(e) Analisi dell'affidabilità dei genotipi multilocus e protocollo di controllo della qualità dei dati***

Il DNA ottenuto da campioni non-invasivi è degradato e presente in quantità molto ridotte, ed è perciò indispensabile adottare protocolli di laboratorio molto rigidi per scongiurare qualsiasi forma di contaminazione tra i campioni; sono inoltre possibili degli errori in fase di amplificazione di singoli *loci* e conseguentemente nella determinazione dei genotipi individuali. Per essere certi che il genotipo ottenuto sia privo di errori occorre fare più repliche per lo stesso campione per ogni *locus* microsatellite, e confrontare poi i risultati ottenuti dalle singole repliche (Taberlet *et al.*; 1996). Poiché il numero di repliche necessarie per ottenere un genotipo affidabile è variabile a seconda del genotipo stesso ed è funzione delle frequenze alleliche, viene usato un apposito *software* (Reliotype; Miller *et al.*; 2002) che calcola, sulla base delle frequenze alleliche, la probabilità che un dato genotipo ottenuto attraverso un certo numero di repliche sia attendibile. Ad esempio, se un genotipo risulta omozigote per un allele che è raro nella popolazione, la probabilità che si tratti di un errore è più alta, a parità di repliche positive, rispetto ad un genotipo omozigote per un allele molto



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

frequente. Quindi nel primo caso (genotipo omozigote per un allele raro) sono richieste un certo numero di repliche (ad esempio otto) per raggiungere l'affidabilità, mentre nel secondo (genotipo omozigote per allele frequente) un diverso numero di repliche, in genere più basso (ad esempio quattro). Per poter stimare l'affidabilità dei genotipi occorre quindi disporre delle frequenze alleliche nella popolazione d'origine dei genotipi, per tutti i *loci* usati.

Il protocollo di analisi per la determinazione del profilo genetico messo a punto presso il Laboratorio di genetica dell'ISPRA prevede una serie di quattro repliche per ogni campione a ciascun *locus*. Il risultato delle repliche viene sottoposto successivamente ad analisi statistica per poter stabilire quante altre repliche devono essere compiute e a quali *loci* in particolare, per raggiungere una soglia di affidabilità del genotipo del 95%. Talvolta per determinati genotipi possono essere richieste anche otto o più repliche per raggiungere il prefissato livello di affidabilità. Il numero di amplificazioni per campione analizzato risulta quindi molto superiore a quelli solitamente necessari per le analisi da campioni di tipo invasivo come tessuti muscolari o prelievi di sangue. Per un singolo campione possono essere pertanto necessarie fino a 48 amplificazioni. I campioni che superano il test di affidabilità vengono considerati genotipi "certi" e non vengono più sottoposti ad ulteriori analisi, per quelli che non lo superano invece vengono fatte ulteriori repliche, come indicato nell'output del *software* Reliotype. Successivamente, un secondo giro di analisi statistiche consentirà di stabilire se tali genotipi avranno raggiunto la soglia di affidabilità.

***(f) Analisi di confronto tra i genotipi ottenuti, aggiornamento database complessivo e invio dei risultati***

Una volta superati i criteri di affidabilità, i genotipi *multilocus* dei campioni vengono confrontati con i genotipi *multilocus* degli animali precedentemente campionati mediante il *software* Gimlet per verificare eventuali ricampionamenti. Al confronto, effettuato esclusivamente su base genetica, segue l'attribuzione del codice identificativo del genotipo del campione che sarà lo stesso in caso di *match* del genotipo al 100% (sei *loci* su sei, oltre al sesso) con un individuo già precedentemente campionato, oppure gli verrà attribuito un codice identificativo nuovo. Tale codice consta di 6-8 caratteri, di cui il primo è la lettera W (Wolf), che è comune a tutti i campioni. Le due lettere successive indicano la provincia in cui il genotipo è stato campionato per la prima volta (es.: FO = Forlì-Cesena). Le seguenti cifre (da una a tre) indicano il numero progressivo del campione in quella particolare provincia o area. L'ultima lettera indica il sesso dell'animale (M = maschio; F =



femmina). Procedendo con le analisi ed utilizzando sempre questo criterio, una volta assegnato il codice ad uno specifico genotipo, tutti i campioni che successivamente risulteranno avere quello stesso genotipo *multilocus* saranno contrassegnati con lo stesso codice identificativo. In questo modo è possibile seguire le ricatture degli stessi esemplari nel corso del tempo. L'analisi di ogni partita di campioni a questo punto è terminata e si procede all'invio dei risultati. Per consentire continuità nel flusso di informazioni tra le squadre di ricerca sul campo e il laboratorio, è stata stabilita una periodicità di analisi e di invio dei risultati indicativamente trimestrale.

***(g) Determinazione delle parentele: analisi di 12 loci microsatellite***

L'analisi delle relazioni di parentela tra gli individui permette di individuare i possibili branchi, essendo questi composti da nuclei familiari, e di comprendere meglio le loro dinamiche ed i processi di dispersione tra i branchi adiacenti. Per analizzare le relazioni parentali è necessaria però una quantità di informazione genetica maggiore rispetto a quella necessaria per identificare i singoli esemplari. Per questo motivo sono stati analizzati, per ciascun genotipo individuato, altri sei *loci* microsatellite, per un totale di 12 *loci* complessivi. I genotipi così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica per determinare il livello di parentela esistente tra loro rispetto all'ipotesi nulla che i genotipi fossero tra loro non imparentati. Determinare un certo livello di parentela superiore alla media, e quindi affermare che certi individui risultano tra loro imparentati, è relativamente semplice con i soli dati genetici dei genotipi e delle frequenze alleliche della popolazione del lupo. Determinare con sicurezza quali sono i genitori e quali i figli è invece molto più complesso. Infatti, per identificare con attendibilità quali sono i figli è necessario aver campionato entrambi i genitori. Se manca anche solo uno dei due genitori, l'analisi diventa molto difficile e il risultato finale meno affidabile. Il tipo di campionamento non-invasivo non permette di avere la certezza di campionare entrambi i genitori e pertanto la stima di quali esemplari, tra quelli risultati tra loro imparentati, possono essere i genitori e quali i figli viene fatta sulla base anche delle informazioni di campo.

***(h) Determinazione del fenotipo melanico***

Il melanismo, la colorazione nera del mantello, nei Mammiferi è un fenomeno comune, ma la frequenza di individui scuri è molto variabile e può differire enormemente anche per la stessa specie in popolazioni differenti. Esistono sette geni principali noti per influenzare la determinazione del colore e coinvolti nel complesso processo di determinazione della pigmentazione del manto. Questi



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

sono coinvolti come attivatori ed inibitori di due pigmenti: eumelanina, scura, e feomelanina, chiara. Nel lupo il fenomeno del melanismo è noto e diffuso; in alcune popolazioni, come in quella Nord Americana, raggiunge in alcuni casi anche percentuali elevate. Ad esempio oltre il 50% della popolazione che occupa il Parco di Yellowstone risulta completamente nera. In Europa il fenomeno del melanismo nel lupo non è comune: nonostante ciò, storicamente, alcuni autori riportano la presenza di alcuni esemplari neri fin dall'800. Apollonio *et al.* nel 2004 e Verardi *et al.* nel 2006 hanno messo in luce l'importanza della ricerca delle cause del fenomeno in Italia, evidenziando che la presenza degli individui neri poteva avere due possibili origini: da un lato la fissazione di una mutazione genetica casuale sorta spontaneamente nella popolazione di lupo, dall'altro la sua derivazione da un episodio di incrocio (ibridazione) con un cane nero. In ogni caso questa caratteristica, rara o completamente assente, è considerata atipica per gli individui europei. Lo stesso si può dire per la popolazione italiana di lupo, ove però da un ventennio a questa parte individui neri sono stati avvistati o filmati e sono state raccolte 12 carcasse attribuibili a lupo con fenotipo completamente nero. Le aree dove queste segnalazioni sono avvenute si trovano principalmente nell'Appennino Tosco Romagnolo ed in particolare 3 sono state rinvenute in aree limitrofe al territorio del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi (vedi Risultati capitolo e).

Pertanto a fronte del numero elevato di segnalazioni, avvistamenti, foto e filmati di individui neri, effettuate sia da forestali che da fotografi ed escursionisti, ed al reperimento di alcune carcasse di individui neri si è cercato di stabilire un metodo genetico in grado di rilevare inequivocabilmente gli esemplari dal manto nero. L'analisi della presenza di esemplari neri sul territorio è stata effettuata mediante l'uso di un marcatore genetico di recente identificato nel cane (Candille *et al.* 2007, Anderson *et al.* 2009), denominato K locus (CBD103DG23), e per cui è stato realizzato un sistema di primers specifici. Si tratta di una delezione di 3 basi su un gene coinvolto nella determinazione del colore del mantello (Candille *et al.* 2007) e presente anche nel lupo (Anderson *et al.* 2009). Gli individui neri di lupo identificati presentano questa delezione in eterozigoti, mentre i cani possono presentarla sia in omozigosi che in eterozigosi. I genotipi campionati nel parco sono stati analizzati anche per questo marcatore, dunque, per verificare la presenza della mutazione che determina il colore nero.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

*(i) Wolf-howling*

La metodologia del wolf-howling, o ululato indotto, consiste nello stimolare e successivamente identificare le vocalizzazioni del lupo. Molti carnivori, essendo poco sociali, fanno scarso uso della comunicazione acustica. Il lupo, che vive in branchi ed emette sonori ululati, costituisce in questo senso un'eccezione. È possibile, quindi, nelle zone frequentate dalla specie, ascoltare le sue vocalizzazioni, ed accertarne in tal modo la presenza. Anche questo, però, è un evento raro, a causa della scarsa densità delle popolazioni. Gli ululati possono essere allora stimolati con la tecnica del playback, che consiste nel diffondere suoni registrati, simulando così la presenza di un branco: può accadere allora che gli animali presenti nelle vicinanze rispondano, ululando a loro volta. Gli ululati del lupo sono udibili dall'uomo fino a circa due chilometri di distanza, e dagli altri lupi a distanze anche maggiori, che tuttavia possono essere limitate dalla presenza di ostacoli che si frappongono alla trasmissione del suono. I periodi più indicati per applicare il playback sono da febbraio ad aprile e da luglio ad ottobre, quando le probabilità di ottenere risposte sono maggiori.

Le grandi distanze che i lupi possono percorrere in poco tempo, ed alle quali possono udire gli ululati, rendono necessaria l'organizzazione di diverse squadre, che si mantengano in contatto via radio, e stimolino ululati indotti contemporaneamente da più aree accuratamente identificate. Perciò l'esecuzione di sessioni di wolf-howling ben pianificate in aree vaste di presenza del lupo richiede la disponibilità di mezzi ed uomini, ed è costosa. Il PNFC è stato in grado di finanziare sessioni di wolf-howling con copertura esaustiva del territorio e l'impiego simultaneo di diverse squadre negli anni 2001 e 2006. La prima sessione, che è stata realizzata nel 2001, ha coperto la maggior parte del territorio del Parco ed è stata coordinata dal Dott. Boscagli, operando con procedure analoghe alla sessione del 2006, che sono di seguito descritte.

Nel 2006, il CTA-CFS del Parco, in collaborazione con il personale del Laboratorio di genetica dell'ISPRA, ha programmato una sessione di wolf-howling condotta per punti, identificati opportunisticamente sulla base dei dati pregressi disponibili. Il metodo di indagine utilizzato è stato il "sondaggio per punti" che ha permesso di ottenere informazioni sulla presenza/assenza degli individui e l'accertamento dell'avvenuta riproduzione. Il "sondaggio per punti" consiste nella contemporanea presenza sul territorio di squadre addette all'emissione/ricezione degli ululati e squadre dedicate alla sola ricezione, disposte in modo da poter udire risposte anche non percepibili dalla sola squadra di emissione a causa della distanza, dell'orografia e di condizioni meteo non perfettamente favorevoli. Occorre notare che usualmente nel trimestre giugno-agosto la stimolabilità fonica del lupo risulta mediamente bassa, al contrario del periodo ottobre-aprile,



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

quando è massima. Sono state impiegate da quattro ad otto squadre, opportunamente formate e costituite da almeno due elementi ciascuna, di cui metà impegnate nel versante Romagnolo e le rimanenti in quello Toscano. Le uscite si sono svolte indicativamente tra le ore 20.00 pm e le ore 5.00 am del giorno successivo, percorrendo circa 200 Km per notte utilizzando automezzi Land Rover di servizio. La sessione è stata effettuata in modo tale da garantire la massima contemporaneità delle emissioni al fine di riuscire ad individuare risposte emesse da eventuali branchi confinanti. Nel 2006 sono state effettuate quattro uscite a settembre (notti del 5, 6, 7 e 8 settembre) e due uscite a novembre (notti dell'8 e 13 novembre). Sono stati utilizzati fino ad otto apparati, con otto squadre di emissione ed otto di ricezione (8 novembre). I punti di emissione e ricezione, 200 in tutto, distribuiti su un territorio di circa 40.000 ha, sono stati preventivamente individuati sulla base delle esperienze pregresse e delle informazioni ottenute elaborando le banche dei dati faunistici e genetici.

Ad ogni squadra sono stati forniti il percorso ed i punti da coprire, garantendo inoltre il contatto radio per la necessaria sincronia delle emissioni e degli ascolti.

Dopo aver verificato le attrezzature, si sono predisposti gli itinerari da portare a termine durante l'uscita, riportando lungo gli stessi i punti di emissione (E), con una freccia orientata nella direzione di propagazione del richiamo, e i corrispettivi punti di ricezione (R) collocati alla distanza massima di due km in linea d'aria dai precedenti, ottenendo così una pianificazione su carta di E1-R1, E2-R2 ecc ... . Si sono previste da 10 a 30 emissioni-ricezioni per notte. In caso di condizioni meteorologiche sfavorevoli e di vento con velocità superiore ai 12 km/h si è valutato caso per caso se fosse necessario sospendere, rimandare o cambiare area, coordinandosi con le pattuglie del versante opposto. La procedura standard ha previsto questa sequenza operativa: 1) posizionamento (durante il tramonto) delle due squadre nei punti prestabiliti; 2) accordo via radio sull'orario di emissione del richiamo; 3) emissione del richiamo; 4) attesa di almeno cinque minuti in assoluto silenzio dopo la conclusione del richiamo per la rilevazione di eventuali risposte; 5) contatto via radio tra le equipe per verificare reciprocamente l'esito; 6) compilazione delle schede di rilevazione; 7) spostamento ai punti di emissione e di ricezione successivi. Nell'eventualità di situazioni particolari come risposte di dubbia appartenenza o provenienza, o esigenze di approfondimento del risultato, è stato deciso al momento un diverso e più mirato modo di procedere. In caso di avvenuta risposta è stata accertata immediatamente l'ora, georeferenziata tramite GPS la posizione di ascolto ed individuata tramite bussola la direzione precisa di provenienza della risposta, in modo da poter confrontare i dati ottenuti dalle altre squadre. Successivamente si è indicato su carta topografica il luogo di presumibile provenienza della



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

vocalizzazione, sono state inoltre riportate informazioni relative alla presenza di cuccioli, alle condizioni meteo o a risposte di cani. Al termine del servizio notturno è stata catalogata la documentazione nell'apposita cartella e compilata la "Scheda Esito" predisposta.

### **(III) Risultati**

#### ***(a) Numero di campioni analizzati e resa di genotipizzazione***

I risultati che qui vengono presentati sono relativi all'intero progetto "Monitoraggio della presenza del lupo nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Campigna e Falterona tramite analisi genetiche di campioni non-invasivi" dall'anno 2002 al 2009, integrando tutti i dati raccolti nell'area del Parco ed in Provincia di Forlì Cesena dalla prima convenzione ad oggi. L'area di studio e la distribuzione del campionamento sono indicati in Fig. 1. Durante gli otto anni di attività di monitoraggio, sono stati raccolti e consegnati al Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (ex INFS) **1949** campioni biologici di presunto lupo: **1937** campioni non invasivi (prevalentemente di tipo fecale) e **12** invasivi (tessuto muscolare e sangue), provenienti da tutte le aree di studio presenti nel territorio del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Campigna e Falterona e nella Provincia di Forlì-Cesena (Tab. 1).



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

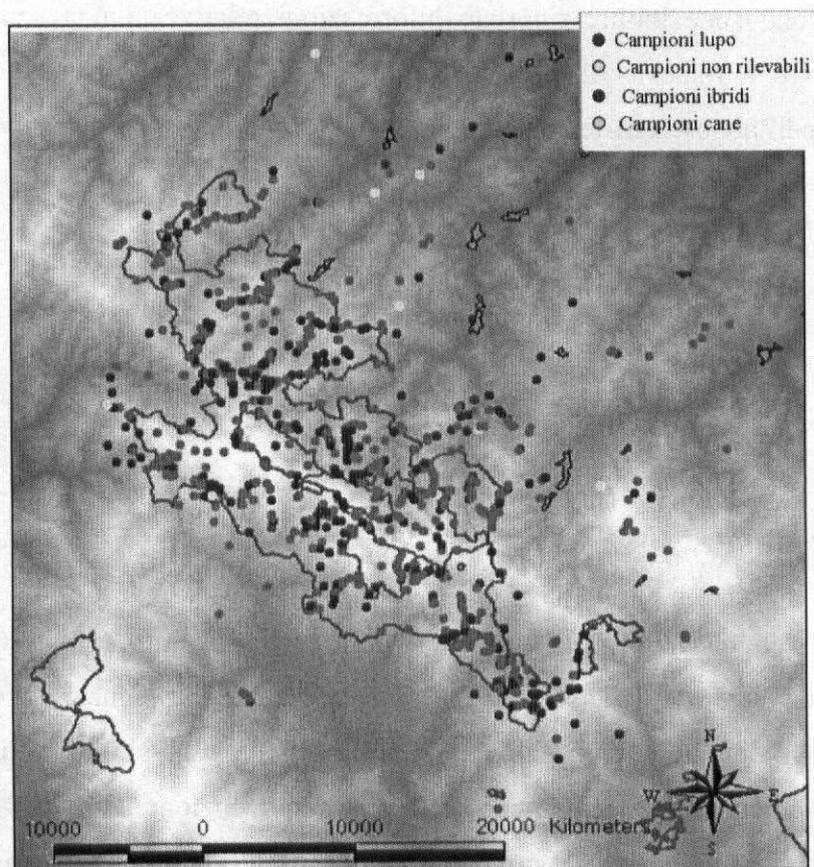


Figura 1. Il Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna. In blu scuro sono indicati i campioni analizzati e risultati appartenere alla popolazione italiana di lupi, in giallo quelli risultati di cane, in rosso quelli che hanno mostrato tracce genetiche di ibridazione. In azzurro i campioni analizzati ma che non hanno fornito risultati affidabili.

Tabella 1. Campioni raccolti ed analizzati dal 2002 al 2009 (\*nei soli mesi da gennaio a marzo).

| ANNO          | Campioni non-invasivi | Campioni invasivi | TOTALE      |
|---------------|-----------------------|-------------------|-------------|
| 2002          | 61                    | 0                 | 61          |
| 2003          | 135                   | 0                 | 135         |
| 2004          | 274                   | 1                 | 275         |
| 2005          | 218                   | 2                 | 220         |
| 2006          | 427                   | 4                 | 431         |
| 2007          | 409                   | 3                 | 412         |
| 2008          | 393                   | 1                 | 394         |
| 2009*         | 20                    | 1                 | 21          |
| <b>TOTALE</b> | <b>1937</b>           | <b>12</b>         | <b>1949</b> |



Tutti i suddetti campioni sono stati opportunamente analizzati ed ove possibile genotipizzati ed i relativi risultati sono stati comunicati al responsabile dell'Ente Parco entro la fine di settembre 2009. Dei **1937** campioni non invasivi analizzati, **1157 (59,7%)** non hanno fornito DNA sufficiente per lo svolgimento delle analisi. Per i rimanenti **780** campioni (**40,3%**), invece, è stato possibile ottenere DNA di buona qualità e i rispettivi genotipi *multi locus* sono risultati affidabili al test di qualità. I campioni genotipizzati con successo sono stati analizzati utilizzando il software GIMLET raggruppando quelli identici, cioè appartenenti allo stesso individuo. In questo modo sono stati identificati 165 distinti genotipi. (Fig. 2)

Nel corso del progetto, sono stati consegnati al personale del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA (ex INFS) **12** campioni invasivi prelevati da carcasse di canide rinvenute all'interno del territorio del Parco. Di questi, **10** sono stati genotipizzati con successo, mentre **2** sono risultati non rilevabili (Tab. 2).

Il numero di campioni raccolti ed analizzati è aumentato nel corso degli anni di progetto, mentre il numero di individui identificati dal 2006 è rimasto pressoché costante, come si può notare nella tabella 1 e nella figura 2.

Tabella 2. Tipologia e assegnazione dei campioni invasivi genotipizzati con successo.

| Campione | Località di ritrovamento                 | Tessuto           | Sesso | Anno | Specie rilevata |
|----------|--|-------------------|-------|------|-----------------|
| FC12     | Ginestreto (Sogliano)                    | pellicola/muscolo | F     | 2006 | lupo            |
| W777     | Montriolo                                | muscolo           | F     | 2004 | lupo            |
| W892     | PNFC                                     | muscolo           | F     | 2005 | lupo            |
| W915     | Poggio alla Lastra<br>(Bagno di Romagna) | muscolo           | ?     | 2006 | ibrido          |
| W931     | Compito                                  | muscolo           | M     | 2006 | lupo            |
| W940     | La Scodella                              | sangue            | M     | 2006 | lupo (WFO116M)  |
| W959     | Montelleri-Stia                          | muscolo           | ?     | 2007 | cane            |
| W978     | Sassello                                 | muscolo           | F     | 2007 | lupo            |
| W1021    | S. Umberto di S. Sofia                   | muscolo           | F     | 2008 | lupo            |
| W1022    | Rocca San Casciano                       | sangue/pellicola  | M     | 2009 | ibrido          |

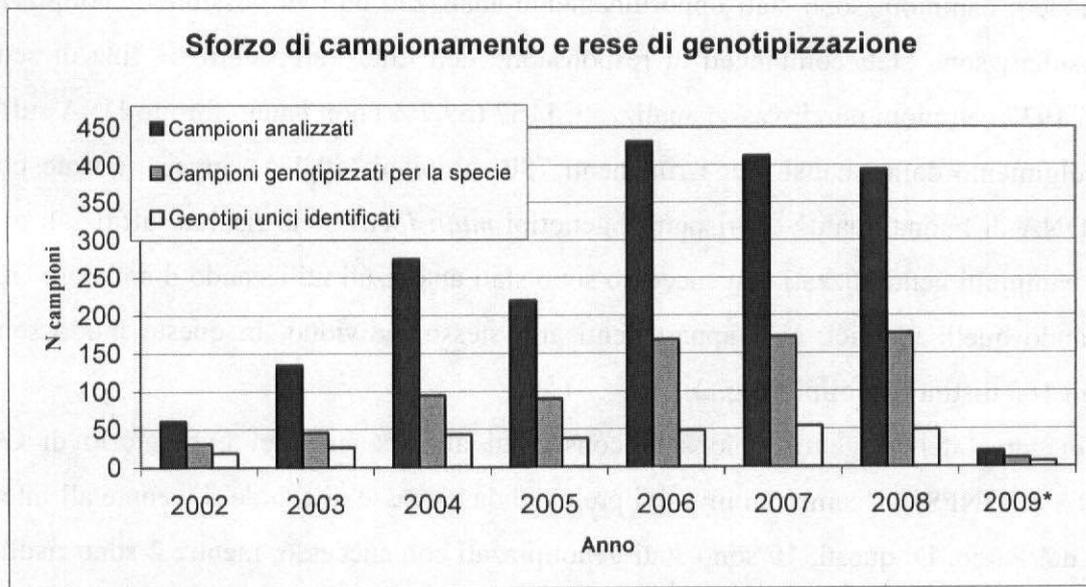


Figura 2. Istogramma che illustra il numero di campioni analizzati e genotipizzati con successo ogni anno, nonché il numero di genotipi unici identificati.

### **(b) Determinazione della specie e test di assegnazione**

I genotipi identificati e risultati affidabili sono stati analizzati per l'assegnazione della specie, utilizzando tutti i marcatori disponibili (12 loci micro satelliti, DNA mitocondriale e 3 loci microsatelliti sul cromosoma Y) ed il software STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003).

L'80,6% dei genotipi identificati (N = 126 non invasivi, N = 6 invasivi, N = 1 sia non invasivo che invasivo) sono risultati appartenere alla popolazione italiana di lupo. Questi genotipi mostravano l'aplotipo mitocondriale W14 unico presente nella popolazione italiana di lupo (Randi *et al.*; 2000), e gli aplotipi U o I al cromosoma Y, che sono quelli più frequenti osservati nella popolazione italiana di lupo. 27 genotipi (di cui uno ricavato da tessuto) sono invece stati identificati come appartenenti a cani domestici (16,3%). Solo due dei cani identificati sono stati campionati in due occasioni. La maggior parte dei campioni appartenenti a cani sono inoltre stati raccolti in territori vicini al confine del parco o all'esterno del parco (Fig. 1). Si presume pertanto che quelli individuati siano cani padronali, piuttosto che esemplari presenti stabilmente in forma inselvaticata o erratica nel territorio del Parco.

Il 3% dei genotipi (2 provenienti da tessuti e 3 da campioni non invasivi) hanno mostrato segni di ibridazione cane-lupo analizzando i loci microsatelliti nucleari e sul cromosoma Y (dove i



tre maschi hanno un aplotipo più frequente nei cani che nei lupi). Tutti i genotipi ibridi sono stati campionati una sola volta, ad eccezione del WFO109M, ricampionato tre volte da luglio ad ottobre 2007. Uno degli ibridi, catturato *in vivo* in località Rocca San Casciano (W1022M), presentava inoltre alcuni caratteri fenotipici intermedi tra lupo e cane.

*(c) Determinazione del sesso e distribuzione temporale dei genotipi*

I genotipi identificati appartenenti alla popolazione di lupo sono stati analizzati al locus ZFX/ZFY per la determinazione del sesso; in questo modo è stato possibile identificare 74 maschi e 59 femmine con un rapporto sessi di 1,25 M:1F. Analizzando i ricampionamenti degli individui nel tempo è stato possibile avere un'indicazione sulla permanenza degli stessi sul territorio e sul loro turnover. La maggior parte dei genotipi di lupo identificati in maniera non invasiva è stata campionata soltanto una volta (N = 47; 37%), due (N= 21; 16,5%), o tre (N=11; 8,6%) mentre i restanti 48 genotipi sono stati campionati più di tre volte (Fig. 3). Dei genotipi identificati in più occasioni, quello maggiormente campionato è WFO82F, che è stato genotipizzato 56 volte.

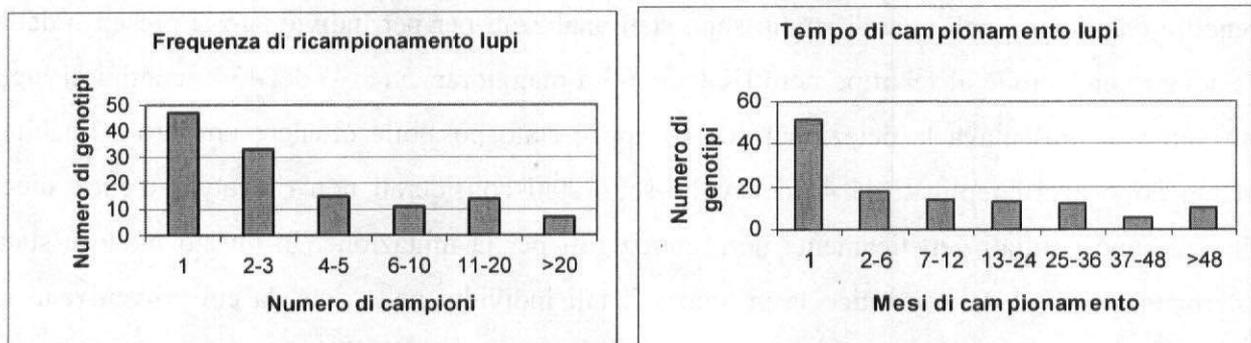


Figura 3. Istogramma dei ricampionamenti dei genotipi di lupo per via non invasiva (sinistra). Il numero medio di campionamenti per genotipo è di 3,1, quello massimo è pari a 56 (WFO82F). Istogramma indicante il tempo intercorso tra il primo e l'ultimo campionamento non invasivo dei genotipi unici di lupo (destra). Il tempo medio di campionamento è stato pari a 9 mesi, con un massimo di 68 (WFO27M).

*d) Analisi dei possibili eventi di dispersione*

All'interno del territorio del Parco sono stati identificati 3 individui (WFI6M, WRA1F, WRA7F) provenienti da altre amministrazioni provinciali e quindi riconducibili ad ipotetici eventi di dispersione. Lo stesso si può affermare per 6 individui che, campionati per la prima volta nel



territorio del Parco, sono stati poi campionati in altre province (WFO15M a Parma; WFO25M, WFO47M, WFO61M e WFO77M a Bologna; WFO46F a Reggio Emilia, Tab. 3).

Tabella 3. Eventi di dispersione identificati.

| Genotipo | Sesso | Primo campionamento |      | Ultimo campionamento |                | Direzione |
|----------|-------|---------------------|------|----------------------|----------------|-----------|
|          |       | Provincia/Parco     | Anno | Provincia/parco      | Anno           |           |
| WFI6M    | M     | FI-BO               | 2002 | PNFC                 | 2005-2006      | NO-SE     |
| WRA1F    | F     | RA                  | 2002 | PNFC/FC              | 2007           | NO-SE     |
| WRA7F    | F     | RA                  | 2005 | PNFC/FC              | 2006           | NO-SE     |
| WFO15M   | M     | PNFC                | 2002 | PR                   | 2004-2006      | SE-NO     |
| WFO25M   | M     | PNFC                | 2002 | FI-BO                | 2005-2006-2007 | SE-NO     |
| WFO46F   | F     | PNFC                | 2004 | RE                   | 2006           | SE-NO     |
| WFO47M   | M     | PNFC                | 2003 | BO-RA                | 2005           | SE-NO     |
| WFO61M   | M     | PNFC                | 2004 | BO                   | 2006-2007      | SE-NO     |
| WFO77M   | M     | PNFC                | 2005 | BO                   | 2007-2008      | SE-NO     |
| WFO89F   | F     | PNFC                | 2006 | FI                   | 2006           | SE-NO     |

#### *(e) Analisi della mutazione legata al manto nero*

I genotipi campionati nell'area di studio sono stati analizzati per individuare la presenza della delezione riconducibile al fenotipo nero (K locus). La maggioranza (114) dei 134 genotipi di lupo analizzati non presentava la delezione; per 10 non è stato possibile ottenere un dato affidabile, pertanto dopo averli replicati da 4 ad 8 volte sono stati considerati non rilevabili, mentre dieci individui sono risultati geneticamente neri, eterozigoti per la mutazione. In questo modo è stata confermata grazie al dato genetico la presenza di tali individui nelle aree da cui provenivano le segnalazioni (Fig. 4). Interpolando i dati relativi al nero con quelli di parentela si sono ottenute ulteriori informazioni utili alla ricostruzione dei pedigree; per maggiori dettagli si rimanda al capitolo successivo relativo alle analisi di parentela.

In sintesi, sette degli individui neri WFO1F WFO9F, WFO59F, WFO60M, WFO62M, WFO63F, WFO80M sono risultati riconducibili ad uno stesso gruppo familiare. Due genotipi WFI6F e WFO47M, anch'essi risultati neri sono legati da vincoli parentali. Per un unico genotipo nero WFO55M non sono stati evidenziati legami di parentela con altri individui. In totale sono stati analizzati per la mutazione del nero 134 differenti genotipi campionati nell'area del parco, oltre ad alcuni individui provenienti dalle aree limitrofe, in particolar modo dalla provincia di Forlì Cesena e



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

da Firenze. Sono state analizzate per la delezione 3 carcasse di lupi neri campionate nella zona di Arezzo a sud del Parco (Fig. 4) ed anche in questo caso la presenza della delezione corrispondeva al dato fenotipico.

Per meglio comprendere la diffusione del fenomeno sono stati inoltre analizzati 23 cani, campionati nell'area del Parco: due sono risultati omozigoti per la delezione che determina il nero, sei eterozigoti, quattordici non presentavano la mutazione; uno non è risultato rilevabile.

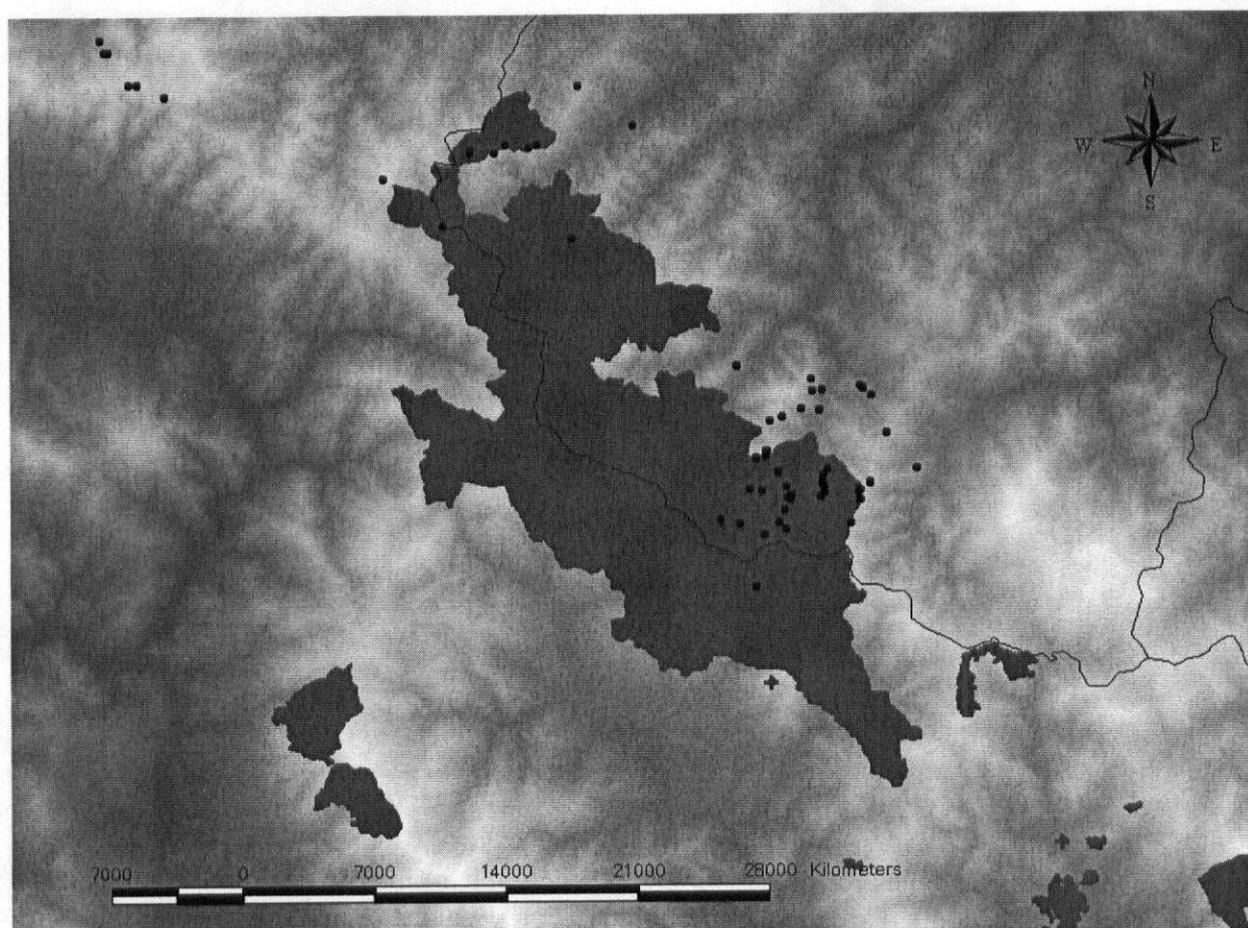


Figura 4. Localizzazione dei campionamenti relativi ai genotipi identificati come neri (per alcuni individui vi sono più ricampionamenti). I punti neri indicano i campionamenti non-invasivi mentre le croci rosse corrispondono alle tre carcasse nere rinvenute in provincia di Arezzo nelle immediate vicinanze del Parco.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

***(f) Analisi delle parentele ed individuazione degli ambiti territoriali***

Tramite il software ARCVIEW GIS v.3.1 (ESRI) è stato possibile localizzare sul territorio tutti i genotipi identificati e i successivi ricampionamenti avvenuti negli anni, individuando così gli individui territorialmente più stabili. Le aree con presenza contemporanea di più individui sono state indagate come possibili aree di occupazione di un branco. In questo modo abbiamo individuato 9 - 10 aree di presenza stabile del lupo all'interno del territorio del Parco (Fig. 5). Utilizzando poi il software PARENTE (Cercueil *et al.* 2002) abbiamo verificato le ipotesi di parentela esistenti fra gli individui presenti in tali aree.

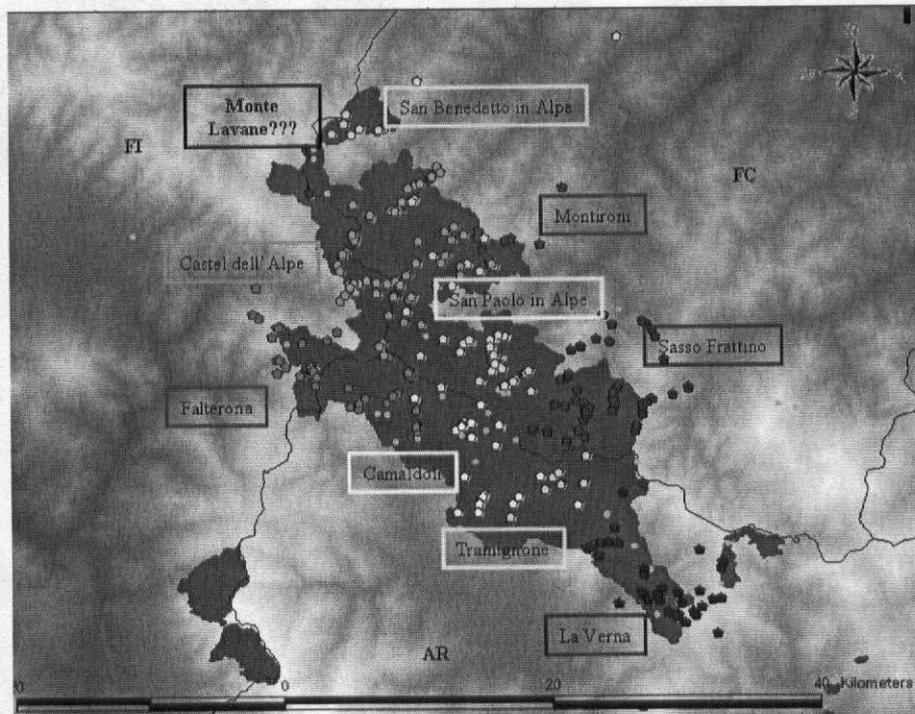


Figura 5. Localizzazione delle aree di presenza stabile del lupo all'interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna: San Benedetto in Alpe, Montironi, Castel dell'Alpe, San Paolo in Alpe, Sasso Fratino, Falterona, Camaldoli, Tramignone e La Verna. L'area di Monte Lavane, al confine settentrionale del Parco, è indicata come incerta (???) poiché per essa, non essendo stati collezionati campioni fecali, non sono disponibili dati genetici che ne supportino l'esistenza, nonostante i dati di *wolf-howling* del 2006 evidenzino la presenza della specie e l'accertata riproduzione.

Nella porzione del Parco che ricade nella provincia di Forlì-Cesena è stato possibile individuare cinque aree di presenza stabile del lupo:



## 1) San Benedetto in Alpe

Dalle analisi genetiche è emerso che quest'area include diversi individui campionati più volte nei vari anni di progetto: WFO6F, WFO10M, WFO36F, WFO47M, WFI6M e WFO84F,; solo tre di questi risultano imparentati (Fig. 6). WFI6M, WFO6F e WFO47M risultano eterozigoti al locus CBD103 ad indicazione di una colorazione melanica del mantello.

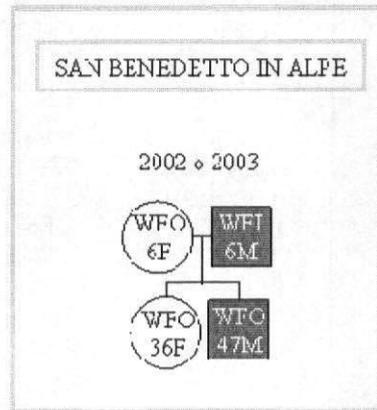


Figura 6. Relazioni parentali ricostruite tra gli individui identificati nell'area San Benedetto in Alpe negli anni 2002 e 2003.

## 2) Castel dell'Alpe (o Valbiancana)

In quest'area, a partire dagli ultimi mesi del 2002, è stata identificata una possibile coppia di individui dominanti, WFO16F e WFO18M, campionati rispettivamente da novembre 2002 a novembre 2004 e da dicembre 2002 a gennaio 2004. A partire da marzo 2004, insieme ad essi è stato campionato anche due nuovi individui, le femmine WFO68F e WFO39F, i cui genotipi risultano compatibili con l'ipotesi che possano essere figlie della coppia dominante, presumibilmente nate l'anno precedente (2003) (Fig. 9).

Dal 2004 quest'ultima femmina (WFO39F) sembra aver sostituito la femmina dominante e aver formato una nuova coppia con il maschio WFO69M (campionato da dicembre 2003 a febbraio 2008) che rimane stabile nell'area fino al 2006. Infatti, a partire dall'autunno 2004, sono stati identificati tre nuovi individui, WFO58F, WFO71M e WFO72F, tutti possibili figli di questa nuova coppia (Fig. 7). Dall'inizio del 2006 vengono campionati altri due nuovi individui, WFO78M e WFO120M, anch'essi possibili figli della nuova coppia, probabilmente nati nel 2005. Infine, ad ottobre del 2007 viene rinvenuta, in località Sassello, la carcassa di una giovane femmina, morta in seguito ad avvelenamento, W978F, anch'essa geneticamente possibile figlia



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

della coppia dominante, probabilmente nata l'anno precedente perché campionata anche in maniera non-invasiva ad aprile del 2007 in località Valbiancana. Infine a dicembre del 2008 è stato identificato un nuovo genotipo, WFO144M, figlio sempre dalla coppia precedente (Fig. 7)

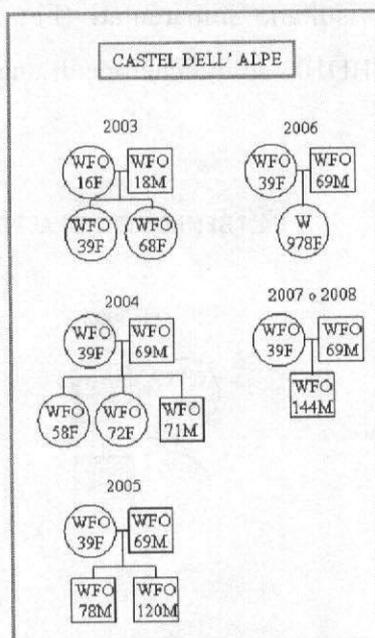


Figura 7. Pedigree che rappresenta le relazioni parentali tra i genotipi campionati nell'area di Castel dell'Alpe durante gli anni 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007.

### 3) San Paolo in Alpe

Fino al 2004 è stato possibile identificare semplicemente una serie di genotipi che non hanno permesso di ricostruire nessun tipo di ipotesi parentale. Per gli anni 2005 e 2006, invece, è stato possibile ricostruire delle genealogie affidabili, identificando come possibili dominanti i due individui presenti già nell'area da diversi anni, la femmina WFO8F (campionata da novembre 2002 a febbraio 2008) ed il maschio WFO27M (campionato da aprile 2003 a febbraio 2008). Infatti, da gennaio 2006, vengono campionati sei nuovi individui (WFO76M, WFO87M, WFO88F, WFO91M, WFO92M, WFO93M) che risultano tutti possibili figli della coppia dominante, presumibilmente nati nel 2005. Infine, un nuovo individuo (WFO122F), campionato da gennaio 2007, risulta anch'esso possibile figlio della stessa coppia dominante, probabilmente nato nel 2006. A fine 2007 inizio 2008 vengono campionati due nuovi individui WFO138F e WFO139F possibili figli (nati nel 2007) della stessa coppia (Fig. 8).

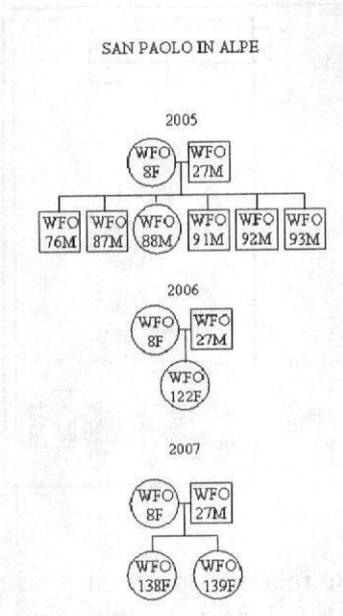


Figura 8. Pedigree che rappresenta le relazioni parentali tra i genotipi campionati nell'area di San Paolo in Alpe durante gli anni 2005 e 2006.

#### 4) Sasso Fratino (o Lama)

In quest'area, nonostante i dati di *wolf-howling* evidenzino l'avvenuta riproduzione per il 2006, è stato possibile ricostruire genealogie affidabili solo per gli anni 2003 e 2004, durante i quali è stata individuata come possibile coppia dominante quella costituita dai genotipi WFO9F (campionato da ottobre 2002 a febbraio 2005) e WFO2M (campionato da settembre 2002 a febbraio 2007). Il genotipo WFO59F, campionato in quest'area a partire da gennaio 2004, risulta geneticamente figlio della coppia, nato probabilmente durante il 2003. I genotipi WFO60M, WFO62M, WFO63F, WFO80M, campionati nell'area tra la fine del 2004 ed i primi mesi del 2005, risultano anch'essi tutti possibili figli della stessa coppia dominante, ma nati durante il 2004 (Fig. 9).

Quest'area è caratterizzata dalla presenza di individui di colore nero, più volte avvistati e fotografati. Le analisi genetiche hanno infatti confermato che la femmina dominante WFO9F e i figli presentano il polimorfismo associato al locus CBD103, che ne determina il melanismo.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

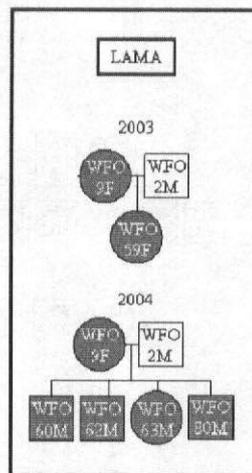


Figura 9. Pedigree che rappresenta le relazioni parentali tra i genotipi campionati nell'area di Sasso Frattino durante gli anni 2003 e 2004. Gli individui melanici sono colorati in grigio.

#### 5) Montironi (o Tiravento)

E' presente una serie di genotipi, apparentemente non legati da alcuna relazione di parentela. I lupi WFO6F e WFO20F sono stati campionati più volte, rispettivamente, da settembre 2002 a gennaio 2004, e da gennaio 2003 a febbraio 2007. Altri individui, WFO4M, WFO35M, WFO112M, sono stati campionati soltanto una volta ciascuno. Sempre in quest'area, in località Montriolo, ad ottobre 2004 è stata rinvenuta la carcassa W777, il cui genotipo appartiene alla popolazione italiana di lupo, ma che non era mai stata campionata prima di allora, e non risulta imparentata con nessuno degli individui presenti (Tab. 2).

La parte di territorio all'interno della Provincia di Arezzo invece risulta caratterizzata da tre aree di presenza stabile del lupo:

#### 6) Camaldoli (o Capanna Maremmana)

Quest'area è caratterizzata, nell'anno 2003, dalla presenza di una possibile coppia dominante costituita dagli individui WFO24F (campionato da dicembre 2002 a novembre 2007) e WFO19M (campionato da febbraio 2003 ad aprile 2004). A partire dalla fine del 2003 compaiono anche dagli individui WFO33M e WFO43M, che risultano entrambi possibili figli della coppia dominante, probabilmente nati durante il 2003. Per gli anni 2004 e 2005, pur essendo stati campionati una serie di individui (WFO24F, WFO33M, WFO34M, WFO43M e WFO46F), non è stato possibile ricostruire relazioni parentali affidabili. La situazione appare più chiara nel 2006, quando è stato possibile ricostruire le relazioni parentali esistenti fra gli



individui campionati. Compare infatti una nuova coppia dominante costituita ancora dalla femmina, FWO24F, e da un nuovo maschio, WFO34M, campionato da dicembre 2003 a gennaio 2008, che prende il posto del precedente maschio dominante (WFO19M, che non viene più campionato da maggio 2004). Insieme ad essi, a partire da febbraio 2007, vengono campionati anche due nuovi individui, WFO101F e WFO121M che risultano entrambi figli della nuova coppia, presumibilmente nati durante il 2006 confermando le risposte corali registrate durante il wolf-howling del 2006.

Tra fine 2007 e inizio 2008 vengono identificati sei nuovi genotipi (WFO127M, WFO130M, WFO131M, WFO132M, WFO134M e WFO143F) tutti possibili figli della coppia precedentemente identificata (Fig. 10).

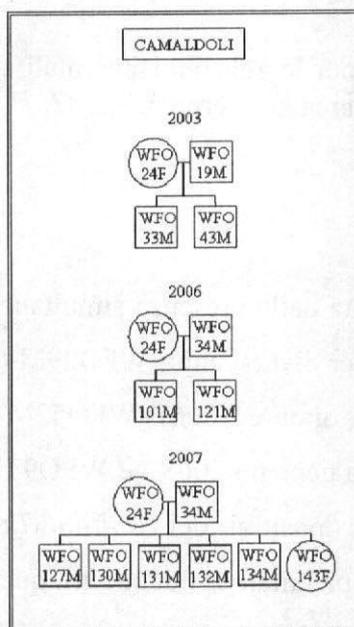


Figura 10. Pedigree che rappresenta le relazioni parentali tra i genotipi campionati nell'area di Camaldoli durante gli anni 2003 e 2006.

## 7) Tramignone

E' un'area caratterizzata dalla presenza di una serie di individui che transitano per brevi periodi di tempo. Probabilmente si tratta di individui stabili nei territori circostanti che compiono movimenti perlustrativi. L'unico individuo che sembra frequentare l'area con una certa regolarità è il lupo WFO105M, che viene campionato per tre anni consecutivi, da gennaio 2005 a gennaio 2008. Dal 2008 compare anche la femmina WFO126F, che insieme a WFO105M può



**ISPRa**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

aver costituito un nucleo familiare, poiché l'individuo WFO145M (che compare da dicembre 2008) risulta loro possibile figlio (Fig 11).

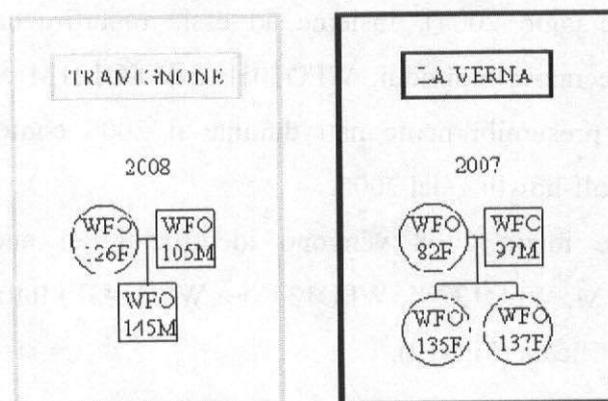


Figura 11. Pedigree che rappresenta le relazioni parentali tra i genotipi campionati nell'area di Tramignone durante il 2008 e nell'area La Verna nel 2007.

#### 8) La Verna (o Vallesanta).

Si tratta di un'area caratterizzata dalla presenza simultanea di diversi individui, alcuni dei quali campionati anche più volte e per diversi anni: WFO29M (da settembre 2002 a novembre 2007), WFO51F (da giugno 2004 ad ottobre 2006), WFO52M (da giugno 2004 a novembre 2006), WFO82F (da novembre 2005 a gennaio 2008) e WFO97M (da febbraio 2006 a febbraio 2008). Tuttavia, nonostante gli esiti positivi del *wolf-howling* del 2006, non è stato possibile identificare nessuna relazione parentale affidabile tra questi genotipi. All'interno di quest'area, in località Compito, ad ottobre 2006 è stata rinvenuta anche una carcassa (W931) che è risultata appartenere alla popolazione italiana di lupo, ma che non era mai stata precedentemente campionata e che non appare imparentata con nessuno degli individui presenti (Tab. 2). Solo nel 2007 due nuovi genotipi, WFO136M e WFO137F, possono essere figli della coppia WFO82F - WFO97M (Fig. 11).

Nell'area del Parco ricadente all'interno della Provincia di Firenze sono state identificate, infine, altre due aree corrispondenti ad altrettanti possibili ambiti territoriali:

#### 9) Monte Lavane.

I dati ottenuti durante le sessioni di *wolf-howling* effettuate nel 2006 evidenziano al suo interno



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

non solo la presenza della specie, ma anche l'accertata riproduzione. Tuttavia, non essendo stati collezionati e quindi analizzati campioni fecali provenienti da tale area, non sono disponibili dati genetici a supporto dell'ipotesi che anch'essa rappresenti un'area di presenza stabile del lupo appena fuori i confini del Parco, sul versante fiorentino dell'Appennino.

#### 10) Falterona (o Rincine):

Si tratta di un'area per la quale è stato possibile ottenere delle genealogie affidabili per gli anni 2003, 2005, 2006 e 2007. Nell'anno 2003, l'area è infatti caratterizzata dalla presenza della possibile coppia dominante costituita dagli individui WFO5F e WFO3M, campionati rispettivamente da ottobre 2002 a luglio 2007, e da ottobre 2002 ad aprile 2006. Insieme ad essi, tra la fine del 2003 ed i primi mesi del 2004, vengono campionati anche due nuovi individui, WFO37M e WFO38M, i cui genotipi risultano possibili figli della coppia dominante, probabilmente nati nel 2003.

Nonostante nel 2004-2005 sia ancora presente la coppia dominante, i dati disponibili per tale anno non permettono di ottenere genealogie affidabili. Al contrario, è possibile ottenere affidabili relazioni parentali fra gli individui presenti nell'area durante il 2006, concordando ancora una volta con gli esiti positivi del *wolf-howling*. Infatti la coppia dominante viene nuovamente campionata ed insieme ad essa, da aprile 2006, è presente un nuovo individuo, WFO99M, che dalle analisi di parentela risulta loro figlio, probabilmente nato nel 2005. Nel 2006 sembra essersi formata una nuova coppia, costituita ancora dalla femmina WFO5F, ma da un nuovo maschio, l'individuo WFO86M, campionato da aprile 2006 ad ottobre 2007, che avrebbe preso il posto del precedente maschio dominante (WFO3M), che infatti non viene più campionato proprio da aprile 2006. Insieme ad essi, a partire dalla primavera del 2007, vengono campionati altri due nuovi individui, WFO106M e WFO107M, i cui genotipi risultano figli della nuova coppia dominante confermando la scomparsa del maschio WFO3M. Infine all'inizio del 2008 viene identificato WFO128F come possibile figlio, nato nel 2007, sempre della stessa coppia dell'anno precedente (Fig. 12).



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

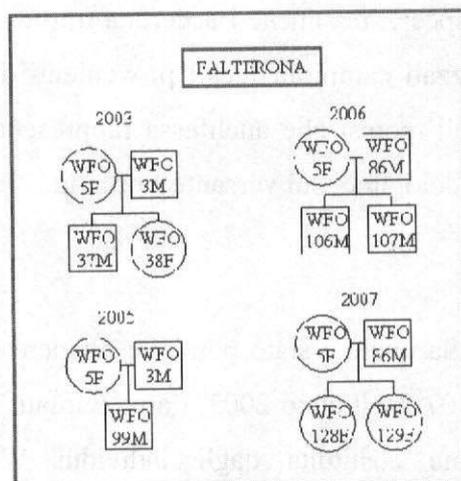


Figura 12. Pedigree che rappresenta le relazioni parentali tra i genotipi campionati nell'area di Falterona durante gli anni 2003, 2005, 2006 e 2007.

*(g) Individuazione dei nuclei familiari con la tecnica del wolf-howling*

Nel 2001 sono state condotte sessioni di wolf-howling che hanno coinvolto 43 dipendenti del CTA-CFS, nel periodo compreso tra il 31 ottobre e il 19 novembre per un totale di 20 uscite notturne, 13 delle quali sono risultate effettivamente utili. Complessivamente sono stati percorsi con gli automezzi 4.640 km, stimando una copertura di 49.870 ettari. L'analisi dei risultati è stata effettuata dopo un'attenta valutazione delle variabili che possono influenzare la percettibilità delle risposte e quindi la stima dei branchi/individui presenti, quali: 1) rilevazione ripetuta dei medesimi esemplari che si spostano tra un'emissione e l'altra, producendo quindi un doppio conteggio degli stessi individui; 2) possibili "effetti eco" che si producono nelle valli strette ed incassate dell'Appennino; 3) presenza di condizioni meteo non ottimali come pioggia, vento leggero; 4) la topografia dell'area investigata, che può limitare la diffusione del suono, limitando l'udibilità delle risposte. I risultati del wolf-howling hanno permesso di individuare nel 2001 da sei a sette branchi, in tre dei quali si è avuta risposta di giovani, attestando quindi l'avvenuta riproduzione (Tab. 4). Nel 2006 sono state ripetute due sessioni di wolf-howling, a settembre e a novembre, con le medesime metodiche utilizzate nel 2001. Le 16 squadre, divise in squadre di emissione e squadre di ricezione, hanno coperto una superficie di 40.000 ettari per un totale di sei notti di indagine.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

Tabella 4. Risultati relativi alle sessioni di *wolf-howling* effettuate negli anni 2001 e 2006. Si indica: la stima della superficie territoriale coperta dalle emissioni, il numero di branchi di lupo identificati, ed il numero di branchi con cuccioli.

| Anno | Periodo (uscite)                       | Superficie | Branchi | Con cuccioli |
|------|--|------------|---------|--------------|
| 2001 | 31-19 novembre (20)                    | 49.870 ha  | 6-7     | 3            |
| 2006 | 5-8 settembre (4)<br>8-13 novembre (2) | 40.000 ha  | 8-9     | 8            |

In Tab. 4 e Fig. 13 sono riassunti i risultati delle 21 risposte, ottenute in totale nel 2006. Nove di esse sono state caratterizzate da risposte corali (otto con cuccioli), mentre quattro sono state risposte di singoli individui e quindi non riconducibili a branchi (Tab. 4). Questo ha permesso di individuare nove nuclei (Fig. 13): uno al confine nord-ovest del Parco in Provincia di Firenze (Monte Lavane), tre nell'area centrale del Parco in Provincia di Forli-Cesena (Castel dell'Alpe, San Paolo in Alpe e Sasso Fratino/Lama), uno al confine nord-est (Montironi), quattro in Toscana in Provincia di Arezzo: due ad ovest (Falterona e Camaldoli) e due a sud (La Verna).

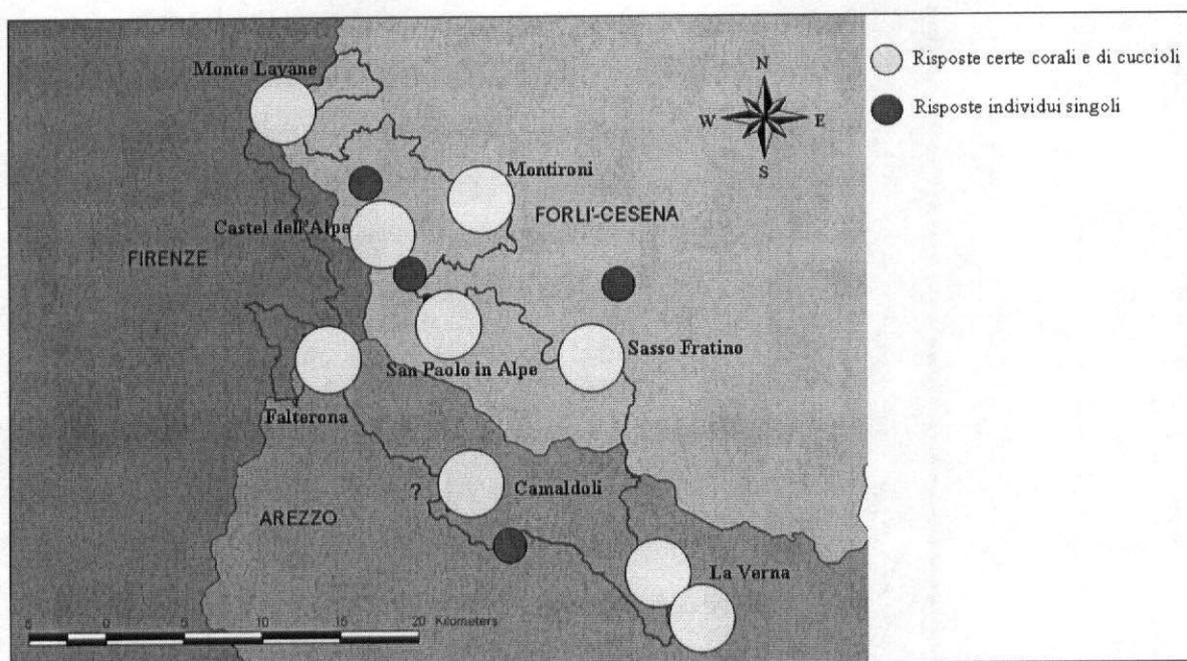


Figura 13. Localizzazione dei nove nuclei di lupo identificati mediante le risposte corali ottenute durante le sessioni di *wolf-howling* effettuate nel 2006.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

Alla realizzazione del progetto, in particolare per quanto riguarda le analisi genetiche di laboratorio, l'analisi e l'elaborazione dei dati, la collaborazione alla definizione e realizzazione degli schemi di campionamento, la formazione dei collaboratori e la divulgazione dei risultati, hanno partecipato:

Dott. Romolo Caniglia (Dottore di Ricerca del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA)

Dott. Elena Fabbri (Dottore di Ricerca del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA)

Dott. Claudia Greco (Dottore di Ricerca del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA)

Dott. Marco Galaverni (dottorando di Ricerca del Laboratorio di Genetica dell'ISPRA)

Il responsabile del laboratorio di genetica

Dott. Ettore Randi

**Bibliografia**

Anderson TM, vonHoldt BM, Candille SI, *et al.* 2009 Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. *Science*. Vol. 323: 1339 – 1343.

Anderson EC, Thompson EA; 2002. A model-based method for identifying species hybrids using *multilocus* genetic data. *Genetics*. Mar, 160(3): 1217-1229.

Apollonio M, Mattioli L, Scandura M (2004) Occurrence of black wolves in the Northern Apennines, Italy. *Acta Theriol.* 49 (2), 281-285.

ARCVIEW® GIS v.3.1, a desktop mapping program produced by ESRI (Environmental Systems Research Institute, Inc.).

Boitani L, Zimen E; 1975. Number and distribution of Wolves in Italy. In "IUCN/WWF 1st Technical Meeting of Wolf Group", D. Pimlott (ed.) Stockolm, 5-6 Sept. 1973 IUCN *Suppl. Pap.* 43: 73-78.

Candille SI, Kaelin CB, Cattanach BM, *et al.* 2007. A  $\beta$ -Defensin Mutation causes black coat color in Domestic Dogs, *Science* Vol 318: 1418 - 1423.

Cercueil A, Bellemain E, Manel S (2002) PARENTE: computer program for parentage analysis. *Journal of Heredity*, 93, 458-459.

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

Fabrizi E; 2004. Analisi dei processi di colonizzazione del lupo italiano nelle Alpi Occidentali: inferenze basate su analisi genetiche *multilocus* con campionamento non-invasivo. *Tesi di dottorato*-Università degli Studi di Ferrara.

Gerloff U, Schlotterer C, Rassmann K, Rambold I, Hohmann G, Fruth B, Tautz D.; 1995. Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, 4: 515-518.



- Lucchini V, Fabbri E, Marucco F *et al.*; 2002. Non-invasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the Western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11: 857-868.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP, 2002. Assessing allele dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160: 357-366.
- Pritchard JK , Donnelly P, Fallush D, Stephens M.; 2003. Inference of population structure using *multilocus* genotype data: linked *loci* and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Randi E, Lucchini V; 2002. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics*, vol. 3, no. 1: 29-43 (15).
- Randi E, Lucchini V, Fjeldsø Christiansen M *et al.*; 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and east European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology*, 14: 464-473.
- Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M, Vilà C (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 10, 1959-1966.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits L, Bouvet J; 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acid Research*, 24: 3189-3194.
- Valière N; 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology*, 2: 377-379.
- Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridisation between freeranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*, 15, 2845-2855.