



Centro
Grandi Carnivori



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TORINO



Progetto LIFE18 NAT/IT/000972 - LIFE WolfAlps EU
“Coordinated Actions to Improve Wolf-Human Coexistence at the Alpine Population Level”

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 ALPINE ITALIANE 2020/2021 (CON EVOLUZIONE DAL 1996 AL 2021)

Maggio 2022



Autori della relazione tecnica:

Marucco F.¹, E. Avanzinelli², M.V. Boiani³, S. Perrone¹, P. Dupont⁴, R. Bischof⁴, C. Milleret⁴, A. von Hardenberg³, K. Pilgrim⁵, O. Friard¹, F. Bisi⁶, G. Bombieri⁷, S. Calderola⁸, S. Carolfi⁹, C. Chioso¹⁰, U. Fattori¹¹, P. Ferrari⁹, A. Menzano², L. Pedrotti^{12,13}, D. Righetti¹⁴, M. Tomasella¹¹, F. Truc¹⁰, P. Aragno¹⁵, V. La Morgia¹⁵, P. Genovesi¹⁵

- (1) Università di Torino, Dipartimento Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi (Partner LWA EU)
- (2) Centro di riferimento Grandi Carnivori, Ente di Gestione delle Aree Protette delle Alpi Marittime (Partner LWA EU)
- (3) University of Chester, Department of Biological Sciences, UK
- (4) Norwegian University of Life Sciences, NMBU, Norway
- (5) National Genomics Center for Wildlife and Fish Conservation, Missoula, MT, USA
- (6) Università degli Studi dell'Insubria - Dipartimento di Scienze Teoriche e Applicate (incaricato da ERSAF, Partner LWA EU)
- (7) MUSE - Museo delle Scienze di Trento (Partner LWA EU)
- (8) Regione del Veneto, Direzione Agroambiente, Programmazione e Gestione ittica e faunistico-venatoria
- (9) Regione Liguria, Settore Politiche della Natura e delle aree Interne, Protette e Marine, Parchi e Biodiversità - Settore Fauna Selvatica, Caccia e Vigilanza Venatoria (Partner LWA EU)
- (10) Regione Autonoma Valle d'Aosta - Flora e fauna - Ufficio per la fauna selvatica e ittica (Partner LWA EU)
- (11) Regione autonoma Friuli Venezia Giulia, Osservatorio biodiversità
- (12) ERSAF, Regione Lombardia, DG Ambiente, Energia e Sviluppo sostenibile, Struttura Valorizzazione aree protette e biodiversità (Partner LWA EU)
- (13) Parco Nazionale dello Stelvio Trentino
- (14) Provincia Autonoma di Bolzano, Ufficio Caccia e Pesca
- (15) ISPRA, Dipartimento BIO, Servizio Coordinamento Fauna Selvatica e Area CFN e EPD

Il contributo dei vari autori è stato:

Coordinamento scientifico e tecnico generale di tutto il lavoro, dal campionamento all'analisi, accorpamento dei dati, stesura del documento: Marucco F., Avanzinelli E.

Stesura di parte dei testi: M.V. Boiani, S. Perrone, P. Dupont, R. Bischof, C. Milleret, K. Pilgrim (in originale in inglese per alcuni autori)

Coordinamento regionale/provinciale della raccolta dei dati (in ordine alfabetico): E. Avanzinelli (regione Piemonte e regione Veneto), F. Bisi (regione Lombardia), G. Bombieri (provincia di Trento), S. Calderola (regione Veneto), S. Carolfi (regione Liguria), C. Chioso (regione Valle d'Aosta), M. Tomasella e U. Fattori (regione Friuli Venezia Giulia), P. Ferrari (regione Liguria), F. Marucco (regione Piemonte), A. Menzano (regione Friuli Venezia Giulia e Piemonte), L. Pedrotti (regione Lombardia e provincia di Trento), D. Righetti (provincia di Bolzano), F. Truc (regione Valle d'Aosta)

Analisi statistiche e modellistiche e presentazione dei dati dei modelli statistici: P. Dupont, R. Bischof, C. Milleret, A. von Hardenberg, M.V. Boiani e F. Marucco; O. Friard per la gestione del dbase in Postgresql

Supervisione del lavoro nell'ambito del piano di monitoraggio nazionale italiano: P. Aragno, V. La Morgia, P. Genovesi

Indicazioni per la citazione:

Marucco F., E. Avanzinelli, M. V. Boiani, A. Menzano, S. Perrone, P. Dupont, R. Bischof, C. Milleret, A. von Hardenberg, K. Pilgrim, O. Friard, F. Bisi, G. Bombieri, S. Calderola, S. Carolfi, C. Chioso, U. Fattori, P. Ferrari, L. Pedrotti, D. Righetti, M. Tomasella, F. Truc, P. Aragno, V. La Morgia, P. Genovesi (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 ISPRA-MITE e nell'ambito del Progetto LIFE 18 NAT/IT/000972 WOLFALPS EU.

Il presente report cita per i trend i dati riportati nel dettaglio nel documento: Marucco F., E. Avanzinelli, B. Bassano, R. Bionda, F. Bisi, S. Calderola, C. Chioso, U. Fattori, L. Pedrotti, D. Righetti, E. Rossi, E. Tironi, F. Truc and K. Pilgrim, Engkjer C., Schwartz M (2018). La popolazione di lupo sulle Alpi Italiane 2014-2018. Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4 e D1, *consultabile e scaricabile al sito http://ex.lifewolfalps.eu/wp-content/uploads/2014/05/Report_monitoraggio_Alpi_completo.pdf*

Laboratori responsabili delle analisi genetiche

L'analisi genetica dei campioni delle regioni alpine, utilizzando marcatori di DNA microsatellite, ha avuto luogo in cinque laboratori di genetica. I 5 laboratori genetici che hanno contribuito alle analisi sono stati:

- National Genomics Laboratory, Missoula, incaricato dal LIFE WolfAlps EU per le analisi del Piemonte, nonché dal Centro Grandi Carnivori per le analisi sui campioni di Regione Veneto e Regione autonoma Friuli-Venezia-Giulia I responsabili delle analisi sono K. Pilgrim e M. Schwartz. Di seguito il laboratorio è citato come NGL.
- Laboratorio settore biotecnologie del Museo Regionale di Scienze naturali Efisio Noussan, Regione autonoma Valle d'Aosta, responsabile F. Guglielmo, per le analisi sui campioni della Regione Valle d'Aosta nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU. Di seguito il laboratorio è citato come MR-VA.
- Laboratorio di genetica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.S. Genetica e Tecniche Omiche Avanzate, per le analisi sui campioni della Regione Liguria nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU, i responsabili delle analisi sono PL Acutis, P. Modesto, e MV Riina. Di seguito il laboratorio è citato come IZS-PL.
- Laboratorio di genetica della Fondazione Edmund Mach (FEM), incaricato dalla Provincia autonoma di Trento e Bolzano, e dal Progetto LIFE WolfAlps EU per le analisi della Regione Lombardia, responsabile H. Hauffe. Di seguito il laboratorio è citato come FEM.
- Laboratorio di genetica dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Area per la Genetica della Conservazione (BIO-CGE), responsabili N. Mucci, R. Caniglia e E. Fabbri che hanno eseguito le analisi sui campioni di possibili ibridi, per la

valutazione dello stato di ibridazione nelle regioni alpine su campioni specifici. Di seguito il laboratorio è citato come ISPRA.

Il laboratorio responsabile delle analisi genetiche per il Progetto Life WolfAlps EU su gran parte delle Alpi italiane è stato il National Genomics Laboratory, del Center for Wildlife and Fish Conservation, RMRS, USFS, US, con il coordinamento della Dott.ssa K. Pilgrim, e il Dott. M. Schwartz. K.Pilgrim ha coordinato il lavoro di confronto genetico con gli altri laboratori sulla base del protocollo nazionale del Laboratorio di Genetica di ISPRA.

Con il contributo delle seguenti Istituzioni/Associazioni:

Istituzioni che hanno partecipato all'attuazione del Monitoraggio del Lupo nelle Regioni italiane, che hanno contribuito alla raccolta dati, e costituenti il Network Lupo Regioni Alpine:

Regione Piemonte:

Centro di Referenza Grandi Carnivori (Ente di gestione delle Aree protette delle Alpi Marittime)
Ente di gestione delle Aree protette delle Alpi Marittime
Ente di gestione delle Aree protette dell'Appennino Piemontese
Ente di gestione delle Aree protette del Monviso
Ente di gestione delle Aree protette delle Alpi Cozie
Ente di gestione delle Aree protette dell'Ossola
Ente di gestione delle Aree protette del Po Piemontese
Ente di gestione delle Aree protette della Valle Sesia
Ente di gestione delle Aree protette del Ticino e del Lago Maggiore
Ente di gestione del Parco Paleontologico Astigiano
Ente di gestione delle Aree protette dei Parchi Reali
Regione Piemonte – Settore Biodiversità ed Aree Naturali
Parco Nazionale del Gran Paradiso
Parco Nazionale della Val Grande
Parco Fluviale Gesso e Stura
Città Metropolitana di Torino – Polizia metropolitana, Servizio della Funzione specializzata Tutela Fauna e Flora, Direzione Sistemi Naturali e Guardie Ecologiche Volontarie (GEV)
Provincia di Alessandria – Ufficio tecnico faunistico provinciale, Polizia Provinciale e Guardie Ecologiche Volontarie (GEV)
Provincia di Asti – Polizia Provinciale, Servizio Ambiente Caccia-Pesca e Guardie Ecologiche Volontarie (GEV)
Provincia di Biella – Servizio Vigilanza Caccia e Pesca e Guardie Ecologiche Volontarie (GEV)
Provincia di Cuneo – Polizia faunistico ambientale, Servizio Tutela Flora e Fauna, Caccia e Pesca
Provincia del Verbano Cusio Ossola – Polizia Provinciale e Settore Tutela della Fauna
Provincia di Vercelli - Polizia Provinciale e Ufficio Biodiversità ed INFEA
Comune di Mondovì – Polizia Municipale
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Alessandria

Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Asti
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Biella
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Cuneo
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Torino
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Novara
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Verbano-Cusio-Ossola
Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Vercelli
CTA Parco Nazionale della Val Grande
Comprensori alpini: CACN1, CACN2, CACN4, CACN5, CATO1, CATO2, CATO3, CAB11
Ambiti Territoriale di Caccia: ATCCN5, ATCCN3, ATCCN1, ATCNO1, ATCNO2
Aziende Faunistico Venatorie: AFV “Vallone d’Otro”, AFV “Val Formazza”, “Carcoforo-Rimasco” e AFV “Albergian” (Associazione Sportiva Albergian)
Vigilanza ambientale del nucleo di Cuneo – WWF Italia
Museo Civico di Storia Naturale di Carmagnola
Guardia di Finanza – Stazione S.A.G.F. di Domodossola e di Riva Valdobbia
Arci Caccia Nazionale
Associazione Italiana Guide Ambientali Escursionistiche (AIGAE)
ASD La Ventura
CIPRA
Centro Recupero Animali Selvatici (CRAS) - Bernezzo (CN)
Coldiretti
Club Alpino Italiano (CAI) – Gruppo Grandi Carnivori
Legambiente Piemonte
Lega Italiana Protezione Uccelli (LIPU)
WWF Italia Onlus
Università degli Studi di Torino – Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi
Università degli Studi di Torino – Dipartimento di Scienze Veterinarie (per la verifica delle cause di mortalità e per le autopsie di lupo)
Servizi Veterinari Aziende Sanitarie Locali ASL AL, ASL AT, ASL CN1, ASL CN2, ASL TO3, ASL TO4, ASL TO5, ASL NO
Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte Liguria e Valle d’Aosta / Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (CeRMAS) (per la verifica delle cause di mortalità e per le autopsie di lupo)

Regione Autonoma Valle d’Aosta:

Regione Autonoma Valle d’Aosta - Flora e fauna - Ufficio per la fauna selvatica e ittica
Corpo Forestale della Valle d’Aosta
Parco Nazionale del Gran Paradiso
Parco Naturale del Mont Avic
Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte Liguria e Valle d’Aosta / Centro Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (CeRMAS)

Regione Lombardia:

Regione Lombardia, DG Ambiente, Energia e Sviluppo sostenibile, Struttura Valorizzazione aree protette e biodiversità
Parco Nazionale dello Stelvio - Ersaf Lombardia
Comando regionale Lombardia Carabinieri Forestale
Parco dell'Adamello
Parco Regionale delle Orobie Valtellinesi
Parco Regionale delle Orobie Bergamasche
Parco Regionale di Montevecchia e della Valle del Curone
Parco Lombardo della Valle del Ticino
Polizia Provinciale di Sondrio
Polizia Provinciale di Brescia
Polizia Provinciale di Como
Polizia Provinciale di Bergamo
Polizia Provinciale di Lecco
Polizia Provinciale di Varese
Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste
Azienda faunistico venatoria Valbelviso – Barbellino
Azienda faunistico venatoria Valbondone - Malgina
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna - Sezione di Sondrio
Università degli Studi dell'Insubria
Università degli Studi di Milano-Bicocca
CAI - Gruppo Grandi Carnivori

Province Autonome di Trento e Bolzano:

MUSE - Museo delle Scienze di Trento
Ufficio Parco Nazionale dello Stelvio Alto Adige
Ufficio Parco Nazionale dello Stelvio Trentino
Associazione Cacciatori Trentini
Provincia Autonoma di Trento, Servizio Foreste e Fauna, Settore Grandi Carnivori
Corpo Forestale della Provincia Autonoma di Trento
Provincia Autonoma di Bolzano, Servizio Forestale, Ufficio Caccia e Pesca
Parco Naturale Adamello Brenta
Parco Naturale Paneveggio – Pale di San Martino
Associazione Io non ho paura del lupo
SAT - Società degli Alpinisti Tridentini (CAI)
WWF Trentino
AIGAE Trentino

Regione Veneto:

Regione del Veneto, Direzione Agroambiente, Programmazione e Gestione ittica e faunistico-venatoria; U.O. Pianificazione e Gestione faunistico-venatoria; Ufficio Territoriale di Belluno; Ufficio territoriale di Treviso; Ufficio territoriale di Vicenza

Parco Nazionale Dolomiti Bellunesi

Parco naturale regionale della Lessinia

Parco naturale regionale delle Dolomiti d'Ampezzo

Parco regionale dei Colli Euganei

Polizia Provinciale di Belluno

Polizia Provinciale di Treviso

Polizia Provinciale di Verona

Polizia Provinciale di Vicenza

Comando Unità per la Tutela Forestale, Ambientale e Agroalimentare Carabinieri Veneto

Reparto Carabinieri Biodiversità Vittorio Veneto

Reparto Carabinieri Parco Nazionale Dolomiti Bellunesi

Reparto Carabinieri Biodiversità Verona

Gruppo Carabinieri Forestale Belluno

Gruppo Carabinieri Forestale Padova

Gruppo Carabinieri Forestale Treviso

Gruppo Carabinieri Forestale Vicenza

Gruppo Carabinieri Forestale Verona

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari

CAI - Gruppo Grandi Carnivori

Associazione Io Non Ho Paura del Lupo

Associazione Naturalistica G. Lorenzoni

Associazione Faunisti Veneti (AS.FA.VE.)

AIGAE

Tutti i Volontari del Network Monitoraggio Lupo Veneto

Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia:

Regione autonoma Friuli Venezia Giulia

Corpo Forestale regionale

Servizio paesaggio e biodiversità – Osservatorio biodiversità

Servizio caccia e risorse ittiche

Reparto Carabinieri Biodiversità di Tarvisio

Università degli studi di Udine, Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali

Associazione Therion research group

Associazione Progetto Lince Italia

Associazione Io non ho paura del lupo

CAI - Gruppo Grandi Carnivori

Regione Liguria:

Regione Liguria

Dipartimento Agricoltura, Turismo, Formazione e Lavoro

*Settore Politiche della Natura e delle aree Interne, Protette e Marine, Parchi e Biodiversità -
Settore Fauna Selvatica, Caccia e Vigilanza Venatoria - Nucleo regionale di Vigilanza Faunistico -
Ambientale*

Carabinieri Forestale – Comando Regione Carabinieri Forestale Liguria

Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Genova

Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Imperia

Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale La Spezia

Carabinieri Forestale – Gruppo Carabinieri Forestale Savona

Carabinieri Forestale – Reparto Carabinieri Parco Nazionale Cinque Terre

Nucleo Comando Carabinieri CITES Genova

Nucleo Comando Carabinieri CITES Imperia

Parco Naturale Regionale delle Alpi Liguri

Parco Naturale Regionale dell'Antola

Parco Naturale Regionale dell'Aveto

Parco Naturale Regionale del Beigua

Parco Nazionale delle Cinque Terre

Parco Naturale Regionale di Piana Crixia

Città Metropolitana di Genova

Provincia di Imperia

Provincia della Spezia

Provincia di Savona

Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (per le analisi genetiche e per le autopsie di lupo).

Si ringraziano tutte le Associazioni e gli Enti che a causa dell'emergenza Covid non hanno potuto partecipare pur avendo dato la loro disponibilità.

Ringraziamenti:

Molti sono gli enti, i professionisti, i tecnici ed i volontari coinvolti nella raccolta dati. Si ringraziano calorosamente i guardiaparco, gli agenti provinciali e forestali, le guardie ecologiche volontarie, i guardiacaccia, i tecnici, i volontari, i veterinari, i ricercatori, i coordinatori, i direttori, i presidenti degli Enti e di tutte le Associazioni citati precedentemente che hanno collaborato al programma di monitoraggio del lupo sul territorio delle regioni alpine.

Indice

Riassunto	9
Abstract	12
1. Introduzione e obiettivi del monitoraggio nazionale dello status della popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane	15
1.1 Il ritorno del lupo sull'arco alpino dal 1993 al 2018: contestualizzazione storica per una corretta interpretazione dei risultati e del trend	17
2. Metodi di campionamento e di analisi dello status della popolazione di lupo nelle regioni alpine Italiane nel 2020/2021	21
2.1 Il disegno di studio: la strategia di campionamento, i criteri standard ed i metodi applicati....	21
2.1.1 Riassunto dei criteri standard per l'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti	25
2.2 Il Network di operatori: la formazione e il coordinamento nelle regioni	27
2.2.1 La gestione del flusso dei dati e l'APP GAIA Observer	31
2.3 Le analisi genetiche sui campioni biologici raccolti	31
2.4 Analisi dei dati per le stime di distribuzione e consistenza della popolazione	34
2.4.1. Modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito	34
3. La popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane nel 2020/2021	36
3.1 Lo sforzo di campionamento	36
3.2 I dati raccolti sulla presenza del lupo nel 2020-2021	39
3.3 I risultati genetici sui campioni biologici analizzati	41
3.4 La distribuzione della popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane e il trend	41
3.5 La stima dell'abbondanza della popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane	46
3.6 I casi di ibridazione cane/lupo documentati per la prima volta nelle Regioni alpine	51
APPENDICI - DETTAGLI SUI METODI ADOTTATI E SUI RISULTATI OTTENUTI	56
APPENDICE 1. Le analisi genetiche e i protocolli di laboratorio del NGL	56
APPENDICE 2. Le analisi statistiche e i modelli espliciti spaziali di cattura-ricattura (SECR)	58
APPENDICE 3. Descrizione nel dettaglio delle analisi del laboratorio NGL, condotte su regione Piemonte, Veneto e Friuli Venezia Giulia	63
BIBLIOGRAFIA	65

Riassunto

Per la realizzazione del primo campionamento nazionale della specie nel 2020-2021 e, soprattutto, per porre le basi per un monitoraggio congiunto del lupo a scala nazionale nel lungo termine, sono state predisposte da ISPRA le “Linee Guida e Protocolli per il monitoraggio del lupo in Italia” che hanno delineato la strategia generale che è stata adottata in tutta Italia. Gli schemi di campionamento e i protocolli sono stati pertanto individuati per stimare la **consistenza (intesa come numero di individui, N)** e la **distribuzione (range minimo occupato) della specie**.

Nelle regioni alpine, in considerazione della conoscenza pregressa della specie e della rete coordinata di monitoraggio già esistente, attiva in modo continuativo dal 1999 al 2021, **si è optato per il campionamento ambizioso del 100% del territorio**. La presenza del lupo è stata ottenuta campionando in modo sistematico tutte le celle dove, nell'anno precedente, si erano riscontrati segni di presenza, ed in modo opportunistico tutte le celle delle regioni alpine. **Il campionamento sistematico si è basato su un effort controllato e quantificato, sia spazialmente sia temporalmente**, perché organizzato sulla base di uscite programmate su transetti. Il campionamento opportunistico è stato svolto in maniera non pianificata. Per effettuare un campionamento di questa entità è stato necessario un gran numero di operatori, adeguatamente formati, ed un buon coordinamento.

Il Centro di riferimento Grandi Carnivori (CGC) e l'Università di Torino (DBIOS) nell'ambito del Progetto LIFE WOLFALPS EU, in contatto e in sinergia con ISPRA, hanno coordinato il lavoro nelle regioni alpine, dando indicazioni sulla modalità di formazione degli operatori, sul campionamento, sulla raccolta ed archiviazione dei dati. **Il coordinamento delle regioni alpine è stato concretizzato, quindi, con la creazione di un gruppo tecnico di referenti regionali, che hanno lavorato in modo sinergico e congiunto per la realizzazione del campionamento. Sono stati realizzati, tra settembre e novembre 2020, un totale di 25 eventi formativi**. Il gruppo di personale istituzionale e volontario, che ha ricevuto una formazione specifica, costituisce il “**Network Lupo Regioni Alpine**”, operativo in modo continuo e capillare sul territorio per la raccolta di tutti i dati utili al monitoraggio della specie, che contribuisce sia al campionamento opportunistico (sempre e ovunque), sia al campionamento sistematico invernale lungo i transetti e con le fototrappole. **Hanno partecipato al campionamento sistematico un totale di 1198 operatori del Network, afferenti a 160 Enti/Associazioni**. Il contributo del Network nel campionamento opportunistico aumenta fino ad un **totale di 1513 operatori distribuiti nelle varie province delle regioni alpine. Il Network Lupo rappresenta un patrimonio di alta qualità nel lungo termine**.

Nell'anno 2020-2021, in totale, nelle regioni alpine sono stati percorsi 1776 transetti, e utilizzate 501 fototrappole. Nel periodo compreso tra ottobre 2020 e aprile 2021 sono stati percorsi dagli operatori un totale di 40725 km. Sono stati registrati 10672 dati di presenza attribuiti al lupo sulla base dei criteri di accuratezza di tipo C1 e C2. In particolare, sono stati documentati 5636 escrementi, individuati 1604,5 km di tracce di lupo, catalogati 3226 video/foto verificate. Sono inoltre stati recuperati 71 lupi morti.

Molti dei campioni biologici raccolti sono stati analizzati geneticamente da 5 laboratori di genetica tra loro coordinati, per un totale di **792 campioni analizzati con successo, che hanno fornito il profilo genetico dell'individuo (genotipo)**. Questi dati sono stati utilizzati per documentare le storie di ricattura dei singoli individui, indispensabili per la stima della consistenza della specie e la determinazione dei branchi. I campioni, senza considerare i tessuti, risultano associati a **449 genotipi unici**, quindi a 449 lupi diversi (222 femmine; 213 maschi; 14 non determinati), che risultano essere la stima minima degli individui presenti in modo certo. Il tasso medio di ricattura è di 1,66 (ds = 1,13) rilevamenti per individuo.

La distribuzione del lupo, considerando il range minimo di presenza nelle regioni alpine nel 2020-2021 e l'anno biologico della specie (1° maggio 2020- 30 aprile 2021), **è stato stimato di 41600 km² (416 celle 10x10km² con presenza documentata**, che corrisponde al **36,8% del totale del territorio delle regioni alpine)**, di cui l'83,9% documentato con dati C1 ed il restante con dati C2. Il territorio montano delle regioni

occidentali è quasi completamente occupato e i segni di presenza certi sono ormai confermati e frequenti anche in aree collinari e di pianura, dove la specie si è insediata stabilmente. Nel resto delle Alpi centro-orientali, seppur sia evidente l'espansione rispetto al 2017-2018, in particolare lungo la fascia trentino/veneta, ci sono ancora molte aree alpine, sia di ambiente montano che pedemontano, dove il lupo non è stato ancora documentato.

Considerando unicamente il range alpino (non delle intere regioni), si è valutata una comparazione con i dati precedentemente raccolti. La valutazione del trend di crescita della distribuzione non ha incluso i dati dell'Appennino ligure e piemontese, dove i lupi erano già presenti in passato, ma non erano stati considerati nell'ultima stima di distribuzione del 2017-2018. **Nel range alpino si documenta in tre anni (dal 2017-2018 al 2020-2021), un raddoppio delle celle con accertata presenza della specie.**

La stima della **consistenza numerica della popolazione di lupo nelle regioni alpine** si è basata inizialmente sulla **stima minima del numero di branchi**, coerente con quanto documentato negli anni precedenti e con quanto stimato dalle altre nazioni alpine, e che permette quindi: 1) una valutazione del trend in quanto a numero di unità riproduttive (branchi/coppie) documentate nel tempo, e 2) un confronto spaziale con le altre nazioni con cui è condivisa la popolazione sulle Alpi. Questa stima è considerata quella biologicamente più significativa per una popolazione in fase di ricolonizzazione, come quella del lupo sulle Alpi. In maniera più accurata, la consistenza numerica della popolazione si è basata sulla **stima esaustiva del numero di lupi con valutazione del livello di precisione della stima (intervalli di credibilità)**. È la prima volta che questa stima viene realizzata a livello di regioni alpine e a scala nazionale. La stima esaustiva della consistenza della popolazione è ottenuta tramite l'applicazione di un **modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito (SECR)**, che ha richiesto uno sforzo di campionamento quantificato tramite la percorrenza dei transetti, e un campionamento genetico non invasivo esteso a tutte le regioni alpine. Questo modello ha fornito anche la **stima esaustiva del numero di branchi con valutazione degli intervalli di credibilità della stima**, che è stato confrontato con la stima minima precedentemente descritta.

Nel 2020-2021 sono stati documentati, nelle regioni alpine, un totale minimo di 124 unità riproduttive, costituite da 102 branchi e 22 coppie, la maggior parte dei quali presenti nella porzione occidentale. Nelle regioni centro-orientali 12 branchi, dei 25 documentati, sono di tipo transregionale. Vista l'elevata presenza di questi branchi transregionali, diventa difficile l'attribuzione di un branco o un numero di lupi a un unico territorio amministrativo, considerando la grandezza dei territori e le capacità di spostamento tipiche della specie. Questo esercizio è pertanto privo di significato dal punto di vista biologico per branchi condivisi tra zone ad alta frammentazione amministrativa. Per questo i numeri devono essere letti in primis in un'ottica d'insieme, successivamente, per facilità di interpretazione si sono distinte **le due parti caratteristiche della popolazione delle regioni alpine: la parte centro-est e la parte centro-ovest**. Con questa distinzione, biologicamente più corretta, **il totale del numero di unità riproduttive per il centro-est delle regioni alpine è di 33 branchi/coppie, ed il centro-ovest di 91 branchi/coppie**. Anche in questo caso, si è valutata una comparazione nel tempo del numero di unità riproduttive considerando unicamente il range Alpi. Dall'ultima stima minima del 2017-2018, le unità riproduttive (coppie e branchi) nelle Alpi **dopo tre anni (al 2020-2021) sono raddoppiate, passando da 51 a 103**.

Grazie al campionamento genetico non invasivo intensivo e la quantificazione dello sforzo di campionamento, è stato possibile applicare modelli SECR bayesiani per la stima esaustiva della consistenza della popolazione di lupo, con la collaborazione di tre Università specialistiche in materia (Norwegian University of Life Sciences, Università di Torino e Università di Chester). **L'abbondanza dei lupi per l'intera area di studio, che comprende tutte le regioni italiane alpine, durante l'inverno 2020-2021, è stata stimata (con un intervallo di credibilità al 95%) di 946 individui (CI95%: 822-1099)**. Sulla base della localizzazione dei centri di attività individuali prevista dal modello SECR bayesiano, abbiamo stimato che tra questi, **680 (CI95%: 602-774) individui fanno parte della parte centro-occidentale della popolazione e 266 (CI95%: 204-343) appartengono alla sezione centro-orientale**. Inoltre, è stato possibile tramite il modello **stimare in modo esaustivo la presenza di 134 unità riproduttive nelle regioni alpine (CI95%: 112-161)**. Si tratta della prima stima di unità riproduttive a larga scala con un livello di credibilità associato. Se confrontiamo questa stima esaustiva del numero di unità riproduttive di 134 (CI95%: 112- 161), con la stima minima certa documentata

di 124 unità riproduttive, vediamo che le stime sono coerenti, in particolare considerando che la stima minima è mancante dei branchi della regione Liguria, invece stimati dal modello SECR bayesiano. Infine, **nella stagione 2020-2021, sono stati documentati i primi 4 casi di branchi riproduttivi con ibridazione lupo-cane, in Liguria, Piemonte e Friuli Venezia Giulia. Due branchi ibridi sono presenti sul territorio alpino delle regioni alpine, e due sul territorio appenninico.**

In conclusione, la raccolta di dati di presenza del lupo, realizzata a scala nazionale in contemporanea per la prima volta nell'inverno 2020-2021, ha restituito una stima diretta di distribuzione e consistenza della specie a scala italiana. Queste stime sono accompagnate da valutazioni quantitative di precisione e credibilità, dato imprescindibile per la corretta interpretazione dei risultati e fondamentale per la pianificazione di future attività di raccolta dei dati e gestione della specie. In particolare, la limitata ampiezza degli intervalli di credibilità relativi alla stima della consistenza rappresenta un punto di forza dei risultati ottenuti per la rilevazione di variazioni significative future. Con questo lavoro, si è così superata la frammentazione amministrativa e metodologica, caratteristica dell'Italia, realizzando sotto il coordinamento di ISPRA un'unica indagine. Il campionamento ha comportato uno sforzo logistico, tecnico e di coordinamento molto ingente, che ha coinvolto operatori, istituzioni e associazioni di tutta Italia, che hanno collaborato per creare un network di operatori presenti in modo capillare e costante sul territorio nazionale. **La creazione di una rete nazionale di operatori formati è uno dei risultati più importanti di questo lavoro, patrimonio importante per la conservazione della biodiversità a scala nazionale nel lungo termine.**

Abstract

The wolf population in the Italian alpine regions in 2020-2021

(with evolution from 1996 to 2021)

The "Guidelines and Protocols for Wolf Monitoring in Italy" were prepared by ISPRA to carry out the first coordinated national wolf survey in 2020-2021 and, most importantly, to lay the foundation for wolf monitoring on a national scale in the long-term. Sampling schemes and protocols were identified to estimate abundance (number of individuals, N) and distribution (minimum occupied range) of the species.

The presence of the species was estimated across the entire range by systematically sampling cells where signs of presence had been found the previous year, and by opportunistically sampling all the cells in the alpine regions. Systematic sampling was based on planned and regularly surveyed transects in order to quantify and control for the heterogeneity in search effort, both spatially and temporally. Opportunistic sampling was carried out in an unplanned manner. This sampling strategy required a large number of operators to cover the entire alpine regions, and intense coordination.

The Large Carnivore Center (CGC) and the University of Turin (DBIOS), within the framework of the LIFE WOLFALPS EU Project and in synergy with ISPRA, coordinated the alpine regions, giving guidance on how to train operators, sampling strategies, and data collection. The coordination of the Alpine regions was based on a technical group of regional reference technicians, who worked synergistically to implement the surveys. A total of 25 training events were held between September and November 2020. The specifically trained operators constituted the "Wolf Network," operating continuously and extensively throughout the territory to collect data, and contribute to both opportunistic sampling and systematic winter surveys along transects and/or with camera traps. A total of 1198 operators, belonging to 160 institutions or associations, participated in systematic sampling. The Network's contribution to opportunistic sampling increased to a total of 1513 operators distributed throughout the various provinces of the Alpine regions. The Wolf Network represents a high-quality asset in the long term.

In 2020-2021, a total of 1776 transects were traveled in the Alpine regions, and 501 camera traps were used. In the period from October 2020 to April 2021, a total of 40725 km was traveled by operators. In total, 10672 wolf presence data were recorded based on C1 and C2 accuracy criteria. Specifically, 5636 scats were collected, 1604.5 km of wolf tracks were followed, and 3226 verified videos/photos were recorded. In addition, 71 dead wolves were recovered.

Many of the samples were genetically analyzed among 5 coordinated genetics laboratories, resulting in a total of 792 successfully genotyped samples. These data were used to create the recapture histories of individuals, which are essential for estimating wolf abundance using spatial capture-recapture methods. The samples, without considering tissues, were associated with 449 unique genotypes, thus 449 different wolves (222 females; 213 males; 14 NA), which represents the minimum estimate of the number of individuals present. The average recapture rate was 1.66 (sd = 1.13) detections per individual.

The distribution of wolves, considering the minimum range of presence in the Alpine regions in 2020-2021, was estimated at 41600 km². It was documented with only C1-C2 type data, which demonstrates the high quality of collected data, distributed over 416 cells (36,8% of the total sampling grid). The mountainous areas of the western range were almost completely occupied, and signs of presence are now confirmed and frequent even in hilly and lowland areas, where the presence has become permanent. In the rest of the Central and Eastern Alps, although expansion is evident compared to 2017-2018, particularly along the Trentino/Veneto range, there are still many alpine areas, where wolf presence has not yet been documented, for both mountain and foothill environments.

Considering only the alpine range (not the entire regions), a comparison with previously collected data was performed. The evaluation of the distribution trend did not include data from the Ligurian and Piedmont Apennines, where wolves were already present in the past but were not considered in the last distribution estimate of 2017-2018. Wolf distribution further increased over the last three years (2017-2018 to 2020-2021): the number of cells occupied doubled.

The estimation of wolf population size in the Alpine regions was firstly based on the minimum estimate of pack numbers, consistent with what has been done in previous years and with what has been estimated by other Alpine countries. This minimum estimate allowed an assessment of the trend in the number of reproductive units (packs/pairs) documented over time. This estimate is considered biologically meaningful for a population undergoing recolonization, such as the wolf population in the Alps. More accurately, the estimate of population size was based on the exhaustive estimate of the number of wolves with an evaluation of the level of precision of the estimate (credibility intervals). This evaluation has been carried out for the first time at the alpine population level, and returned the first comprehensive estimate of population size through the application of a spatially explicit capture-recapture model (SECR), which required a quantified sampling effort, and non-invasive genetic sampling extended to all alpine regions. This model also provided an estimate of the number of reproductive units with credibility intervals, which was compared with the previously described minimum estimate.

In 2020-2021, 124 breeding units, consisting of 102 packs and 22 pairs, were documented in the alpine regions, most of which were in the western range. In the central and eastern regions, 12 packs, of the 25 documented, were transregional. Given the presence of these transregional packs, it became difficult to attribute a pack or a number of wolves to a single administrative unit, considering the size of the territories and the species' typical movement behavior. Therefore, this exercise is biologically meaningless for packs in areas with high administrative fragmentation. Numbers should be reported from an overall perspective, where it is more biologically meaningful to distinguish between populations found in the central-eastern and central-western Alpine regions. With this distinction, the estimated total number of breeding units is 33 packs/pairs in the central-eastern range and 91 packs/pairs in the central-western one. Again, a comparison over time of the number of reproductive units was evaluated by considering only the Alps range. Since the last estimate in 2017-2018 in the Alps, in three years (up to 2020-2021), the minimum number of breeding units (pairs and packs) doubled from 51 to 103.

Through intensive non-invasive genetic sampling and quantification of sampling effort, it was possible to conduct a comprehensive analysis for the estimation of wolf population size in collaboration with three universities (Norwegian University of Life Sciences, University of Turin, and University of Chester). Mean wolf abundance for the entire study area, which included all Italian alpine regions, during the winter of 2020-2021, was estimated (with a 95% credibility interval) to be 946 individuals (CI95%: 822-1099). Based on the location of individual activity centers predicted by the model, we estimated that among these, 680 (CI95%:602-774) individuals belong to the west-central part of the population and 266 (CI95%:204-343) individuals instead belong to the east-central section of the population. In addition, it was possible to estimate the presence of 134 breeding units (CI95%:112-161). This represents the first large-scale estimate of reproductive units with an associated level of credibility. If we compare this comprehensive estimate, with the documented minimum number of 124 breeding units, we see that the estimates are consistent, especially considering that the minimum estimate was lacking packs in the Liguria region, which were included in the Bayesian SECR model.

Finally, in the 2020-2021 season, the first 4 cases of wolf-dog hybridization have been documented in reproductive packs in Liguria, Piedmont, and Friuli Venezia Giulia. Two hybrid packs were present in the alpine territory of Alpine regions and two in the Apennine territory.

In conclusion, the first wolf monitoring program carried out at the national scale in 2020-2021 has provided direct estimates of distribution and abundance of the species for Italy. These estimates are accompanied by quantitative assessments of accuracy, an essential information for the correct interpretation of the results

and fundamental for planning future data collection and management activities for the species. In particular, the estimates with credible intervals represent an important result, which will allow the detection of significant future variations. With this work, the administrative and methodological fragmentation, typical of Italy, has been overcome by implementing a single survey under the coordination of ISPRA. The sampling required a huge logistical, technical, and coordination effort, involving operators, institutions, and associations from all over Italy, who collaborated to create a network of operators spread throughout the country. The creation of a national network of trained operators is one of the most important results of this work, an important asset for biodiversity conservation at the national scale in the long term.

1. Introduzione e obiettivi del monitoraggio nazionale dello status della popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane

Per la realizzazione del primo campionamento omogeneo nazionale della specie realizzato nel 2020-2021 e, soprattutto, per porre le basi per un monitoraggio congiunto del lupo a scala nazionale, sono state predisposte da ISPRA le **“Linee Guida e Protocolli per il monitoraggio del lupo in Italia”** (Marucco et al., 2020), che delineano la strategia generale per il primo campionamento nazionale, seguendo le precedenti indicazioni formulate in Genovesi (2006), Ciucci e Boitani (2011) e Marucco et al. (2014).

In linea con la più recente tendenza di valorizzazione del monitoraggio come strumento attivo di conservazione e attenta gestione (Nichols et al. 2006), la strategia di monitoraggio del lupo applicata sulle regioni italiane è finalizzata alla valutazione del raggiungimento di obiettivi gestionali e ad un adattamento e miglioramento continuo delle strategie di conservazione della specie. Il primo passo compiuto tramite la strategia proposta è consistito nella definizione degli **obiettivi**, esplicitando le finalità di conservazione e gestione della specie. I risultati dei campionamenti dovranno infatti costituire la base di future scelte gestionali e permettere di valutare il raggiungimento degli obiettivi di conservazione, *in primis* il mantenimento, a livello nazionale, di uno *status* di conservazione favorevole della specie. A tal fine, tenendo presente quanto richiesto dalla Direttiva 92/43/CEE ‘Habitat’, la scelta degli **attributi** da monitorare è ricaduta **sull’abbondanza o consistenza (intesa come numero di individui, N) e sulla distribuzione (range minimo occupato) della specie**. Data la peculiare organizzazione sociale della specie, l’identificazione di questi attributi ha portato anche a riconoscere la necessità di considerare come **unità di campionamento non solo il singolo individuo, ma anche il branco, che rappresenta l’unità riproduttiva fondamentale**, su cui si struttura la dinamica di popolazione per il lupo. Inoltre nel contesto alpino, il branco è l’attributo comune richiesto nel monitoraggio della popolazione transfrontaliera, e che permette il confronto con gli altri Stati (WAG, 2022). Il numero e la distribuzione dei branchi sono pertanto parametri fondamentali nella definizione del campionamento per il periodo 2020-2021 nelle Regioni alpine (e non per le regioni della Penisola italiana) (Marucco et al. 2020). A questi parametri, si sono aggiunti quelli relativi alla localizzazione di eventi di ibridazione con il cane, ancora minimi sul territorio delle regioni alpine, e quindi obiettivo di monitoraggio nel tempo.

Gli schemi di campionamento e i protocolli di seguito esposti sono stati pertanto individuati sulla base degli obiettivi e dalle motivazioni enunciate, tenendo presente la necessità di raggiungere una **omogeneità nel campionamento** della popolazione di lupo tra le regioni alpine e le regioni appenniniche. L’espansione del lupo sia in Appennino sia sulle Alpi ha reso necessaria la differenziazione tra la popolazione di lupo appenninica e quella alpina, considerate due entità gestionali separate secondo le “Guidelines for Population Level Management Plans for Large Carnivores” approvate nel 2008 dalla DG Ambiente della Commissione Europea e dal Comitato Permanente della Convenzione di Berna (Linnell et al. 2008). La linea spaziale di demarcazione tra le due popolazioni è stata arbitrariamente individuata in corrispondenza del Colle di Cadibona (WAG 2022). In realtà le due popolazioni potrebbero essere considerate una sola, sia dal punto di vista genetico, non essendoci una chiara struttura genetica e condividendo lo stesso pool genetico dall’Aspromonte alle Alpi, sia dal punto di vista demografico, essendo distribuite su un’area pressoché continua. La differenza riguarda piuttosto l’aspetto ecologico-gestionale, poichè la popolazione appenninica è distribuita interamente sul territorio italiano, mentre quella alpina è condivisa tra più Paesi (Italia, Francia, Svizzera, Germania, Austria e Slovenia), motivo per cui è richiesto un approccio di collaborazione internazionale alle Regioni alpine. Con l’espansione del lupo nelle zone di pianura, lontane dalle Alpi e dagli Appennini, la distribuzione della specie si è estesa, determinando la necessità di implementare un

campionamento all'intero territorio nazionale, che è stato suddiviso tra le Regioni alpine e Regioni dell'Italia peninsulare (Figura 1), abbandonando il criterio di demarcazione geografica tra le due popolazioni, individuato convenzionalmente in corrispondenza del Colle di Cadibona.

La presente relazione tecnica descrive il campionamento 2020-2021 delle Regioni alpine, ed i relativi risultati.



Figura 1. Regioni della Zona Alpi e regioni della Zona dell'Italia Peninsulare con sovrainpressa la griglia di campionamento nazionale (10x10 km) da Marucco et al. 2020.

La strategia di campionamento (Marucco et al. 2020) è stata disegnata per permettere un confronto finale dei risultati a scala nazionale, e l'approccio di campionamento adottato nelle Regioni alpine e nelle regioni dell'Italia peninsulare è stato simile, lasciando comunque un margine di adattamento del disegno di studio alle due situazioni geografiche distinte. Le differenze di campionamento, eseguito in maniera esaustiva per le Regioni alpine, sono dovute principalmente a due aspetti importanti descritti di seguito:

1. **la presenza già esistente di una rete di monitoraggio coordinata alpina italiana, attiva in modo continuativo dal 1999 al 2021, che ha prodotto negli anni dati uniformi sulla specie nel contesto alpino, per una popolazione in fase di ricolonizzazione e di dimensione inferiore rispetto a quella appenninica.** In ambito alpino la frammentazione delle pratiche gestionali e del monitoraggio è stata da subito individuata come una delle principali minacce alla conservazione della specie a partire dal primo ritorno del lupo a fine anni '90. Questa consapevolezza ha permesso che si avviasse un percorso di coordinamento, attuato in primis nell'ovest delle Alpi con il Progetto Lupo Piemonte (1999-2012) e poi esteso su tutte le regioni alpine con il coordinamento del Progetto LIFE WolfAlps (2013-2018) e, fino ad oggi, grazie alla sua prosecuzione nel Progetto LIFE WolfAlps EU (2019-2024). Il percorso di coordinamento, già presente nelle Regioni alpine, ha permesso la realizzazione in tempo breve di un'estesa rete di operatori che, anche data la più ridotta distribuzione della specie rispetto all'Appennino, hanno campionato in modo esaustivo l'intero territorio di possibile presenza della specie. Inoltre la

popolazione è monitorata fin dalle origini, e l'insediamento di ogni branco è stato seguito nel dettaglio dal 1999, solo con qualche interruzione (cfr, cap. 1.1).

Gli obiettivi e la strategia di monitoraggio nazionale sono stati gli stessi per entrambe le zone, le differenze di applicazione riguardano principalmente lo sforzo e l'estensione del campionamento (Marucco et al. 2020).

- 2. la condivisione transfrontaliera della popolazione alpina con Francia, Svizzera, Austria e Slovenia.** In un quadro gestionale transfrontaliero è richiesto un approccio di collaborazione internazionale, come suggerito dal Piano di Azione in Italia ed in Europa, in cui è suggerito a tutti i Paesi membri della CE di monitorare e gestire il lupo a livello di popolazione, senza tener conto dei confini geografici, piuttosto mantenendo e migliorando la connessione con le popolazioni vicine. In quest'ottica nel 2000 è nato il Wolf Alpine Group (WAG), un gruppo di esperti dei vari Paesi alpini che aggiornano ogni 3-4 anni, sulla base delle informazioni disponibili, lo stato della presenza del lupo sulle Alpi. Allo stesso modo il Large Carnivore Initiative for Europe (LCIE, www.lcie.org), gruppo specialistico dell'Unione Mondiale per la Conservazione della Natura (IUCN), in collaborazione con il WAG per la popolazione alpina, aggiorna ogni 6 anni lo stato della presenza del lupo a livello europeo. Grazie a queste forme di collaborazione, le tempistiche di valutazione della popolazione alpina transfrontaliera tra gli Stati sono state gestite in sinergia con i Paesi confinanti per gli anni 2020-2021 e 2023-2024 (WAG, 2022). Pertanto, la presente valutazione dello status della popolazione alpina di lupo sulle Regioni alpine italiane si inserisce in un contesto di effettiva collaborazione internazionale finalizzata a contribuire ad aggiornare lo status della specie, nei documenti che saranno redatti sia a livello alpino transfrontaliero, sia a livello europeo.

1.1 Il ritorno del lupo sull'arco alpino dal 1993 al 2018: contestualizzazione storica per una corretta interpretazione dei risultati e del trend

Dagli anni '80 il lupo ha recuperato parte del suo territorio originale sull'Appennino e ha iniziato a ricolonizzare naturalmente le Alpi sud-occidentali di Italia e Francia per naturale dispersione dalla popolazione appenninica dagli anni '90 (Fabbri et al. 2007). Nel 1993/1994 è stata documentata la presenza del primo branco transfrontaliero nel Parco Nazionale del Mercantour (Francia meridionale) (Poulle et al. 1995). Dall'inverno 1995/1996 la presenza del lupo risultava stabile sul territorio alpino italiano con un branco nel Parco Naturale della Valle Pesio (CN) nelle Alpi Liguri-Marittime e successivamente uno in Valle Stura (CN) ed un altro nel Parco Naturale del Gran Bosco di Salbertrand (TO) (Marucco et al. 2010). Il ritorno del lupo sulle Alpi occidentali a partire dai primi anni Novanta del secolo scorso, dopo circa 70 anni di assenza, è stato un evento di grande interesse e significato non solo ecologico ma anche sociale e culturale, che ha implicato importanti scelte gestionali per ridurre i conflitti con la zootecnia. La Regione Piemonte ha finanziato il Progetto Lupo Piemonte dal 1999 prima nell'ambito di un'iniziativa INTERREG, poi, dal 2002 fino al 2012, con risorse regionali sotto il coordinamento del Centro Gestione e Conservazione Grandi Carnivori del Parco Naturale Alpi Marittime. Nell'ambito del Progetto Lupo Piemonte con un Network di biologi, veterinari, guardiaparco, personale del CFS, Comprensori Alpini e Province, si sono iniziati a studiare nel dettaglio i lupi della popolazione italiana alpina, le loro storie individuali e di branco, si è documentata l'espansione territoriale, il formarsi di nuovi branchi e le dispersioni naturali fino alle Alpi centrali e orientali. Allo stesso tempo in Francia l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) ha studiato nel dettaglio l'espansione del lupo sulle Alpi francesi con metodi e obiettivi simili a quelli del Progetto Lupo Piemonte, e fin dal 2000 si sono confrontati annualmente i dati per documentare la presenza di branchi transfrontalieri.

Nel 2014 la popolazione di lupo si era insediata in forma stabile nella parte occidentale delle Alpi, tra Francia e Italia (WAG 2014). Sul versante italiano la maggior parte dei branchi riproduttivi era presente in regione Piemonte (Marucco et al. 2012). In Francia, è stato documentato un *trend* simile a quello osservato sul versante italiano (Duchamp et al. 2012), che confermava l'internazionalità di questa popolazione, come un *unicum* biologico nelle Alpi occidentali. In particolare, dal 2000 i ricercatori italiani del Progetto Lupo Piemonte insieme ai colleghi francesi dell'ONCFS e a quelli svizzeri del KORA, hanno costituito il Wolf Alpine Group (WAG) ed iniziato a lavorare in modo congiunto. Dal 2010 il gruppo si è esteso a Germania, Austria e Slovenia. Grazie a questo approccio sinergico, nel 2012, sono stati documentati su tutto il territorio alpino internazionale un totale di 35 branchi e 6 nuove coppie di lupo, la maggior parte presenti sulle Alpi occidentali italo-francesi, alcuni con territorio transfrontaliero (WAG 2014). In Svizzera, dal 1994 è stata registrata la presenza di singoli individui provenienti dalla popolazione alpina italiana e francese (Valiere et al. 2003), ma mai di branchi; la presenza del primo branco riproduttivo è stata documentata solo nell'estate del 2012 (WAG 2014). In Austria sono arrivati i primi lupi in dispersione dal 2008 non solo dalla popolazione di lupo italiana, ma anche da quella dinarica e dei Carpazi (WAG 2014). Già dal 2010 sono state documentate le prime dispersioni di lupo anche nel settore centro-orientale delle Alpi italiane: un primo lupo era presente dal 2010 tra il Trentino, in Val di Non, e la provincia di Bolzano, in Val d'Ultimo, e una prima coppia ha stabilito il suo territorio tra Trentino e Veneto nei pressi del Parco Naturale della Lessinia. In particolare quest'ultima coppia si era costituita dall'incontro tra un lupo arrivato per naturale dispersione dalle Alpi Dinariche della Slovenia (il famoso Slavc) e una lupa arrivata dalle Alpi occidentali. Questa coppia si è riprodotta con successo per la prima volta nell'estate 2013. Questo fenomeno ha contribuito a documentare il ricongiungimento sull'arco alpino della popolazione di lupo italiana con quella dinarica, dopo più di un secolo. Una coppia con stessa doppia origine è stata campionata anche nel 2013-2014 in Friuli nelle Prealpi Pordenonesi.

Quindi nel 2013, prima dell'inizio del Progetto LIFE WolfAlps, la popolazione di lupo sulle Alpi occupava in modo stabile solo una parte del *range* potenzialmente utilizzabile, principalmente sul lato occidentale. È importante evidenziare il fatto che un lupo in dispersione è solo di passaggio, anche se può causare i primi problemi con la zootecnia, ma solo la formazione di un branco, che nasce dall'incontro di un lupo maschio ed una femmina che si stabiliscono su un territorio e si riproducono, può essere considerata il ritorno effettivo della specie. Dopo due anni di mancanza di dati e aggiornamenti di distribuzione in regione Piemonte (2012/2013 e 2013/2014), a fine 2013 è stato finanziato il progetto LIFE WolfAlps, per favorire azioni coordinate per la conservazione del lupo sull'intero arco alpino. Una delle prime azioni intraprese è consistita nella **riorganizzazione di un monitoraggio sistematico**, ma questa volta **su tutto il territorio alpino italiano** per stimare le tendenze demografiche della specie e raccogliere dati oggettivi sullo status della popolazione di lupo, fondamentali per qualsiasi azione di gestione. La **strategia di campionamento** per il monitoraggio della specie ed i relativi obiettivi sono stati definiti in dettaglio nel documento "Strategia, metodi e criteri per il monitoraggio dello stato di conservazione della popolazione di lupo sulle Alpi italiane" (Marucco et al. 2014) redatto nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps. Il campionamento attivo applicato si è basato su una raccolta dati organizzata sia in modo sistematico sia opportunistico da parte di personale opportunamente preparato su protocolli standardizzati. È stato utilizzato un programma di lavoro metodico e costante, calendarizzato a livello regionale, e adattato alle esigenze e alle disponibilità locali, e conformemente con i protocolli integrati, francesi, svizzeri e sloveni. La metodologia non invasiva applicata si è basata su snow-tracking, wolf-howling, analisi genetiche di campioni biologici e fototrappolaggio ed è stata focalizzata sul **rilievo della presenza di branchi, coppie ed individui solitari con territorio stabile**. Tutto ciò ha permesso di avere **dati confrontabili su larga scala e realizzare così nell'anno 2014/2015 il primo monitoraggio standardizzato del lupo per l'arco alpino italiano. Lo stesso monitoraggio è stato replicato nell'anno 2015/2016 e 2017/2018.**

Il personale degli Enti coinvolti nel Progetto è stato preparato nell'ambito di corsi di formazione ad hoc e ha costituito il primo **Network Lupo Alpino di monitoraggio del lupo**, operativo sul territorio per la raccolta dei dati e dei campioni, composto da **circa 456 operatori** appartenenti a 43 Enti distribuiti sull'intero territorio alpino (Aree protette regionali e nazionali, Corpo Forestale dello Stato oggi Carabinieri-Forestale, Regioni e Province Autonome e non, Comprensori Alpini di Caccia, Ambiti Territoriali di Caccia), costituendo una risorsa di alta qualità, che è poi stata riattivata ed estesa, per questo campionamento nazionale 2020-2021. Il monitoraggio, coordinato dal Centro di riferimento Grandi Carnivori (Ente di Gestione Aree Protette Alpi Marittime), si è svolto inoltre in collaborazione con le Associazioni di categoria (allevatori, cacciatori, conservazionisti), le Università, I.Z.S. ed i Servizi Sanitari regionali (A.S.L.). I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'areale totale minimo di presenza della popolazione di lupo alpina era stimato nel 2017-2018 di 17.500 km². In particolare, è stato evidenziato che **la presenza del lupo era in continua crescita sull'arco alpino italiano**, e come atteso **la popolazione è aumentata rispetto al 2012**, raggiungendo **nell'anno 2017-2018** almeno **46 branchi e 5 coppie per un totale di 51 unità riproduttive** documentate con dati C1, ed una stima minima di **287 lupi**, la maggior parte dei quali presenti in Piemonte (Figura 2).

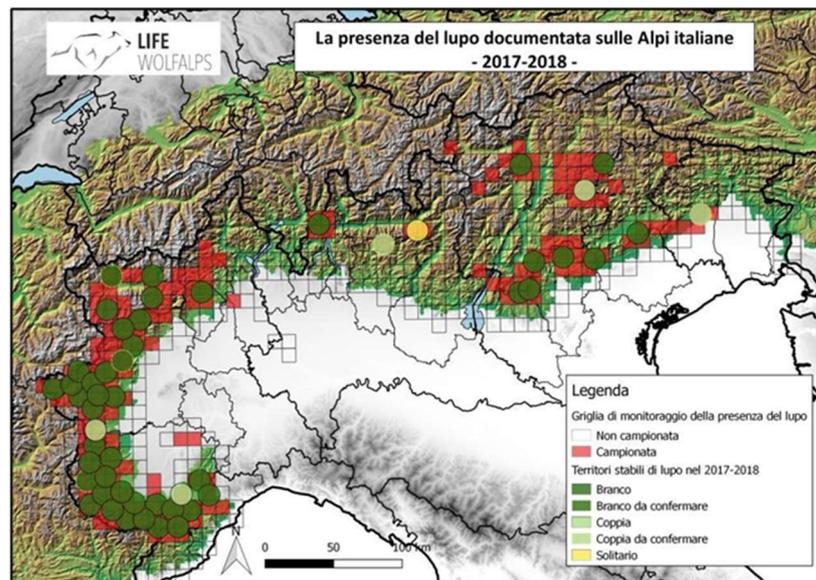


Figura 2. Carta di distribuzione prodotta nell'ambito del LIFE WolfAlps per il 2017-2018 (Marucco et al. 2018), scaricabile al link: http://ex.lifewolfalps.eu/wp-content/uploads/2014/05/Report_monitoraggio_Alpi_completo.pdf

Nel dettaglio in Piemonte nell'anno 2017-2018 si è stimata la presenza di almeno **33 branchi e 2 coppie, per un totale di minimo 195 lupi**. Nel resto delle Alpi italiane nel 2017-2018 sono presenti **4 branchi in Valle d'Aosta** dove è documentata anche una nuova coppia, **7 branchi tra Veneto e provincia di Trento**, di cui **6 documentati accuratamente dalla Regione Veneto** (vedi dettagli nell'Allegato C, Avanzinelli et al. 2018) ed uno documentato dalla Provincia autonoma di Trento, infine un branco tra Bolzano e Trento, una nuova coppia in provincia di Trento e una in Friuli Venezia Giulia, ed il branco transfrontaliero in Lombardia tra la provincia di Como e la Svizzera. In Lombardia, è presente almeno **1 individuo solitario identificato genotipicamente con territorio stabile da più di un anno ed una nuova coppia**. Avvistamenti sporadici sono registrati in modo crescente nel resto delle Alpi centro-orientali e nelle Alpi occidentali anche nelle zone collinari pedemontane. Il tasso di incremento annuale sulle Alpi italiane documentato tra il 2014-2015 ed il 2015-2016 era di **1,20** considerando la stima minima dei lupi, di **1,22** per le unità riproduttive (sia branchi che coppie) e per la distribuzione di presenza è di **1,12**. Il tasso documentato successivamente dal 2015-2016 al 2017-2018 è di **1,26** considerando la stima minima dei lupi, di **1,16** per le unità riproduttive e di **1,19** per la distribuzione di presenza. E' interessante notare che è incrementata maggiormente la crescita

della distribuzione e del numero di lupi stimati, rispetto al numero di branchi e coppie. Questo è indice, nell'ultimo anno 2017-2018, di una forte spinta di espansione da parte di individui singoli a muoversi verso nuove aree libere, specialmente evidente in regione Veneto e nella provincia di Trento, mentre si evince un rallentamento nell'incremento delle unità riproduttive in provincia di Cuneo e Torino, dove la densità di branchi è alta e le zone montane sono arrivate ad uno stato di saturazione (Marucco e Avanzinelli, 2018). La stima della densità media annuale della popolazione alpina nell'areale di presenza nel periodo 2014-2018 risulta di 1,5 lupi/100 km², valore inferiore alla densità annuale rilevata per la sola regione Piemonte di 2 lupi/100 km² dove è infatti rilevato il più alto numero di branchi oramai adiacenti tra loro (Marucco e Avanzinelli 2018). **Territori montani liberi dalla presenza stabile del lupo nel 2018 erano rimasti presenti principalmente nel nord del Piemonte ed in tutte le Alpi centro-orientali.**

Rapidi aggiornamenti sulla stima della popolazione non sono stati più possibili dal 2018 in Piemonte nelle province di Cuneo e Torino dove la presenza di branchi adiacenti ha reso difficoltose le possibilità di ottenere delle stime quantitative affidabili in mancanza di un monitoraggio sistematico basato sulla raccolta di dati C1, che implica un importante sforzo di campionamento ed un elevato impegno economico da destinare alle analisi genetiche. Per queste ragioni, nei due anni successivi al termine del periodo di finanziamento del Progetto LIFE WolfAlps (2013-2018), sono mancati completamente i dati del monitoraggio della popolazione. Nelle zone di nuova ricolonizzazione, invece, è possibile stimare ancora annualmente la presenza di branchi se distanti uno dall'altro, o l'eventuale nuova comparsa della specie, anche con un minimo sforzo. La totale stima della popolazione alpina è stata possibile nuovamente solo con un nuovo consistente finanziamento, ottenuto grazie ai fondi del Progetto LIFE WolfAlps EU (2019-2024), che ha permesso quindi di impostare un nuovo monitoraggio della specie a scala alpina, contestualmente al primo monitoraggio nazionale della specie coordinato da ISPRA, sempre per l'anno 2020-2021.

2. Metodi di campionamento e di analisi dello status della popolazione di lupo nelle regioni alpine Italiane nel 2020/2021

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

Le “Linee Guida e Protocolli per il monitoraggio del lupo in Italia” redatte da ISPRA (Marucco et al., 2020) in collaborazione con esperti nazionali ed internazionali, definiscono la strategia di campionamento nelle Regioni alpine in base agli obiettivi ed alle risorse messe a disposizione da ogni Ente nell’ambito del progetto LIFE WolfAlps EU, e sono quantificate su una griglia di campionamento (Figura 3). Il Documento è stato adottato da tutte le Regioni, Province, Parchi regionali e nazionali, Carabinieri Forestali, e da tutte le altre Istituzioni e Associazioni che hanno collaborato all’attuazione della prima survey nazionale, definendo le tempistiche di campionamento ed i criteri per la classificazione dei dati raccolti, fondamentali per il coordinamento del monitoraggio del lupo su scala alpina. Il documento è stato presentato nei workshop locali in ottobre 2020, prima dell’implementazione del monitoraggio dell’anno 2020-2021. In passato la popolazione di riferimento da campionare e quindi quella sulla quale si son fatte inferenze, è stata la popolazione di lupo sulle Alpi italiane. Di conseguenza, nel periodo 1999 - 2018, l’estensione dell’area da campionare era costituita dall’arco alpino italiano, come da Convenzione delle Alpi (Figura 3). Dal 2020-2021, per i motivi dettagliati nel cap. 1, l’area di indagine ha interessato l’intera zona delle regioni alpine italiane (Figura 4), estendendo così l’areale da campionare. Per garantire un confronto della crescita della popolazione rispetto al passato, si continua a fornire anche la stima del numero di branchi in riferimento al territorio descritto in Fig.3, oltre all’intera stima di popolazione.

Nella definizione del disegno di studio è stata adottata una griglia di 10 x 10 km sull’intero territorio da campionare, così come richiesto nell’ambito della rendicontazione prevista dalle disposizioni della Direttiva Habitat (Articolo 17). Per il posizionamento della griglia è stato utilizzato il sistema di riferimento europeo ETRS 1989 LAEA che è il sistema suggerito dalla European Environmental Agency (EEA 2006) (Figura 1). Ogni cella della griglia rappresenta un’unità di campionamento per la valutazione della distribuzione.

Va però precisato che il lupo, come in generale tutti i carnivori, è presente sul territorio con basse densità, in forma aggregata, ed è caratterizzato da un comportamento elusivo (Thompson, 2004; Boitani e Powell, 2012). Per queste caratteristiche eto-ecologiche, che rappresentano potenziali criticità nella definizione del disegno di studio, un monitoraggio sistematico e casuale, necessario per ottenere una stima robusta della sua abbondanza, richiederebbe uno **sforzo** di fatto non realizzabile a scala nazionale (Linnell et al., 1998) e, con buona probabilità, porterebbe ad un elevatissimo coefficiente di variazione delle stime. Per ridurre la varianza di queste ultime è stata considerata la necessità di stratificare, o comunque calibrare, il campionamento sulla base della probabilità di presenza della specie, come raccomandato anche da Boitani e Powell (2012).

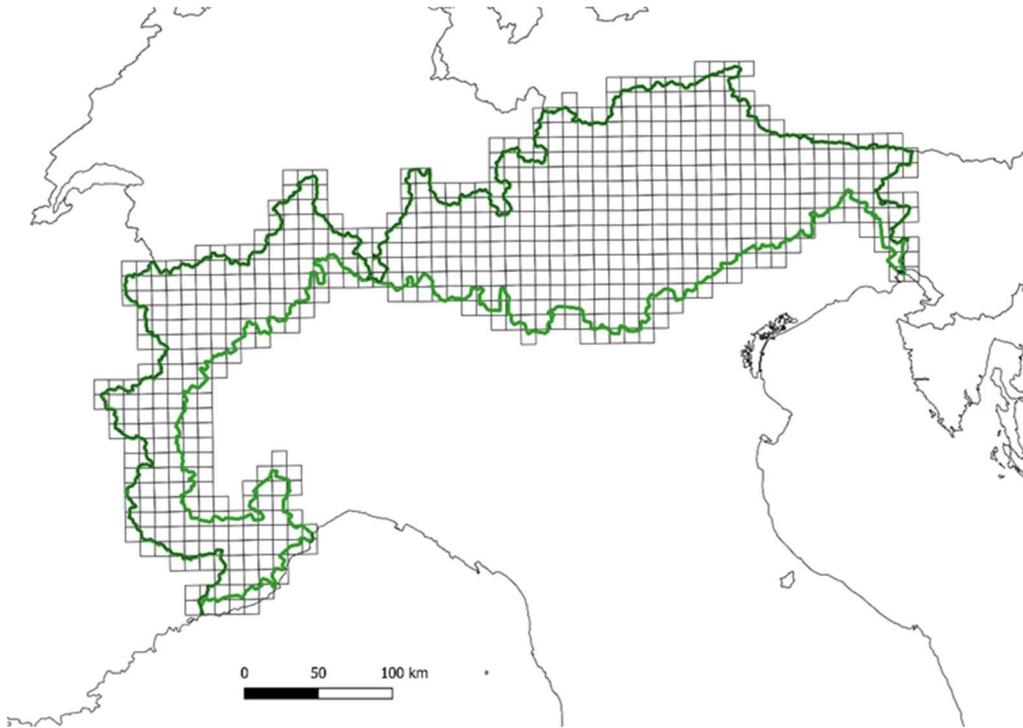


Figura 3. Griglia di campionamento di 10 x 10 km sovrainposta sull'arco alpino definito dalla Convenzione delle Alpi.

Per la stima dei parametri di popolazione nelle Regioni alpine il lavoro è stato coordinato nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU, coordinato dal Centro di Referenza Regionale Grandi Carnivori presso l'Ente di Gestione delle Aree Protette delle Alpi Marittime, in collaborazione con l'Università di Torino, Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi.

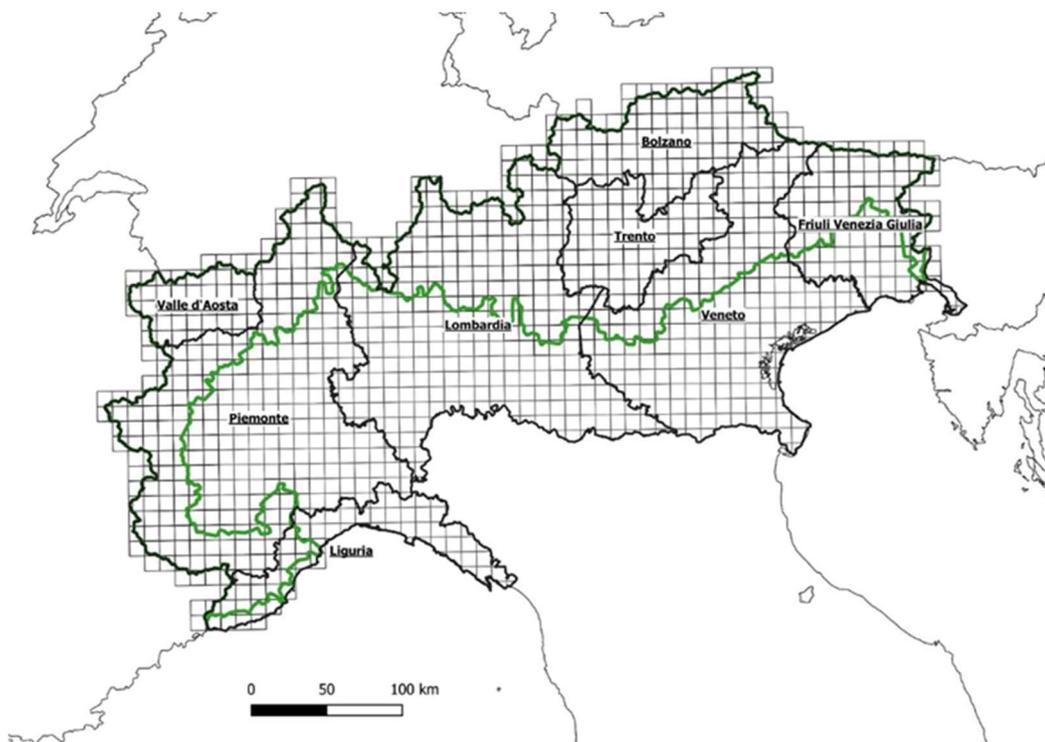


Figura 4. Griglia di campionamento di 10 x 10 km sovrainposta sull'arco alpino definito dalla Convenzione delle Alpi.

Per questo motivo, sono stati considerati con attenzione i dati già disponibili sulla distribuzione della specie dell'anno 2017-2018 (Figura 2). La stima della distribuzione e abbondanza della popolazione di lupi a livello nazionale nel 2020-2021 è stata quindi ottenuta attraverso una strategia di campionamento che ha utilizzato un disegno articolato in due fasi collegate:

Fase a. un campionamento estensivo che ha avuto come obiettivo la stima della distribuzione della specie attraverso l'analisi di segni di presenza del lupo raccolti sul territorio nazionale delle regioni alpine. In questo caso l'unità di campionamento è la cella della griglia 10x10 km selezionata sulla base della valutazione dei dati pregressi, che hanno permesso la definizione una prima stratificazione (Figura 5);

Fase b. un campionamento intensivo, che ha avuto l'obiettivo di ottenere una stima della densità della popolazione tramite un rilevamento dei segni di presenza coadiuvato dalle analisi genetiche non invasive, con il fine di ottenere una stima della densità della popolazione applicando tecniche di cattura e marcatura spaziali (Chandler and Royle, 2013; Royle et al., 2014) (Cap. 2.4.1), abbinata ad una stima dei casi di ibridazione locale (Cap. 3.6). In queste aree si è proceduto anche alla raccolta dei dati sulla presenza e numerosità dei branchi. In questo caso l'unità di campionamento è l'individuo per la stima della densità/abbondanza, ed il branco per la stima delle unità riproduttive (Figura 5).

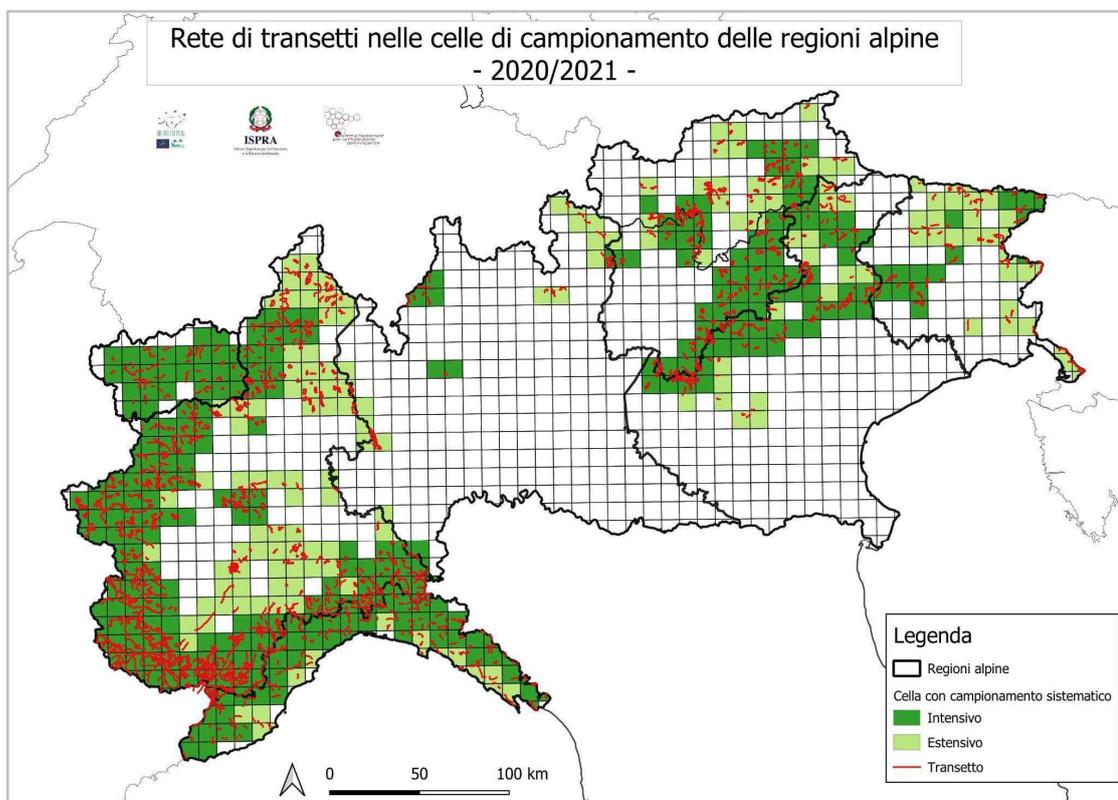


Figura 5. La rete dei transetti individuati nelle celle del campionamento sistematico (intensivo ed estensivo) del monitoraggio nazionale (1° ottobre 2020 - 30 aprile).

In ogni caso, sia con un approccio di tipo intensivo sia di tipo estensivo, il monitoraggio del lupo è stato condotto tramite la combinazione di un **campionamento opportunistico** (svolto sulla base di uscite non programmate) e di un **campionamento sistematico** (sulla base di transetti predefiniti e uscite programmate nel tempo e nello spazio).

Il **campionamento sistematico** si è basato su un *effort* controllato e quantificato, sia spazialmente sia temporalmente. Il campionamento è stato considerato sistematico temporalmente perché organizzato sulla base di uscite programmate, ma anche spazialmente, perché caratterizzato da un esplicito schema che individua transetti/punti dove fare i rilievi. Per definire con sistematicità il campionamento dal punto di vista spaziale, è stato fatto sempre riferimento alla griglia con celle di 10x10 km sull'intero territorio italiano, individuando all'interno delle celle transetti e/o punti di marcatura da controllare periodicamente e da campionare sulla base di criteri e protocolli congiunti, di seguito descritti. Il campionamento ha utilizzato indici di presenza ottenuti da tracce su neve, segni, campioni genetici non-invasivi, fototrappole (i dettagli dei protocolli sono in Marucco et al. 2020).

Il **campionamento opportunistico** è stato svolto in maniera non pianificata, sulla base di indici di presenza raccolti durante attività sul campo dedicate allo studio del lupo o altre attività. Questi dati hanno integrato i dati raccolti in maniera sistematica incrementando la qualità e la quantità della conoscenza di base sulla distribuzione e presenza del lupo, migliorando la pianificazione del campionamento sia estensivo che intensivo.

Sulla base della griglia e dei diversi livelli di campionamento stratificato, a loro volta decisi sulla presunta presenza del lupo, è stata necessaria una valutazione e una quantificazione precisa dello sforzo per cella della griglia e per transetto, il quale è stato anche monitorato nel tempo. Gli operatori hanno quindi misurato in modo preciso *l'effort* considerando:

- il numero di repliche di campionamento del transetto eseguite (le repliche nel tempo sono necessarie per valutare la contattabilità incompleta del lupo),
- la percentuale del transetto percorso in ogni replica, considerando che impedimenti di vario genere, tra cui la presenza di molta neve o la pericolosità del percorso dovuto a rischio di valanghe poteva limitare la parziale o totale percorribilità.

I metodi e i protocolli di campionamento

I metodi di campionamento utilizzati sono definiti **non invasivi** perché non implicano la cattura fisica dell'animale. Questi metodi sono particolarmente idonei per monitorare i parametri di popolazione, quali la dimensione, il tasso di sopravvivenza, la distribuzione, perché di facile applicazione su larga scala ed utili per una specie elusiva difficile da catturare ed avvistare come il lupo. Le tecniche di campionamento non invasive sono sia quelle tradizionali usate da decenni, come lo snow-tracking ed il wolf-howling, sia le tecniche di recente sviluppo, quali i metodi genetici e le fototrappole. Il migliore risultato si è ottenuto combinando più tecniche non invasive, dato che ognuna presenta vantaggi e criticità. In ogni caso, la combinazione di queste tecniche è riconosciuta come la migliore soluzione per documentare su larga scala la dimensione della popolazione e la distribuzione del lupo, i parametri di interesse per il monitoraggio del lupo sulle Alpi. La frequenza con cui sono state svolte le seguenti attività è dipesa dal tipo di campionamento, se attivo

intensivo, o attivo estensivo, tenendo conto delle disponibilità ed esigenze degli Enti di gestione del personale coinvolto. In particolare è stato condotto su tutte le regioni alpine:

- Controllo sistematico di transetti invernali per la raccolta di segni di presenza
- Attività di *Snow-tracking* – Tracciatore su neve
- Raccolta di campioni biologici non invasivi per le analisi di genetica molecolare
- Documentazione di carcasse di ungulati selvatici e domestici
- Attività di *Wolf Howling* – Ululati indotti nel periodo estivo per la documentazione di eventi di riproduzione
- Utilizzo delle trappole video-fotografiche e di foto-video documentati direttamente

I protocolli di applicazione per ognuna di queste tecniche sono descritti nel dettaglio nelle Linee Guida sopracitate (Marucco et al. 2020).

2.1.1 Riassunto dei criteri standard per l'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti

Come descritto in Marucco et al. (2020) i dati sono stati categorizzati in:

- **Dato C1: "Hard evidence" = evidenza certa**, che senza ambiguità conferma la presenza del lupo.
- **Dato C2: "Confirmed observation" = osservazione confermata**, segni indiretti di lupo, quali le tracce sulla neve, escrementi e predazioni confermate da un esperto.
- **Dato C3: "Unconfirmed observation" = osservazione non confermata**, tutte le osservazioni non confermate da un esperto oppure le osservazioni che per loro natura non possono essere confermate.

In questa valutazione dello status della popolazione di lupo sulle Regioni alpine Italiane sono stati considerati **solo i dati C1 e C2**, non sono stati considerati i dati C3. Sono state escluse le osservazioni non attribuite a lupo, per le quali il lupo può essere escluso con certezza o con alta probabilità, e anche quelle false, ossia osservazioni per le quali si è valutata la manomissione delle informazioni (ad esempio per fotografie ritoccate o falsificate).

E' stata anche necessaria la definizione dei criteri comuni per l'individuazione sia di un branco, sia di una coppia di lupi, sulla base dei dati raccolti (Tabella 1):

- **Branco**: un gruppo di più di due lupi documentati muoversi insieme in un territorio stabile tramite dati C1 e C2.
- **Coppia stabile**: coppia di due lupi di sesso opposto documentati muoversi insieme in un territorio stabile tramite dati C1 e C2 distribuiti a distanza di almeno un anno. La coppia è anche confermata essere presente nell'anno biologico precedente la prima riproduzione documentata tramite dati C1 e C2.

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 (Tabella 1). In particolare per la valutazione del/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 2 segni di presenza C2 indipendenti, oppure 10 segni di presenza C2 non indipendenti.

- **Distribuzione dei territori stabili dei branchi, delle coppie e degli individui solitari:** tutti i dati C1 e C2 raccolti ed utilizzati *in primis* per stabilire la presenza del branco/coppia, sono utilizzati per definire il relativo territorio minimo. Tale territorio è centrato nel punto di più alta frequenza di dati C1 e C2 raccolti per quel branco/coppia/individuo e per le Alpi, in coerenza con gli altri Stati alpini, ed è definito da un cerchio di 200 km² centrato nel punto (WAG, 2018).

Parametro	Metodo	Criteri standard per l'interpretazione dei dati
<ul style="list-style-type: none"> Numero di branchi Numero di coppie stabili 	- Survey degli indici di presenza, snow tracking, analisi genetiche, wolf howling, documentazione fotografico / video	La presenza di un branco o coppia, deve essere confermata tramite dati sia C1 che C2
<ul style="list-style-type: none"> Dimensione del branco (stima minima) 	- Snow tracking, analisi genetiche, wolf howling, documentazione fotografico / video	La dimensione minima di un branco è documentata tramite dati C1 o minimo due C2 indipendenti
<ul style="list-style-type: none"> Riproduzione 	- Snow tracking, analisi genetiche, wolf howling, documentazione fotografico / video	La riproduzione è documentata tramite dati C1 o minimo due C2 indipendenti
<ul style="list-style-type: none"> Distribuzione: minimo range occupato dalla specie 	- Survey degli indici di presenza	Un dato C1, o almeno 2 segni di presenza C2 indipendenti, per ogni cella 10 x 10 km ed anno
<ul style="list-style-type: none"> Distribuzione dei territori stabili dei branchi, delle coppie e degli individui solitari 	- Survey degli indici di presenza, snow tracking, analisi genetiche, wolf howling, documentazione fotografico / video	Utilizzo di tutti i dati C1 e C2 raccolti per centrare il territorio nella zona di più alta frequenza di ritrovamenti.
<ul style="list-style-type: none"> Branchi adiacenti 	- Branchi adiacenti devono essere chiaramente distinti per essere considerati due unità (o più) mediante: <ul style="list-style-type: none"> ❖ dati genetici per l'identificazione del branco tramite pedigree ❖ prova simultanea di riproduzione ❖ dati di telemetria su lupi con collare GPS 	Dati C1 necessari

Tabella 1. Criteri standard per l'interpretazione dei dati (da Marucco et al. 2020).

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

Il primo monitoraggio nazionale del lupo, realizzato in modo omogeneo e standardizzato a livello nazionale nel rispetto delle Linee Guida ISPRA (Marucco et al. 2020), è stato possibile nelle regioni alpine grazie ad un coordinamento strutturato su più livelli tra loro interconnessi: nazionale, regionale e locale.

Il Centro di riferimento Grandi Carnivori (CGC), istituito presso l'Ente di Gestione delle Aree Protette delle Alpi Marittime e l'Università di Torino (Dipartimento di Biologia dei Sistemi – DBIOS) in contatto e in sinergia con ISPRA, hanno coordinato le regioni alpine e i partners del Progetto Life WOLFALPS EU nelle varie fasi di svolgimento del monitoraggio nazionale dando indicazioni sulla modalità di formazione degli operatori, sul campionamento, sulla raccolta ed archiviazione dei dati. **Il coordinamento delle regioni alpine è stato concretizzato, quindi, con la creazione di un gruppo tecnico di referenti regionali, che hanno lavorato in modo congiunto e sinergico per la realizzazione del primo monitoraggio nazionale: questo risultato rappresenta sicuramente un valore aggiunto a tutto il lavoro svolto, che rimarrà a lungo termine.**

A livello regionale e locale le Regioni e la Provincia Autonoma di Bolzano hanno coordinato il proprio ambito territoriale di competenza seguendo direttamente la formazione del personale addetto alla raccolta dei segni di presenza attribuibili al lupo e l'andamento del campionamento stesso (sistematico ed opportunistico). In particolare, in Piemonte il coordinamento a livello regionale è stato seguito dal Centro di riferimento regionale dei Grandi Carnivori con l'Università di Torino in sinergia con i Partners piemontesi del Progetto Life WOLFALPS EU, referenti locali dello svolgimento del monitoraggio in Piemonte. Il Coordinamento del campionamento sistematico e la formazione del personale volontario addetto alla raccolta dei dati nella Provincia di Trento sono stati seguiti dal MUSE di Trento, Partner del Progetto LIFE WolfAlps EU.

La collaborazione delle Istituzioni e delle Associazioni, che hanno contribuito con il proprio personale dipendente o volontario, è stata fondamentale per l'attuazione del primo monitoraggio nazionale della popolazione di lupo in Italia. Le Istituzioni e Associazioni delle regioni alpine che hanno collaborato e rappresentano realtà territoriali con competenze di vario genere: Enti gestori delle Aree protette (Parchi Naturali Provinciali, Regionali e Nazionali), le Amministrazioni Provinciali e Regionali, i Carabinieri Forestali, i Comprensori Alpini insieme agli Ambiti territoriali di caccia e le Aziende Faunistico venatorie, le Università, le Associazioni nazionali di volontariato afferenti a diverse categorie (escursionismo, ambientaliste, venatorie) o realtà più piccole e locali. La rete di Istituzioni e Associazioni nelle regioni alpine che hanno contribuito al monitoraggio nazionale è composta da 160 unità. Un grande risultato di compartecipazione ad un progetto esteso a larga scala, ma capillare sul territorio. La formazione di nuovi operatori e l'aggiornamento di personale già esperto è avvenuta tramite corsi di formazione e workshops compiuti in presenza (Figura 6) oppure, nel periodo in emergenza sanitaria Covid-19, in modalità on line. **Sono stati realizzati tra settembre e novembre 2020 un totale 25 eventi formativi** del Progetto LIFE WOLFALPS EU strutturati in:

- **9 corsi di formazione** con sessioni teoriche e pratiche in presenza dedicati alla formazione di nuovi operatori;
- **16 workshops** introduttivi per l'avvio del campionamento invernale 2020/2021.

Durante questi eventi sono state fornite le basi di biologia ed ecologia del lupo ed indicati i criteri principali per il riconoscimento dei segni di presenza, se rivolti ai nuovi operatori; sono stati, per tutti gli operatori, descritti i protocolli ed i metodi di campionamento riportati nelle linee Guida ISPRA (Marucco et al. 2020) insieme alle schede di monitoraggio e all'uso dell'Applicazione GAIA per la registrazione diretta sul campo dei segni di presenza. Nei vari workshops locali sono stati, inoltre, definiti e finalizzati i transetti da monitorare insieme al calendario delle uscite sistematiche.



Figura 6. Eventi di formazione in presenza realizzati in varie località nell'autunno 2020 nell'ambito del Progetto Life WolfAlps EU in preparazione al campionamento del monitoraggio nazionale 2020-2021 (Foto Archivio LIFE WolfAlps EU).

Nella Tabella 2 sono elencati tutti i corsi di formazione e workshops, propedeutici all'attività di campionamento iniziata ad ottobre 2020. **La partecipazione agli eventi formativi è stata significativa, infatti, in totale hanno partecipato 750 operatori ai corsi di formazione e 738 operatori ai workshop introduttivi al campionamento invernale 2020/2021.**

Nelle regioni alpine in totale nel 2020 sono stati formati e opportunamente aggiornati per il campionamento nel monitoraggio nazionale del lupo secondo le Linee Guida ISPRA 1291 operatori afferenti a diverse Istituzioni e Associazioni.

Regione	Corsi di formazione (C)/ Workshop (W)	N. eventi e modalità*	N. operatori formati
Liguria	· 04/11/2020 (C); 05/11/2020 (C), 06/11/2020 (C), 24/11/2020 (C); 12/10/2021 (W), 28/10/2020 (W), 29/10/2020 (W)	7 O	230
Piemonte	· Chiusa Pesio (CN): 14/09/2020 (C), 22/09/2020 (W) · Avigliana (TO): 15/09/2020 (C); Salbertrand (TO) 22/09/2020 (W) · Ornavasso (VB): 02/10/2020 (C) · Lerma (AL): 23/09/2020 (W) · Varallo (VC): 25/09/2020 (W) · Crodo (VB): 29/09/2020 (W) · Asti (AT): 29/09/2020 (W) · 01/10/2020 (W)	9 P; 1 O	516
Valle d'Aosta	· Aosta (AO): 06-07-08/10/2020 (W)	3P	29
Lombardia	· 30/10/2020 (C); 02/10/2020 (W)	2 O	206
Prov. di Trento	· Trento (TN): 07/10/2020 (C)	1 P e O	86
Veneto	· Sedico (BL): 18/09/2020 (W)	1 P e O	164
Friuli Ven-Giulia	· Udine (UD): 17/09/2020 (W)	1P	60

Tabella 2. Dettaglio degli eventi di formazione realizzati tra settembre-novembre 2020 nelle regioni alpine rivolti agli operatori coinvolti nel campionamento nell'ambito del monitoraggio nazionale 2020/2021, con indicata la data, il tipo di evento, la modalità di esecuzione (*) se on line (O) o in presenza (P) e il numero di operatori formati a evento. Coordinamento e formazione realizzato nell'ambito del Progetto Life WolfAlps EU.

In aggiunta alla formazione propedeutica al campionamento 2020/21 descritta sopra, ISPRA ha fornito nel corso dell'anno 2021 un'ulteriore opportunità formativa ad un numero selezionato di operatori delle regioni alpine tramite il Corso di E-learning "Corso di formazione per operatore monitoraggio nazionale del lupo". Il corso, strutturato in 4 moduli formativi e 13 unità formative ed eseguito in modalità asincrona è stato completato da 315 iscritti, provenienti dalle regioni alpine, i quali hanno conseguito l'attestato di "operatore qualificato per il monitoraggio nazionale del lupo".

Il gruppo di personale istituzionale e volontario, che hanno ricevuto una formazione specifica costituisce il "Network Lupo Regioni Alpine", operativo in modo continuo e capillare sul territorio con la raccolta di tutti i dati utili al monitoraggio della specie contribuendo sia al campionamento opportunistico (sempre e ovunque) sia al campionamento sistematico invernale lungo i transetti e/o con le fototrappole. Gli operatori del Network hanno provveduto anche alla raccolta dei campioni biologici utili per l'analisi genetica non invasiva.

Il Network Lupo è una realtà dinamica che si è consolidata nel tempo, ulteriormente estesa numericamente e territorialmente con il passare degli anni, in sincronia con il processo di ricolonizzazione alpino del lupo. Il Network si è originato, infatti, prima nelle Alpi Occidentali (Piemonte e Valle d'Aosta) a partire dalla fine degli anni '90, mantenuto attivo e aggiornato con una formazione continua degli operatori nell'ambito di Progetti Regionali (es. Progetto Lupo Piemonte, Valle d'Aosta, Liguria). In seguito, grazie anche ai Progetti Life WolfAlps (2014-2018) e WolfAlps EU (2019-2024) la rete di operatori si è estesa ed implementata anche verso le Alpi Centro-Orientali con l'ulteriore integrazione di nuovi operatori provenienti dal resto delle regioni alpine. **Il Network Lupo Alpi rappresenta un patrimonio di alta qualità per le regioni alpine nel lungo termine.**

Il monitoraggio nazionale è stato possibile grazie al campionamento svolto dagli operatori del Network Lupo Regioni Alpine, che hanno contribuito sia nel campionamento sistematico con la percorrenza periodica dei transetti pianificati nel periodo tra ottobre 2020 e aprile 2021, sia nel campionamento opportunistico con la raccolta occasionale dei segni di presenza (sempre ed ovunque).

Hanno partecipato al campionamento sistematico un totale di 1198 operatori del Network, dipendenti di Enti e volontari appartenenti a varie categorie (Figura 7), distribuiti nelle varie regioni alpine (Figura 8), localizzati nelle province in cui erano individuati i transetti. La collaborazione dei volontari afferenti ad Associazioni (CAI, venatorie, ambientaliste, naturalistiche, altro) o affiliati ad Istituzioni (es. Parchi Naturali, Province) è stato importante nel campionamento sistematico 2020/2021, infatti i volontari che hanno partecipato attivamente rappresentano il 27,6% del totale degli operatori.

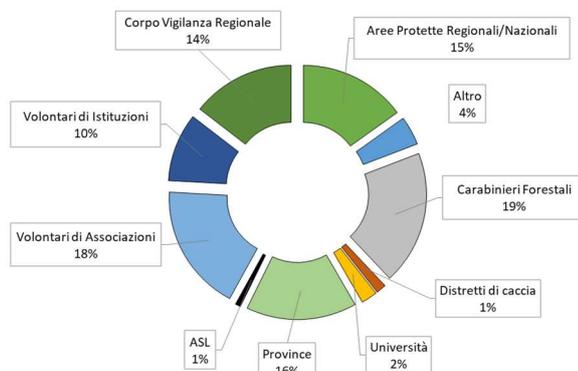


Figura 7. Il contributo delle varie Istituzioni e Associazioni nel campionamento sistematico 2020/2021 del monitoraggio nazionale del lupo.

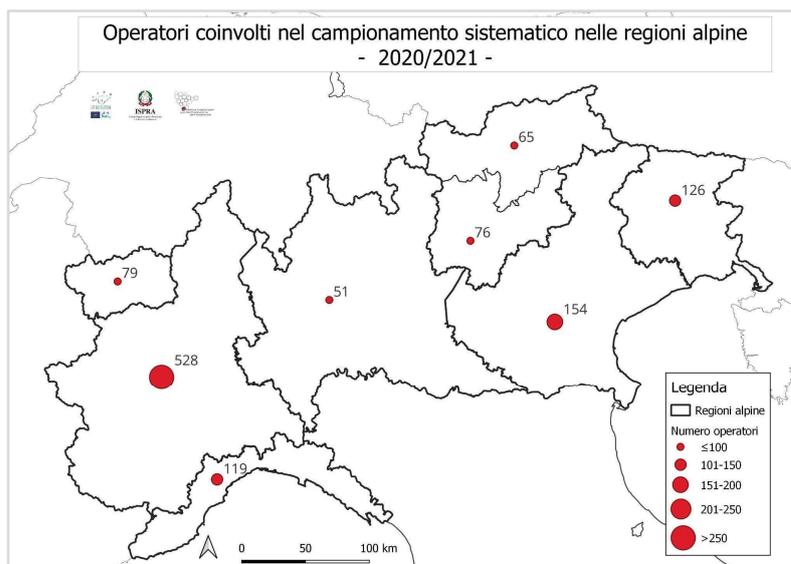


Figura 8. Operatori del "Network Alpi", suddivisi per regioni e provincia autonoma, che hanno contribuito al campionamento sistematico invernale 2020/2021 del monitoraggio nazionale del lupo realizzato per le regioni alpine nell'ambito del Progetto Life WolfAlps EU.

Il contributo del Network nel campionamento opportunistico aumenta fino ad un totale di 1513 operatori distribuiti nelle varie province delle regioni alpine (Figura 9).

Il contributo del Network nel campionamento opportunistico è stato valutato analizzando le singole realtà regionali. Infatti per ogni regione è stato calcolato il personale formato e potenzialmente operativo attivato sull'intero territorio regionale 1) selezionando il numero maggiore confrontando gli operatori formati con workshop/corsi formazione nel 2020 e i partecipanti al campionamento sistematico, quando il personale nelle due attività era complementare (es. Lombardia, Liguria); oppure 2) sommando i due valori quando gli operatori coinvolti nella formazione e nel campionamento sistematico erano differenziati (es. Valle d'Aosta). Il Network, laddove già operativo, ha permesso un campionamento opportunistico durante l'intero anno biologico 2020/2021, quindi anche nei mesi precedenti alla finestra temporale in cui è stato pianificato il monitoraggio nazionale.

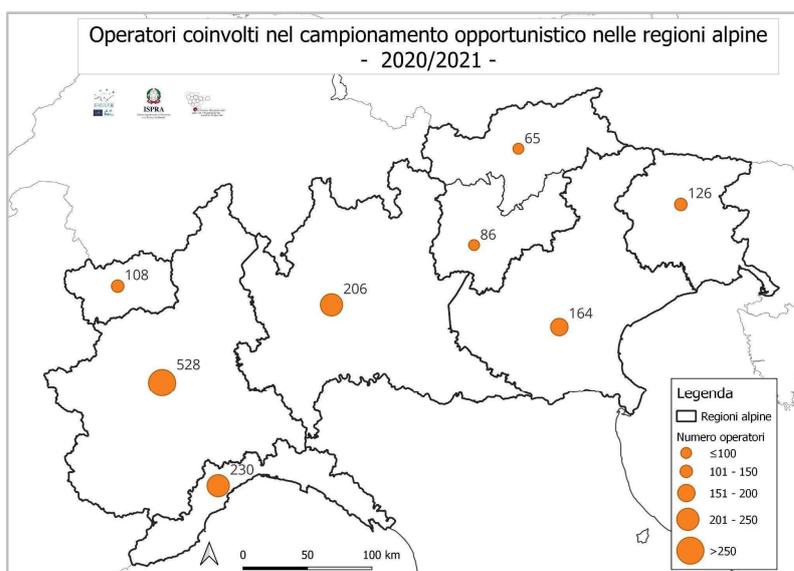


Figura 9. Gli operatori del "Network Alpi", suddivisi per regioni e provincia autonoma, che hanno contribuito al campionamento opportunistico nel monitoraggio nazionale del lupo realizzato per le regioni alpine nell'ambito del Progetto Life WolfAlps EU.

2.2.1 La gestione del flusso dei dati e l'APP GAIA Observer

Per facilitare la raccolta dei dati sul campo il progetto LIFE WOLFALPS-EU, in collaborazione con Federparchi e la Piattaforma Grandi Carnivori Grosseto, 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 ambientali. È stato inoltre predisposto un server in cui far confluire i dati registrati tramite l'applicazione, che per le Regioni alpine è stato gestito dal Centro Grandi Carnivori nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU.

Nell'anno 2020-2021 hanno utilizzato ufficialmente l'APP Gaia nelle regioni alpine un totale di 490 operatori registrati.

I dati potevano quindi essere registrati tramite due vie:

- Registrazione tramite applicazione e successiva validazione dai tecnici referenti regionali o da parte del Centro Grandi Carnivori e quindi inserimento nel database.
- Registrazione tramite scheda cartacea, invio ai tecnici provinciali e regionali di riferimento, validazione da parte dei tecnici e quindi inserimento nel database.

Infine tutti i dati validati sono stati unificati dal Centro Grandi Carnivori insieme all'Università di Torino (DBIOS) in un unico database.

2.3 Le analisi genetiche sui campioni biologici raccolti

L'analisi genetica dei campioni delle regioni alpine, utilizzando marcatori di DNA microsatellite, ha avuto luogo in cinque laboratori di genetica. I 5 laboratori genetici che hanno contribuito al campionamento nazionale conducendo le analisi sono stati:

- National Genomic Laboratory, Missoula, incaricato dal LIFE WolfAlps EU per le analisi del Piemonte, insieme all'incarico del Centro Grandi Carnivori per le analisi sui campioni di Regione Veneto e Regione autonoma Friuli-Venezia-Giulia. Di seguito il laboratorio è citato come **NGL**. I responsabili delle analisi sono K. Pilgrim e M. Schwartz.
- Laboratorio di genetica del Museo Regionale di Scienze naturali, Regione autonoma Valle d'Aosta, responsabile F. Guglielmo per le analisi sui campioni della Regione Valle d'Aosta nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU. Di seguito il laboratorio è citato come **MR-VA**.
- Laboratorio di genetica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.S. Genetica e Tecniche Omiche Avanzate, di seguito il laboratorio è citato come **IZS-PL**, per le analisi sui campioni della Regione Liguria nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU, i responsabili delle analisi sono PL Acutis, P. Modesto, e MV Riina
- Laboratorio di genetica della Fondazione Edmund Mach, incaricato dalla Provincia autonoma di Trento e Bolzano, e dal Progetto LIFE WolfAlps EU per le analisi della Regione Lombardia, responsabile H. Hauffe. Di seguito il laboratorio è citato come **FEM**.
- Laboratorio di genetica dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Area per la Genetica della Conservazione (BIO-CGE), responsabili N. Mucci, R. Caniglia e E. Fabbri che hanno eseguito le analisi sui campioni di possibili ibridi, per la valutazione dello stato di ibridazione nelle regioni alpine su campioni specifici. Di seguito il laboratorio è citato come **ISPRA**.

La scelta dei marcatori del DNA da utilizzare per determinare l'identificazione individuale si è basata su loci precedentemente rilevati su campioni di lupo in Italia e già condivisi tra i laboratori nell'ambito del Gruppo genetico alpino formalizzato nel Progetto LIFE WolfAlps EU (Caniglia et al. 2020), e dei precedenti protocolli condivisi alpini redatti nell'ambito del Wolf Alpine Group (Schwartz et al. 2015). I protocolli di analisi sono stati formalizzati e condivisi dal laboratorio genetico di ISPRA, e tutti i laboratori hanno seguito i protocolli ISPRA come riferimento. I dati allelici dei microsatelliti sono misurati in base alla lunghezza in paia di basi (bp) e al fine di fornire la coerenza del valore allelico tra i laboratori, il DNA dei campioni genotipizzati è stato condiviso tra i laboratori insieme ai valori allelici dei microsatelliti, in modo che i dati allelici dei microsatelliti fossero standardizzati. Questo ha permesso ai diversi laboratori di produrre dati microsatelliti sui campioni di lupo che potevano essere confrontati. Il laboratorio responsabile delle analisi genetiche per il Progetto Life WolfAlps EU su gran parte delle Alpi italiane è stato il National Genomics Center for Wildlife and Fish Conservation, RMRS, USFS, US, con il coordinamento della Dott.ssa K. Pilgrim, che ha coordinato il lavoro di confronto genetico con gli altri laboratori sulla base del protocollo nazionale del Laboratorio di Genetica di ISPRA.

La maggior parte dei campioni è stata analizzata tramite finanziamenti nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU. Finanziamenti indipendenti dal LIFE, nell'ambito del monitoraggio nazionale, sono anche stati resi disponibili da Regione Veneto e Regione autonoma Friuli-Venezia-Giulia, e dalle due Province autonome di Trento e Bolzano. Tutte le altre Regioni hanno utilizzato i finanziamenti LIFE. La maggior parte dei campioni è stata analizzata dal laboratorio di Genetica NGL, a seguire MR-VA, FEM, IZS-PL (Tabella 5). Tutti i risultati di questi 4 laboratori di genetica (NGL, MR-VA, FEM, IZS-PL) hanno contribuito a identificare il numero di genotipi presenti sul territorio delle regioni alpine, e a quantificare le storie di ricatture dei genotipi, fondamentali per l'applicazione del modello spaziale di cattura - ricattura (cap. 3.5), e la stima finale del numero di lupi. Il laboratorio genetico ISPRA ha invece svolto analisi genetiche unicamente per l'identificazione di ibridi sul territorio regionale, le cui ricatture sono state comunque utilizzate per la stima della consistenza della popolazione.

Nell' Appendice 1 è descritta nel dettaglio l'analisi genetica svolta dal laboratorio NGS, che ha condotto le analisi sulla base del protocollo ISPRA condiviso con tutti gli altri laboratori, e calibrata con IZS-PI, MR-VA e ISPRA.

Di seguito è riportata la descrizione della metodologia del laboratorio NGL, specificata in Appendice 1, come prima indicazione. Per NGL tutti i campioni sono stati analizzati sul DNA mitocondriale. Il DNA mitocondriale ha permesso di determinare la specie per i campioni non invasivi e di identificare l'aplotipo per tutti i campioni di lupo. I campioni dei lupi sono stati ulteriormente testati utilizzando loci microsatelliti variabili per determinare l'individuo e il sesso. Si rimanda alle relazioni regionali per i protocolli specifici degli altri laboratori, comunque simili. Nell'ambito dell'analisi NGL, si sono amplificati 16 loci microsatelliti variabili, dieci dei quali sono stati usati precedentemente su lupi nelle regioni alpine e sono condivisi con MR-VA e IZS-PL e FEM. Questi 10 marcatori sono anche condivisi con gli altri laboratori di genetica alpini e permettono un confronto di risultati transfrontaliero (Caniglia et al. 2021). Tutti e 16 i marcatori sono condivisi con ISPRA. In particolare, i loci microsatelliti utilizzati in questo studio sono stati: CPH2, CPH4, CPH5, CPH8, CPH12, FH2004, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096, FH2137, FH2140, FH2161, CO9.250, C20.253, e Pez17 (Ostrander et al. 1993, Freedholm e Winteroe 1995, Francisco et al. 1996, Neff et al. 1999). Il DNA da campioni fecali e peli non invasivi è stato amplificato almeno due volte per ogni locus utilizzando un approccio multi-tubo (McKelvey e Schwartz 2004). I dati dei microsatelliti sono stati controllati per la qualità e il potenziale *dropout* allelico e i falsi alleli. Sono stati utilizzati gli scores allelici solo se erano coerenti tra le amplificazioni, inoltre

i campioni sono stati amplificati nuovamente almeno altre due volte nei loci con discrepanze fino a quando gli alleli sono stati confermati o sono stati eliminati da ulteriori analisi. I campioni che hanno fallito in 8 o più loci sono stati rimossi, perché considerati di scarsa qualità. È stato utilizzato il programma Dropout 2.3 (McKelvey e Schwartz 2005) per determinare i campioni corrispondenti e calcolare la probabilità di identità. Questo programma identifica anche i campioni che hanno genotipi che differiscono solo per uno o due alleli dei diversi loci. In questi casi, gli scores allelici sono stati ricontrollati e/o i campioni sono stati amplificati nuovamente nei loci in questione per determinare se i campioni provenissero dallo stesso individuo. I genotipi unici sono stati ulteriormente valutati per l'eterozigosità e la diversità allelica tramite GenAlEx (Peakall e Smouse 2006, 2012). La struttura dei branchi è stata analizzata per individuare i genitori ed i figli in ogni branco e ricostruire i pedigree, utilizzando un processo di esclusione e successivamente utilizzando il programma CERVUS 3.0, utilizzando i criteri di confidenza rigorosi (95%) per valutare tali relazioni (<https://cervus.software.informer.com/3.0/>). I genotipi sono stati valutati infine con il programma ML-Relate (Kalinowski et al. 2006), dove è stata testata la parentela individuale con altri individui nei branchi ipotizzati.

2.4 Analisi dei dati per le stime di distribuzione e consistenza della popolazione

La strategia di campionamento del lupo a scala nazionale ha avuto due obiettivi principali: la stima della **distribuzione spaziale della popolazione e la sua consistenza numerica complessiva**.

Stima minima della distribuzione spaziale della popolazione

Per le regioni alpine, come descritto precedentemente, si è effettuato un campionamento opportunistico totale delle celle, e un campionamento sistematico di tutte le celle dove era stata documentata la presenza del lupo nell'anno precedente. La distribuzione della specie nelle regioni alpine nell'anno 2020-2021 (cap. 3.4) è stata quindi rappresentata dal range (minimo) di presenza del lupo, calcolato sulla base della distribuzione di tutti i segni di presenza verificati, documentati nelle celle della griglia di campionamento (10x10 km), secondo i criteri indicati nelle linee guida ISPRA (Marucco et al. 2020). Questa stima è coerente con quanto documentato negli anni precedenti (Marucco et al. 2018), e con quanto stimato dalle altre nazioni alpine (WAG 2014, 2022), e permette quindi sia una valutazione del trend nel tempo e sia un confronto spaziale con le altre nazioni, con cui si condivide la popolazione sulle Alpi.

Stima della consistenza numerica della popolazione

La stima della consistenza numerica della popolazione di lupo nelle regioni alpine si è basata sulla:

- **stima minima del numero di branchi**, valutata sulla base dei criteri delle Linee Guida e riassunti nel cap. 2.1. Questa stima è coerente con quanto documentato negli anni precedenti (Marucco et al. 2018), e con quanto stimato dalle altre nazioni alpine (WAG 2014, 2022), e permette quindi sia una valutazione del trend in quanto a numero di unità riproduttive (branchi/coppie) documentate nel tempo e sia un confronto spaziale con le altre nazioni con cui si condivide la popolazione sulle Alpi. Questa stima è considerata la stima biologicamente più significativa per una popolazione in fase di ricolonizzazione, come quella del lupo sulle Alpi, e specialmente per una popolazione campionata annualmente nel dettaglio (Reinhardt et al. 2019).
- **stima esaustiva del numero di lupi con valutazione del livello di precisione della stima (Intervalli di credibilità)**. Questa stima è la prima volta che viene realizzata a livello di regioni alpine e a scala nazionale, e restituisce una stima esaustiva della consistenza della popolazione tramite l'applicazione di un modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito, che ha richiesto uno sforzo di campionamento quantificato tramite la percorrenza dei transetti, e un campionamento genetico non invasivo esteso a tutte le regioni alpine. Questo modello ha fornito anche **la stima esaustiva del numero di branchi con valutazione del livello di precisione della stima (Intervalli di credibilità)**, che è stato confrontato con la stima minima precedentemente descritta.

2.4.1. Modello di cattura-ricattura spazialmente esplicito

La stima della consistenza numerica di una popolazione e del suo livello di precisione è ottenuta tramite l'applicazione di modelli statistici. Quelli più frequentemente utilizzati appartengono alla famiglia dei modelli di cattura-ricattura (Lebreton et al. 1992; McDonald et al. 2001; Pledger et al. 2003), che utilizzano i ricampionamenti di individui marcati all'interno della popolazione, per stimare quale proporzione di individui sia probabilmente presente ma non stata campionata, consentendo quindi di giungere ad una stima delle dimensioni totali della popolazione. Questi modelli sono già stati utilizzati per stimare le popolazioni di lupo, spesso applicando modelli aperti di cattura-ricattura tradizionali, come i modelli Cormack-Jolly-Seber, anche sulle Alpi (Cubaynes et al. 2010, Marucco et al. 2009). Modelli di questo tipo richiedono un grandissimo sforzo

di campionamento e di ricatture genetiche, e spesso assunti statistici importanti, come la modellizzazione esplicita dell'eterogeneità di ricattura degli individui per ottenere stime corrette (Cubaynes et al. 2010; 2012).

Recentemente i modelli di cattura-ricattura hanno avuto un nuovo sviluppo, e i nuovi approcci statistici hanno permesso l'applicazione dei modelli in maniera spazialmente esplicita (Efford e Fewster, 2013; Efford e Schofield, 2020). Queste nuove implementazioni hanno aperto all'opportunità di applicazione di una nuova famiglia di modelli definiti Spatially-Explicit Capture-Recapture Models, in italiano modelli di cattura-ricattura spaziali (SECR o SCR, Efford 2004; Royle et al. 2014). Questi modelli sono stati utilizzati per stimare la consistenza delle popolazioni di grandi carnivori per la prima volta in Scandinavia, utilizzando i dati genetici non invasivi come base delle ricostruzioni delle storie di ricattura (Bischof et al. 2020). I modelli SECR hanno permesso la quantificazione di stime di consistenza anche su grandissima scala, richiedendo un livello di ricatture genetiche inferiore per la stima dei parametri rispetto ai modelli tradizionali. Sulla base dell'esperienza scandinava, si è deciso di campionare e stimare la popolazione di lupo nelle regioni alpine seguendo lo stesso approccio modellistico, e coinvolgendo il gruppo di ricerca che ha sviluppato i modelli scandinavi dell'Università norvegese "Norwegian University of Life Sciences" (NMBU) per le analisi statistiche. Le analisi sono state condotte da NMBU (P. Dupont, C. Milleret, R. Bischof) che ha sviluppato il modello in collaborazione con l'Università di Torino, Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi (DBIOS) (F. Marucco) e l'Università di Chester (M. V. Boiani, A. von Hardenberg). Al fine di analizzare i dati del campionamento genetico non invasivo (NGS), raccolti sull'intero territorio delle regioni alpine italiane, abbiamo quindi costruito un modello Bayesiano di cattura-marcatura spazialmente esplicito (Spatial Explicit Capture Recapture, SECR) (Royle 2009). Nel dettaglio, i modelli SECR possono essere scomposti in tre sottomodelli: *i*) un modello spaziale che descrive la distribuzione dei centri di attività (AC) degli individui, *ii*) un modello di stato, a scala di individuo, utilizzato per stimare la dimensione della popolazione, e *iii*) un modello di contattabilità che descrive come la probabilità di contattabilità individuale varia nello spazio.

Il modello SECR, al fine di stimare la densità della popolazione e quindi la sua consistenza numerica, utilizza le ricatture dei singoli genotipi documentati dalle analisi genetiche (cap. 2.3), insieme alla localizzazione precisa nello spazio di ogni individuo campionato geneticamente, per stimare la probabilità di ogni individuo di essere ricatturato (tenendo in considerazione lo sforzo di campionamento effettuato) e la distribuzione dei centri di attività individuali. Nei modelli SECR i due parametri che vengono stimati, sono i parametri p_0 (probabilità di contattabilità) e σ (sigma, parametro spaziale), 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 di popolazione e della relativa consistenza numerica. I modelli utilizzati sono complessi e vengono descritti nel dettaglio in Appendice 2.

3. La popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane nel 2020/2021

3.1 Lo sforzo di campionamento

Il campionamento opportunistico è stato condotto su tutte le celle della griglia senza una pianificazione programmata e realizzato ad ogni segnalazione pervenuta al Network Regioni Alpine (Figura 9). Il campionamento sistematico è stato condotto unicamente nelle celle dello stratum 1 e 2 (cap. 2.1), dove sono stati percorsi transetti sistematici da parte di operatori preparati per ricercare e raccogliere i segni di presenza indiretti del lupo. Le uscite per coprire i transetti di un settore (i dettagli sono riportati nei report regionali) sono state programmate dal 1° ottobre fino al 30 aprile dell'inverno 2020-2021 e definite in anticipo con un calendario annuale, che ne ha pianificato dalle 3 alle 6 repliche per transetto, a seconda dell'intensità di campionamento prevista. L'implementazione e la programmazione delle uscite ha richiesto un grande coordinamento tra istituzioni a livello provinciale, con un approccio comune che segue le linee guida nazionali (Marucco et al. 2020). Nel corso del campionamento sistematico sono stati apportati alcuni adattamenti rispetto alla pianificazione iniziale di alcuni transetti, i quali sono stati controllati con una minore frequenza da quella preventivata, a causa della mancata disponibilità di operatori a livello locale per le restrizioni di spostamento imposte dalla emergenza sanitaria Covid-19, condizione riscontrata in tutte le regioni per i volontari. Di contro laddove era presente personale istituzionale dedicato la frequenza di percorrenza dei transetti è stata superiore anche alle 6 sessioni preventivate.

Lo sforzo di campionamento sistematico è riassunto nella Tabella 3 per l'anno 2020-2021: **in totale nelle regioni alpine sono stati percorsi 1776 transetti, dove per ogni replica effettuata sono stati percorsi complessivamente 8184,5 km e utilizzate 501 fototrappole.** Il dettaglio per ogni regione è descritto nei report regionali in allegato. Se valutiamo la quantificazione dettagliata a livello spaziale dello sforzo del campionamento sistematico effettuato nelle regioni alpine durante la stagione di invernale (1° ottobre 2020 - 30 aprile 2021) si evidenziano le aree più intensamente monitorate, ovvero laddove lo sforzo di campionamento è stato maggiore per chilometri complessivi percorsi e/o più intenso e frequente per numero di repliche totali effettuate per transetto. Entrambi questi parametri descrivono a livello spaziale in modo adeguato e preciso lo sforzo realizzato localmente nelle regioni alpine.

Regione / Provincia Autonoma	Transetti	Repliche previste per transetto	Lunghezza transetti (per replica)	Fototrappole
	N.	N.	km	N
Liguria	103	6	455,9	8
Piemonte	648	3-6	5021,3	187
Valle d'Aosta	46	6	270,2	109
Lombardia	29	3-6	164,8	9
Bolzano	79	3-6	608,5	73
Trento	76	3-6	695,7	108
Veneto	124	3-6	576,5	7
Friuli Venezia Giulia	71	3-6	391,6	-
REGIONI ALPINE	1176	3-6	8184,5	501

Tabella 3. Il campionamento sistematico nelle regioni alpine per il monitoraggio nazionale 2020-2021 realizzato tramite la percorrenza dei transetti e l'uso di fototrappole. Coordinamento effettuato nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU.

Lo sforzo di campionamento a livello spaziale è stato descritto con la misurazione di 2 parametri:

- 1) **la lunghezza totale dei transetti percorsi per ogni cella (5x5 km) della griglia di campionamento**, considerando la percentuale della distanza effettivamente percorsa dagli operatori lungo i transetti realizzati (0, 25%, 50%, 75%, 100%). Nel territorio alpino alcuni tratti di transetto non sono sempre percorribili in inverno per motivi di sicurezza a causa delle condizioni del manto nevoso, per questo in alcuni casi il transetto è stato percorso solo parzialmente.
- 2) **la frequenza** in cui ogni transetto è stato controllato nel campionamento sistematico, calcolando il valore totale **delle ripetizioni effettuate all'interno di ogni cella (5x5 km) della griglia**.

La scelta di riportare questi parametri all'interno di una griglia 5x5 km ricade sul fatto che questi sono i valori poi utilizzati dal modello per la stima della densità di lupo, per il quale si è scelta una risoluzione più di dettaglio di 5x5 km (per maggiori dettagli si rimanda all'Appendice 2).

Le aree maggiormente campionate tramite una più ampia copertura di chilometri sono più estese ed evidenti nelle regioni Piemonte (in particolare nella provincia di Cuneo) e Valle d'Aosta, più localizzate in determinate aree nelle regioni orientali (Figura 10). Il valore medio della distanza percorsa per cella è di 45,90 km ($\pm 35,91$) con range da 0,01 a 658,09 km.

Anche l'intensità delle repliche per cella mostra la stessa distribuzione seppur a livello complessivo con valori più omogenei nei valori intermedi (media $8,09 \pm 5,76$; range 1-60) e qualche picco localizzato più evidente (37-60 ripetizioni per cella) (Figura 11).

Nel periodo compreso tra ottobre 2020 e aprile 2021 nelle regioni alpine sono stati percorsi dagli operatori del Network Alpi un totale di 40725 km, calcolati sulla base della effettiva distanza percorsa, come descritto sopra.

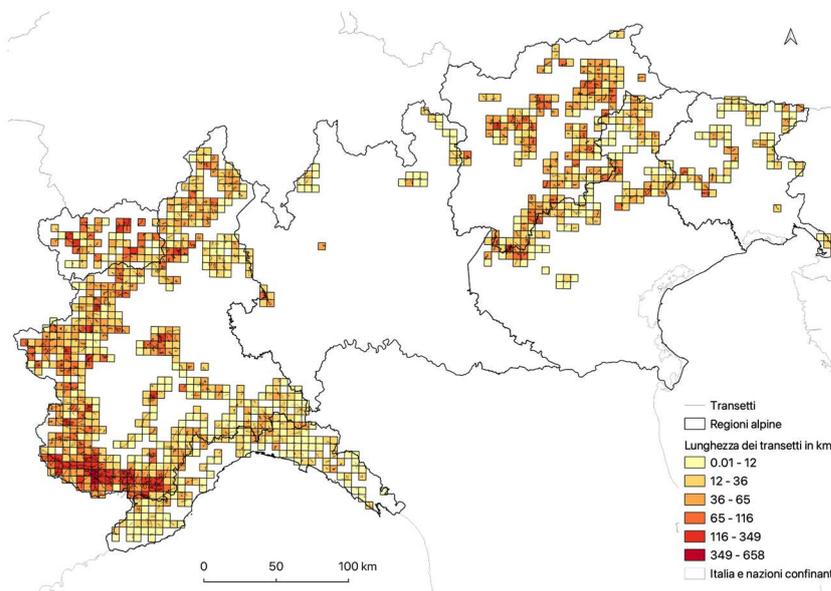


Figura 10. Mappa quantitativa dello sforzo effettuato con il campionamento sistematico (1° ottobre 2020 - 30 aprile 2021) nelle regioni alpine basata sulla distanza effettivamente percorsa dagli operatori in ogni cella della griglia (5x5 km).

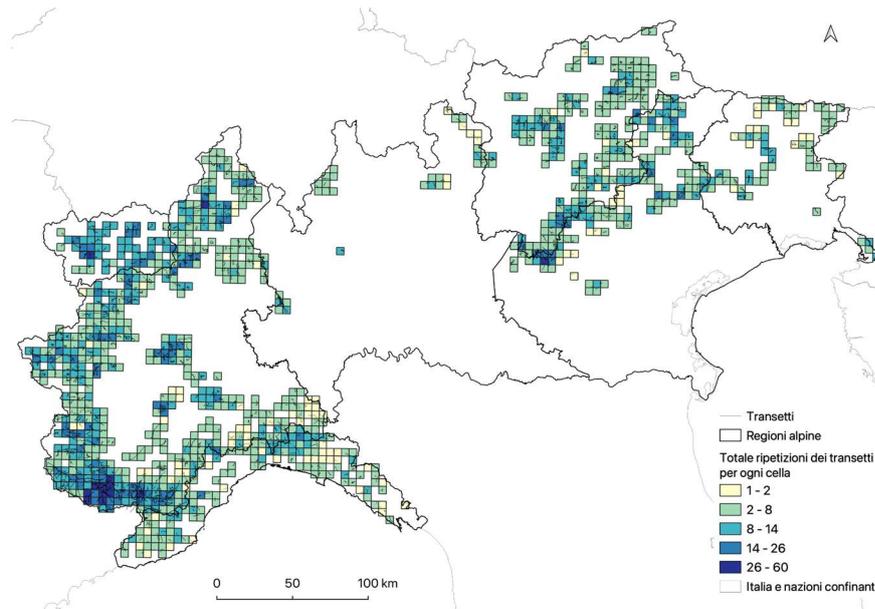


Figura 11. Mappa quantitativa dello sforzo effettuato con il campionamento sistematico (1° ottobre 2020 - 30 aprile 2021) nelle regioni alpine basata sul numero totale delle repliche dei transetti percorsi in ogni cella della griglia (5x5 km).

Se alle informazioni spaziali riguardanti lo sforzo del campionamento viene integrata anche l'informazione spaziale relativa all'esperienza degli operatori coinvolti nell'attività di monitoraggio, si evidenzia che l'esperienza degli operatori varia a livello locale e nelle varie regioni, e si rilevano le aree dove il campionamento è stato realizzato da operatori che hanno acquisito con il tempo una maggiore pratica nel ricercare e riconoscere i segni indiretti del lupo. Questo indice è stato calcolato per ogni cella (5x5 km) della griglia di campionamento come descritto in Appendice 2, considerando gli anni di coinvolgimento nell'attività di monitoraggio (identificato per province) e l'esperienza di ogni operatore (data dalla categoria di appartenenza). Le aree dove è presente personale delle Istituzioni con maggiore esperienza nel monitorare il lupo, sono evidenti ed estese nella regione occidentali (in particolare in Piemonte), più localizzate in determinate aree nelle regioni orientali (Figura 12). Il valore medio dell'indice di esperienza per cella è $4,82 \pm 02,44$ con range da 1 a 10.

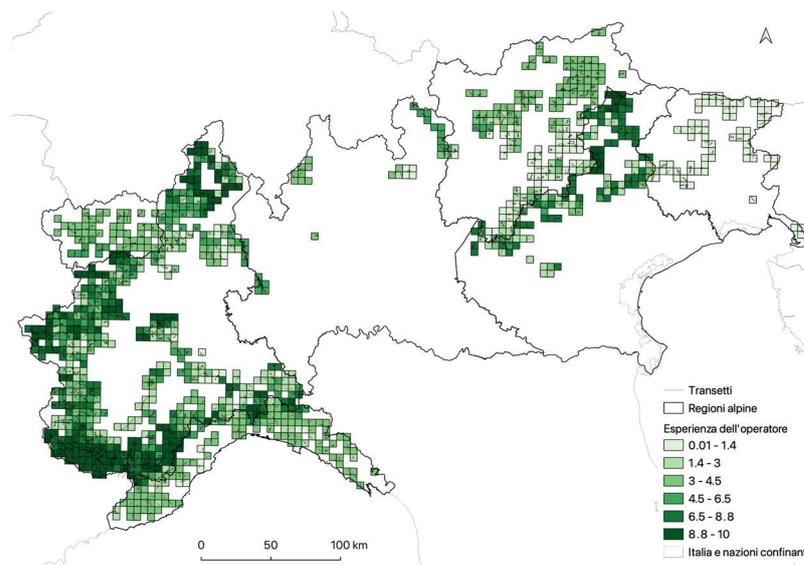


Figura 12. Mappa qualitativa dello sforzo effettuato con il campionamento sistematico (1° ottobre 2020 - 30 aprile 2021) nelle regioni alpine basata sull'esperienza degli operatori che hanno percorso i transetti in ogni cella della griglia (5x5 km).

3.2 I dati raccolti sulla presenza del lupo nel 2020-2021

Nell'ambito del monitoraggio nazionale compreso dal 1° ottobre 2020 al 30 aprile 2021 nelle regioni alpine sono stati registrati **10672 dati di presenza attribuiti al lupo sulla base dei criteri di accuratezza di tipo C1 e C2 raccolti tramite il campionamento opportunistico e sistematico**. In particolare, sono stati documentati **5636 escrementi, individuate 1027 piste di lunghezza superiore ai 500 mt (in parte georiferite con tracciatura lineare per ad una lunghezza complessiva di 1604,5 km), catalogate 712 carcasse di selvatico consumate dal lupo e segnalati 3226 video/foto registrati da fototrappola gestita da operatore del Network o immagini/video provenienti da terzi poi verificati (Tab. 4)**. Sono inoltre stati recuperati **71 lupi morti**. Il dettaglio per ogni regione è descritto nei report regionali in allegato.

Regione / Provincia Autonoma	Piste di lupo (C2)		Escrementi (C2)	Carcasse (C2)	Avvistamenti (video/foto) (C1)	Lupi morti (C1)
	N.	km	N.	N.	N.	N.
Liguria	14	18,3	429	-	26	8
Piemonte	525	1238,3	4010	95	1698	39
Valle d'Aosta	199	62,2	525	49	865	4
Lombardia	27	-	48	42	15	2
Bolzano	25	-	51	17	19	0
Trento	165	196,3	178	492	373	7
Veneto	47	41,9	358	17	216	8
Friuli V. G.	25	47,5	37	0	14	3
REGIONI ALPINE	1027	1604,5	5636	712	3226	71

Tabella 4. Segni di presenza del lupo documentati in ogni provincia autonoma e regione alpina durante il periodo del monitoraggio nazionale (ottobre 2020 – aprile 2021). Coordinamento effettuato nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU.

Gli escrementi ritenuti più idonei sono stati selezionati per le analisi genetiche, attraverso una valutazione della qualità di conservazione, della freschezza e della localizzazione, tale che fosse informativa sia per la presenza delle specie sul territorio sia per l'individuazione delle unità riproduttive. Questi campioni sono stati inviati ai laboratori di riferimento per l'identificazione della specie e la tipizzazione del genotipo (cap. 3.3). La distribuzione spaziale degli escrementi raccolti nelle regioni alpine, poi risultati con genotipo (dato C1) è mostrata nella Figura 13. Il dettaglio per ogni regione è descritto nei report regionali in allegato.

La distribuzione e densità complessiva dei segni di presenza del lupo nelle regioni alpine è stata valutata tramite la quantificazione dei dati C1 e C2 documentati in ogni cella (10x10 km) della griglia di campionamento. Per questa mappa, mostrata in Figura 14, sono stati considerati tutti i dati georiferiti raccolti in modo sistematico nell'ambito del programma invernale di monitoraggio del lupo uniti ai dati documentati in modo opportunistico durante tutto l'anno biologico (1° maggio 2020 – 30 aprile 2021). Sono stati utilizzati tutti i dati certi (C1) confermati dalle analisi genetiche, i lupi recuperati morti o documentati con video/foto di buona qualità uniti a tutti i dati confermati e ritenuti altamente probabili, perché rinvenuti lungo le sessioni di tracciatura e/o valutati da esperti (C2).

Nell'anno 2020-2021 sono stati registrati un totale di 11014 dati di presenza del lupo: 50,8 % dati di tipo C1 e 49,2% dati di tipo C2 (Figura 14). Nel dettaglio, considerando solo le celle con almeno un dato, la media dei dati C1 presenti per cella è di $16,03 \pm 30,69$ (1 a 297), mentre la media dei dati C2 presenti per cella è di $14,75 \pm 21,80$ (1 a 167). I dati raccolti sono di alta qualità perché escludono i dati C3 e considerano

unicamente i dati C1 e C2. I dati C1 e C2 sono distribuiti su tutte le regioni alpine italiane con densità variabili (Figura 14) in relazione sia all'intensità del campionamento e sia alla consistenza della specie nell'area.

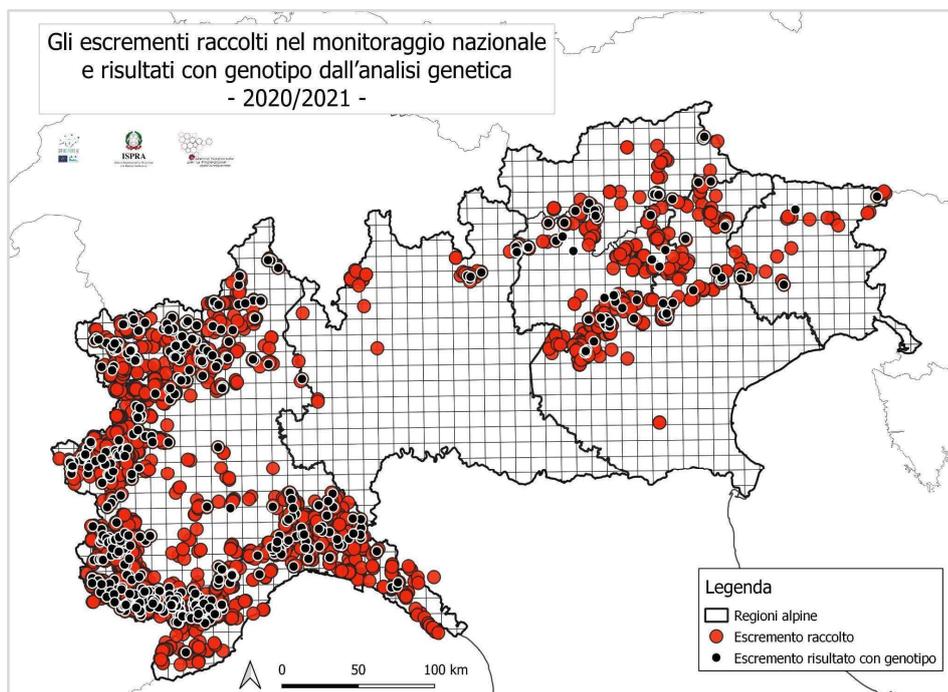


Figura 13. Distribuzione spaziale degli escrementi documentati (in rosso) e risultati con genotipo dall'analisi genetica (in nero), campionati nelle regioni alpine durante la stagione del campionamento del monitoraggio nazionale (1° ottobre 2020 - 30 aprile 2021).

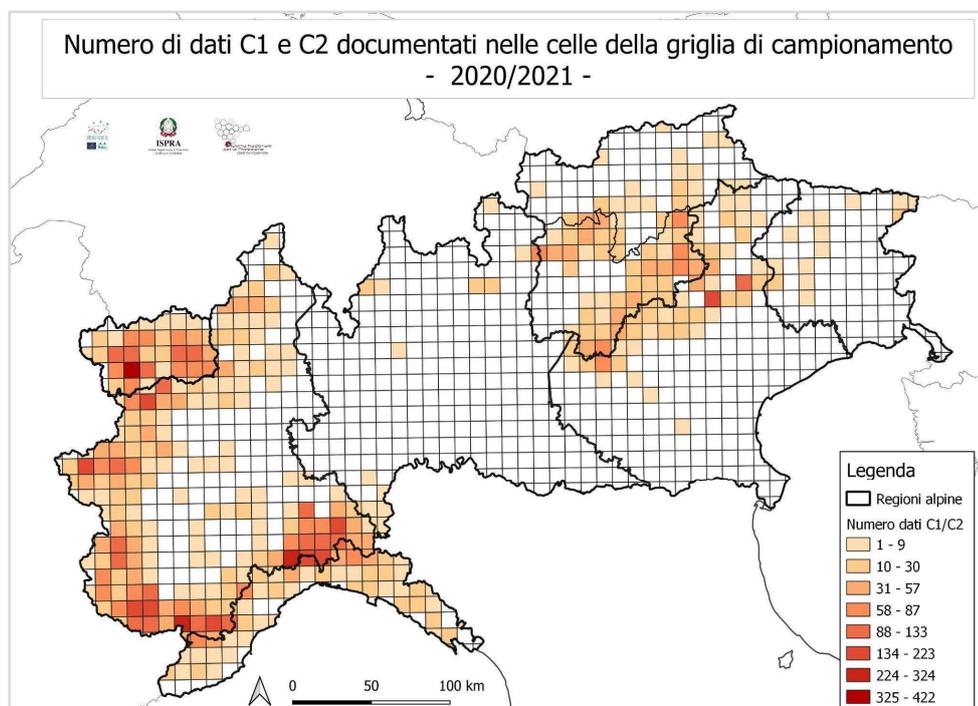


Figura 14. Il numero di segni di presenza C1 e C2 documentati per cella della griglia di campionamento nell'anno 2020-2021 (1° maggio 2020 - 30 aprile 2021).

3.3 I risultati genetici sui campioni biologici analizzati

Nella Tabella 5 è riportato il totale dei campioni utilizzati per documentare le ricatture genetiche dei singoli individui. Questi dati sono stati utilizzati nel modello SECR (cap. 3.4) per la stima della consistenza della popolazione, e per la ricostruzione del numero minimo di branchi e coppie tramite analisi di pedigree. Tutti i dettagli dei pedigree e delle analisi di ogni laboratorio sono riportati nei report regionali, se realizzati.

Laboratorio di genetica	Totale dei campioni con genotipo
	N.
NGL - Life WolfAlps	577
IZS Liguria-Piemonte	21
MR VA - Museo Valle d'Aosta	102
FEM	92
Ispra	7
Totale REGIONI ALPINE	792
Ovest regioni alpine	633
Est regioni alpine	159

Tabella 5. Totale del numero di genotipi unici individuati per laboratorio, considerando i vari laboratori che hanno analizzato geneticamente i campioni nelle regioni alpine nel 2020-2021, utilizzati successivamente per la stima di popolazione.

Quindi, nell'ambito del campionamento intensivo 2020-2021, attuato da ottobre 2020 ad aprile 2021, un totale di 792 genotipi sono stati individuati, come indicato in Tabella 5 e in Figura 13. Nel modello non sono stati considerati gli individui trovati morti, per un totale di **745 campioni genetici di lupo** (384 femmine; 347 maschi; 14 NA) che sono stati genotipizzati con successo così da poter essere inclusi nell'analisi per la stima della consistenza di lupo nelle regioni alpine italiane. **I campioni, senza considerare i tessuti, risultano associati a 449 genotipi unici, quindi a 449 lupi diversi** (222 femmine; 213 maschi; 14 NA), che risultano essere la stima minima degli individui presenti certi. Il tasso medio di ricattura è di 1,66 (ds = 1,13) rilevamenti per individuo complessivi e 1,73 (ds = 1,23) e 1,62 (ds = 1,05) rispettivamente per femmine e maschi.

In Appendice 3, viene descritta l'analisi dei dati genetici svolta unicamente dal laboratorio genetico NGL, nell'ambito del LIFE WolfAlps EU, sui campioni raccolti nel 2020-2021, appartenenti alle regioni Piemonte, Veneto e Friuli Venezia Giulia. Questi campioni costituiscono la maggior parte dei campioni identificati, e su questi si è eseguita un'analisi dei livelli di eterozigotità valutati, che possono essere rappresentativi per la totalità della popolazione, essendo distribuiti sia a est che a ovest delle Alpi. Tutti i dettagli delle valutazioni genetiche sono nell'Appendice 3.

3.4 La distribuzione della popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane e il trend

La distribuzione della specie nelle regioni alpine nell'anno 2020-2021 è rappresentata dal range (minimo) di presenza del lupo, calcolato sulla base della distribuzione dei segni di presenza lupo documentati nelle celle della griglia di campionamento (10x10 km) secondo i criteri indicati nelle Linee Guida (Marucco et al. 2020). Sono stati considerati un minimo di 2 dati C2 per la conferma della presenza nella cella, in linea con il passato e nel rispetto dei parametri della strategia internazionale alpina definita nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU (WAG 2022).

Il range minimo di presenza del lupo nelle regioni alpine nel 2020-2021, considerando l'anno biologico della specie (1° maggio 2020 - 30 aprile 2021), è stato stimato di 41600 km² (416 celle 10x10 km² con presenza documentata, 36,8% del territorio totale delle regioni alpine), di cui l'83,9% documentato con dati C1 ed il restante con dati C2, a dimostrazione dall'alta qualità dei dati raccolti. La mappa che rappresenta la distribuzione del lupo nelle regioni alpine nel 2020- 2021 è mostrata in Figura 15.

La presenza del lupo è stata campionata su un vasto territorio che comprende la fascia alpina (montana e pedemontana) e il corridoio appenninico fino ad estendersi in modo ormai pressoché continuo sia a sud verso la costa ligure, sia allungandosi verso le aree più interne e centrali piemontesi (Langhe, Astigiano, Collina di Torino, Canavese e Novarese). In particolare, il territorio montano delle regioni occidentali è quasi completamente occupato e i segni di presenza certi sono ormai confermati e frequenti anche in aree collinari e di pianura, dove la specie si è insediata stabilmente.

Nel resto delle Alpi centro-orientali, seppur è evidente l'espansione rispetto al 2017-2018 (Marucco et. al 2018) - in particolare lungo la fascia trentino/veneta - ci sono ancora molte aree alpine (ambiente montano e pedemontano), dove il lupo non è stato ancora campionato; le zone di pianura/collinari con presenza certa confermata, sono più limitate e localizzate (Ticino e Pavese in Lombardia, Colli Euganei in Veneto).

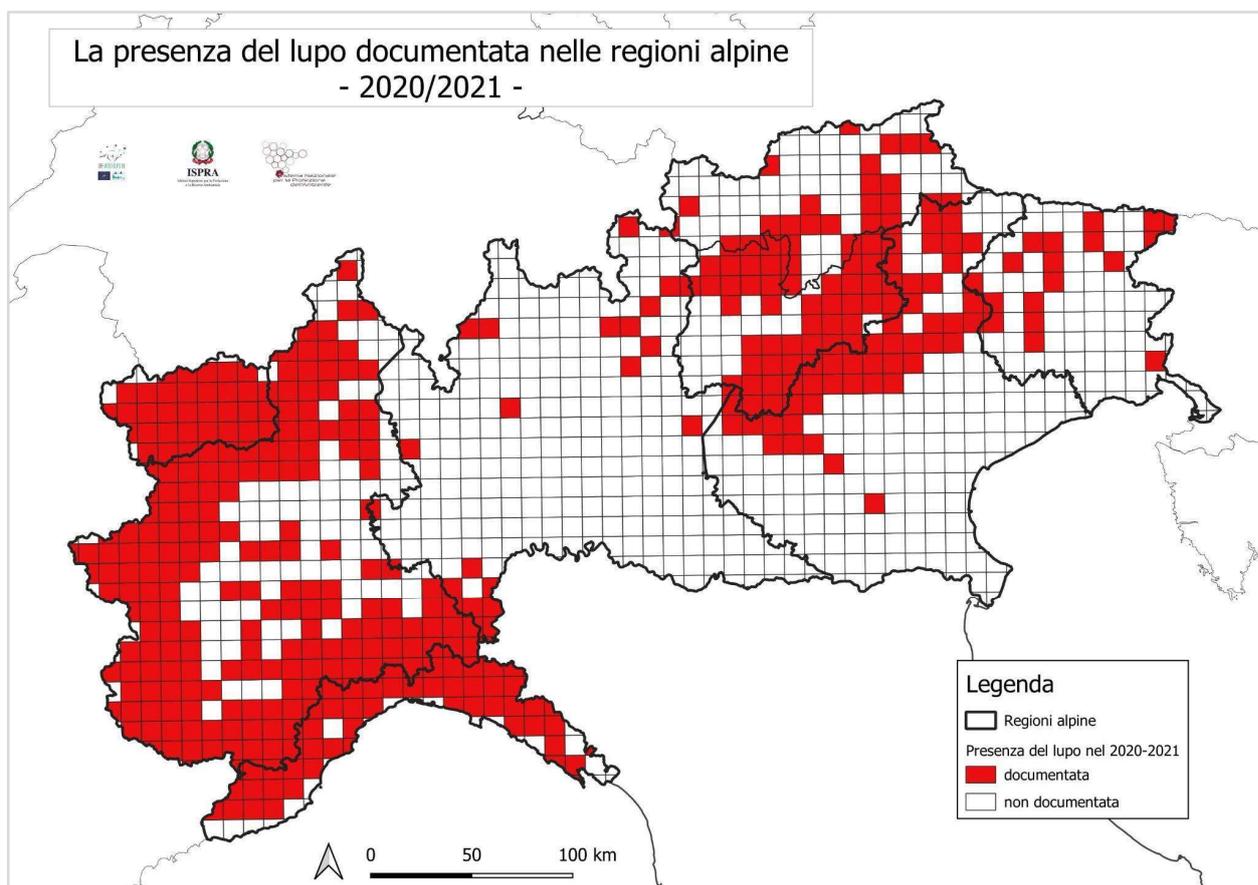


Figura 15. Distribuzione del lupo documentata nelle regioni alpine nel 2020-2021, rappresentato come range minimo occupato dalla specie sulla base dei dati raccolti durante l'anno biologico. Coordinamento effettuato nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU.

Considerando unicamente il range alpino (Figura 3), si è valutata una comparazione con i dati precedentemente raccolti. La valutazione del trend di crescita della distribuzione non ha incluso i dati dell'Appennino ligure e piemontese, dove i lupi erano già presenti in passato, ma non erano stati considerati nella stima di distribuzione precedente. Quindi per una comparazione temporale corretta è stato analizzato

unicamente il range alpino. Considerando la distribuzione minima documentata nelle celle 10x10 km, la presenza del lupo è aumentata in questo territorio negli anni in modo crescente (Marucco et al. 2018) (Figura 16). Con il campionamento del 2020-2021 si sono documentate nella sola area alpi 322 celle di presenza (Figura 15), registrando un ulteriore incremento della distribuzione minima rispetto al 2017-2018, dove erano state documentate 175 celle. Si documenta quindi, in tre anni (dal 2017-2018 al 2020-2021), un raddoppio delle celle con accertata presenza. Il trend è descritto nella Figura 16. È importante notare che nell'anno 2016-17 e nel biennio 2018-2020 non sono stati effettuati i campionamenti regionali a scala alpina.

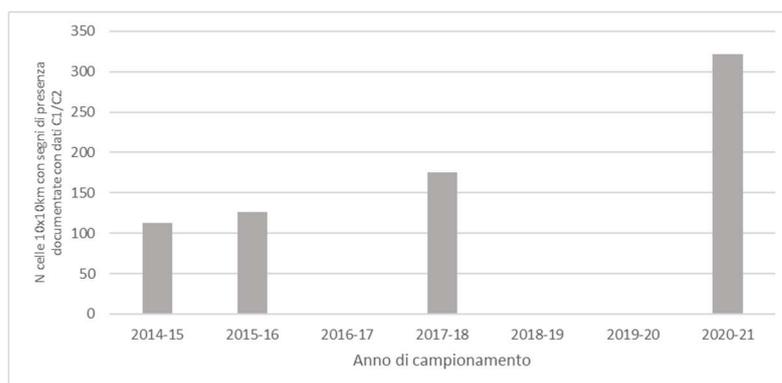


Figura 16. Quantificazione della distribuzione minima del lupo documentata con il numero di celle della griglia 10x10 km dove sono stati documentati segni di presenza del lupo con dati C1/C2 nella zona Alpi delle regioni italiane dal 2014 al 2021. Importante notare che negli anni 2016-17 e 2018-2020 non sono stati effettuati i campionamenti regionali a scala alpina.

Il numero delle unità riproduttive è stato stimato per tutte le regioni ad eccezione della Liguria, dove l'alta densità di presenza di branchi limitrofi in assenza di un campionamento intensivo genetico non ne permetteva una valutazione. La stima del numero di lupi invece ha tenuto conto anche di questa regione, grazie all'applicazione del modello SECR (cap. 3.5).

Nel 2020-2021 sono stati documentati nelle regioni alpine un totale minimo di 124 unità riproduttive, costituite da 102 branchi e 22 coppie, la maggior parte dei quali presenti nella porzione occidentale (n=91), con 9 unità riproduttive in Valle d'Aosta (di cui 8 branchi e 1 coppia), 80 in Piemonte (67 branchi e 13 coppie) e due in Lombardia (Figura 17, Tabella 6). Una parte dei branchi documentati lungo il corridoio Alpi-Appennino sono condivisi tra Piemonte e Liguria. La densità dei branchi nella porzione montana piemontese è ormai satura, soprattutto nella provincia di Cuneo, in alcune valli di Torino e Alessandria, in aggiunta nuove unità riproduttive si sono insediate nelle zone pedemontane e nelle zone più centrali di pianura/collina, sintomo di una espansione della popolazione verso nuovi territori liberi, non ancora occupati stabilmente dalla specie. Nelle regioni centro-orientali 12 branchi dei 25 documentati, sono di tipo transregionale: 10 branchi con territori che si estendono lungo la fascia alpina a cavallo tra Veneto e Province Autonome di Trento e Bolzano, 1 branco condiviso tra la Lombardia e Trento e 1 branco più ad Est tra Veneto e Friuli Venezia Giulia (Figura 17, Tabella 6).

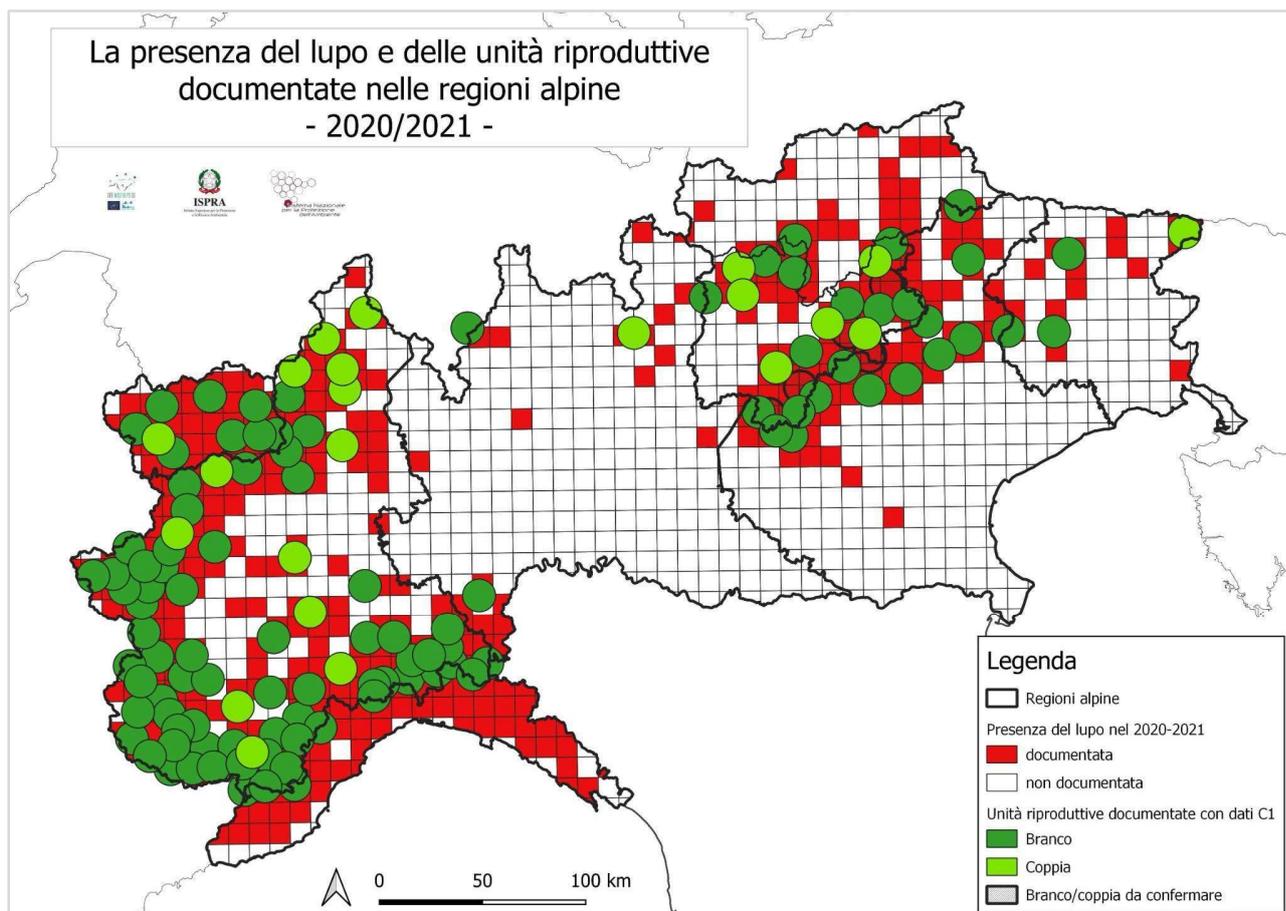


Figura 17. Distribuzione minima del lupo nelle regioni alpine e consistenza delle unità riproduttive (branchi e coppie) per l'anno 2020-2021. Coordinamento effettuato nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU.

Il totale del numero dei branchi e delle coppie documentate nelle regioni alpine è riassunto nella Tabella 6. Molti dei branchi documentati hanno un territorio transregionale (territorio condiviso su più regioni), quindi nella tabella 6 è stato indicativamente attribuito il branco/coppia alla regione/provincia, dove il branco/coppia presenta una maggiore documentazione. Il territorio del branco/coppia è rappresentato simbolicamente dai cerchi in Figura 17, come descritto nel cap. 2.1. Il conteggio del numero totale delle unità riproduttive attribuite alla regione/provincia sulla base di questo criterio indicativo è evidenziato nei campi in grigio nella Tabella 6. In particolare nella Tabella 6 è anche riportato il dettaglio dei branchi considerati transregionali, documentati tra quelli riportati nei totali (quindi non si addizionano, ma sono un dettaglio compreso nel totale). Inoltre, nella tabella è indicato dove è stato possibile confermare geneticamente gli spostamenti transregionali di individui (genotipi) appartenenti ad un solo branco, che hanno confermato con certezza la presenza del branco transregionale ed aiutato ad evitare doppi conteggi.

Vista la presenza di molti branchi transregionali nella zona est delle Alpi, tra regione Veneto e provincia di Trento e Bolzano, come evidenziato in Figura 17 e Tabella 6, diventa difficile l'attribuzione di un branco o un numero di lupi a un unico territorio amministrativo, considerando la grandezza dei territori e le capacità di spostamento tipiche della specie (Mech e Boitani 2003). Questo esercizio di suddivisione amministrativa delle unità riproduttive è pertanto privo di significato dal punto di vista biologico per branchi condivisi tra zone ad alta frammentazione amministrativa. Per questo i numeri riportati in Tabella 6 devono essere letti in un'ottica di insieme e di totali, dove **ha più significato biologico distinguere tra popolazioni presenti nel centro-est e nel centro-ovest delle regioni alpine**. La distinzione naturale ricade a metà della regione Lombardia, dove il branco di Como condiviso con la Svizzera e quello della provincia di Pavia vengono considerati insieme al centro-ovest della porzione (Figura 17), e i lupi nell'est della Lombardia considerati con il centro-est della

popolazione. Questa distinzione rispecchia anche il processo di evoluzione e espansione delle due parti di popolazione, originate all’ovest da un’espansione diretta appenninica (Fabbri et al. 2007), e all’est accelerata da un evento stocastico che ha formato il primo branco in Lessinia, da cui si sono generati velocemente molti dei branchi adiacenti (Avanzinelli et al. 2018). Inoltre, l’aumento della popolazione dell’est è influenzato anche dall’espansione della vicina popolazione dinarica (Razen et al. 2016).

Con questa distinzione, biologicamente più corretta, **il totale del numero di unità riproduttive per il centro-est delle regioni alpine è di 33 branchi/coppie, ed il centro ovest di 91 branchi/coppie (Tabella 6, Figura 17)**. La stima della consistenza della popolazione totale rispecchia anche questa distinzione (cap. 3.5), che rappresenta il criterio di distinzione territoriale più significativo dal punto di vista biologico per la realtà delle regioni alpine. Ovviamente il meglio è sempre leggere i dati nella loro totalità.

Regione / Provincia Autonoma	Branchi Totali	Dettaglio dei branchi transregionali (*)	Coppie Totali	Dettaglio delle coppie transregionali (*)	Unità riproduttive Totali
Piemonte (PIE)	67	9 (Liguria)	13	-	80
Valle d’Aosta (VDA)	8	1 (PIE) ¹	1	-	9
Lombardia (LOM)	3	1 (TN) ¹	1	-	4
Bolzano (BZ)	2	2 (1TN ¹ ; 1VEN ¹)	-	-	2
Trento (TN)	9	4 (1 BZ ¹ ; 1 BZ-VEN; 2 VEN)	6	1 (BZ)	15
Veneto (VEN)	10	4 (TN) ²	-	-	10
Friuli Venezia Giulia	3	1 (VEN) ¹	1	-	4
Totale	102	22	22	1	124
Centro-ovest regioni alpine	77		14		91
Centro-est regioni alpine	25		8		33

Tabella 6 - Numero di branchi e coppie documentati nel 2020-2021 nelle regioni alpine. Sono indicati nel dettaglio i branchi/coppie (*) che condividono il territorio tra regioni confinanti, conteggiati nel numero totale dei branchi/coppie della regione/provincia, come indicato nella relativa colonna dei totali (in grigio). Coordinamento effettuato nell’ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU. Sono anche indicati il totale delle unità riproduttive per il centro-ovest e centro-est delle regioni alpine. Ulteriori specifiche e spiegazioni nel testo. Note: ¹ branco confermato geneticamente essere transregionale, ² 2 branchi confermati geneticamente essere transregionali.

Considerando unicamente il range alpino (Figura 3), si è valutata una comparazione nel tempo del numero di unità riproduttive documentate sulle Alpi italiane. La valutazione del trend di crescita del numero di unità riproduttive non ha incluso i dati dell’Appennino ligure e piemontese, dove i lupi erano già presenti in passato, ma non erano stati considerati nella stima del numero di unità riproduttive precedenti. Quindi, per una comparazione temporale corretta è stato usato unicamente il range alpino. Il numero di branchi/coppie documentati è aumentato in questo territorio negli anni in modo crescente, con l’ultima stima minima del 2017-2018 di 51 unità riproduttive (coppie e branchi) (Marucco et al. 2018). Con il campionamento del 2020-2021 (Figura 17), si registra un ulteriore incremento del numero di unità riproduttive che nel solo range alpino arriva a 103. Dall’ultima stima del 2017-2018, le unità riproduttive (coppie e branchi) nelle Alpi dopo tre anni (al 2020-2021) sono raddoppiate, passando appunto da 51 a 103. Il trend è descritto nella Figura 18. È importante notare che nell’anno 2016-17 e nel biennio 2018-2020 non sono stati effettuati i campionamenti regionali a scala alpina. Questo tipo di crescita indica un andamento di tipo esponenziale, da verificare con ulteriori analisi, come già documentato in altre popolazioni europee che stanno avendo la stessa evoluzione, come quella in Germania (Reinhard et al. 2019).

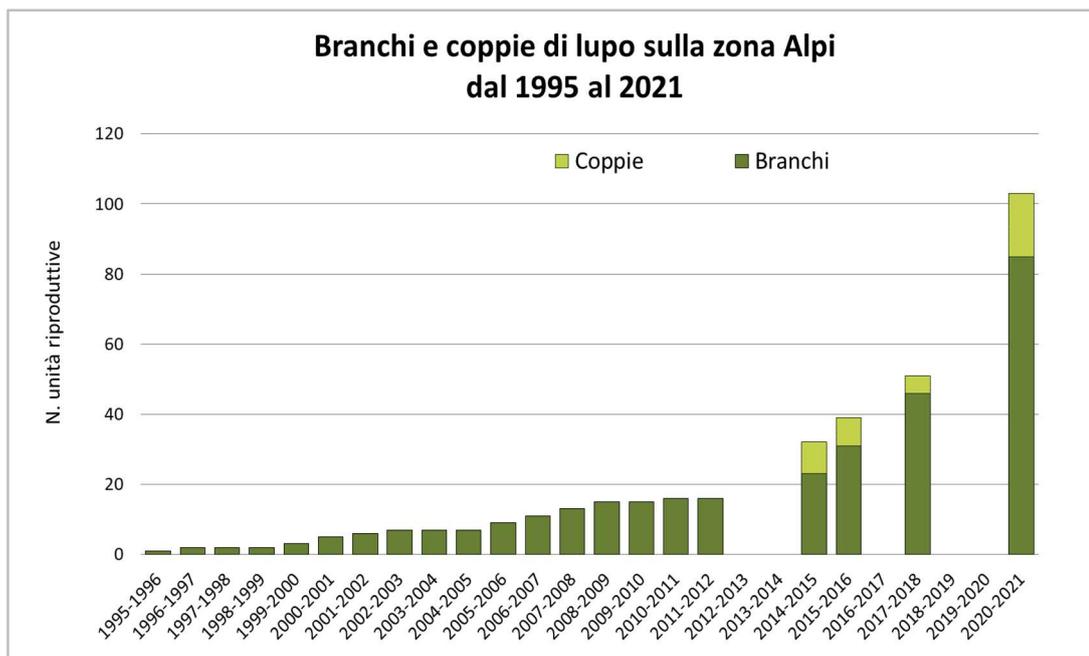


Figura 18. Stima del numero di branchi e coppie di lupo presenti nella zona Alpi delle regioni italiane dal 1996 al 2021, considerando anche quelli con territorio transfrontaliero tra Italia, Francia e Svizzera.

3.5 La stima dell'abbondanza della popolazione di lupo nelle regioni alpine italiane

Grazie al campionamento genetico non invasivo intensivo dell'anno 2020-2021, attuato da ottobre 2020 ad aprile 2021, un totale di 745 campioni genetici di lupo (384 femmine; 347 maschi; 14 indeterminati) sono stati genotipizzati con successo così da poter essere inclusi nell'analisi di modellizzazione per la stima esaustiva della consistenza della popolazione di lupo nelle regioni alpine (Figura 19). I campioni risultano associati a 449 lupi (genotipi), che costituiscono la stima minima di conteggio di genotipi campionati simultaneamente nell'inverno sul totale del territorio (Figura 13). Il tasso medio di ricattura è di 1,66 (ds = 1,13) rilevamenti per individuo complessivi e 1,73 (ds = 1,23) e 1,62 (ds = 1,05) rispettivamente per femmine e maschi. Le ricatture degli individui sono indispensabili per poter stimare la popolazione non campionata, tramite i modelli SECR, soprattutto grazie alla misura accurata dello sforzo di campionamento condotto, misurata grazie alla percorrenza sistematica dei transetti, distribuiti sull'intera area di indagine (Figure 5, 10, 11, 12). In seguito i risultati verranno riportati differenziando la popolazione alpina di lupo in base al sesso e agli status sociali (alpha, figli, altri), per maggiori dettagli a riguardo vedere in Appendice 2 la descrizione di ciascuna categoria. Inoltre come discusso nel capitolo precedente, cap. 3.4, vengono forniti i totali delle stime di consistenza, ed anche il dettaglio per la popolazione centro-est e centro-ovest.

L'abbondanza dei lupi per l'intera area di studio (Figura 19), che comprende tutte le regioni italiane alpine, durante l'inverno 2020-2021, è stata stimata (con un intervallo di credibilità al 95%) di 946 (CI95%: 822-1099) individui. Sulla base della localizzazione dei centri di attività individuali prevista dal modello, abbiamo stimato che tra questi, **680 (CI95%:602-774)** individui fanno parte della parte centro-occidentale della popolazione e **266 (CI95%:204-343)** individui invece appartengono alla sezione centro-orientale della popolazione (Tabella 7).

Area	alpha (genitori)	figli	altri	Totale
Centro-Est	69 (48-95)	168 (120-229)	29 (19-42)	266 (204-343)
Centro-Ovest	198 (169-234)	412 (339-501)	69 (53-89)	680 (602-774)
Regioni alpine (totale)	267 (224-321)	580 (469-718)	98 (76-126)	946 (822-1099)

Tabella 7. Abbondanza del lupo stimata dal modello SECR per l'anno di monitoraggio 2020/2021 per area e status sociale. Nello specifico in ogni riga sono riportate le diverse aree considerate, le regioni alpine, la suddivisione delle regioni in Est e Ovest.

Inoltre, come spiegato precedentemente, al fine di poter confrontare l'attuale lavoro con le stime relative agli anni precedenti di monitoraggio di lupo (Marucco et al. 2018), si sono estratte le stime per la sola area alpina precedentemente monitorata (corrispondente al territorio definito dalla Convenzione delle Alpi, e monitorato nell'ambito del Wolf Alpine Group (WAG, 2022), che è visibile nella mappa di densità con perimetro blu (Figura 19).

Infatti nelle stime degli anni passati non sono state considerate la parte appenninica della Regione Liguria e la Provincia di Alessandria in Piemonte, nonostante il lupo fosse già presente in alte densità in queste zone. La Regione Liguria e la Provincia di Alessandria in questo lavoro sono considerate insieme alle regioni alpine e sono parte della stima precedentemente esposta (Tabella 7). Quindi per sola comparazione con il passato viene fornita anche la stima della consistenza del lupo per la porzione alpina italiana, stimato di **686 (CI95%: 598-792)**.

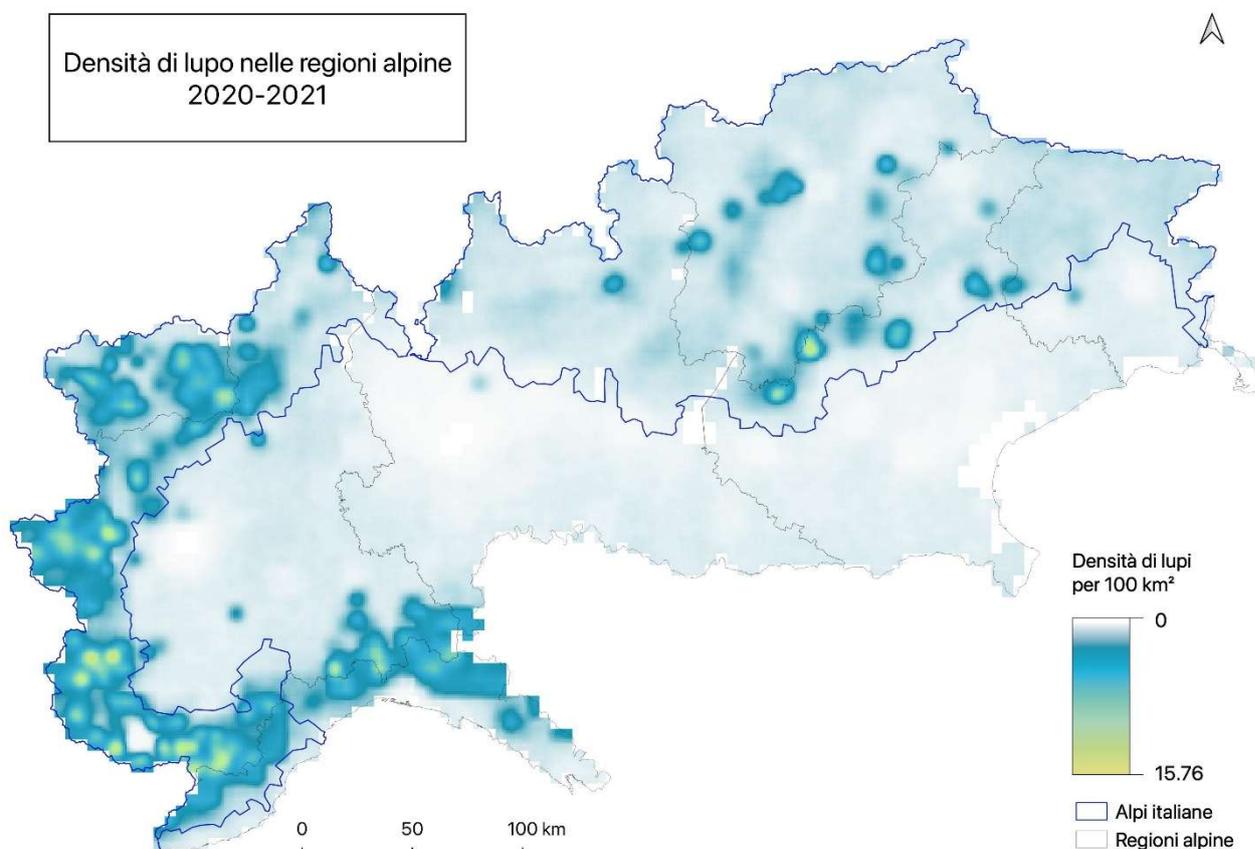


Figura 19. Mappa di densità di lupo per l'area delle regioni alpine (evidenziate in nero) e per l'area identificata come area alpina (in blu) ottenuta per la stagione di monitoraggio 2020/2021 dal modello di cattura-marcatore spaziale costruito utilizzando i dati genetici non-invasivi.

Tramite i risultati del modello si è stimato che la sex ratio della popolazione di lupi alpini sia 1:1, infatti le femmine compongono il 49.5 % (CI95%: 47%-53 %) della popolazione totale, contando tra 469 (CI95%: 396-561) individui, mentre gli individui identificati come maschi sono 478 (CI95%: 390 - 586).

Sul totale della popolazione inoltre, **267 (CI95%: 224-321)** individui sono stati categorizzati come alpha/genitori - quindi il 28.2% (CI95%: 23%-34%) della popolazione, mentre per le categorie di “figli” e “altri” si sono stimati rispettivamente **580 (CI95%: 469-718)** e **98 (76-126)** individui (Tabella 7). Gli individui “giovani” sono la componente maggiore della popolazione, per i quali si stima una percentuale del 61.3% (CI95%: 55% - 68%) sul totale, mentre come atteso, gli “altri”, ovvero i lupi non appartenenti a branchi, occupano una fetta esigua della popolazione avendo una percentuale del 10% (CI95%: 7% - 13%).

Queste stime sono rilevanti, in particolare considerando che un branco di lupi è generalmente formato da una sola coppia alpha, ossia da una sola coppia di genitori, questo fa sì che si possa usare la stima del modello diviso due (come gli individui della coppia) per quantificare il numero di branchi. Data la stima di 267 (CI95%: 224-321) individui alpha, si possono quindi **stimare 134 (CI95%: 112-161), unità riproduttive nelle regioni alpine (arrotondate per eccesso). Questa stima a sua volta è significativa, infatti fornisce la prima stima di unità riproduttive a larga scala con un livello di credibilità associato.**

Se confrontiamo questa stima esaustiva del numero di unità riproduttive di 134 (CI95%: 112- 161), con la stima minima certa documentata di 124 unità riproduttive (Tabella 6, Figura 17), vediamo che la stima prodotta dal modello è altamente affidabile, in particolare considerando che la stima minima prodotta in Tabella 6 è considerata molto precisa, ma mancante dei branchi della regione Liguria, invece stimati dal modello bayesiano.

Oltre alle stime di abbondanza, il modello di cattura-marcatura spazialmente esplicito, SECR, è stato in grado di stimare la variazione spaziale della densità del lupo nelle Alpi italiane (Figura 19). Le densità di lupo più alte si sono riscontrate nelle zone di presenza storica nota per la specie, come in alcune zone della provincia di Torino (13,8 lupi per 100 km²) e Alessandria (12,3 lupi per 100 km²). La densità media della provincia di Torino in totale è comunque di 1.8 lupi per 100 km², e della provincia di Alessandria è di 1.7 lupi per 100 km². In particolare il valore massimo risulta in un'area della provincia di Cuneo con 15,8 lupi per 100 km², va sottolineato però che nella stessa provincia si sono riscontrate anche delle densità molto basse e che la media per la provincia di Cuneo è comunque di 2.6 lupi per 100 km². Nelle regioni dell'est anche si è documentata un'area limitata con alta densità, tra la provincia di Vicenza e Verona (14,7 lupi per 100 km²). In particolare, la densità media della provincia di Vicenza nel totale dell'area di presenza è comunque di 0.8 lupi per 100 km². È altresì importante rimarcare le basse densità di porzioni vaste dell'area considerata come ad esempio la Lombardia, dove la densità media di lupi non supera la media di 0,4 individui per 100 km² con minimo e massimo rispettivamente di 0,002 e 5,5 lupi per 100 km². Questo per sottolineare ancora una volta, come già riportato nel corrente report, la grande eterogeneità nella densità della specie a scala alpina. Per fornire una media complessiva su tutto il territorio di presenza, poco significativa considerando le alte differenze di densità rilevate, la stima è di 1 lupo per 100 km² (precisamente 0.8 per 100 km²) (Figura 19).

Per quanto riguarda le covariate utilizzate per modellare la densità del lupo (Figura 20) si è riscontrato come quest'ultima sia positivamente associata (per ordine di grandezza) alla presenza storica del lupo ($\beta = 0,63$ [0,52 - 0,75]), seguita dalla percentuale di praterie ($\beta = 2,36$ [1,02 - 3,65]), dalla percentuale di copertura forestale ($\beta = 0,49$ [-0,30-1,34]) e associata negativamente alla densità di popolazione umana ($\beta = -0,67$ [-1,34 -0,15]) e alla percentuale di roccia nuda ($\beta = -0,45$ [-1,46 - 0,56]).

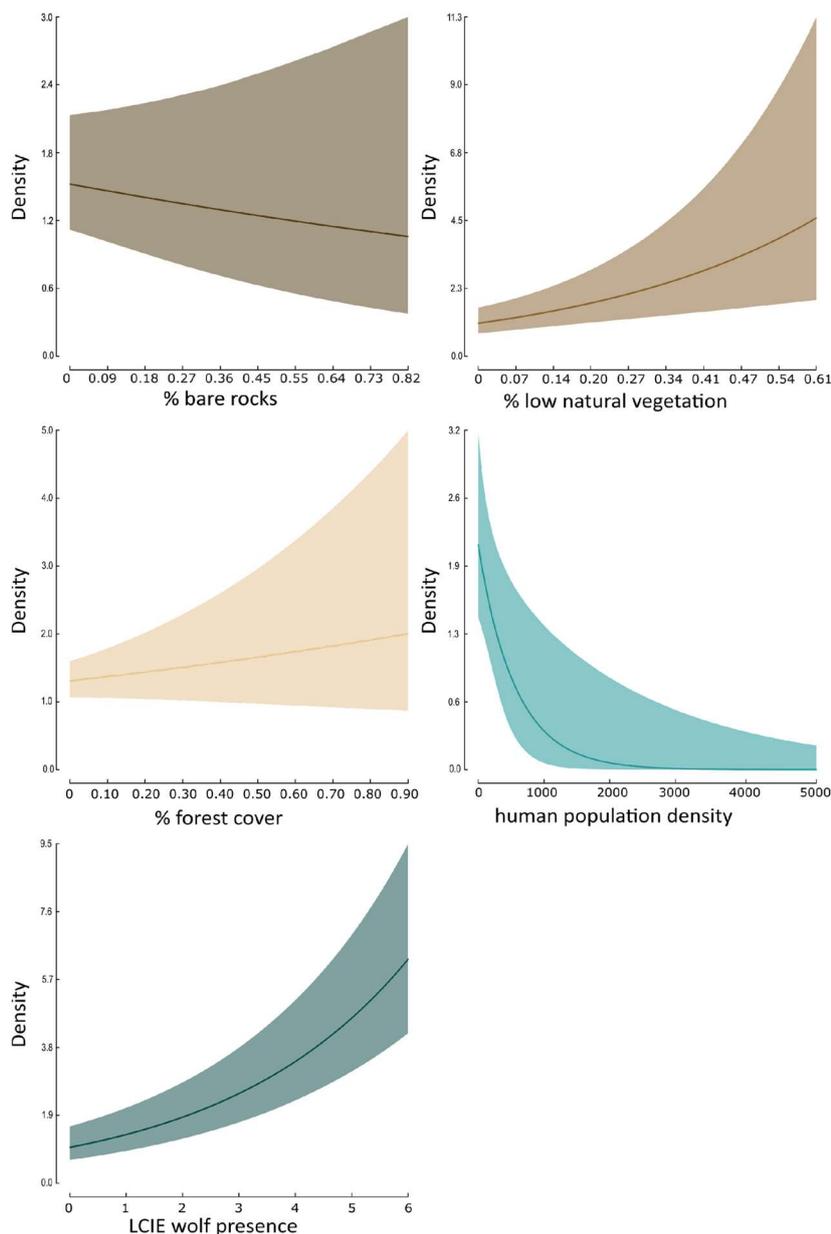


Figura 20. Relazione fra le covariate ambientali e la densità di lupo per le regioni alpine nella stagione di monitoraggio 2020/21 individuate dal modello di cattura-marcatura spaziale costruito sui dati genetici non-invasivi. La densità è indicata come individui/100 km².

Probabilità di contattabilità

Le probabilità di *baseline detection*, contattabilità di base (p_0), per entrambi i sessi sono risultate più alte per gli individui alpha (gli intervalli di credibilità bayesiani al 95% sono forniti tra parentesi; p_0 femmine alpha = 0,006 [0,004-0,009], p_0 maschi alpha = 0,012 [0,007-0,017]) che per i figli (p_0 cuccioli femmina = 0,004 [0,003-0,007], p_0 cuccioli maschio = 0,004 [0,002-0,007]) e gli "altri" (p_0 altri femmina = 0,0005 [0,0002-0,0009], p_0 altri maschio = 0,0002 [0,0001-0,0003]). Come atteso dalla biologia della specie, anche il sesso è risultato un fattore non significativo nell'interpretare le differenze di probabilità di contattabilità tra gli individui, con maschi e femmine che hanno evidenziato in media valori simili.

Questo risultato è un'importante conferma di quanto atteso, infatti era prevedibile rilevare una contattabilità più elevata per i lupi genitori, sia maschi che femmine, con ruolo di alpha. Come noto, i lupi che occupano il più alto gradino sociale all'interno del branco di appartenenza difendono passivamente il territorio tramite

segnali odorosi e quindi con marcature in punti strategici ricorrenti, a differenza dei lupi giovani o solitari che depositano le loro fatte solitamente fuori sentiero (Marucco, 2009; Mech e Boitani, 2003). Date queste caratteristiche etologiche era opportuno attendersi quindi che le fatte degli individui dominanti fossero generalmente più individuabili rispetto a quelle degli altri status analizzati.

La probabilità di contattabilità risulta variare sostanzialmente anche in relazione a una serie di covariate di osservazione (Figura 21). Come atteso e recentemente sottolineato anche da Louvier e colleghi (2017), risulta aumentare soprattutto con l'incremento dello sforzo di campionamento, considerato nel modello come lunghezza dei transetti percorsi ($\beta_i = 0,20 [0,16-0,26]$) seguito dall'esperienza degli operatori che hanno svolto i transetti ($\beta = 0,13[0,10-0,16]$), dalla quantità media di neve caduta al suolo durante il periodo di monitoraggio ($\beta = 0,23 [0,07-0,39]$) e in misura molto minore con il logaritmo della densità della popolazione umana ($\beta = 0,06 [-0,05-0,18]$). Inoltre, la probabilità di contattabilità di base risulta leggermente più alta per la parte contrassegnata come Alpi occidentali, anche se non in modo significativo ($\beta_{\text{ovest}} = 0,19 [-0,09-0,48]$).

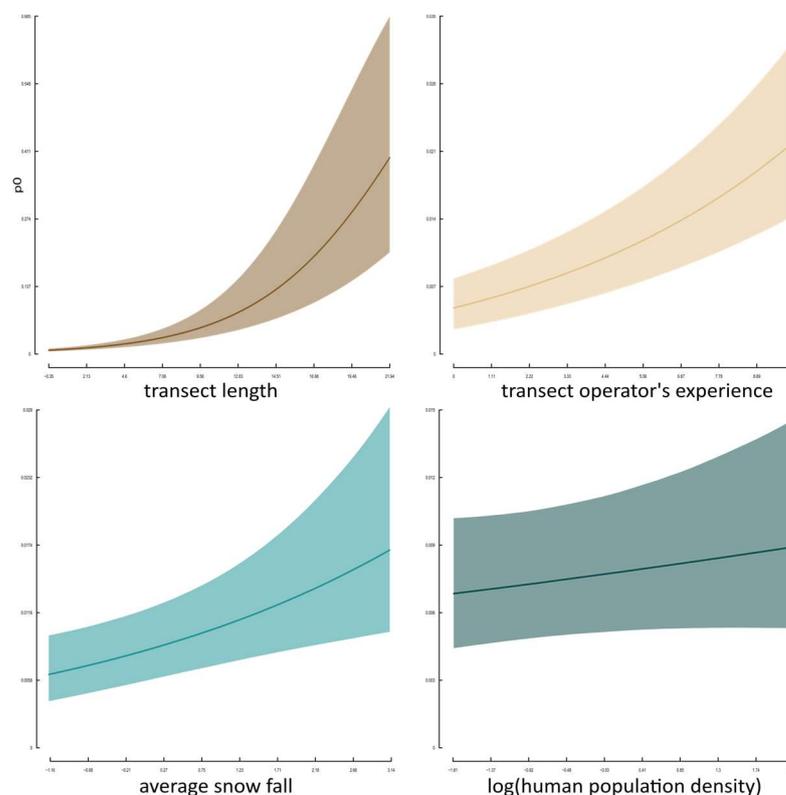


Figura 21. Covariate spaziali della probabilità di contattabilità (p_0) di base per il lupo nelle regioni alpine nella stagione di monitoraggio 2020/21 individuati dal modello di cattura-marcatura spaziale costruito sui dati genetici non-invasivi.

Per quanto riguarda le stime del parametro spaziale σ , relazionato ai movimenti degli individui ed alla relazione con il centro di attività stimato, differiscono fortemente tra gli status sociali (Figura 22) con il valore più alto stimato per gli "altri" maschi ($\sigma_{\text{maschi 'altri'}} = 29,8 \text{ km} [22,6 - 40,9]$) mentre il più piccolo per i maschi alpha ($\sigma_{\text{maschi alpha}} = 2,4 \text{ km} [2,1 - 2,8]$). Anche le femmine "altre" risultano avere parametri di scala più ampi ($\sigma_{\text{femmina 'altri'}} = 13,5 \text{ km} [10,5 - 17,6]$) rispetto alle femmine alpha ($\sigma_{\text{femmina alpha}} = 3,7 \text{ km} [3,2 - 4,1]$) anche se in misura minore rispetto ai maschi. Infine, sia le femmine che i maschi indicati come cuccioli hanno parametri di scala molto simili tra loro ($\sigma_{\text{femmina cucciolo}} = 2,9 \text{ km} [2,5 - 3,5]$ e $\sigma_{\text{maschio cucciolo}} = 2,8 \text{ km} [2,3 - 3,5]$). Questi risultati sono in linea con i più recenti lavori in merito alle strategie riproduttive nelle specie sociali. Ad esempio Ausband (2022), constata come siano i lupi maschi a compiere con più frequenza e successo lunghi viaggi di dispersione in cerca di posizioni riproduttive vacanti all'interno di altri branchi, rispetto alle femmine che invece manifestano un comportamento tendenzialmente più filopatrico. Questa strategia trova

conferma nei parametri di scala spaziale individuati per i lupi nelle regioni alpine, infatti come enunciato sopra i lupi con il valore più ampio, che riflette più ampi spostamenti, sono sempre i maschi soprattutto quelli della categoria 'altri' e quindi individui associati ad un branco con il quale non condividono il patrimonio genetico. È importante però sottolineare che il parametro spaziale σ discusso sopra non è una stima della effettiva dimensione del territorio degli individui anche se spesso viene associato alla stima degli home range (Royle et al. 2014).

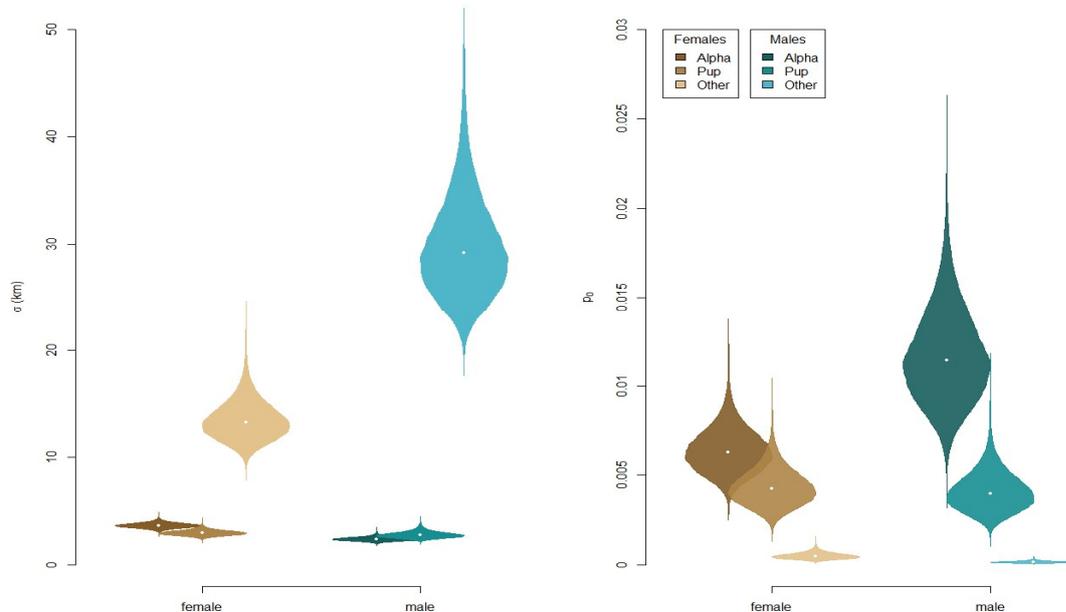


Figure 22. Parametro spaziale (σ) e probabilità di contattabilità di base (p_0) per sesso e status sociale dei lupi delle regioni alpine durante il monitoraggio 2020/2021.

3.6 I casi di ibridazione cane/lupo documentati per la prima volta nelle Regioni alpine

In Europa, la potenziale ibridazione con il cane (*Canis lupus familiaris*) rappresenta una tra le principali minacce per la conservazione della specie selvatica (Boitani et al. 2015). L'ibridazione lupo-cane determina l'introduzione di geni non adattativi nella popolazione selvatica (Leonard et al. 2014) e può modificare l'identità genetica e, conseguentemente, l'ecologia, la morfologia, il comportamento, gli adattamenti, nonché i valori socioculturali e di conservazione della specie (Hindrikson et al. 2017). Per queste ragioni, in Europa, la Convenzione di Berna (Raccomandazione n. 173/2014 - Consiglio d'Europa) esorta gli Stati Membri, tra cui l'Italia, ad implementare delle misure volte sia a monitorare e prevenire questa minaccia, sia a gestire concretamente le casistiche rilevate, facendo ricorso alla rimozione degli individui ibridi lupo-cane dal contesto naturale.

Mentre in occasione delle precedenti campagne di monitoraggio (anche genetico) della popolazione di lupo alpina tutti gli animali campionati sono risultati appartenenti alla specie selvatica *Canis lupus* L. (Marucco et al. 2018; Pilgrim et al. 2018), le indagini condotte nell'ambito del monitoraggio nazionale 2020-2021 hanno portato alla luce i primi 4 casi di branchi con ibridazione lupo-cane nelle Regioni alpine italiane (interessando anche in modo particolare l'Appennino Ligure e Piemontese). Anche screening genetici della popolazione di lupo alpina condotti in contesti internazionali e in anni recenti, hanno documentato un tasso di introgressione molto basso (<2%) su un elevato numero di campioni raccolti tra il 1998 e il 2017, e confrontabile o inferiore

a quello delle altre popolazioni europee (Dufresnes et al. 2019), confermando, sulle Alpi, l'esordio del fenomeno in tempi molto recenti.

Nella stagione 2020-2021, i 4 casi di branchi riproduttivi con ibridazione lupo-cane, sono stati documentati in Liguria, Piemonte e Friuli Venezia Giulia, e sono stati rilevati nel corso di attività condotte da parte degli Enti preposti alla sorveglianza della specie (Figura 23). Due branchi ibridi sono presenti sul territorio alpino delle regioni alpine, e due sul territorio appenninico. L'impiego delle fototrappole previsto dalle Linee Guida e Protocolli per il monitoraggio nazionale del lupo in Italia (Marucco et al. 2020) ha consentito di individuare preliminarmente alcuni soggetti caratterizzati da aspetto molto diverso rispetto a quello tipico della specie selvatica (*wild type*), soprattutto nelle caratteristiche della colorazione del mantello (Figura 24). Nei siti in cui sono stati identificati tali individui fenotipicamente anomali, le attività di campionamento sono state intensificate, soprattutto con l'obiettivo di ottenere un efficace campionamento genetico dei soggetti con caratteristiche fenotipiche sospette, nonché la conferma genetica del fenomeno di ibridazione tramite test genetico di assegnazione, condotto su campioni biologici non-invasivi, confrontando il campione biologico raccolto con le popolazioni di lupo di riferimento e con altre specie, tra cui il cane. Il test di assegnazione è stato condotto dal laboratorio di genetica di ISPRA.

CASO 1 - In Regione Piemonte il primo caso di ibridazione è stato documentato da parte dell'Ente di Gestione dell'Appennino Piemontese, nella zona sud-occidentale della Provincia di Alessandria (nei pressi di Acqui Terme). L'impiego delle fototrappole nel monitoraggio anche in questa zona, ha portato al rilevamento di 6 esemplari (anno 2020-21), caratterizzati da mantello chiaro pressoché uniforme (fenotipo chiaro - Figura 24b). Dato che i primi avvistamenti documentati risalgono al biennio 2019-2020, con un incremento delle frequenze dei rilievi fotografici nell'inverno 2020-2021, è stato documentato che il branco è presente stabilmente nella zona dal 2019-2020 e ha dato luogo a almeno 2 eventi riproduttivi. Il monitoraggio genetico effettuato sui campioni non-invasivi presso i laboratori di biologia molecolare di ISPRA in collaborazione con il laboratorio NGL, ha portato alla luce 5 soggetti ibridi lupo-cane e un genotipo/fenotipo *wild type*. In modo specifico la coppia alpha di questo branco sarebbe costituita da un maschio di lupo (AL-M101) e da una femmina ibrida lupo-cane (AL-F78) di colore biondo, che avrebbe dato luogo a prole, anch'essa campionata sia tramite fototrappole e sia geneticamente nell'inverno 2020-2021. Il pedigree del branco ibrido è stato quindi ricostruito, con un totale di 5 individui risultati geneticamente ibridi.

Considerando quindi il campionamento esaustivo dei genotipi presenti sul territorio delle regioni alpine effettuato nell'ambito del monitoraggio nazionale, e considerando l'individuazione della coppia alpha del branco di ibridi e dei genotipi dei figli, sono stati ricercati campionamenti genetici di questi genotipi nel resto del Piemonte e delle regioni alpine nel database totale.

Grazie a questo approccio, durante il monitoraggio del 2020-2021, un ulteriore evento di dispersione da parte di un giovane individuo ibrido femmina ricampionato, figlia della coppia alpha del branco di ibridi della Provincia di Alessandria (AL-F78 e AL-M101), è stato documentato geneticamente in Provincia di Cuneo, nel Comune di Paroldo. Tuttavia, trattandosi di una giovane femmina in dispersione, non è ancora noto se la presenza dell'animale nell'area sia stabile oppure transitoria, pertanto nella zona è stata attivata un'intensificazione dei controlli senza averla più campionata.

CASO 2 - Un secondo caso di ibridazione per la Regione Piemonte è stato documentato dall'Ente di Gestione delle Aree Protette delle Alpi Cozie, nella provincia di Torino (Bassa Valle di Susa) dove, durante attività di monitoraggio faunistico, è stata rilevata preliminarmente la presenza di un soggetto con mantello chiaro (Figura 24c). Il fenomeno dell'ibridazione è stato confermato anche in questo sito dai referti genetici ottenuti nell'ambito del progetto LIFE Wolfalps EU e dal laboratorio genetico di ISPRA tramite il monitoraggio nazionale. È stata infatti, dimostrata la provenienza di un ibrido (maschio) (TO-M367), nato dalla coppia ibrida della Provincia di Alessandria (branco di Acqui Terme), che ha raggiunto la bassa Valle di Susa per dispersione, costituendo una coppia insieme ad un individuo appartenente alla specie selvatica. Il maschio alpha ibrido

TO-M367 è stato campionato 3 volte nel corso nell'inverno 2020-21 e documentato con il branco. Dunque il branco campionato in Bassa Valle di Susa presenta caratteristiche di introgressione.

CASO 3 - In Liguria, le attività di monitoraggio condotte nel 2020-2021 hanno consentito di identificare la presenza di un branco ibrido in una zona appenninica al confine tra la Provincia di Genova e quella di La Spezia (Comuni dell'Alta Val Petronio), confermando una situazione già nota nel precedente biennio (2018-2019), e rilevata con campionamenti condotti dalla Regione Liguria in collaborazione con l'Associazione ATC Genova 2-Levante. L'impiego delle fototrappole ha portato all'individuazione di alcuni soggetti caratterizzati da mantello scuro, con macchia bianca sulla gola e sul rostrò, sulle zampe, e all'altezza di carpo e metacarpo (Figura 24a), accompagnati ad altri soggetti *wild-type*. Il ricampionamento nel tempo di soggetti con fenotipo anomalo ha dimostrato che il branco fenotipicamente ibrido ha consolidato la sua presenza nel tempo in quest'area, dando luogo anche ad eventi riproduttivi (e probabili dispersioni). Le analisi genetiche su questi individui sono in corso.

CASO 4 - In Friuli Venezia Giulia, il caso di ibridazione è stato rilevato nel contesto dell'area denominata Foresta di Tarvisio, in provincia di Udine. La segnalazione dei soggetti presunti ibridi è datata 2020, raccolta nell'ambito dei monitoraggi condotti dal Reparto Carabinieri Biodiversità di Tarvisio in collaborazione con l'Associazione Progetto Lince Italia. Era inizialmente riferita a un animale (maschio) con mantello completamente nero (Figura 24d), associato ad un altro soggetto normotipo (femmina). Le analisi dei reperti raccolti nel 2020, effettuate dal laboratorio di genetica di ISPRA, hanno permesso di documentare solo la presenza di una femmina di lupo pura, di provenienza italiana. La coppia si è riprodotta nel 2021 producendo 7 cuccioli. Successive analisi dei reperti raccolti a cavallo tra il 2021 e l'inizio del 2022 hanno accertato la presenza di una seconda femmina pura (con componente genetica italiana e dinarica), verosimilmente il soggetto alpha (la prima femmina italice del 2020 non è stata più campionata), e di 3 soggetti ibridi, figli del maschio nero che, sulla base delle numerose documentazioni foto e video raccolte, è stato individuato quale maschio alpha. L'interpretazione congiunta dei dati derivanti dal monitoraggio classico e dei dati genetici ha permesso pertanto di accertare la presenza di un branco di 9 esemplari, di cui 8 ibridi, il padre presumibilmente F1 (cane x lupo), di probabile provenienza slovena, che si è incrociato con la femmina pura, generando 7 cuccioli F2.

Sebbene l'ibridazione lupo-cane sia risultata localizzata in 4 siti, le possibilità di rapida evoluzione del fenomeno sono molto elevate per via del comportamento di dispersione dei giovani individui, che potrebbe acuitizzare una tra le più gravi minacce alla conservazione della specie e quindi della popolazione alpina (Boitani et al. 2015). E' stata dunque ritenuta urgente l'implementazione di interventi mirati alla rimozione e controllo riproduttivo degli ibridi, a partire dai 4 principali siti individuati sopra descritti, affinché non si assista alla progressiva estensione del fenomeno in tutta la popolazione alpina, per effetto di successive riproduzioni e dispersioni.

Nell'ambito del Progetto LIFE Wolfalps EU (2019-2024) e attraverso il contributo delle Regioni Alpine e la supervisione di ISPRA, sono state redatte le "Linee guida per la gestione degli ibridi lupo-cane nelle Regioni alpine" (AA.VV. 2021), che propongono un iter autorizzativo e procedurale per orientare gli interventi di neutralizzazione riproduttiva dei soggetti ibridi dal contesto naturale, nell'ambito della popolazione di lupo alpina, in coerenza con il quadro normativo nazionale e comunitario attualmente vigente, il quale presenta alcune situazioni di "vuoto regolamentare" rispetto alla gestione e mitigazione di questa minaccia. Il documento offre anche uno strumento (in forma di allegato) per poter, eventualmente, aggiornare la distribuzione dei casi nel tempo.

A partire da tali indicazioni le Regioni interessate alla gestione del fenomeno, hanno attivato delle strategie operative atte ad ottenere le autorizzazioni necessarie, da parte del Ministero per la Transizione Ecologica (Mi.T.E), su parere ISPRA, per supportare l'implementazione degli interventi di mitigazione del fenomeno nel

breve periodo. La gestione dei casi di ibridazione è stata avviata dalla Regione Friuli Venezia Giulia in collaborazione con i Carabinieri Forestali e Progetto Lince Italia a partire dal settembre 2021, mentre in Piemonte e Liguria sono stati organizzati degli interventi di neutralizzazione riproduttiva dei soggetti ibridi, che avranno luogo a partire dal secondo semestre del 2022 e nell'ambito del finanziamento LIFE Wolfalps EU. Nello specifico, la gestione dei 2 casi documentati nel corridoio Appenninico si avvarrà del supporto operativo del Wolf Apennine Center (fondato dal Parco Nazionale dell'Appennino Tosco-Emiliano) per l'esperienza specifica già consolidata in ambito appenninico nell'ambito del Progetto LIFE Mirco lupo. Il caso delle Alpi Cozie sarà gestito grazie ad una task-force creata da Ente di Gestione Aree Protette Alpi Cozie, Città Metropolitana di Torino, Centro di referenza Grandi Carnivori, CANC, Università di Torino supportati dalla Regione Piemonte.

Le prime esperienze di gestione dei casi di ibridazione sulle Alpi hanno permesso di verificare che l'attuale strategia, che prevede la cattura dei soggetti presunti ibridi, la loro captivazione in attesa dell'esito delle analisi genetiche, la loro eventuale neutralizzazione riproduttiva (e/o l'aborto), rappresenta una soluzione eccessivamente complessa, onerosa, non sostenibile a medio/lungo termine e quindi non efficace per affrontare adeguatamente il problema.

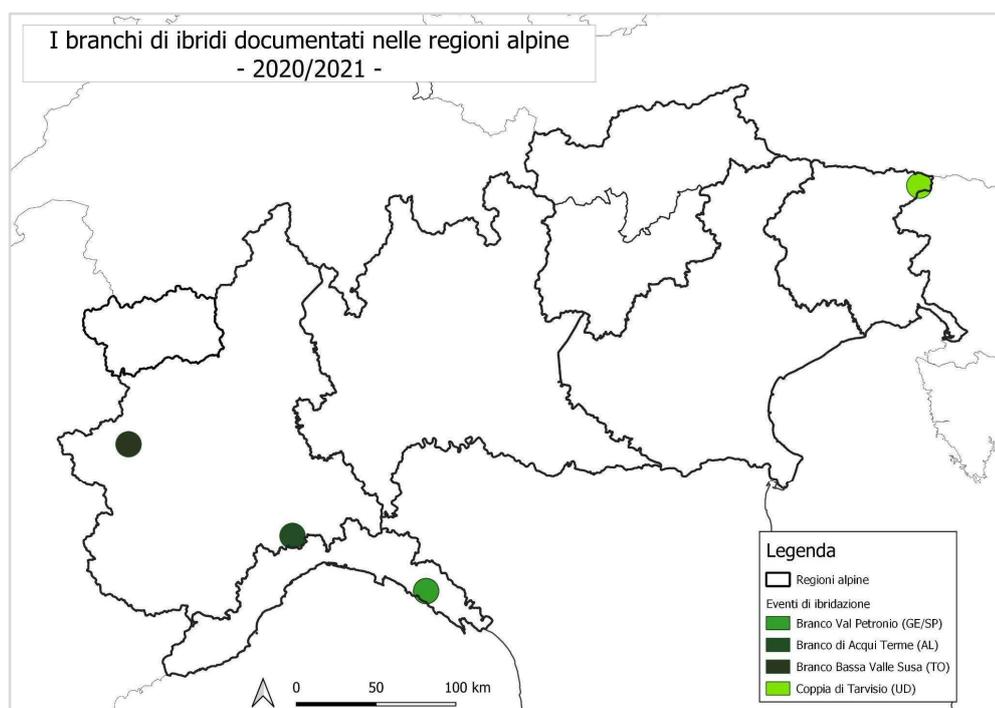


Figura 23. Distribuzione dei casi documentati di ibridazione tra il lupo e il cane nelle Regioni Alpine con aggiornamento all'inverno 2020-2021, grazie al contributo di Regioni Liguria, Regione Piemonte (Ente di Gestione Aree Protette Appennino Piemontese ed Ente di Gestione delle Aree Protette Alpi Cozie), e Progetto Lince Italia.

a) Fenotipo anomalo nero rilevato in Liguria - Provincia di Genova-La Spezia, in Val Petronio (foto: Regione Liguria in collaborazione con ATC Genova 2 – Levante)



b) Fenotipo biondo anomalo rilevato in Piemonte - Provincia di Alessandria, nel Comune di Morbello (foto: ASD La Ventura)



c) Fenotipo biondo anomalo rilevato in Piemonte - Provincia di Torino in val di Susa (foto: Ente di Gestione Aree Protette Alpi Cozie)



d) Fenotipo nero anomalo rilevato in Friuli Venezia Giulia, in Provincia di Udine (foto: Progetto Lince Italia)



Figura 24. - Le immagini da fototrappole che ritraggono gli Individui ibridi lupo-cane documentati nelle Regioni Alpine italiane nei 4 casi di branchi ibridi documentati.

APPENDICI - DETTAGLI SUI METODI ADOTTATI E SUI RISULTATI OTTENUTI

APPENDICE 1. Le analisi genetiche e i protocolli di laboratorio del NGL

*Kristy Pilgrim, Laboratory Supervisor
National Genomics Center for Wildlife and Fish Conservation*

Choice of DNA markers to be used for determining individual identification were based on loci previously on wolf samples from Italy and DNA primers and protocols were formalized by ISPRA. Microsatellite allele data is measured by length in base pairs (bp) and in order to provide consistency of allele scoring between laboratories, DNA from genotyped samples was shared between laboratories along with accompanying microsatellite allele scores so that microsatellite allele data were standardized. This allowed for the multiple laboratories to produce microsatellite data on wolf samples that could be compared. All samples were tested with mitochondrial DNA. Mitochondrial DNA allowed us to determine species for the non-invasive samples as well as identify haplotype for all wolf samples. Samples from wolves were further tested using variable microsatellite loci to determine individual, and a DNA sexing test where needed

DNA was extracted from scats using the QIAGEN QIAmp Fast DNA Stool Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and from hair using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturers protocols and modifications for hair (Mills et al. 2000). Scat and hair samples were processed in a dedicated laboratory for non-invasive samples and were eluted in 100µl. DNA was extracted from tissues using the DNeasy Blood and Tissue Kit following the protocol for tissue. We amplified the left domain of the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) for species and haplotype testing using primers WdloopH519F and WdloopH519R (Fabbri et al. 2014). Reaction volumes of 30 µl contained 50–100 ng DNA, 1× reaction buffer (Life Technologies, NY, USA), 2.5 mM MgCl₂, 200 µM each dNTP, 1 µM each primer, 1 U Amplitaq Gold DNA polymerase (Life Technologies, NY, USA). The PCR program was 94 °C/5 min, [94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min 30s] × 34 cycles, 72 °C/5 min. The quality and quantity of template DNA were determined by 1.6% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified using ExoSap-IT (Affymetrix-USB Corporation, OH, USA) according to manufacturer's instructions. Reactions were sequenced using the same primers at Eurofins Genomics (Louisville, KY) using standard Sanger sequencing protocols. DNA sequence data were viewed and aligned with Sequencher (Gene Codes Corp. MI) and compared for haplotype using the program Dambe (Xia and Xie 2001).

We amplified 16 variable microsatellite loci, ten of which were used previously on wolves from this region (Marucco et al. 2009). Microsatellite loci used in this study were: CPH2, CPH4, CPH5, CPH8, CPH12, FH2004, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096, FH2137, FH2140, FH2161, CO9.250, C20.253, and Pez17 (Ostrander et al. 1993, Freedholm and Winteroe 1995, Francisco et al. 1996, Neff et al. 1999). Non-invasive samples were also tested for sex (Lucchini et al. 2002). The reaction volume (10 µl) contained 1.0 µl DNA, 1x reaction buffer (Life Technologies), 2.0 mM MgCl₂, 200µM of each dNTP, 1µM reverse primer, 1µM dye-labeled forward primer, 1.5 mg/ml BSA, and 1µ Amplitaq Gold DNA polymerase (Life Technologies). The PCR profile was 94°C/5 min, [94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/30s] x 45 cycles). DNA from non-invasive scat and hair samples was amplified at least twice at each locus using a multi-tube approach (McKelvey and Schwartz 2004). The resultant PCR products were visualized on a LI-COR DNA analyzer (LI-COR Biotechnology).

Microsatellite data was error checked for quality and potential allelic dropout and false alleles. We used allele scores only if they were consistent between amplifications, and samples were re-amplified at least twice more at loci with discrepancies until alleles were confirmed or were dropped from further analysis. Samples that failed at 8 or more loci were removed as poor quality. We used the program Dropout 2.3 (McKelvey and

Schwartz 2005) to determine matching samples and calculate the probability of identity. This program also identifies samples that have genotypes that differ by only one or two alleles across loci. In those cases, allele scores are checked and/or samples are re-amplified at the loci in question to determine if samples are from the same individual. Unique genotypes were further tested for heterozygosity and allelic diversity GenAEx (Peakall and Smouse, 2012). We evaluated pack structure for paternal and maternal relationships using exclusion conducted by hand and subsequently using the program CERVUS 3.0 using the strict (95%) confidence criteria to assess those relationships (<https://cervus.software.informer.com/3.0/>). Genotypes were also evaluated with ML-RELATE (Kalinowski et al. 2006). where we tested individual relatedness to other individuals in the putative packs.

Cited references for Appendix 1

- Fabbri, E., Caniglia, R., Kusak, J., Galov, A., Gomerčič, T., Arbanasić C C, H., Huber, D., & Randi, E. (2014). Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mammalian Biology*, 79, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.10.002>
- Kalinowski, S., A.P. Wagner, A.P. and Taper, M.L. (2006). ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6, 576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
- Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L., & Randi, E. (2002). Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11, 857–868.
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm Genome* 7: 359–362.
- Fredholm M and Winteroe AK. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm Genome* 6: 11–18.
- Marucco, F., Pletscher, D., Boitani, L., Schwartz, M., Pilgrim, K., & Lebreton, J. (2009). Wolf survival and population trend using non-invasive capture-recapture techniques in the Western Alps. *Journal of Applied Ecology*, 46(5), 1003–1010.
- McKelvey KS and Schwartz MK. 2005. Dropout: a program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Molecular Ecology Notes* 5: 716–718.
- Mills LS, Pilgrim, KL, Schwartz MK, McKelvey KM. 2000. Identifying lynx and other North American felids based on mtDNA. *Conservation Genetics*, 1: 285–288.
- Neff MW, Broman KW, Mellersh CS, Ray K, Ackland GM, Aguirre GD, Ziegler JS, Ostrander EA, Rine J. 1999. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151:803–820.
- Ostrander EA, Sprague GF, Rine J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dogs. *Genomics* 16: 207–213.
- Peakall R. and Smouse PE. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Xia X and Xie Z. 2001. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity* 94: 371-373.

APPENDICE 2. Le analisi statistiche e i modelli espliciti spaziali di cattura-ricattura (SECR)

P. Dupont, R. Bischof, C. Milleret, M.V. Boiani, A. von Hardenberg e F. Marucco
Norwegian University of Life Sciences, NMBU
University of Chester, Department of Biological Sciences
University of Torino, Dipartimento Scienze della Vita e Biologia dei sistemi, DBIOS

Per poter analizzare i dati raccolti per l'intero arco alpino italiano, tramite campionamento genetico non invasivo (ngs), abbiamo sviluppato un modello Bayesiano di cattura-marcatura spaziale (Spatial explicit Capture Recapture, SECR) (Royle 2009). I modelli SECR possono essere decomposti in tre sottomodelli: *i*) un modello spaziale che descrive la distribuzione dei centri di attività (AC) degli individui, *ii*) un modello di stato, a scala di individuo, utilizzato per stimare la dimensione della popolazione, e *iii*) un modello di contattabilità che descrive come la probabilità di contattabilità individuale vari nello spazio.

Modello spaziale

I modelli SECR standard assumono che i centri di attività degli individui siano uniformemente distribuiti nell'habitat disponibile S , assumendo così una densità di popolazione omogenea (Royle et al., 2013). Nella nostra analisi, S è stata definita come l'intera area di studio (tutte le Alpi italiane; Figura 4) alla quale è stato applicato un buffer di 30 km per consentire il rilevamento all'interno dell'area di studio di individui che vivono anche all'esterno di essa. Abbiamo poi disegnato una griglia di 5x5 km sull'area risultante al fine di definire l'habitat per il potenziale posizionamento degli AC. Abbiamo inoltre rimosso tutte le celle della griglia che erano coperte da più del 50% di neve perenne (ghiacciai) o più del 50% di grandi laghi o ancora con densità di popolazione umana superiore a 5000 ab/km² ritenendole a priori non idonee.

Tuttavia, la densità dei lupi nelle Alpi è tutt'altro che omogenea (Marucco et al. 2018). Al fine di tenere conto di questa potenziale violazione dell'assunto e stimare la variazione spaziale della densità del lupo in tutte le Alpi italiane, abbiamo modellato la distribuzione dei centri di attività individuali su S come un processo puntiforme binomiale disomogeneo (Wei et al., 2021, Illian 2008) con intensità:

$$I_h = e^{\beta X_h}$$

dove I_h è l'intensità del processo puntiforme nella cella h della griglia dell'habitat, X_h è il vettore dei valori delle covariate per la cella h della griglia dell'habitat e β è il vettore dei coefficienti associati. Per modellare i centri di attività individuali, abbiamo quindi considerato le seguenti covariate:

- Presenza storica del lupo: la densità attuale del lupo è il risultato della storia di ricolonizzazione della specie nelle Alpi italiane dalla popolazione appenninica (Fabbri et al., 2007; Marucco et al. 2010) e dinarica (Fabbri et al. 2014). Per ottenere un strato che potesse rappresentare questo processo abbiamo combinato le griglie di presenza del lupo, con risoluzione 10 km, prodotte dalla Large Carnivore Initiative Europe (LCIE-IUCN) nel 2014 (Chapron et al.) e nel 2018 (Boitani et al., IUCN Red List). La prima griglia è basata su informazioni raccolte dal 2006 al 2012, mentre la seconda griglia ha utilizzato i dati dal 2012 al 2016. Entrambe le griglie hanno classificato la presenza del lupo negli anni considerati come sporadica o permanente, abbiamo trasformato questa informazione in valore numerico (1 per sporadica e 3 per permanente). In un secondo momento abbiamo sommato le due griglie (ponderate in base alla sovrapposizione dell'area tra la griglia LCIE-IUCN di 10 km e la griglia habitat di 5 km utilizzata nel modello) per creare un indice della presenza storica dei lupi in ogni cella della griglia habitat (da 0, nessuna presenza di lupo registrata nei due periodi, a 6, presenza permanente nei due periodi).

- % di copertura forestale: Partendo dal Corine Land Cover (CLC) 2018, la più recente elaborazione di Copernicus per l'uso del suolo a livello europeo, abbiamo calcolato la percentuale di copertura forestale complessiva raggruppando tutte le categorie forestali (latifoglie, conifere e miste) sotto un'unica classe forestale, in un secondo passo abbiamo calcolato la percentuale complessiva per ogni cella della griglia dell'habitat.

- % di vegetazione bassa naturale: Come sopra, abbiamo utilizzato in input il dato CLC 2018. Al fine di ottenere questo strato abbiamo aggregato diverse categorie come: brughiera, arbusti di transizione e praterie naturali che rientravano nella classificazione più ampia di vegetazione bassa naturale. Abbiamo in ultimo calcolato la percentuale di copertura per ogni cella della griglia dell'habitat.

- % di roccia nuda: Quest'ultima covariata ambientale, come le due precedenti è stata originata a partire dal CLC 2018, è data dall'aggregazione di tutti quegli strati riferiti alla vegetazione rada o assente. La percentuale è quindi calcolata per tutte le celle della griglia dell'habitat.

- Densità della popolazione umana: Abbiamo ottenuto una quantificazione della popolazione umana attraverso l'aggregazione e il calcolo del valore medio della griglia di densità della popolazione umana di WorldPop (<https://www.worldpop.org/>), che originariamente ha una risoluzione di 1 km, per tutte le celle della griglia dei detectors. L'unità di misura è il numero di abitanti per chilometro quadrato. In ultimo, abbiamo applicato a tutte le celle della griglia ottenuta precedentemente una trasformazione logaritmica al fine di rendere la distribuzione dei dati più vicina a una distribuzione normale.

Modello di stato individuale

Al fine di poter stimare la popolazione totale, i modelli bayesiani SECR utilizzano generalmente un approccio di incremento dei dati, ovvero vengono simulati nel modello degli individui potenzialmente non campionati ma presenti nella popolazione (Royle et al. 2013). Per poter tener conto di questa funzione, lo stato di un individuo è descritto da una variabile di stato Z avente distribuzione di Bernoulli, che assume valore 1 se l'individuo è un vero membro della popolazione e 0 nel caso contrario (ovvero se è uno di quegli individui inseriti nel modello tramite incremento dei dati):

$$z_i \sim \text{Bernoulli}(\psi)$$

dove ψ è la probabilità per un individuo del gruppo di individui stimati presenti anche se non campionati di appartenere alla popolazione. La dimensione della popolazione (N) si ottiene quindi sommando il vettore Z :

$$N = \sum_{i=1}^M z_i$$

dove M è il numero totale di individui considerati nel gruppo aumentato ($M \gg N$).

Allo stesso modo, anche sesso e status sociale possono essere stimati per questi individui e per quelli di cui non si ha preventivamente l'informazione sul sesso o lo status sociale (Indeterminati). Infatti, le covariate individuali mancanti sono una caratteristica comune dei modelli SECR, poiché queste saranno sempre mancanti per gli individui che non sono mai stati rilevati, cioè gli individui aumentati, e potrebbero anche essere mancanti per un certo numero di individui rilevati il cui stato non può essere determinato sulla base

dei campioni raccolti (per esempio a causa di un'amplificazione del *sex-marker* fallita o a causa di incertezza nell'osservazione dello status sociale). Le covariate individuali sono quindi trattate come variabili latenti per le quali viene elaborato un modello all'interno del modello SECR stesso. Nella presente analisi, abbiamo modellato il sesso individuale come una variabile di stato proveniente da una distribuzione di Bernoulli, che assume valore 1 se l'individuo è femmina e 0 se maschio:

$$sex_i \sim \text{Bernoulli}(\rho)$$

dove ρ è la proporzione di femmine nella popolazione (di seguito la *sex-ratio*).

Poiché un assunto innovativo del nostro modello è che la probabilità di rilevamento, e quindi i modelli di rilevamento spaziale, differissero a seconda dello status sociale dei lupi nella popolazione, abbiamo anche considerato lo status degli individui rilevati sulla base delle analisi genetiche di pedigree di ogni branco individuato. In particolare, in ogni branco campionato, abbiamo distinto i genotipi tramite pedigree in:

- **alpha/genitori**: dalla ricostruzione del pedigree di ogni individuo è stato possibile definire con precisione gli individui riproduttori, quindi i due genitori
- **figli**: tramite analisi di pedigree è stato anche possibile definire con precisione i figli della coppia riproduttiva. Non è stato possibile definire l'età, quindi se figli dell'anno o dell'anno precedente, nel caso in cui la coppia fosse rimasta la stessa. Si indicano quindi come figli generici, senza definire l'età.
- **altro**: nel caso in cui il genotipo del lupo campionato fosse completamente diverso da quelli del branco in cui è presente, e non dimostrasse nessun legame di parentela con gli individui del branco
- **non determinato (NA)**: nel caso in cui non fosse stato possibile risalire a nessuna informazione

Si vuole sottolineare l'unicità di questo tipo di dato soprattutto considerata l'ampia scala spaziale analizzata. Difatti, riuscire ad ottenere un riconoscimento degli individui a livello di pedigree per lo studio di una popolazione di carnivori costituisce un *unicum* a livello internazionale e i risultati di questa analisi sono sicuramente un primo passo verso un potenziamento della conoscenza della specie a scala sociale-spaziale.

Lo status sociale degli individui è stato poi modellato come una variabile di stato categorica:

$$status_i \sim \text{Categorical}(\theta_{sex})$$

dove θ_{sex} è un vettore sesso-specifico che denota la proporzione di individui di ogni sesso in ogni categoria di stato sociale ($\sum \theta_{sex} = 1$).

Modello di contattabilità

Il modello di contattabilità descrive come la probabilità di rilevamento individuale varia nello spazio, cioè come la probabilità di poter campionare o meno un individuo dipende dalla sua posizione rispetto alla posizione dei *detectors*, ovvero una serie di covariate trasformate in una rete puntiforme, utilizzate per descrivere al meglio il variare della probabilità di riscontrare o meno segni di presenza della specie. Questo perché, uno degli assunti fondamentali dei modelli SECR è che la contattabilità è massima quando il punto di campionamento potenziale, *detectors*, coincide con il centro degli AC, e diminuisce seguendo una funzione semi-normale, all'allontanarsi da quel punto nello spazio (Borchers & Efford 2008). Questo valore massimo di contattabilità (*baseline detection*) è definito p_0 mentre, il parametro spaziale σ , che è uguale a $p_0/2$, è

ritenuto essere in relazione con la dimensione dell'home range dell'individuo, o meglio parlando in termini probabilistici, all'uso dello spazio specifico.

Quindi, p_{ij} , ovvero la probabilità per l'individuo i di essere rilevato al *detectors* j , è in funzione della distanza d_{ij} tra il centro di attività individuale s_i e il *detectors* j :

$$p_{ij} = \dot{p}_{o_{ij}} e^{\frac{-d^2}{2\sigma_i^2}}$$

Con

$$\text{logit}(\dot{p}_{o_{ij}}) = p_{0_{sex_i status_i}} + \beta X_j$$

e

$$\sigma_i = \sigma_{sex_i status_i}$$

dove $p_{0_{sex_i status_i}}$ è la probabilità di contattabilità di base, specifica per sesso e status, mentre $\sigma_{sex_i status_i}$ è il parametro spaziale specifico per sesso e status (Royle et al, 2013), X_j è il vettore delle covariate relative ai *detectors* e β è il vettore dei coefficienti ed esse associati. Per modellare la contattabilità, abbiamo quindi considerato le seguenti covariate:

- Lunghezza dei transetti (Figura 10): Che rappresenta la somma delle lunghezze di tutti i transetti percorsi durante la stagione di campionamento (ottobre 2020 - aprile 2021) per ogni cella della griglia dei *detectors*. Per ogni transetto abbiamo considerato l'esatta percentuale di distanza percorsa, questo perchè nelle Alpi durante la stagione invernale, alcuni tratti dei transetti non sono percorribili quando c'è neve al suolo e quindi per una questione di sicurezza gli operatori devono fermarsi prima del raggiungimento di quelle porzioni di transetto, e quindi del completamento dell'intero percorso. Per ulteriori dettagli riguardo lo svolgimento dei transetti e il calcolo dello sforzo si rimanda al cap. 3.1 'Sforzo di campionamento'.

- Esperienza degli operatori (Figura 12): Oltre alle informazioni riguardanti lo sforzo del campionamento (lunghezza dei transetti), abbiamo individuato la necessità di tenere conto dell'esperienza di formazione degli operatori coinvolti nell'attività di monitoraggio. Abbiamo ottenuto questo dato moltiplicando un primo parametro dato dagli anni di coinvolgimento nell'attività di monitoraggio del lupo, identificato per province, e l'esperienza di ogni operatore, data dalla categoria di appartenenza (es. i guardiaparco hanno un'esperienza maggiore dei volontari). Il dato finale utilizzato dal modello è stato determinato dalla media dell'indice ottenuto per ogni cella della griglia.

- Neve al suolo: Per ottenere una stima delle quantità di neve caduta al suolo abbiamo calcolato la media, per ogni cella della griglia dei *detectors*, del totale della neve accumulata sulla superficie terrestre (in metri di acqua equivalente) durante la stagione di campionamento (ottobre 2020 - aprile 2021), dato originariamente ottenuto dalla rianalisi ERA-5 (<https://cds.climate.copernicus.eu/>).

- Est/Ovest : Abbiamo inoltre suddiviso la regione alpina in due sottoregioni per tenere conto delle potenziali differenze di rilevabilità tra le due aree. Le Alpi occidentali sono state ricolonizzate per prime (Marucco et al., 2009.) e presentano densità di lupo generalmente più elevate e quindi è ipotizzabile una probabilità diversa di rilevare la presenza del lupo rispetto alla parte più orientale. Per fare ciò abbiamo utilizzato la griglia di presenza del lupo di LCIE (descritta precedentemente in 'Modello Spaziale'), grazie alla quale siamo stati in

grado di localizzare l'area in cui la popolazione alpina di lupo si può dividere naturalmente in parte occidentale e parte orientale.

- Densità della popolazione umana: Stessa variabile, ed elaborazione, della covariata utilizzata per la modellizzazione degli AC nel modello spaziale, vedi il paragrafo 'Modello Spaziale'.

Infine, le informazioni ottenute riguardanti la contattabilità y_{ij} sono modellate come la realizzazione di un processo binomiale condizionato dallo status individuale, dal sesso e dalla probabilità di contattabilità specifica dei *detectors*:

$$y_{ij} \sim \text{Binomial}(p_{ij}, z_i, \text{size}_j)$$

Il prodotto p_{ij} è usato per imporre che gli individui aumentati nel modello non possano essere rilevati.

Per tenere conto del fatto che i lupi potrebbero essere rilevati in maniera opportunistica ovunque all'interno dell'area di studio (quindi non solamente durante lo svolgimento dei transetti sistematici, data la presenza di personale formato ovunque nelle regioni alpine), abbiamo sovrapposto una griglia di 5x5 km sull'intera area di studio e abbiamo usato i centroidi delle celle di questa griglia per definire le posizioni spaziali dei *detectors*. Ogni cella della griglia, durante la modellizzazione, è stata suddivisa in ulteriori 25 celle (*sub-detectors*) da 1x1 km utilizzando un modello Binomiale Parzialmente Aggregato (PAB, Millert et al. 2018) così da poter modellizzare la probabilità di contattabilità in ogni cella 5x5 invece di avere solamente valori 0 o 1 come invece si sarebbe ottenuto con una distribuzione di Bernoulli.

Abbiamo poi rimosso tutte le celle della griglia che erano coperte da più del 50% di neve perenne (ghiacciai) o più del 50% di grandi laghi o con densità di popolazione umana superiore a 5000 ab/km², ritenendole a priori non idonee alla presenza del lupo.

Fitting del modello e post-processing

Per sviluppare i modelli SECR abbiamo utilizzato il pacchetto NIMBLE versione 0.6-9 (de Valpine et al. 2017) implementato nel linguaggio statistico R (versione 3.5.2, R Development Core Team 2018). Al fine di ottenere dei risultati robusti abbiamo eseguito 4 diverse catene (Catena di Markov Monte Carlo, MCMC) aventi 50.000 interazioni ciascuna e infine scartato i primi 10.000 campioni come *burn-in*, portando ad un totale di 160.000 campioni MCMC. Abbiamo valutato la convergenza fra le catene MCMC guardando il valore potenziale di riduzione di scala, che combina il tasso di variabilità totale tra catene con la variabilità interna alle catene, per tutti i parametri e la miscelazione delle catene usando dei *trace-plot* (Brooks e Gelman 1998). I campioni ottenuti dalle catene MCMC sono stati assottigliati selezionando un valore ogni 10 (*thinning rate*, che permette di ridurre il calcolo computazionale salvando solamente un'iterazione ogni 10 e ridurre la correlazione fra campioni MCMC). Le stime dei nostri modelli SECR sono dunque basate su un campione di 16000 valori della distribuzione a posteriori. Per poter ottenere una stima dell'abbondanza per ogni area, quindi sia per l'intera regione di studio, per l'area alpina o considerando la divisione di Est e Ovest, abbiamo sommato il numero di posizioni dei centri di attività previsti dal modello che cadevano nell'area di interesse per ogni iterazione delle catene MCMC, generando così una distribuzione a posteriori dell'abbondanza per ogni area di interesse.

APPENDICE 3. Descrizione nel dettaglio delle analisi del laboratorio NGL, condotte su regione Piemonte, Veneto e Friuli Venezia Giulia

Kristy Pilgrim, Laboratory Supervisor
National Genomics Center for Wildlife and Fish Conservation

Nell'ambito del LIFE WolfAlps EU, e grazie al lavoro del laboratorio genetico NGL, sono stati analizzati geneticamente un totale di 1.172 campioni raccolti nel 2020-2021, appartenenti alle regioni Piemonte, Veneto e Friuli Venezia Giulia. Questi campioni costituiscono la maggior parte dei campioni identificati, e su questi si è eseguita un'analisi dei livelli di eterozigotità valutati, che possono essere rappresentativi per la totalità della popolazione, essendo distribuiti sia a est sia a ovest delle alpi. La maggior parte dei campioni era composta da escrementi, (1.653) insieme a tessuti (98), sangue (3), peli (9), denti (2) e tamponi di sangue o saliva (6). Dopo aver rimosso i campioni che non hanno superato le misure di qualità iniziali (cioè l'amplificazione allelica coerente a 8 o più loci), e rimuovendo i campioni che avevano sospetto di *dropout* allelico o presenza di falsi alleli, abbiamo ottenuto dati di genotipo microsatellite di qualità da **745 campioni**. I test di errore eseguiti nel programma DROPOUT hanno determinato che gli individui differivano di due o più loci (Figura A3-1). Questo suggerisce che non ci siano errori nel set di dati, poiché gli errori spesso si presentano come una seconda modalità sul lato sinistro del grafico.

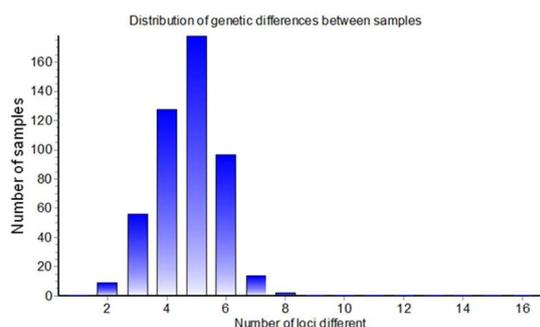


Figura A3-1. Risultati del test Examining Bimodality (EB) sui dati del genotipo del lupo del progetto LIFE WOLFALPS EU.

Le misure della diversità genetica per questo set di dati hanno indicato che i loci utilizzati avevano un ampio potere di distinguere gli individui. E' stata stimata la probabilità di identità (PI; Paetkau e 1994) e la probabilità che i fratelli siano identici (PIsib; Evett e Weir 1998) come $2.98E-13$ e $5.69E-06$, rispettivamente. Queste probabilità si traducono nella possibilità che due individui siano diversi, ma abbiamo una probabilità di 1 su 3.370.407.819.346 (oltre 3 trilioni) che due individui corrispondano solo per caso con il pannello dei marcatori, e una probabilità di 1 su 176.460 che due fratelli abbiano un genotipo identico, a dimostrazione della bassa probabilità di errore individuata. Questa valutazione è fondamentale perché poi questi genotipi sono stati utilizzati nell'ambito della valutazione della consistenza della popolazione (cap. 3.5.).

Di seguito vengono presentate alcune statistiche riassuntive su ogni popolazione di alleli per locus (Tabella A3_1). Sono stati eseguiti i calcoli delle misure genetiche comuni per 449 individui unici, di quelli utilizzati per la stima dell'abbondanza (Tabella A3_1). La prima colonna è il nome del locus microsatellite, seguito dal numero di alleli a quel locus nella popolazione, il numero effettivo di alleli, l'eterozigosi osservata (H_o) e l'eterozigosi attesa (H_e) date le ipotesi genetiche della popolazione. E' stato calcolato H_o (0,58), H_e (0,64) e il numero medio di alleli per locus (7,75). Il contenuto medio di informazione polimorfica (PIC) era 0,58. Gli individui differivano di 2 o più alleli attraverso i loci.

Locus	# Alleles	Effective # Alleles	Observed Heterozygosity	Expected Heterozygosity
CPH5	8	2.89	0.64	0.65
CO9.250	6	3.30	0.61	0.70
FH2088	5	3.20	0.64	0.69
FH2096	4	2.47	0.57	0.59
FH2137	13	6.15	0.76	0.84
FH2054	10	4.96	0.72	0.80
FH2140	9	2.41	0.48	0.58
FH2161	13	4.45	0.73	0.78
Pez17	7	2.92	0.60	0.66
CPH2	8	3.20	0.61	0.69
CPH4	5	1.81	0.37	0.45
CPH8	8	4.16	0.68	0.76
CPH12	5	2.24	0.51	0.55
C20.253	7	1.25	0.19	0.20
FH2004	11	3.16	0.63	0.68
FH2079	5	2.58	0.54	0.61
Mean	7.75	3.20	0.58	0.64
SE	0.71	0.31	0.04	0.04

Tabella A3-1. Riassunto della variabilità genetica rilevata nei 449 lupi documentati per ogni locus analizzato e nel totale.

E' stato ottenuto DNA di qualità per l'analisi del DNA mitocondriale da 1.240 campioni. La maggior parte dei campioni (1.182) aveva sequenze di mtDNA di lupo che corrispondono ad un singolo aplotipo identico all'aplotipo italiano (W14 in Randi et al. 2000). Tre campioni hanno DNA mitocondriale che corrisponde all'aplotipo W3 precedentemente identificato da lupi in Croazia e Slovenia (Randi et al. 2000, Montana et al. 2017). Cinquantadue campioni di scat non invasivo sono stati identificati come provenienti dal cane (*Canis familiaris*) ed esclusi dalle analisi, e per la prima volta dall'inizio del monitoraggio nei primi anni 2000, abbiamo identificato tre campioni (tutti raccolti in Regione Friuli-Venezia-Giulia) che sono stati identificati come provenienti dallo sciacallo europeo (*Canis aureus*).

BIBLIOGRAFIA

AA.VV. (2021) Linee guida per la gestione degli ibridi lupo-cane nelle Regioni alpine - Progetto LIFE18 NAT/IT/000972 LIFE WolfAlps EU – AZIONE A6

Ausband D. E. (2022). Inherit the kingdom or storm the castle? Breeding strategies in a social carnivore. *Ethology*, 128, 152–158. <https://doi.org/10.1111/eth.13250>

Avanzinelli E. e Marucco F. (2018) Lo stato di presenza del lupo in provincia di Torino nel periodo 2014-2018. In Marucco F. e Avanzinelli E. (2018): Lo Status del lupo in Regione Piemonte 2014-2018. In: Marucco et al. (2018). Lo Status della popolazione di lupo sulle Alpi Italiane e Slovene 2014-2018 Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4 e D1.

Bischof R., Brøseth, H., & Gimenez, O. (2016). Wildlife in a Politically Divided World: Insularism Inflates Estimates of Brown Bear Abundance. *Conservation Letters*, 9(2), 122–130. <https://doi.org/10.1111/CONL.12183>

Bischof R., Milleret, C., Dupont, P., Chipperfield, J., Tourani, M., Andr´, A., Ordiz, A., de Valpine, P., Turek, D., Royle, J. A., Gimenez, O., Flagstad, Ø., Mikaelákesson, M. M., Svensson, L., Brøseth, H., & Kindberg, J. (2020). Estimating and forecasting spatial population dynamics of apex predators using transnational genetic monitoring. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011383117/-/DCSupplemental.y>

Bischof R., & Swenson, J. E. (2012). Linking noninvasive genetic sampling and traditional monitoring to aid management of a trans-border carnivore population. *Ecological Applications*, 22(1), 361–373. <https://doi.org/10.1890/11-0013.1>

Boitani L., and R. A. Powell (2012). *Carnivore Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. Oxford University Press, New York, New York, 506 pp.

Boitani L., Alvarez F., Anders O., Andren H., Avanzinelli E., Balys V., Blanco J. C., Breitenmoser U., Chapron G., Ciucci P., Dutsov A., Groff C., Huber D., Ionescu O., Knauer F., Kojola I., Kubala J., Kutal M., Linnell J., Majic A., Mannil P., Manz R., Marucco F., Melovski D., Molinari A., Norberg H., Nowak S., Ozolins J., Palazon S., Potocnik H., Quenette P.-Y., Reinhardt I., Rigg R., Selva N., Sergiel A., Shkvyria M., Swenson J., Trajce A., Von Arx M., Wolf M., Wotschikowsky U., Zlatanova D. (2015) Key actions for Large Carnivore populations in Europe. Institute of Applied Ecology (Rome, Italy). Report to DG Environment, European Commission, Bruxelles. Contract no. 07.0307/2013/654446/SER/B3

Boitani L., Phillips M. & Jhala Y. (2018) *Canis lupus* (errata version published in 2020). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T3746A163508960. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T3746A163508960.en>.

Borchers D.L. and Efford M.G. (2008) Spatially Explicit Maximum Likelihood Methods for Capture–Recapture Studies. *Biometrics*, 64: 377-385. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2007.00927.x>

Caniglia R., Fabbri E., Konec M., Marucco F., Mattucci F., Mucci N., Pilgrim K.L., Schwartz M.K., Skrbinšek T., Stronen A.V., Velli E. (2021) International genetic protocols for cost-effective monitoring of the Alpine wolf population and detection of hybridization. Report for LIFE WolfAlps EU project LIFE18 NAT/IT/000972 Action A5-A6.

Chandler, R.B. and 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

Chapron G., Kaczensky P., Linnell J.D.C., ... , Boitani L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe’s modern human-dominated landscapes. *Science*. 346 (6216) : 1517-1519. http://resolver.scholarsportal.info/resolve/00368075/v346i6216/1517_rolciemhl.xml.

Ciucci P., e Boitani L., (2011) Il monitoraggio del lupo (*Canis lupus*) in Italia: inquadramento, finalità e obiettivi. Università La Sapienza, Roma.

Cubaynes S., Pradel R., Choquet R. et al (2010) Importance of accounting for detection heterogeneity when estimating abundance: the case of French wolves. *Conserv Biol* 24:621–626

Cubaynes S., Lavergne C., Marboutin E. and Gimenez, O. (2012). Assessing individual heterogeneity using model selection criteria: How many mixture components in capture-recapture models? *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 564–573.

Duchamp C., Boyer J., Briaudet P., Leonard Y., Moris P., Bataille A., Dahier T., Delacour G., Millisher G., Miquel C., Poillot C. and Marboutin E. (2012). Wolf monitoring in France : a dual frame process to survey time- and space-related changes in the population. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 23(1), pp.14-28. <https://doi.org/10.4404/hystrix-23.1-4559>

Dufresnes C., Remollino N., Stoffel C., Manz R., Weber J.-M., Fumagalli L. (2019). Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. *Sci. Rep.* 9, 148. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37331-x>

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

Efford M. G. and Fewster R. M. (2013). Estimating population size by spatially explicit capture-recapture. *Oikos*, 122(6), 918–928. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0706.2012.20440.X>

Efford M. G. and Schofield M. R. (2020). A spatial open-population capture-recapture model. *Biometrics*, 76(2), 392–402. <https://doi.org/10.1111/BIOM.13150>

Evetts IW and Weir BS. 1998. *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA.

European Union, Copernicus Land Monitoring Service 2018, European Environment Agency (EEA)

Fabbi 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 naturally expanding Italian wolf *Canis lupus* population. *Molecular Ecology* 16:1991-1671 [10.1111/j.1365-294X.2007.03262.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03262.x).

Francisco L.V., Langston A.A., Mellers C.S., Neal C.L., Ostrander E.A. (1996). A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm Genome* 7: 359–362.

Fredholm M. and Winteroe A.K. (1995). Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm Genome* 6: 11–18.

Genovesi P. (2006). *Manuale per il monitoraggio del lupo*. Documento interno. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, INFS.

Hindrikson, M., Remm J., Pilot M., Godinho R., Stronen A.V., Baltrūnaitė L., ..., Saarma U. (2017). Wolf population genetics in Europe: a systematic review, metaanalysis and suggestions for conservation and management. *Biol. Rev.* 92, 1601–1629.

Kalinowski S.T., Taper M.L. (2006) Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conserv Genet* 7, 991–995 <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9134-9>

Lebreton J.-D., Burnham K.P., Clobert, J. and Anderson D.R. (1992) Modeling survival and testing biological hypothesis using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*, 62, 67–118.

Leonard J., Echegaray J. Rand E. Vilà C. (2015). Impact of hybridization with domestic dogs on the conservation of wild canids. *Free-Ranging Dogs Wildl. Conserv.* <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199663217.003.0007>

Linnell J.D.C., Salvatori V. and Boitani L. (2008). Guidelines for population level management plans for large carnivores in Europe. Pages 1-78. A Large Carnivore Initiative for Europe (LCIE) report prepared for the European Commission (contract 070501/2005/424162/MAR/B2).

- Louvrier J., Duchamp C., Lauret V., Marboutin E., Cubaynes S., Choquet R., Miquel C. and Gimenez O. (2018), Mapping and explaining wolf recolonization in France using dynamic occupancy models and opportunistic data. *Ecography*, 41: 647-660. <https://doi.org/10.1111/ecog.02874>
- Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L., & Randi E. (2002). Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11, 857–868
- Marucco F., Pletscher D. H. , Boitani L., Schwartz M. K., Pilgrim K. L., and Lebreton J. D. (2009) Wolf survival and population trend using non-invasive capture-recapture techniques in the Western Alps. *Journal of Applied Ecology* 46:1003-1010.
- Marucco F., Avanzinelli E., S. Dalmaso S. and Orlando L. (2010). Rapporto 1999-2010 - Progetto Lupo Piemonte. Pages 1-136. Regione Piemonte, Torino
- Marucco, F., E. Avanzinelli and M. Colombo. (2012) Il Monitoraggio del lupo in regione Piemonte. I dati raccolti nell'inverno 2011-2012. Centro Gestione e Conservazione Grandi Carnivori Regione Piemonte, Torino.
- Marucco F., Mattei L., Papitto G., Bionda R., Ramassa E., Avanzinelli E., Pedrini P., Bragalanti N., Martinelli L., Canavese G., Sigaudò D., Pedrotti L., Righetti D., Bassano B., Agreiter A., Stadler M., Groff C., Fattori U., Tironi E. Malenotti E., Calderola S., Potocnik H. and 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.
- Marucco, F., E. Avanzinelli, B. Bassano, R. Bionda, F. Bisi, S. Calderola, C. Chioso, U. Fattori, L. Pedrotti, D. Righetti, E. Rossi, E. Tironi, F. Truc and K. Pilgrim, Engkjer C. and Schwartz M. (2018). La popolazione di lupo sulle Alpi Italiane 2014-2018. Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4 e D1.
- 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".
- Mech L.D. and Boitani L. (2003) *Wolves: Behavior, Ecology, and Conservation*. Chicago & London: University of Chicago Press.
- Montana L, Caniglia R, Galaverni M, Fabbri E, Randi E. 2017. A new mitochondrial haplotype confirms the distinctiveness of the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Mamm. Biol.* 84, 30–34.
- McDonald T.L. and S.C. Amstrup (2001) Estimation of Population Size Using Open Capture-Recapture Models, *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* Vol. 6, No. 2, in *Estimation of Animal Abundance and Related Parameters* (Jun., 2001), pp. 206-220 (15 pages)
- McKelvey K.S. and Schwartz M.K. (2004). Genetic error associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *The Journal of Wildlife Management*, 68: 439-448. [https://doi.org/10.2193/0022-541X\(2004\)068\[0439:GEAWPE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0022-541X(2004)068[0439:GEAWPE]2.0.CO;2)
- McKelvey K.S. and Schwartz M.K. (2005), dropout: a program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Molecular Ecology Notes*, 5: 716-718. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01038.>
- Milleret C., Dupont P., Brøseth H., Kindberg J., Royle J.A. and Bischof R. (2018) Using partial aggregation in spatial capture recapture. *Methods Ecol Evol*; 9: 1896– 1907. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13030>
- Neff M.W., Broman K.W., Mellersh C.S., Ray K., Ackland G.M., Aguirre G.D., Ziegle J.S., Ostrander E.A. and Rine J. (1999). A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151:803–820.
- Ostrander E.A., Sprague G.F., Rine J. (1993). Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dogs. *Genomics* 16: 207–213.

Paetkau, D. and Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3, 489-95.

Peakall R. and Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Peakall R. and Smouse P.E. (2012). GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

Pilgrim K., C. Engkjer C., Schwartz M. (2018) Genetic Analysis Summary and Preliminary Population (2018) Genetic Evaluation of Wolves (*Canis lupus*) in the Italian Alps in 2014-2018. In: Marucco et al. (2018). Lo Status della popolazione di lupo sulle Alpi Italiane e Slovene 2014-2018 Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4 e D1.

Pledger S., Pollock K.H. and Norris J.L. (2003) Open capture-recapture models with heterogeneity: I. Cormack-Jolly-Seber model. *Biometrics*, 59, 786–794.

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. V Lucchini, MF Christensen, N Mucci, SM Funk, G Dolf andV Loeschcke. 2000. Mitochondrial DNA Variability in Italian and East European Wolves: Detecting the Consequences of Small Population Size and Hybridization. *Conservation Biology*, 14(2), 464–473.

Ražen N., Brugnoli A., Castagna C., Groff C., Kaczensky P., Kljun F., Knauer F., Kos I., Krofel M., Luštrik R., Majić A., Rauer G., Righetti D. and Potočnik H. (2016). Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. *European Journal of Wildlife Research*, 62, 137–142.
<https://doi.org/10.1007/s10344-015-0971-z>

Reinhardt I., Kluth G., Nowak C., et al. (2019). Military training areas facilitate the recolonization of wolves in Germany. *Conservation Letters*. 2019;e12635. <https://doi.org/10.1111/conl.12635>

Royle J.A., Karanth K.U., Gopaldaswamy A.M. and Kumar N.S. (2009) Bayesian inference in camera trapping studies for a class of spatial capture–recapture models. *Ecology*, 90: 3233-3244. <https://doi.org/10.1890/08-1481.1>

Royle J.A., Chandler R.B., Gazenski K.D. and Graves T.A. (2013) Spatial capture–recapture models for jointly estimating population density and landscape connectivity. *Ecology*, 94: 287-294. <https://doi.org/10.1890/12-0413.1>

Royle J.A., Chandler R.B., Sun C.C. and Fuller A.K. (2014) Reply to Efford on ‘Integrating resource selection information with spatial capture–recapture’. *Methods Ecol Evol*, 5: 603-605. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12205>

Schwartz et al. (2015) Summary of the Genetic Workshop, organized in the framework of the 8th Wolf Alpine Group Workshop “Wolf monitoring over the Alps - towards a unique genetic approach” organized in Bormio, Italy, on 28/10/20105.

Thompson W.L. (2004) *Sampling Rare or Elusive Species*. Island Press, Covell, Ca.

Valière N., Fumagalli L., Gielly L., Miquel C., Lequette B., Poulle M.-L., Weber J.M., Arlettaz R., Taberlet P. (2006). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*. 6, 83 - 92. 10.1017/S1367943003003111.

de Valpine P., Turek D., Paciorek C.J., Anderson-Bergman C., Temple Lang D. and Bodik R. (2017) Programming with models: writing statistical algorithms for general model structures with NIMBLE, *J. Comput. Graph. Stat.* 26, pp. 403–413. doi:<https://doi.org/10.1080/10618600.2016.1172487>.

Wolf Alpine Group (2014). Wolf population status in the alps: pack distribution and trends up to 2012.

Wolf Alpine Group (2018). Wolf population status in the Alps: pack distribution and trend in 2015-2016.

Wolf Alpine Group (2022). The integrated monitoring of the wolf alpine population over 6 countries. Report for LIFE WolfAlps EU project LIFE18 NAT/IT/000972, Action A5.

WorldPop Data (2021) WorldPop, University of Southampton, Southampton, UK. 2021.
http://www.worldpop.org.uk/data/data_sources.