

LINEE GUIDA E PROTOCOLLI PER IL MONITORAGGIO NAZIONALE DEL LUPO IN ITALIA

Aprile 2020

A cura di:

Marucco F.¹, La Morgia V.², Aragno P.¹, Salvatori V.¹, Caniglia R.³, Fabbri E.³, Mucci N.³ e Genovesi P.⁴

¹ ISPRA – Dipartimento BIO, Area CFN

² ISPRA – Dipartimento BIO, Area EPD

³ ISPRA – Dipartimento BIO, Area CGE

⁴ ISPRA – Dipartimento BIO, Servizio Coordinamento Fauna Selvatica

Hanno contribuito con commenti e suggerimenti:

LUIGI BOITANI - Università di Roma “La Sapienza”

LORENZO GAUDIANO - Università di Bari “Aldo Moro”

ALESSANDRO MASSOLO - Università di Pisa

FRANCESCO ROVERO - Università di Firenze

ACHAZ VON-HARDENBERG - University of Chester, UK

Indicazione per la citazione:

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”.

Indice

PREMESSA	1
1 LA STRATEGIA PER LA STIMA DI DISTRIBUZIONE E CONSISTENZA DELLA POPOLAZIONE A SCALA NAZIONALE	4
1.1 MONITORARE NEL TEMPO LA POPOLAZIONE DI LUPO IN ITALIA: OBIETTIVI GENERALI.....	4
1.2 LOGICA E IMPOSTAZIONE DELLA STRATEGIA PER LA STIMA DEI PARAMETRI DI INTERESSE	6
1.3 CRITICITÀ E LIMITAZIONI AL DISEGNO DI CAMPIONAMENTO.....	8
2 LA DISTRIBUZIONE DEL LUPO SULLA BASE DEI DATI PREGRESSI	10
2.1 OBIETTIVI	10
2.2 LA SITUAZIONE DI PARTENZA: CARTA DI DISTRIBUZIONE CON DATI PREGRESSI DISOMOGENEI	10
3 STIMA DELLA CONSISTENZA E DELLA DISTRIBUZIONE DEL LUPO IN ITALIA: DISEGNO DI CAMPIONAMENTO 2020-2021	19
3.1 CAMPIONAMENTO ESTENSIVO.....	20
3.1.1 <i>Numero e selezione delle celle da campionare in Italia peninsulare</i>	20
3.1.2 <i>Descrizione delle attività di campionamento estensivo nelle celle</i>	24
3.2 CAMPIONAMENTO INTENSIVO	27
3.2.1 <i>Numero e selezione delle celle da campionare nell'Italia peninsulare</i>	27
3.2.2 <i>Descrizione delle attività di campionamento intensivo nelle aree campione</i>	28
3.3 MONITORAGGIO DELLO SFORZO DI CAMPIONAMENTO	31
3.4 ANALISI DEI DATI E MODELLIZZAZIONE	32
4 CRITERI STANDARD PER CLASSIFICARE E INTERPRETARE I DATI	34
4.1 CRITERI PER CLASSIFICARE I DATI RACCOLTI SULLA PRESENZA DEL LUPO (CRITERI C1-C2-C3)	34
4.2 CRITERI PER L'ANALISI E L'INTERPRETAZIONE DEI DATI RACCOLTI.....	37
5 COORDINAMENTO DEL LAVORO PER IL MONITORAGGIO DEL LUPO IN ITALIA	39
5.1 ENTI INTERESSATI DAL MONITORAGGIO DELLA SPECIE	40
5.1 ORGANIZZAZIONE DEL LAVORO PER LE REGIONI DELL'ITALIA PENINSULARE	41
5.3 ORGANIZZAZIONE DEL LAVORO PER LE REGIONI ALPINE.....	42
5.4 LA FORMAZIONE DEL NETWORK DI OPERATORI PER UNA RACCOLTA STANDARDIZZATA DEI DATI.....	44
5.4.1 <i>Corsi di Formazione</i>	44
5.4.2 <i>L'Applicazione per la raccolta dei dati e il flusso dei dati a scala nazionale</i>	45
5.5 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ DEL PIANO DI LAVORO E DELLA FATTIBILITÀ DI ESTENSIONE A LUNGO TERMINE	47
6 PROTOCOLLI	49
6.1 CONTROLLO SISTEMATICO DI TRANSETTI E/O PUNTI DI MARCATURA PER LA RACCOLTA DI SEGNI DI PRESENZA.....	50
6.2 PROTOCOLLO PER L'UTILIZZO DELLE TRAPPOLE FOTOGRAFICHE.....	52
6.3 PROTOCOLLO PER LA RACCOLTA DI DOCUMENTAZIONE VIDEO-FOTOGRAFICA DA TERZI	55
6.4 PROTOCOLLO PER L'ATTIVITÀ DI SNOW-TRACKING	56
6.5 PROTOCOLLO PER L'ATTIVITÀ DI WOLF-HOWLING – ULULATI INDOTTI	58
6.6 PROTOCOLLO PER LA DOCUMENTAZIONE DI CARCASSE DI UNGULATI SELVATICI E DOMESTICI.....	59
6.7 PROTOCOLLO PER L'ARCHIVIAZIONE DI DATI DEI LUPI MORTI RINVENUTI	59
6.8 PROTOCOLLO PER LA RACCOLTA DI CAMPIONI BIOLOGICI NON-INVASIVI E CONFERIMENTO DEL CAMPIONE AL LABORATORIO	61

6.9	PROTOCOLLO DELLE ANALISI GENETICHE DEL LABORATORIO ISPRA: DAL CONFERIMENTO DEL CAMPIONE BIOLOGICO ALL'IDENTIFICAZIONE DEL GENOTIPO	63
6.9.1	<i>Arrivo dei campioni in laboratorio e compilazione del DataBase ISPRA</i>	63
6.9.2	<i>Analisi del DNA</i>	64
6.9.3	<i>Analisi dei loci microsatellite</i>	65
6.9.4	<i>Identificazione della specie e degli individui con tracce di ibridazione</i>	65
7	SCHEDI DI RILEVAMENTO	68
7.1	CODICI UNIVOCI PER IL MONITORAGGIO DEL LUPO IN ITALIA	68
7.2	SCHEDI DI RILEVAMENTO DATI	70
8	BIBLIOGRAFIA	80
	APPENDICI	87
	APPENDICE 1: RAPPORTI TECNICI SUL MONITORAGGIO DEL LUPO IN ITALIA	88
	APPENDICE 2: CRITERI APPLICATI PER L'AGGIORNAMENTO DELLA CARTA DI DISTRIBUZIONE DA DATI PREGRESSI	94
	APPENDICI 3: SELEZIONE DELLE CELLE DI CAMPIONAMENTO ESTENSIVO E SELEZIONE DELLE AREE DI CAMPIONAMENTO INTENSIVO IN ITALIA PENINSULARE	98

PREMESSA

In linea con la più recente tendenza di valorizzazione del monitoraggio come strumento attivo per l'attenta valutazione delle strategie di conservazione della specie (Nichols *et al.* 2006), **il monitoraggio della distribuzione e consistenza del lupo in Italia è uno strumento essenziale per valutare l'evoluzione dello stato di conservazione della specie e l'efficienza delle misure gestionali** messe in atto dalle Amministrazioni locali e regionali. In quest'ottica, il presente documento è realizzato nell'ambito del mandato che ISPRA ha avuto da parte del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) per la realizzazione della strategia nazionale per il monitoraggio del lupo in Italia (Aragno *et al.* 2019). In particolare, queste linee guida descrivono **gli aspetti operativi per la realizzazione della prima survey 2020-2021 di avvio del monitoraggio nazionale del lupo**, finalizzata a produrre una prima stima annuale omogenea della **distribuzione e consistenza** della specie che rappresenti il riferimento iniziale di un piano pluriennale di monitoraggio. In Italia, il monitoraggio del lupo su scala nazionale è previsto dal vigente quadro normativo, come nel DPR 8 settembre 1997 n. 357, di recepimento della Direttiva 'Habitat' (Direttiva 92/43/CEE), così come modificato ed integrato dal DPR 120/2003. Il lupo è inserito tra le specie di interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di Zone Speciali di Conservazione (ZSC) e una protezione rigorosa. La stessa normativa stabilisce anche l'obbligo di monitorare le sue popolazioni, affidando alle Regioni il compito di realizzare il monitoraggio secondo linee guida definite dal MATTM, sentiti ISPRA e Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali (DPR 357/97 e s.m.i., art. 7 c. 2). La delega alle amministrazioni Regionali per lo svolgimento delle attività inerenti la conservazione del lupo, incluso il monitoraggio, e il mancato coordinamento a livello nazionale, ha portato ad una situazione di **elevata frammentazione amministrativa e gestionale**, che **non** ha facilitato l'attuazione di un sistema univoco, coordinato e contemporaneo di monitoraggio del lupo a livello nazionale, come suggerito nei documenti sopracitati, tanto che nel 2019 tale sistema è ancora mancante, anche per la sola stima della distribuzione. Nonostante sia da sempre chiara **la necessità di un monitoraggio omogeneo e simultaneo su base nazionale e annuale** per la stima dei parametri di popolazione, questo rimane una delle prime carenze per una buona gestione del lupo in Italia.

La recente espansione del lupo sia in Appennino sia sulle Alpi ha reso ancora più urgente colmare tali carenze, e allo stesso tempo 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 Direzione Generale 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 fissata al Colle di Cadibona (WAG, 2014), ma oggi le popolazioni stanno raggiungendo le zone di pianura, rendendo questa distinzione inefficace e inducendo la differenziazione alla scala regionale in zona 'Alpina' e zona 'Italia peninsulare' (Figura 1). In realtà le due 'popolazioni' dovrebbero essere considerate una sola, sia da un punto di vista genetico - non essendoci una chiara struttura genetica e condividendo lo stesso *pool* genetico dall'Aspromonte alle Alpi, sia da un punto di vista demografico, essendo distribuite su un'area pressoché continua. La differenza risiede piuttosto all'aspetto ecologico-gestionale, in quanto 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. **Nella zona Alpina** (Figura 1) la frammentazione gestionale è stata

considerata tra le principali minacce alla conservazione della specie come in Appennino, così che tale minaccia è stata enunciata come problematica da risolvere nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps (2013-2018). **Tale carenza è stata oggi colmata dall'intenso lavoro di coordinamento attuato nell'ambito di questo progetto**, che è stato riproposto e ampliato nell'ambito del nuovo LIFE WolfAlps EU (2019-2024). Quindi, per un'ottimizzazione delle risorse, per il monitoraggio della popolazione di lupo nelle regioni alpine, si rimanda al LIFE WolfAlps EU (2019-2024) nell'ambito del quale le attività saranno condotte in coerenza con le presenti linee guida di monitoraggio nazionale del lupo.

Nell'Italia peninsulare (Figura 1), invece, la frammentazione gestionale rimane uno dei principali ostacoli alla realizzazione di un monitoraggio con approccio omogeneo e coordinato su scala nazionale. Nonostante la presenza di dati di elevata qualità in molte aree appenniniche e la presenza di numerosi progetti di ricerca e monitoraggio passati e in corso (Appendice 1), tale frammentazione è ancora marcata, ed un approccio omogeneo per il monitoraggio della distribuzione e consistenza del lupo non è mai stato realizzato. È quindi evidente la necessità di un approccio a scala nazionale e a livello di popolazione, con un elevato coordinamento tra le diverse Istituzioni italiane che operano sulla fauna, per arrivare a una valutazione condivisa e robusta dello *status* della specie. L'effettiva applicazione di tale approccio sarà **fortemente dipendente dalla volontà delle singole Istituzioni di contribuire alla realizzazione di un monitoraggio congiunto**, che avrà enormi vantaggi nel lungo termine, e grandi benefici comuni. Quindi **lo scopo generale di questo lavoro è la definizione della strategia e degli strumenti operativi che sottendono alla realizzazione del primo stadio di un monitoraggio omogeneo nazionale della presenza e abbondanza della specie nel 2020-2021.**

Occorre evidenziare che il percorso che si intende avviare con questo documento non sarà certamente privo di difficoltà. Molte e diverse **limitazioni logistiche sono il primo inevitabile ostacolo da superare per applicare l'approccio teorico-scientifico al contesto reale**: ad esempio, l'ampiezza dell'area da sottoporre al campionamento, la raccolta di dati in contemporanea in aree anche spazialmente molto lontane e con caratteristiche ecologiche diverse, l'accessibilità ad aree sottoposte a diversa gestione territoriale, l'applicazione di tecniche che richiedono notevoli risorse umane. La sfida attuale è definire un disegno unitario che permetta di raccogliere dati robusti per la stima dei parametri di interesse (*i.e.*, distribuzione, consistenza/densità). Il campionamento ovviamente deve interessare tutta la popolazione di riferimento ed essere rappresentativo secondo una strategia che garantisca una accettabile *precisione* e un minimo *bias* (errore sistematico). La scelta della strategia di campionamento è quindi cruciale e si deve basare su una continua quantificazione dell'*effort*, ossia lo sforzo di campionamento (in termini di forza lavoro e disponibilità economica). Ovviamente **più le restrizioni logistiche sono importanti, minore la capacità di realizzare un campionamento rappresentativo, con effetti negativi sulla correttezza della stima**. Questo disegno di campionamento è proposto con l'intento di raggiungere un risultato scientificamente difendibile: eccessive limitazioni logistiche o la mancata esecuzione del campionamento da parte di operatori locali potrebbero portare all'inevitabile caduta degli assunti e all'impossibilità di produrre una stima attendibile. Infine, la definizione e applicazione di **criteri standardizzati** per l'interpretazione dei dati raccolti è fondamentale al fine dell'integrazione a larga scala dei risultati ottenuti.

Quindi, il presente documento si pone come **ultimo obiettivo di strutturare un piano di monitoraggio a lungo termine e a scala nazionale, da realizzare attraverso la collaborazione di numerosi operatori attivi a scala locale che costituiranno una rete nazionale denominata il "Network Lupo", in**

piena considerazione delle problematiche che emergeranno nel primo anno di campionamento 2020-2021, e tenendo in considerazione tutta la bibliografia disponibile in materia, italiana e straniera. Ciò avuto riguardo anche della necessità di ottimizzare l'utilizzo delle risorse, finanziarie e umane, impiegate allo scopo dagli Enti coinvolti e dal MATTM. L'impostazione generale di queste linee guida, affinché siano strategiche ed efficaci a lungo termine, vede quindi una prima valutazione della strategia generale già redatta da Aragno *et al.* (2019) (Capitolo 1), un'attenta analisi dei dati pregressi utile per l'impostazione del lavoro (Capitolo 2), la definizione del campionamento per la stima della distribuzione e dell'abbondanza per l'anno 2020-2021 (Capitolo 3), la definizione dei criteri di valutazione e interpretazione dei dati raccolti (Capitolo 4), l'impostazione del coordinamento nazionale, la creazione del *Network* di personale per la raccolta dati (Capitolo 5) e i protocolli di campionamento (Capitolo 6), al fine ultimo di valutare lo *status* di conservazione della specie e avendo riguardo di monitorare costantemente lo sforzo necessario per ottimizzarne i costi nel lungo termine.

1 LA STRATEGIA PER LA STIMA DI DISTRIBUZIONE E CONSISTENZA DELLA POPOLAZIONE A SCALA NAZIONALE

1.1 Monitorare nel tempo la popolazione di lupo in Italia: obiettivi generali

Nell'ottica di realizzazione del primo campionamento omogeneo nazionale della specie, da realizzarsi nel 2020-2021 e, soprattutto, di porre le basi per un monitoraggio congiunto a scala nazionale, tale da comportare dei vantaggi nel lungo termine, è stata formulata una prima strategia generale per il monitoraggio del lupo in Italia (Aragno *et al.* 2019), seguendo le precedenti indicazioni nazionali formulate in Genovesi (2002, 2006), Ciucci *et al.* (2002) e Ciucci e Boitani (2011). La strategia proposta ha considerato la necessità di produrre, in particolare, stime aggiornate della distribuzione e consistenza della popolazione, identificati come attributi da sottoporre a monitoraggio. Per questi attributi (o parametri) è stata esplicitata la necessità di ottenere, nel corso del tempo, stime ripetute, dove con il termine 'stima' si intende la determinazione del valore numerico del parametro di interesse, associata ad una valutazione della sua precisione.

Infatti, la stima di un parametro di popolazione, quali la dimensione o la distribuzione, deve essere ripetuta nel tempo perché si possa realizzare un monitoraggio del parametro di interesse. Spesso quest'ultimo termine viene invece confuso con una singola *survey* (indagine), che è un rilevamento del parametro relativo ad un definito momento nel tempo. Il 'monitoraggio' è quindi una misurazione ripetuta nel tempo di un parametro al fine di rilevarne un cambiamento (Thompson *et al.* 1998; Boitani e Powell 2012). **In questo documento, si vuole impostare la prima *survey* nazionale per stimare lo *status* della popolazione di lupo nell'anno 2020-2021 in quanto a distribuzione e consistenza, e impostare il lavoro in modo che esso possa essere ripetuto negli anni, per garantire il monitoraggio della popolazione italiana di lupo nel tempo.**

Il primo passo compiuto tramite la strategia proposta è stato quindi quello di definire gli **obiettivi**, esplicitando le finalità di conservazione e gestione della specie. Come indicato in Aragno *et al.* (2019), i risultati del monitoraggio dovranno costituire la base di future scelte gestionali e permettere di valutare il raggiungimento (o il grado di 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 naturalmente ricaduta **sull'abbondanza o consistenza (intesa come numero di individui, N) e sulla distribuzione (range occupato) della specie**. Inoltre, data la peculiare organizzazione sociale della specie, l'identificazione di questi attributi ha portato anche a riconoscere la necessità di considerare nell'ambito del campionamento intensivo (cfr. § 3.2) 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. Il numero e la distribuzione dei branchi saranno pertanto parametri fondamentali nella definizione del campionamento intensivo per il periodo 2020-2021.

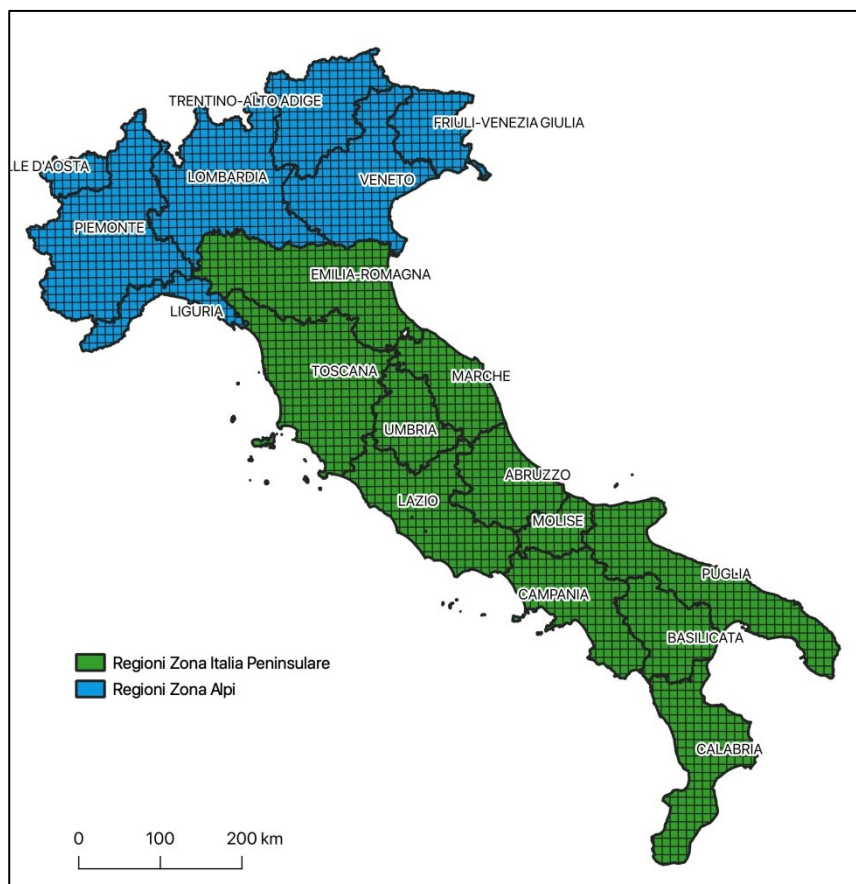


Figura 1. Regioni della Zona Alpi e regioni della Zona dell'Italia Peninsulare con sovrapposita la griglia di campionamento nazionale (10x10 km).

Dati questi obiettivi e attributi, **la strategia proposta ha innanzitutto mirato a chiarire le fasi necessarie per la realizzazione di una singola indagine o survey. La valutazione ultima dell'impostazione del piano di monitoraggio dello stato di popolazione del lupo in Italia verrà realizzata dopo tale survey (2020-2021), in modo da poter individuare la strategia a lungo termine, avendo testato i limiti del metodo.**

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 **uniformità di strategia e metodi nel campionamento** della popolazione di lupo soprattutto nel contesto appenninico. A questo proposito, si richiama quanto già riportato in premessa, in relazione alla distinzione ecologico-gestionale della popolazione di lupo alpina da quella appenninica. Nel contesto alpino la frammentazione delle pratiche gestionali e del monitoraggio è stata da subito individuata come una delle principali minacce alla conservazione della specie. Questa consapevolezza ha permesso che si avviasse un percorso di coordinamento, attuato principalmente nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps e, nei prossimi anni, grazie alla sua prosecuzione nel Progetto LIFE WolfAlps EU (2019-2024). Il percorso di coordinamento è invece mancato nel contesto appenninico ed è questa la principale lacuna che la formulazione della strategia e la proposta di campionamento 2020-2021 hanno l'obiettivo di colmare, comunque considerando la necessità di un unico campionamento nazionale dalle Alpi all'Appennino. La seguente

proposta di impostazione delle attività di campionamento assume quindi specifica rilevanza per la popolazione appenninica di lupo, pur mantenendo un forte coordinamento con la popolazione alpina. Infine, in un'ottica di ottimizzazione, dato che la frammentazione gestionale si può considerare parzialmente risolta a livello alpino e che in tale area è già stata adottata una strategia di monitoraggio omogenea (Marucco *et al.* 2014), per la stima dei parametri di popolazione sulle Alpi si può rimandare alla pianificazione adottata dal Progetto LIFE WolfAlps EU. In passato la linea spaziale di demarcazione tra le due popolazioni è stata arbitrariamente fissata al Colle di Cadibona (WAG 2014), ma oggi le popolazioni stanno raggiungendo le zone di pianura rendendo questa distinzione inefficace e inducendo la differenziazione alla scala regionale in zona 'alpina' e zona 'Italia peninsulare' (Figura 1). Di conseguenza, per motivi pratici verranno distinte le regioni della zona 'alpina' interessate principalmente dalla popolazione di lupo alpina che oramai si estende anche in zone collinari, dalle regioni della zona dell' 'Italia peninsulare', con presenza di maggiore frammentazione metodologica e con maggiore territorio e numero di lupi da monitorare (Figura 1). Gli obiettivi e la strategia di monitoraggio nazionale saranno gli stessi su entrambe le zone (§ 1.2). Le differenze di applicazione sono dettagliate nel Capitolo 3, e il coordinamento nazionale relativo nei §§ 5.2 e 5.3. In questo modo le Regioni potranno affrontare in modo univoco la realizzazione del monitoraggio a scala regionale.

1.2 Logica e impostazione della strategia per la stima dei parametri di interesse

L'approccio delineato, qui in termini generali e successivamente approfondito nei Capitoli 3-5, è stato definito a seguito di un'**attenta analisi della letteratura** in materia di schemi di campionamento per la stima della consistenza delle popolazioni (Cochran 1977; Thompson *et al.* 1998; Pollock *et al.* 2002; Thompson 2012), con particolare attenzione agli schemi per specie rare e/o elusive (e.g., Thompson *et al.* 2004) e alle proposte specifiche per la specie lupo. Seguendo in particolare le indicazioni di Thomson *et al.* (1998, 2004) e Williams *et al.* (2002) riguardo all'efficiente pianificazione delle indagini (*surveys*), sono stati identificati e definiti gli obiettivi (§ 1.1), la popolazione *target* e il corrispondente dominio spaziale (*sampling frame*, § 1.2), e sono stati quindi descritti gli schemi di campionamento (*sampling scheme*, §§ 3.1.2 e 3.2.2) e i metodi adottati per la stima della distribuzione e dell'abbondanza (Capitolo 3).

Per quanto riguarda l'analisi degli approcci utilizzati per le stime di popolazione di lupo, sono stati considerati con attenzione tutti i documenti in materia prodotti in Italia (Appendice 1), con particolare riguardo all'approccio utilizzato da Santini *et al.* (2015) per la stima prodotta nell'ambito della prima versione del nuovo Piano di conservazione e gestione del lupo (Boitani e Salvatori 2015) e agli approcci suggeriti a scala di popolazione italiana (Ciucci e Boitani 2011; Marucco *et al.* 2014; Galaverni *et al.* 2016). Inoltre, sono state valutate le strategie elaborate e attuate in altri paesi a livello di popolazione, tenendo in considerazione sia la letteratura grigia, sia le pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali. Sono state approfondite e considerate in particolare le metodologie adottate in:

- Francia (Louvrier *et al.* 2017; Duchamp *et al.* 2012, 2017);
- Germania (Kaczensky *et al.* 2009; Reinhardt *et al.* 2015);
- Spagna (Jimenez *et al.* 2018; Blanco e Cortéz 2012);
- Norvegia e Svezia (Chapron *et al.* 2016; Bishof *et al.* 2019);

- Nord America: in particolare in Minnesota (Erb *et al.* 2019), in Montana (Rich *et al.* 2013; Inman *et al.* 2018), Idaho (Horne *et al.* 2018) ed in Alberta (Bassing *et al.* 2019), dove sono state affrontate criticità simili a quelle del contesto italiano (la grande scala di applicazione, limitazioni dovute allo sforzo di campionamento e alla logistica).

Per il superamento di alcune di queste criticità, *in primis* quella dell'estensione dell'area di studio, nell'ambito della strategia di monitoraggio e per la definizione degli schemi di campionamento si è innanzitutto optato per la suddivisione dell'area in unità di campionamento spaziali (unità di griglia di 10x10 km, anche in accordo con quanto richiesto per la rendicontazione ai sensi della Direttiva 92/43/CEE), da selezionarsi in maniera probabilistica e rappresentativa (Thompson 2004) ai fini della raccolta dei dati. Mentre per le regioni della zona Alpi si prevede una raccolta dati in tutte le celle (100%) di possibile presenza documentata l'anno antecedente il campionamento, nelle regioni dell'Italia peninsulare l'impossibilità di misurare i parametri della popolazione su tutta l'area implica la necessità di campionare in modo probabilistico la popolazione nello spazio, in modo tale da permettere un'inferenza induttiva rispetto alle aree non indagate (Cochran 1977; Thompson 2012; McDonald 2004).

Tuttavia, il lupo, come in generale tutti i carnivori, è presente sul territorio con basse densità e in forma aggregata, ed ha un comportamento elusivo (Thompson 2004; Boitani e Powell 2012). Considerando queste ulteriori criticità, un campionamento 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 si è quindi tenuta presente la necessità di stratificare, per allocare lo sforzo di campionamento sulla base della probabilità di presenza della specie, come già raccomandato anche da Boitani e Powell (2012). Per questo motivo, si sono considerati con attenzione i dati già disponibili sulla distribuzione della specie nelle regioni dell'Italia peninsulare, anche se raccolti in anni diversi e con diversi approcci. È stata effettuata una valutazione quali-quantitativa delle informazioni disponibili sulla presenza della specie, utilizzando i dati pregressi (di cui al seguente Capitolo 2), finalizzata alla classificazione delle unità di campionamento (unità di griglia di 10x10 km) e alla definizione di strati di campionamento sulla base della probabilità di presenza della specie (Linnell *et al.* 1998) e della sua contattabilità (Pollock *et al.* 2002; Nichols e Williams 2006), e si sono quindi identificate **le seguenti fasi** (*multi-phase sampling*) per la raccolta ed elaborazione dei dati:

Fase a. un campionamento estensivo (§ 3.1) che ha come obiettivo la stima della distribuzione della specie attraverso l'analisi di segni di presenza del lupo raccolti sul territorio nazionale, da attuarsi con l'individuazione delle celle da campionare su base probabilistica per una stima finale dell'*occupancy*, ovvero della probabilità di vera presenza della specie (McKenzie *et al.* 2006; Latham *et al.* 2014; per dettagli si rimanda al § 3.4). In questo caso l'unità di campionamento è la cella della griglia 10x10 km. Dalla popolazione di celle 10x10 km è estratto un campione stratificato sulla base dei dati pregressi per le regioni dell'Italia peninsulare, mentre per le regioni alpine i dati sono raccolti nel 100% delle celle con possibile presenza (Capitolo 2);

Fase b. l'individuazione, per le regioni dell'Italia peninsulare, di una serie di aree campione di approfondimento (11 aree campione), nelle quali effettuare **un campionamento intensivo** (§ 3.2) dei segni di presenza coadiuvato dalle analisi genetiche non invasive, con l'obiettivo di ottenere una stima

della densità della popolazione per area (es., applicando tecniche di cattura e marcatura spaziali - Chandler e Royle, 2013; Royle *et al.* 2014; per dettagli si rimanda al § 3.4). Nelle Alpi il campionamento intensivo verrà applicato su tutte le celle di possibile presenza di branchi, per una stima accurata della consistenza di popolazione. In queste aree di campionamento intensivo si procederà a scala nazionale 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. Assunto irrinunciabile per ottenere stime attendibili è che le aree campione in Italia peninsulare siano nel loro insieme rappresentative della variabilità di condizioni ecologiche e demografiche della popolazione di lupo sull'intero areale peninsulare, e per la selezione di queste si rimanda al § 3.3.

Come sarà descritto in seguito più nel dettaglio (§ 3.1.1 e § 3.2.1), in entrambe le fasi si è pertanto puntato per l'Italia peninsulare all'adozione di uno schema di campionamento probabilistico (Thompson *et al.* 1998; Manly 2004), sulla base dei dati pregressi (Capitolo 2), che al momento rappresentano l'unico *proxy* dell'abbondanza della specie per questa zona.

1.3 Criticità e limitazioni al disegno di campionamento

È doveroso evidenziare che il percorso che si intende avviare con questo documento non sarà certamente privo di difficoltà. L'ampiezza dell'area da sottoporre al campionamento, la raccolta di dati in contemporanea in aree anche spazialmente molto lontane e con caratteristiche ecologiche diverse, l'accessibilità ad aree sottoposte a diversa gestione territoriale, l'applicazione di tecniche che richiedono notevoli risorse umane, etc., rappresentano tutti elementi che potrebbero fortemente influenzare l'esito della prima *survey* 2020-2021 e, di conseguenza, la possibilità di impostare il monitoraggio di lungo periodo. In generale, il processo di stima degli attributi individuati non è di semplice realizzazione anche per caratteristiche intrinseche alle popolazioni di grandi carnivori, quali ad esempio l'elusività degli animali e la tendenza all'aggregazione spaziale, determinata anche, nel caso specifico, dalla struttura sociale del lupo. Unitamente all'areale troppo ampio per consentire un campionamento esaustivo nell'Italia peninsulare, l'impossibilità di effettuare conteggi esaustivi data la limitata *detectability* degli animali e la distribuzione spaziale aggregata rappresentano ulteriori problematiche da affrontare per la pianificazione della raccolta dati e la stima della consistenza della popolazione (Thompson *et al.* 1998, 2004). Queste problematiche sono inoltre fortemente connesse con la necessità di attuare uno sforzo di campionamento adeguato a ottenere delle stime il più possibile precise e accurate dei parametri di interesse (Pollock *et al.* 2002; Manly 2004; McDonald 2004). Tenendo conto anche di queste criticità, è stata pertanto proposta la **strategia a più fasi**, sopra brevemente delineata.

Non potendo effettuare un campionamento esaustivo sull'intero areale occupato dalla specie nell'Italia peninsulare, si è proposto di procedere con un campionamento su aree ristrette da cui successivamente estrapolare informazioni su aree non sottoposte ad indagine (Pollock *et al.* 2002). La miglior realizzazione della strategia prevedrebbe ovviamente la necessità di adottare, in tutte le fasi, un campionamento strettamente probabilistico e rappresentativo della variabilità del parametro, rispettando gli assunti statistici che permettono di effettuare inferenza dalle aree campionate a quelle non campionate.

A questo riguardo, occorre richiamare che le informazioni attualmente disponibili in Italia peninsulare relativamente alla variabilità del parametro di abbondanza restano limitate e che la selezione delle aree da sottoporre a campionamento (§§ 3.1 e 3.2) avviene sulla base di un *proxy* dell'abbondanza stessa. Non essendo nota la variabilità, è inoltre problematico valutare, in fase di impostazione del campionamento, l'effettiva rappresentatività delle aree selezionate per il campionamento intensivo e l'adeguatezza della dimensione campionaria. Il numero delle aree campione di approfondimento in Italia peninsulare (11) rappresenta pertanto un compromesso tra la necessità di assicurare un campione di dimensioni adeguate per catturare la variabilità del parametro di interesse e limitazioni di carattere logistico (es., valutazione dello sforzo di raccolta e analisi dati attuabile; si veda in proposito anche il Capitolo 5). Nella zona Alpi, nell'ambito del coordinamento del Progetto LIFE WolfAlps EU, per l'indagine 2020-2021 la raccolta dati intensiva sarà effettuata sull'intero strato di celle di possibile presenza di un branco, assicurando così la rappresentatività spaziale dei dati raccolti e aumentando l'accuratezza dei parametri stimati. In una successiva valutazione di monitoraggio nazionale a lungo termine, e considerando che la popolazione alpina sta crescendo ed espandendosi su tutto il territorio delle regioni interessate, si potrà tuttavia considerare l'estensione del campionamento probabilistico, puntando ad ottenere, in futuro, stime di popolazione con minore sforzo anche per la zona Alpi.

2 LA DISTRIBUZIONE DEL LUPO SULLA BASE DEI DATI PREGRESSI

2.1 Obiettivi

Come indicato nel capitolo precedente, la definizione dell'area di presenza minima della specie costituisce il primo e cruciale obiettivo dell'intero schema di monitoraggio. Lo scopo è di fornire informazioni quantitative per permettere una stratificazione del campionamento. L'obiettivo è realizzato attraverso l'analisi dei dati pregressi di presenza della specie a scala nazionale.

L'obiettivo dell'analisi dei dati pregressi di presenza della specie a scala nazionale è stato quello di delimitare l'area di presenza minima della specie e fornire informazioni quantitative per la stratificazione del campionamento. In assenza di dati raccolti in modo coerente, omogeneo e contemporaneo sul territorio nazionale, si è proceduto alla raccolta e integrazione dei dati ottenuti con le numerose iniziative di indagine condotte nel nostro paese, in particolare nel periodo più recente (2013-2019), che forniscono comunque informazioni indicative sulla presenza della specie, utili alla definizione del disegno di campionamento (Capitolo 3). Nel dettaglio l'informazione di base sulla presenza minima ottenuta con i dati pregressi permette di selezionare le celle da campionare in via probabilistica sulla base della stratificazione (§§ 3.1.1 e 3.2.1). L'integrazione di dati provenienti da iniziative non coordinate ha il limite fondamentale di fornire esclusivamente dati puntuali di presenza rilevata, a volte, in periodi di tempo limitati e non contemporanei, non permettendo quindi una valutazione della presenza della specie alla scala spaziale e temporale appropriate. Obiettivo che invece verrà raggiunto grazie al campionamento estensivo del 2020-2021 (§ 3.1).

2.2 La situazione di partenza: carta di distribuzione con dati pregressi disomogenei

Per fornire una carta di presenza del lupo sul territorio nazionale con dati pregressi, si è proceduto in modo separato per l'ambito alpino e peninsulare, anche in considerazione delle attività svolte in occasione del progetto LIFE WolfAlps (2013-2018). Per l'individuazione della carta di distribuzione iniziale è stata utilizzata una griglia di 10×10 Km usata anche per il reporting ai sensi dell'art. 17, Direttiva 92/43/CEE e dell'art. 13, comma 1, della DPR 357/97 (recepimento nazionale della Direttiva Europea).

Per l'area peninsulare, si è tenuto conto degli eventi di centralizzazione di dati condotti a scala nazionale negli anni passati, ossia i processi di rendicontazione realizzati dal nostro Paese ai sensi della Direttiva Habitat (svolti con il coordinamento di ISPRA negli anni 2012 e 2018) e l'acquisizione di dati condotta dall'Unione Zoologica Italiana (UZI) nel 2015, per conto del MATTM, ai fini della redazione della bozza del nuovo Piano di conservazione e gestione del lupo (Boitani e Salvatori 2015). L'analisi preliminare di confronto tra i dati riferibili alle tre occasioni di revisione della carta di distribuzione della specie (2012, 2015 e 2018, rispettivamente nella Figura 2, Figura 3 e Figura 4), ha evidenziato alcuni aspetti che è stato necessario chiarire:

1. La carta del 2015 era stata prodotta adottando il sistema di valutazione e interpretazione dei dati già utilizzato nelle Alpi nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps, che prevedeva la classificazione dei diversi segni di presenza e la loro interpretazione in base a criteri standard (Marucco *et al.*, 2014). Utilizzando tali criteri, la carta fornisce indicazioni sulla presenza stabile o sporadica della specie, secondo le categorie sotto riportate:

- A. Cella con presenza stabile: cella occupata in modo costante dal lupo (almeno il 50% del periodo considerato, e per un minimo di 3 anni) e/o evidenza di eventi riproduttivi; il dato può essere confermato da carcasse, analisi DNA, foto, tracce, prede uccise.
- B. Cella con presenza sporadica: solo presenza occasionale anche confermata con carcasse, analisi DNA, foto, tracce, prede uccise, ma non presenza permanente o eventi riproduttivi (quindi in assenza dei criteri della categoria sopra).

Tuttavia, tale classificazione soffre della discontinuità dei rilievi nel tempo e nello spazio, pertanto i criteri non sono sempre applicabili nell'ambito peninsulare, dove le attività di monitoraggio del lupo sono frammentate nelle due dimensioni.

2. Molte delle celle incluse nella distribuzione del III reporting (2012) erano state mantenute nella raccolta dei dati del 2015. Per alcune di queste, tuttavia, nella carta prodotta per il Piano di conservazione e gestione del lupo era stata indicata presenza "presunta", in quanto nel 2015 non erano risultati disponibili dati che potessero confermarla. D'altra parte, la dislocazione spaziale di tali celle (indicate come C in Figura 3) aveva indotto gli autori della carta del 2015 ad assumere che la presenza del lupo in tali aree fosse altamente probabile, sulla base delle opinioni di esperti. Per altre celle presenti nella carta del 2012, in assenza dei requisiti sopra descritti, gli autori avevano invece ritenuto più opportuno non mantenerle nella carta.

3. Il reporting previsto dalla Direttiva Habitat avviene sulla base degli aggiornamenti forniti dalle Regioni, Enti responsabili del monitoraggio delle specie protette, ai sensi dell'articolo 13, comma 2, del DPR 357/97. Per la produzione di mappe nell'ambito della rendicontazione non è richiesta dalla Commissione Europea una distinzione delle celle in base alla natura della presenza delle specie, definita in base a criteri standard, quali quelli applicati in occasione del lavoro condotto dall'UZI. In occasione della IV rendicontazione (2018), diverse Regioni, sulla base di indagini o iniziative di monitoraggio più recenti, avevano proposto un ampliamento dell'areale di presenza, rispetto anche al 2015. Nel processo di validazione del dato, condotto nell'ambito del procedimento di rendicontazione tale ampliamento era stato confermato, in alcuni contesti, dai dati forniti da esperti mentre in altri casi era risultato coerente con quanto riportato negli aggiornamenti dei Formulari Standard della Rete Natura 2000 (ai sensi dell'art. 4 della Direttiva 92/43/CEE). Al contempo non sempre le celle aggiunte nel 2015 erano risultate presenti nell'aggiornamento proposto dalle Regioni, tuttavia, tenendo conto del parere di esperti e con successivo consenso da parte delle Regioni, erano state incluse nel IV reporting.

Alla luce di tali aspetti, rappresentativi peraltro delle ripercussioni della mancanza di un coordinamento a scala nazionale del monitoraggio della specie, è parso necessario acquisire ulteriori informazioni, al fine di chiarire la natura della presenza del lupo su tutte le celle indicate nel IV reporting, con l'obiettivo di produrre una carta aggiornata della presenza stabile e sporadica del lupo su tutto il

territorio dell'Italia peninsulare. In linea generale quindi si è scelto di mantenere la categoria di appartenenza delle celle individuata nel 2015 e di revisionare quelle allora non comprese nella carta, quelle che furono attribuite alla categoria C e quelle aggiunte nella IV rendicontazione (Figura 4). Per le regioni alpine invece si è fatto riferimento al risultato del monitoraggio condotto nell'ambito del LIFE WolfAlps (Marucco *et al.* 2018) (Figura 7 e Figura 8), e nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU si provvederà ad aggiornare la mappa sulla base di dati relativi alle stagioni più recenti.

In Italia peninsulare, le informazioni relative alle celle sprovviste di dettagli circa la natura della presenza del lupo sono state raccolte contattando direttamente alcuni referenti di Regioni e di Aree Protette, per le celle ricadenti all'interno dei relativi territori di competenza, o alcuni ricercatori responsabili di attività di monitoraggio relativi a queste aree (in particolare il Dott. Massimo Scandura dell'Università di Sassari, la Dott.ssa Elisa Torretta dell'Università di Pavia, il Dott. Lorenzo Gaudiano dell'Università di Bari, la Dott.ssa Luciana Carotenuto della Regione Lazio, il Dott. Francesco Pinchera incaricato dalla Regione Abruzzo per la IV rendicontazione, la Dott.ssa Paola Morini, del Parco Naturale Regionale Sirente Velino, il Dott. Antonino Siclari del Parco Nazionale dell'Aspromonte, la Dott.ssa Romina Fusillo incaricata dalla Regione Calabria per la IV rendicontazione). Si è provveduto quindi a richiedere informazioni e documentazione relativa agli studi e rilievi che giustificavano la inclusione delle celle nella carta di distribuzione del IV report, ottenendo in alcuni casi un ulteriore aggiornamento riguardo la presenza della specie. Infine, si è provveduto a cartografare tutti i campioni genotipizzati ed attribuiti a lupo o ibrido dal laboratorio di genetica di ISPRA riferiti al periodo 2013-2019.

Dalla revisione di quanto raccolto è emersa la necessità di rivedere i criteri di attribuzione delle celle alle categorie individuati in occasione della carta prodotta nel 2015, in quanto in diversi casi non è stato possibile basarsi su dati originari, bensì sulle elaborazioni prodotte dai ricercatori o tecnici o pubblicate nella letteratura (e.g. mappe di branchi). I documenti consultati per questa valutazione sono riportati in Appendice 1. In Appendice 2 sono riportati nel dettaglio i criteri applicati nelle diverse aree. La carta così prodotta è riportata nella Figura 6. Tale carta è la base sulla quale è stata identificata la stratificazione per il campionamento delle celle della fase estensiva (§ 3.1).

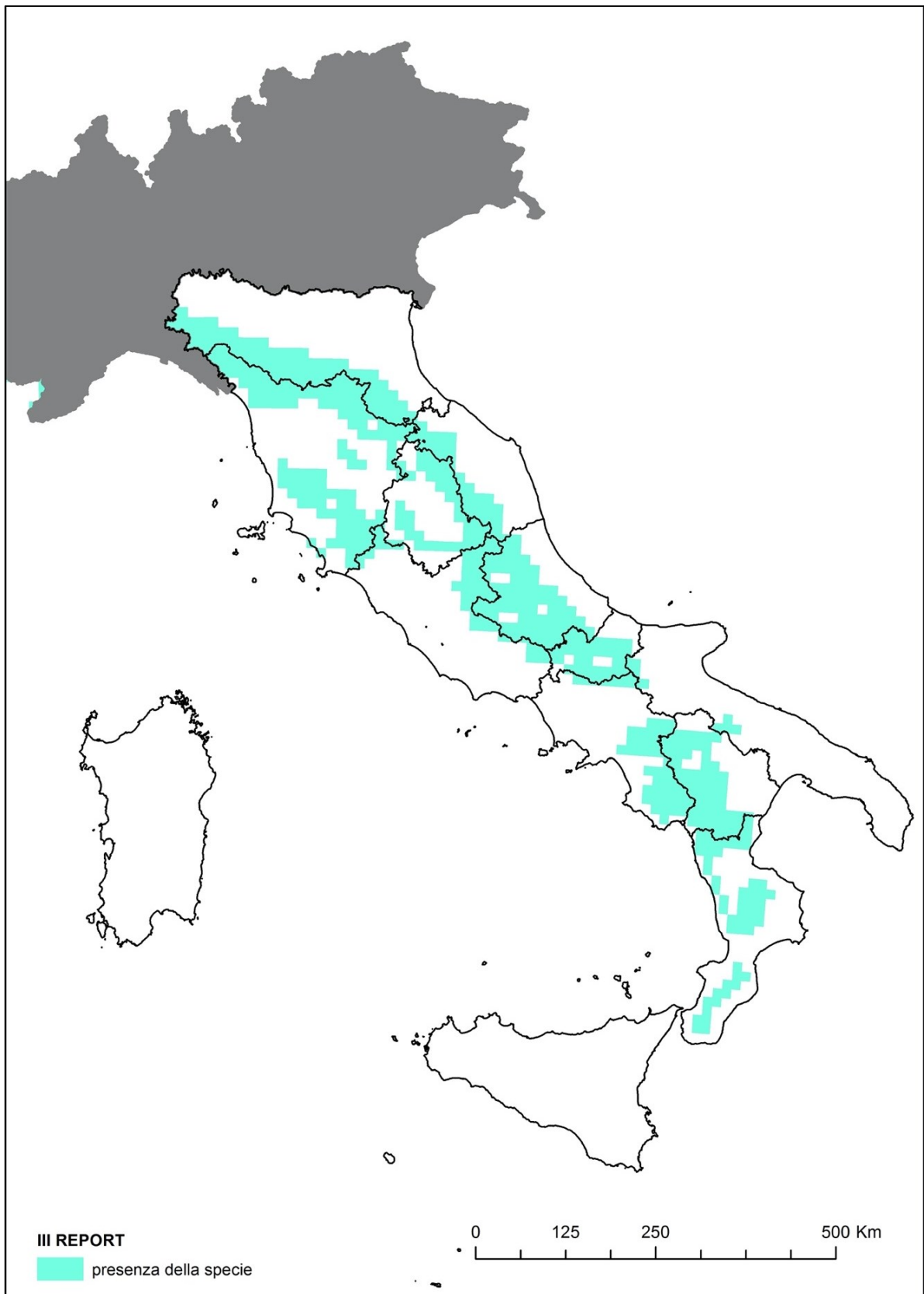


Figura 2. Carta di distribuzione prodotta in occasione del III Report (2012)

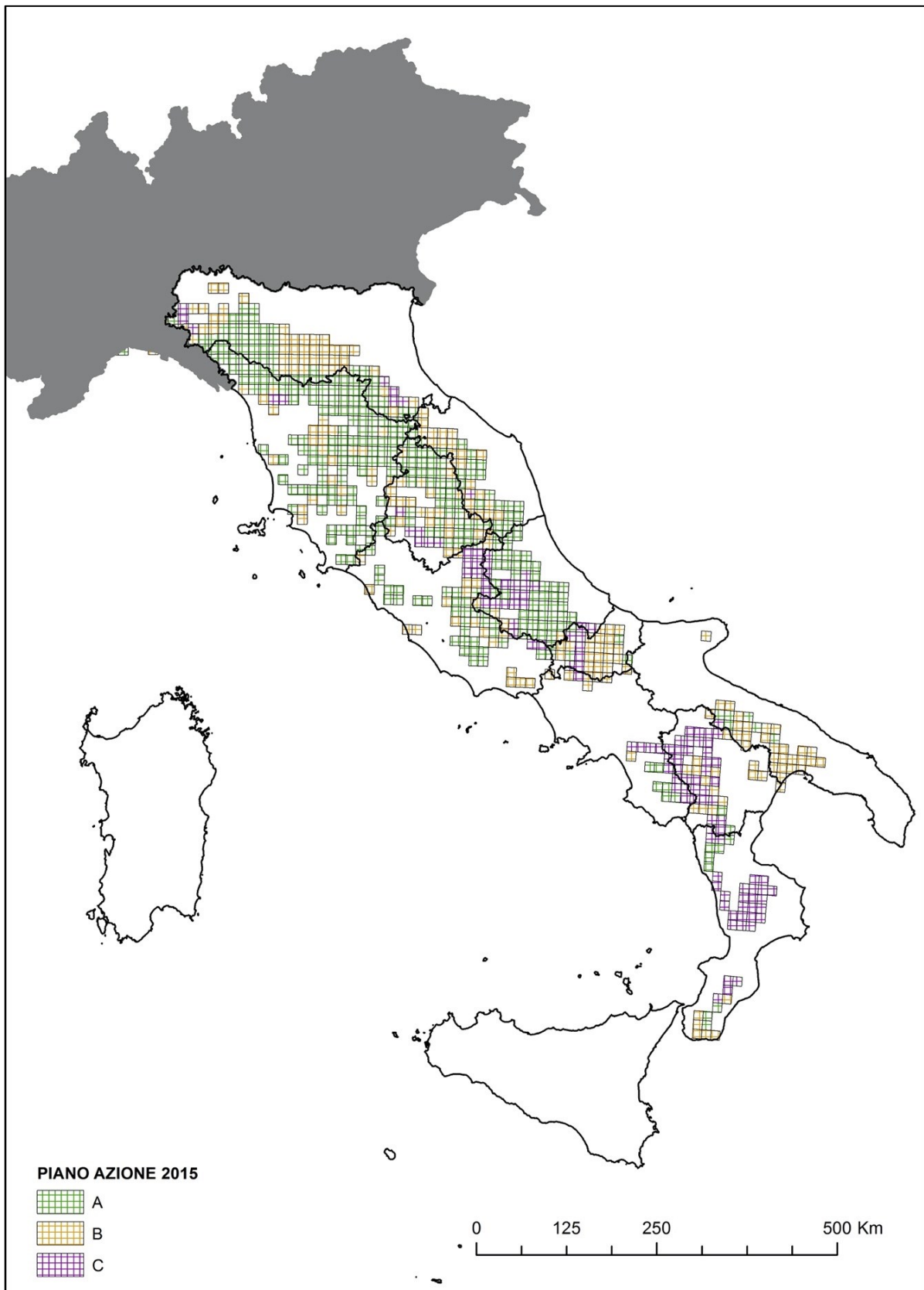


Figura 3. Carta di distribuzione derivante dal lavoro condotto dall'UZI nel 2015. A: presenza stabile, B: presenza sporadica, C: presenza presunta. Rispetto alla carta originale, questa esclude la Liguria centro-orientale, poiché nell'ambito di queste linee guida è stata adottata la suddivisione in una zona Alpi e in una zona dell'Italia peninsulare, per le quali si rimanda alla Figura 1

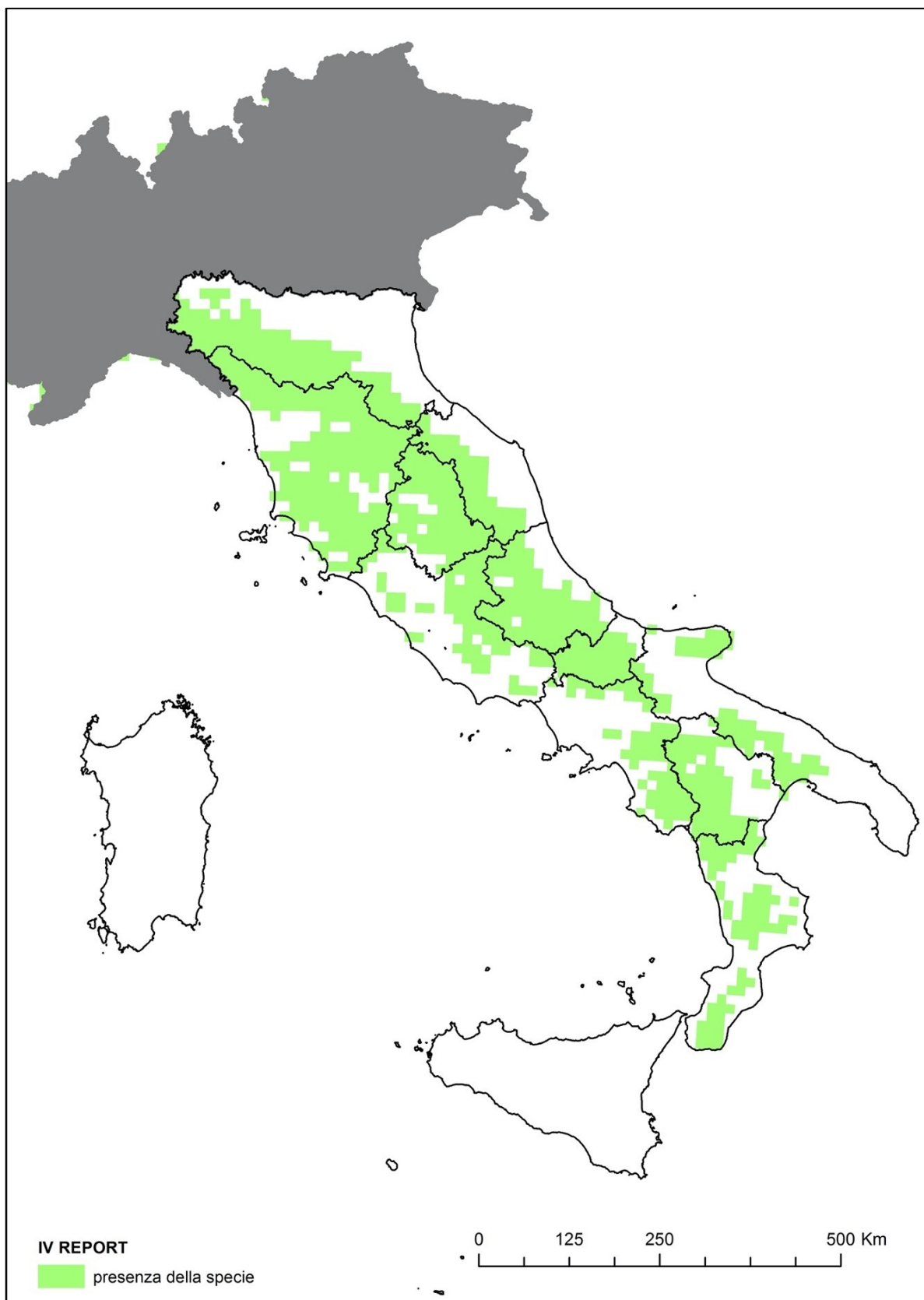


Figura 4. Carta di distribuzione prodotta in occasione del IV Report (2018)

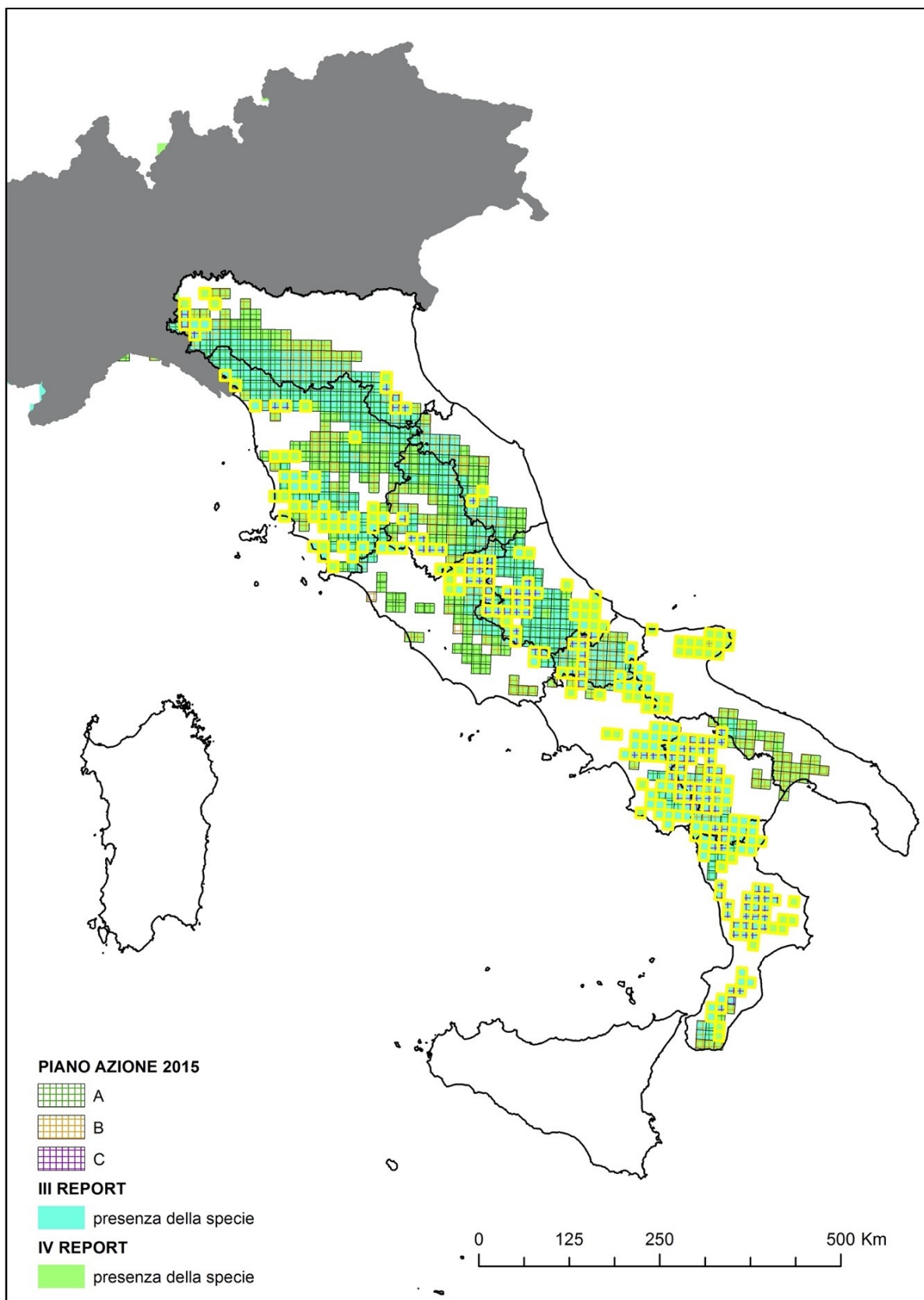


Figura 5. Sovrapposizione dei tre layer (2012, 2015 e 2018), in giallo le celle per le quali sono state ricercate informazioni.

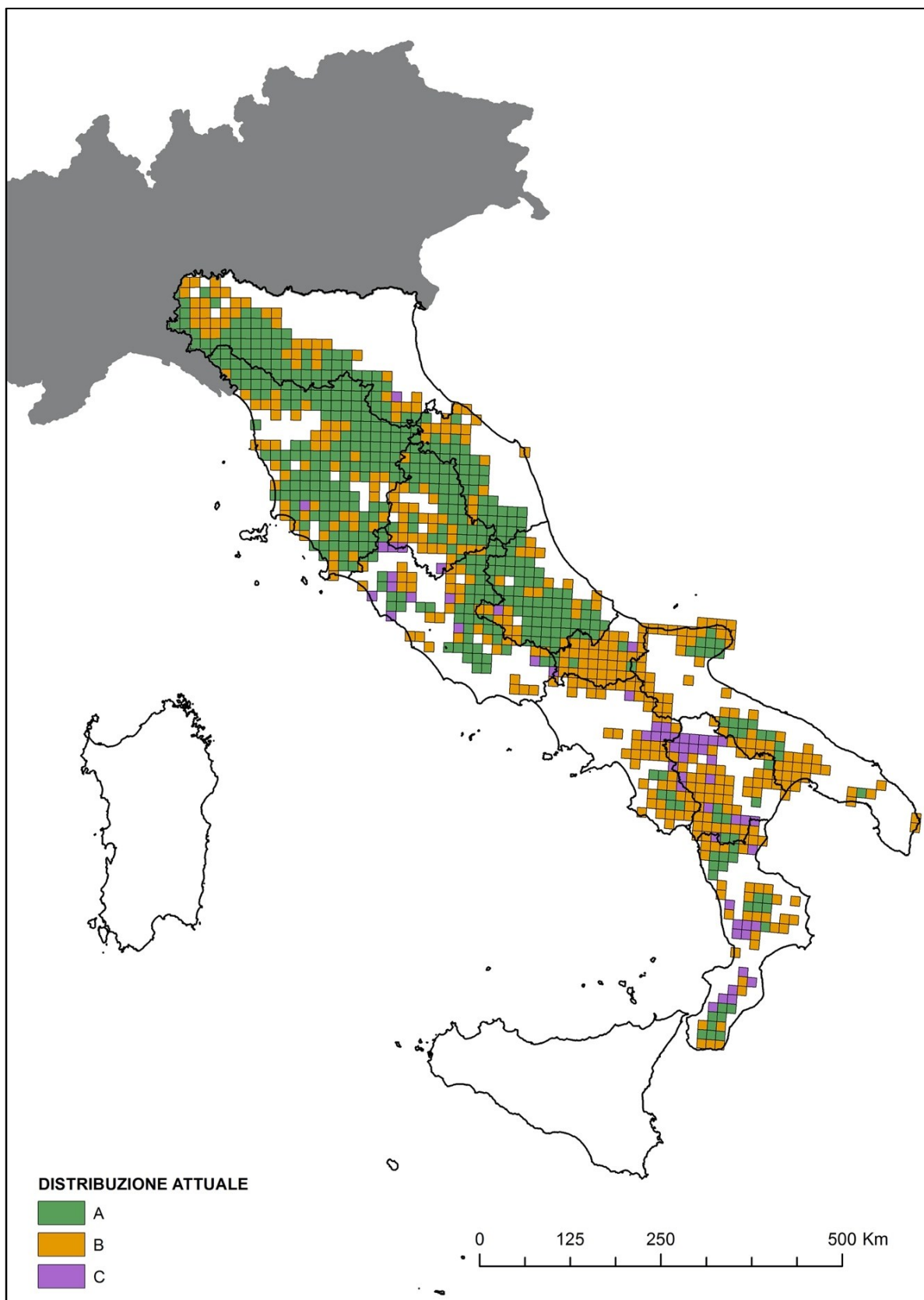


Figura 6. Carta della distribuzione attuale (2019) nell'Italia peninsulare prodotta sulla base dei dati raccolti nell'arco temporale 2013-2019

Infine, per la Zona Alpi sono stati utilizzati gli ultimi dati di presenza raccolti in contemporanea nell'anno 2017-2018 prodotti nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps (Marucco *et al.* 2018) (Figura 7), dove per cella sono indicati il numero di dati C1 e C2 raccolti nell'ambito del monitoraggio della popolazione alpina (Marucco *et al.* 2014) (Figura 8). I dati verranno aggiornati nell'ambito del nuovo Progetto LIFE WolfAlps EU (2019-2024) prima dell'indagine 2020-2021, al fine di effettuare la raccolta dati in tutte le celle di possibile presenza.

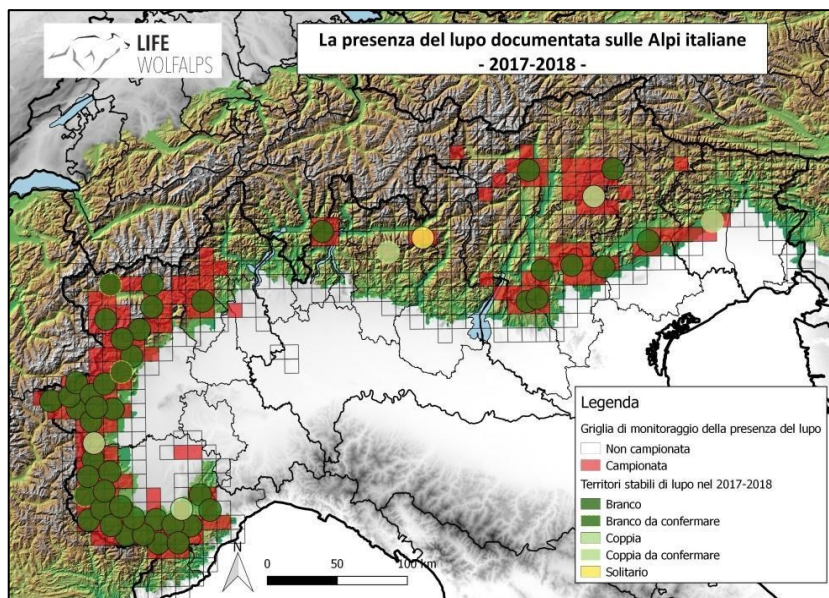


Figura 7. Carta di distribuzione prodotta nell'ambito del LIFE WolfAlps per il 2017-2018 (Marucco *et al.* 2018), scaricabile al link: http://www.lifewolfalps.eu/wp-content/uploads/2014/05/Report_monitoraggio_Alpi_completo.pdf

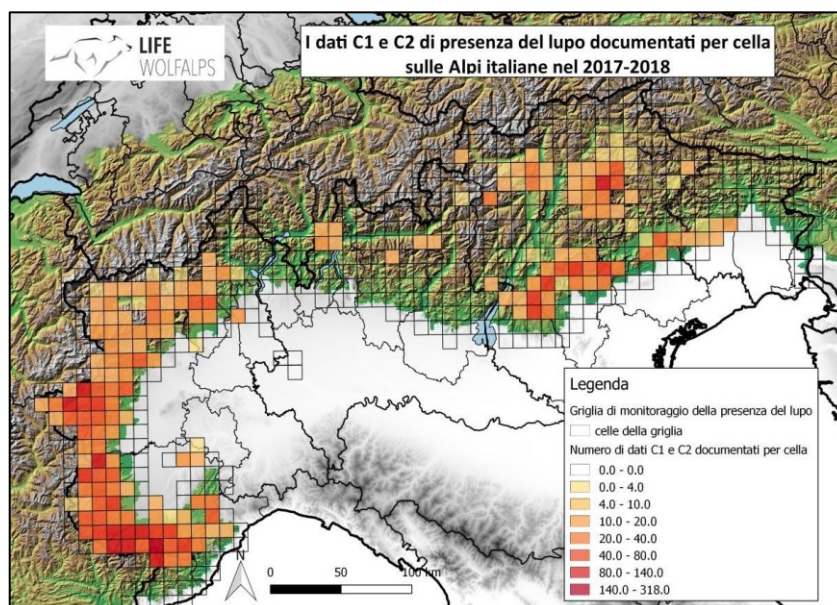


Figura 8. I dati C1 e C2 di presenza del lupo documentati per cella sulle Alpi italiane, nell'ambito del monitoraggio del LIFE WolfAlps per il 2017-2018 (Marucco *et al.* 2018).

3 STIMA DELLA CONSISTENZA E DELLA DISTRIBUZIONE DEL LUPO IN ITALIA: DISEGNO DI CAMPIONAMENTO 2020-2021

La stima della distribuzione e abbondanza della popolazione di lupi a livello nazionale nel 2020-2021 sarà ottenuta attraverso una strategia di campionamento che utilizzerà un disegno articolato in due Fasi (*a* e *b*), con celle di possibile presenza della specie campionate in maniera probabilistica per l'Italia peninsulare e indagate *in toto* nelle regioni alpine. Il processo, già sinteticamente descritto nel § 1.2, prevede in particolare:

- a. **il campionamento estensivo**, che ha come primo obiettivo la stima contemporanea della distribuzione della specie a scala nazionale, attraverso la raccolta di segni di presenza del lupo in un campione di celle di possibile presenza individuate su base probabilistica per l'Italia peninsulare (§ 3.1), tenendo conto dei risultati della valutazione dei dati pregressi (Capitolo 2), e in tutte le celle di possibile presenza nella zona Alpi. L'approccio estensivo permetterà di ricavare la stima della distribuzione nazionale della specie, basata sulla stima dell'*occupancy* realizzata con modelli statistici (MacKenzie *et al.* 2006). Per ogni cella indagata con approccio estensivo verranno raccolti tutti i segni di presenza in modo sistematico, coadiuvati da dati opportunistici;
- b. **il campionamento intensivo**, che ha l'obiettivo di ottenere una stima della densità della popolazione all'interno di 11 aree campione di approfondimento in Italia peninsulare, anche applicando tecniche di cattura e marcatura spaziali (Royle *et al.* 2014) realizzate tramite la raccolta dei segni di presenza attribuiti a specifici individui tramite analisi genetiche non invasive (§ 3.2). Il campionamento intensivo corredato da analisi genetiche è condotto su tutte le celle con possibile presenza di branchi sulle regioni alpine.

In un contesto di *multi-phase sampling* verranno correlati i risultati della Fase *a* e della Fase *b* per la stima della consistenza della popolazione come da § 3.4.

In ogni caso, sia con un approccio di tipo intensivo che di tipo estensivo, la raccolta dei dati sul lupo è condotta tramite la combinazione di un **campionamento opportunistico** (dati ottenuti in modo casuale o sulla base di uscite non programmate spazialmente) e di un **campionamento sistematico** (sulla base di transetti predefiniti e uscite/dati raccolti in modo programmato nel tempo e nello spazio con una valutazione dello sforzo). I dettagli sono descritti nel § 3.1.2.

3.1 Campionamento estensivo

L'obiettivo del campionamento estensivo della Fase *a* è la stima della distribuzione annuale a scala nazionale. Per la prima volta in Italia tale stima sarà ottenuta tramite la realizzazione di attività contemporanee, coordinate, e realizzate con un approccio omogeneo, grazie a un campionamento probabilistico di celle per l'Italia peninsulare, realizzato tenendo conto dei dati pregressi (Capitolo 2). Questi ultimi non possono infatti essere considerati una stima di distribuzione della specie, in quanto raccolti in modo disomogeneo ed in un arco temporale lungo (2013-2019, ed in alcuni casi antecedenti). In questo lasso di tempo estinzioni locali e ricolonizzazioni non sono state quantificate, non permettendo una reale stima di distribuzione annuale. Pur con questi limiti, il dato pregresso è stato nondimeno fondamentale per la selezione delle celle da campionare in Italia peninsulare, per diminuire lo sforzo richiesto (si veda in proposito il § 3.1.1) e ottimizzare il campionamento. Nelle regioni alpine, invece, in ragione della più recente ricolonizzazione da parte della specie, si sottoporrà a rilevamento il totale delle celle con possibile presenza (100%). Nelle regioni alpine quindi non è stata necessaria la selezione delle celle di cui al successivo § 3.1.1. In ogni caso, per ogni cella selezionata sarà necessario attuare il campionamento estensivo nell'anno 2020-2021 (§ 3.1.2), sulla base di criteri (Capitolo 4) e protocolli (Capitolo 6) congiunti, dove ogni cella della griglia è considerata l'unità di campionamento.

3.1.1 Numero e selezione delle celle da campionare in Italia peninsulare

I carnivori, come altre specie, sono raramente distribuiti in modo casuale sul territorio. Spesso presentano una distribuzione aggregata, ad esempio nelle aree con habitat più idoneo e con alta densità di prede. Per questo motivo, come già indicato nella descrizione generale della strategia di campionamento (§ 1.2), allocare le unità di campionamento in modo totalmente casuale non è adeguato: molte unità di campionamento andrebbero a ricadere dove gli animali sono assenti, causando una bassa efficienza del campionamento e creando difficoltà anche nella fase di analisi dei dati (Boitani e Powell 2012). Risulta pertanto più opportuna l'adozione di un **campionamento stratificato**, dove gli **strati** (raggruppamenti delle unità di campionamento per tipologia) sono definiti dalla probabilità di presenza del lupo stabilita sulla base di indicazioni pregresse (Becker *et al.*, 1998; Koen *et al.*, 2008; Boitani e Powell, 2012). La stratificazione è un modo per ottimizzare lo sforzo di campionamento, distribuendolo in ragione della variabilità del parametro di interesse, in questo caso della densità (nota o presunta) (McDonald 2004). Sulla base dei dati pregressi (Capitolo 2) si sono perciò identificati tre strati, caratterizzati da diversi livelli di continuità della presenza della specie (A, B, C) (Figura 6). Come già riportato, le informazioni derivate dai dati pregressi e quindi i livelli di continuità della presenza della specie rappresentano al momento il miglior *proxy* disponibile per una stratificazione spaziale connessa alla densità della specie sul territorio dell'Italia peninsulare. Tuttavia, per alcune celle non esistevano affatto informazioni utili a classificarle nell'ambito di queste categorie, tanto da non poter confermare o escludere, al loro interno, la presenza della specie. Per questo si è deciso di includere nel campionamento uno strato D, aggiuntivo rispetto ai tre definiti dai dati pregressi, costituito dalle celle adiacenti a quelle di presenza nota o presunta (A, B o C) e per le quali non sono mai state raccolte informazioni in precedenza. L'inclusione dello strato D permette di evidenziare eventuali variabilità nel *range* della specie non precedentemente valutate con i dati pregressi, ma

soprattutto risponde, almeno in parte, anche alla necessità di tenere conto delle sproporzioni passate di sforzo di indagine sul territorio.

Per tale motivo, ai fini della selezione delle celle da sottoporre a campionamento estensivo, sono stati identificati, sulla base dei dati pregressi (Capitolo 2) e di queste considerazioni, i seguenti 4 strati in Italia peninsulare rappresentati in Figura 9 (per i criteri di attribuzione a queste classi si rimanda al Capitolo 2 e all'Appendice 2):

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

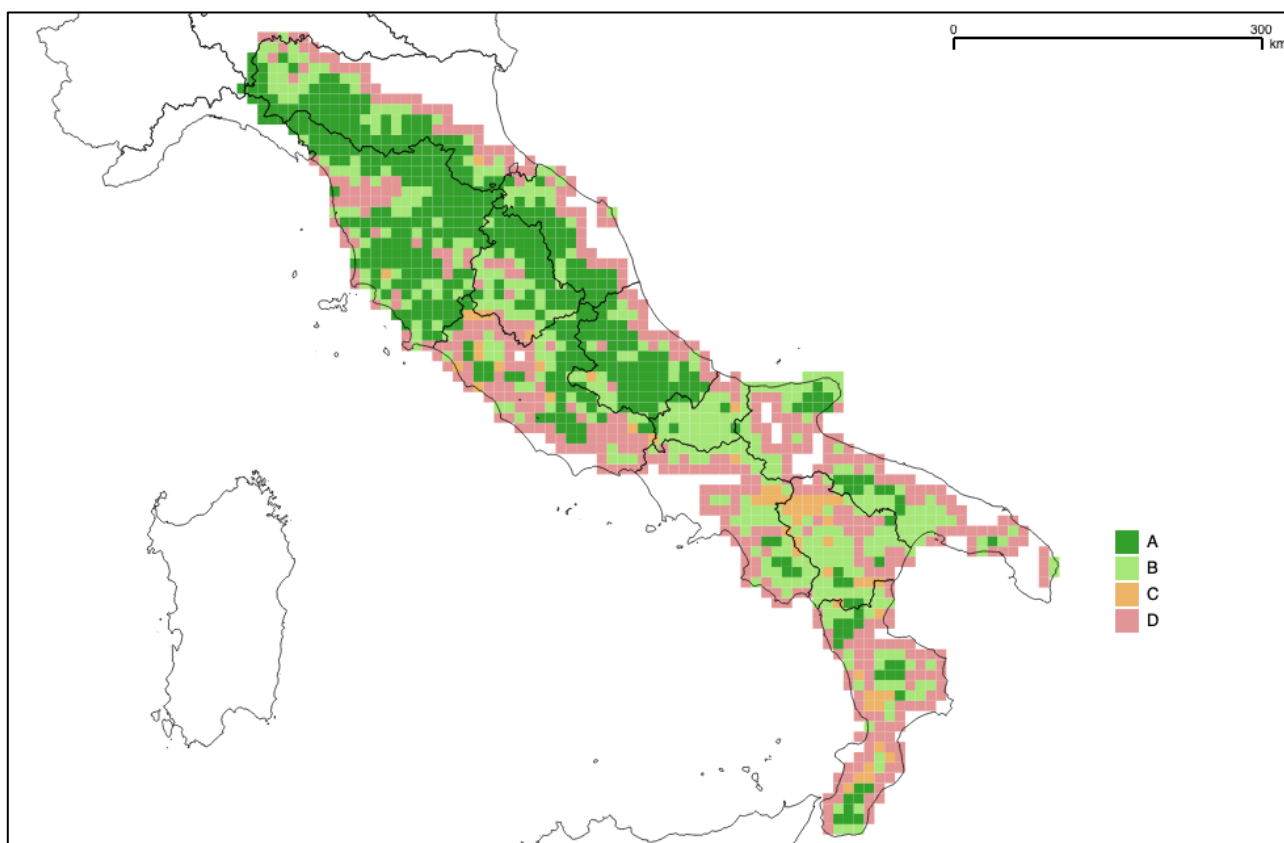


Figura 9. Stratificazione delle celle sulla base dei quattro criteri sopra esposti: A, B, C, D.

Dato il numero totale di celle nel *range* della specie ed uno sforzo totale di campionamento prefissato, la ripartizione dello sforzo tra gli strati è avvenuta in modo proporzionale alla presunta abbondanza della specie, assumendo che questa ultima sia almeno parzialmente in relazione ai criteri di continuità di presenza utilizzati per la stratificazione dei dati pregressi. In un'ottica adattativa, la distribuzione spaziale del campione potrà ovviamente essere in futuro rivista non appena, grazie alla prima

survey 2020-2021, si renderanno disponibili dati effettivi (*e non proxy*) sulla densità della specie. Secondo un approccio già suggerito da Manly (2004), sulla base di Cochran (1977), è stata utilizzata la formula:

$$u_t = \left(\frac{U_i \sigma_i}{\sum_{j=1}^m U_i \sigma_j} \right) u_T$$

in cui m rappresenta il numero di strati totali (4), U_i e σ_i sono rispettivamente le unità di campionamento (celle) disponibili e la deviazione standard dell'attributo all'interno dello strato i (che nel caso in esame, non essendo nota, è ipotizzata come maggiore nello strato A, e decrescente fino ad un minimo nello strato D), e u_T rappresenta lo sforzo di campionamento totale (numero totale di celle da indagare in modo estensivo).

Data la stratificazione, si è optato per l'adozione di un campionamento spazialmente bilanciato, in grado di assicurare una buona rappresentatività del campione (Stevens e Olsen 2004; Roberston *et al.* 2013a, b, 2017, 2018; Brown *et al.* 2015; Abi *et al.* 2017; Pagliarelli *et al.* 2017; Grafström e Matei 2018; Van Dam-Bates *et al.* 2018). L'applicazione di un corrispondente algoritmo (Appendice 3a) ha prodotto la prima selezione probabilistica delle celle (356 *celle di tipo 1*, corrispondenti al 25% del totale, cioè della somma delle celle disponibili negli strati A, B, C, D), come rappresentata in Figura 10.

Nell'ambito della prima selezione, si è optato per un valore arbitrario minimo da campionare del 25%. Tale percentuale rappresenta un valore già valido dal punto di vista statistico e in quanto tale dovrebbe fornire un risultato rappresentativo della situazione nell'Italia peninsulare. Tale rappresentatività potrebbe essere ottenuta, eventualmente, anche con un minor numero di celle. Tuttavia, in questo caso le informazioni disponibili sulla variabilità del parametro di interesse (l'abbondanza della popolazione, che incide anche sulla probabilità di contattare la specie) sono limitate. Tenendo conto dell'elevata variabilità ambientale che contraddistingue il contesto peninsulare e che potrebbe riflettersi in una corrispondente elevata variabilità della densità di lupi, si è pertanto preferito fissare, precauzionalmente, una percentuale elevata. Nell'ambito del piano di monitoraggio a lungo termine, lo sforzo di campionamento potrà successivamente essere ridotto, usando i dati dell'indagine 2020-2021 come base per la ridefinizione del numero di celle da campionare nel corso delle indagini successive. Per questo motivo, nell'indagine 2020-2021 lo sforzo di campionamento non potrà scendere sotto questa soglia e le celle non potranno essere sostituite arbitrariamente. Nelle regioni del sud Italia (Campania, Puglia, Basilicata, Calabria e Molise), dove è registrata la più alta percentuale di celle D (251 su 768 celle – 33%, rispetto a 227 su 1000 – 23% nell'Italia centrale), si è ritenuto inoltre necessario, per la prima indagine 2020-2021, incrementare il campionamento includendo anche le celle selezionate ipotizzando un campionamento complessivo, a scala nazionale, del 50% delle celle disponibili. L'incremento dello sforzo di campionamento nell'Italia meridionale è da mettersi in relazione alla mancanza di dati pregressi di queste aree, nelle quali quindi la varianza della densità potrebbe essere maggiore di quella generalmente attesa. Le celle selezionate per le Regioni dell'Italia peninsulare centrale e meridionale sono riportate nella Figura 10.

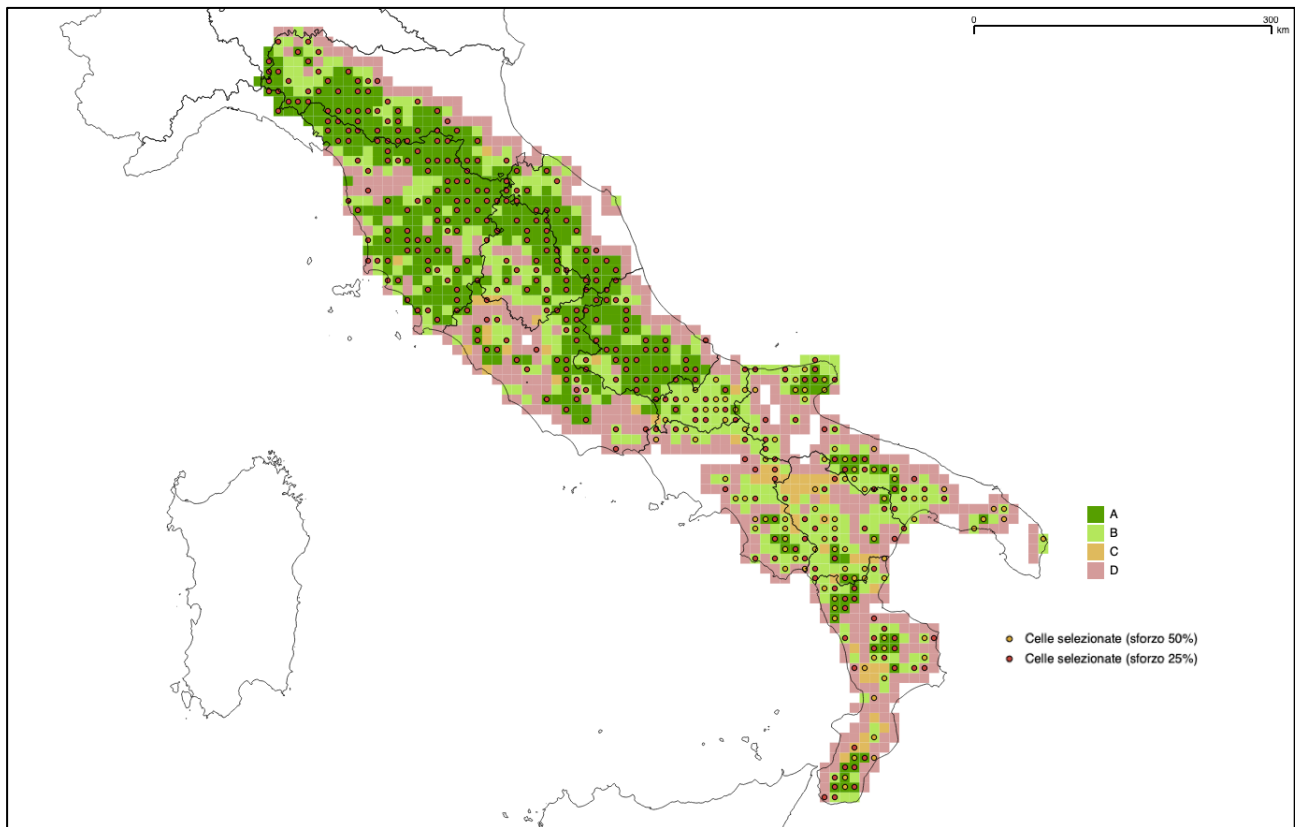


Figura 10. Celle selezionate per il campionamento estensivo in Italia peninsulare.

Il numero di celle selezionate in ogni strato, ottenute grazie ad un algoritmo di campionamento spazialmente bilanciato (Stevens e Olsen 2004; Claire *et al.* 2019) è descritta in Figura 11. Nello specifico, è stato adottato uno schema di campionamento GRTS (*Generalized Random Tessellation Stratified*) che sfrutta la suddivisione dell'area di studio in celle di dimensione regolare (area di studio 'tessellata'), in questo caso di 10×10 km. Ad ogni cella della griglia 10×10 km viene assegnato un identificativo a seconda della sua posizione nello spazio, e l'insieme ordinato delle celle viene quindi selezionato in modo *random* sistematico. La selezione a partire dall'insieme ordinato delle celle assicura il bilanciamento spaziale del campione (le celle campionate riflettono la densità spaziale delle celle disponibili) e nell'ambito del processo è possibile assegnare alle singole celle delle differenti probabilità di selezione. Nel nostro caso, la probabilità di selezione è stata diversificata tenendo conto della stratificazione (A, B, C, D). Come anticipato, si è infatti deciso di allocare un campione proporzionalmente maggiore nelle celle dove si aspetta maggiore varianza del parametro di interesse, specialmente in relazione alla densità attesa di segni rilevati. L'algoritmo di campionamento spazialmente bilanciato utilizzato per la selezione delle celle da campionare con approccio estensivo è visionabile in Appendice 3a. Il totale delle celle selezionate è di 449: 254 ricadono nello strato A, 153 nel B, 8 nel C e infine 34 nel D (Figura 11).

In relazione al numero totale di celle da campionare, si evidenzia che esse saranno in parte coincidenti (N=44) con quelle individuate per il successivo campionamento intensivo (per il quale si rimanda al § 3.2).

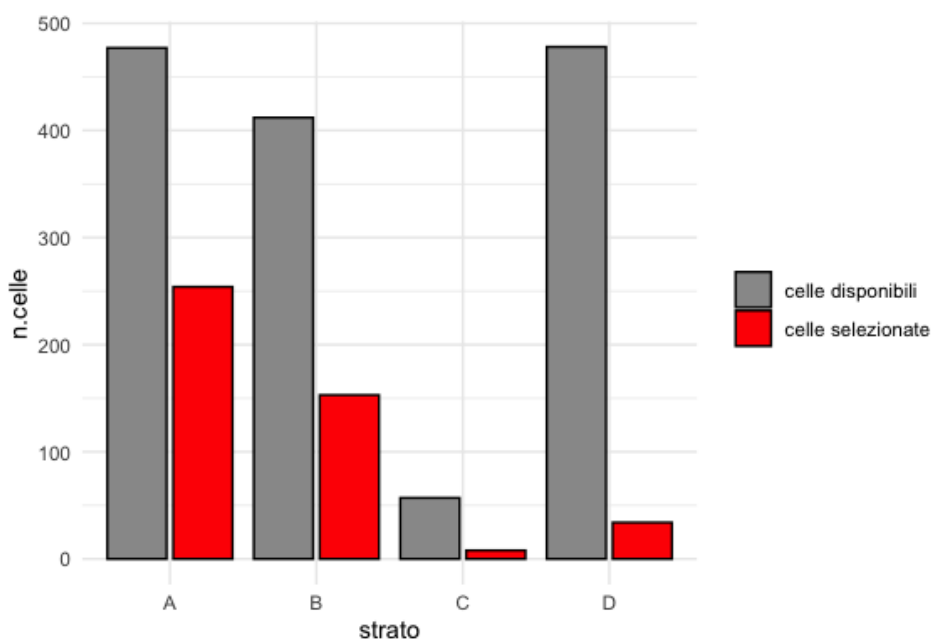


Figura 11. Numero di celle selezionate (in totale 449) con campionamento spazialmente bilanciato per strato.

3.1.2 Descrizione delle attività di campionamento estensivo nelle celle

Il **campionamento estensivo** si applica attuando una raccolta dati organizzata sia in modo **sistematico che opportunistico** da parte di personale opportunamente preparato (Capitolo 5) sulla base di criteri (Capitolo 4) e protocolli (Capitolo 6) standardizzati. Tale campionamento ha come obiettivo la stima della distribuzione a scala nazionale, ma risulta fondamentale anche per la stima dell'abbondanza (per dettagli § 3.4). In Figura 10 sono indicate le celle selezionate per la raccolta dei dati in modo estensivo nell'Italia peninsulare. Nella zona Alpi invece si camperanno il 100% delle celle di possibile presenza documentate nell'anno precedente la *survey* 2020-2021. In Figura 7 sono evidenziate in rosso tutte le celle con segni di presenza documentati nell'anno 2017-2018 sulla base dei dati ottenuti nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps. L'individuazione dello strato di possibile presenza della specie sul territorio alpino sarà aggiornato sulla base di un approccio adattativo con una valutazione pre-campionamento che sarà condotta nell'ambito del LIFE WolfAlps EU prima della stagione di campionamento 2020-2021. Nell'ambito **del monitoraggio della zona alpina** le celle dello strato non verranno sottocampionate e saranno **tutte interessate da attività di campionamento estensivo**. Considerando la limitata estensione dell'area occupata dal lupo sulle Alpi e l'alta disponibilità di risorse grazie al progetto LIFE WolfAlps EU, si tratterà di un campionamento esaustivo su tutte le celle dello strato di possibile presenza. La raccolta dati sarà condotta durante lo svolgimento del progetto LIFE WolfAlps EU da tutti gli operatori del *Network Lupo* delle regioni alpine formato e istituito già nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps (Capitolo 5). Il campionamento nell'Italia peninsulare sarà condotto da tutti gli operatori individuati che faranno parte di una rete, denominata *Network Lupo* dell'Italia peninsulare, coordinati nella zona dell'Italia peninsulare

da tecnici individuati mediante selezione e che opereranno in collaborazione con le Aree Protette e le Regioni. Il processo di coordinamento nazionale è dettagliato nel Capitolo 5.

Il campionamento sistematico ha un tipo di *effort* controllato e quantificato (§ 3.1.4), sia spazialmente sia temporalmente. Il campionamento è temporalmente sistematico perché sarà organizzato sulla base di uscite programmate, ed è spazialmente sistematico 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, si fa 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. Ogni cella della griglia rappresenta l'unità di campionamento per la valutazione diretta della distribuzione ed al suo interno i transetti e/o punti sono individuati a scala locale dai tecnici, come descritto nel Capitolo 5. Il campionamento sistematico è finalizzato alla raccolta di segni di presenza ottenuti lunghi i transetti programmati, che possono consistere in escrementi e/o tracce su neve. Gli escrementi possono poi essere indirizzati per le analisi genetiche non-invasive, questo avviene necessariamente nelle celle del campionamento intensivo, come da § 3.2. L'uso di fototrappole è incoraggiato come monitoraggio sistematico, ossia realizzato attraverso una distribuzione di fototrappole sul territorio e registrando lo sforzo di campionamento che viene applicato (i dettagli dei protocolli sono nel Capitolo 7).

Il campionamento opportunistico è svolto in maniera non pianificata, sulla base di segni di presenza raccolti casualmente durante attività sul campo non dedicate allo studio del lupo o perché segnalati da terzi casualmente. Questi dati sono una utile integrazione ai dati raccolti in maniera sistematica perché incrementano la qualità e quantità della conoscenza di base sulla distribuzione e presenza del lupo e migliorano la pianificazione del campionamento sia estensivo che intensivo. Poiché sono dati di natura opportunistica non possono essere utilizzati per le quantificazioni dello sforzo (*effort*). Ricadono ad esempio in questa categoria le fotografie casuali fatte da terzi e verificate, escrementi raccolti casualmente sul territorio e non nell'ambito di transetti sistematici, etc.

Il campionamento di tipo estensivo in una singola cella ha l'obiettivo di accertare la presenza della specie e la presenza eventuale di branchi e di quantificare la presenza grazie ad un approccio sistematico per controllare lo sforzo, coadiuvato da un campionamento opportunistico. In ogni cella 10x10 km selezionata i tecnici (Capitolo 5) a livello locale dovranno individuare transetti e/o punti di marcatura, che dovranno poi essere controllati periodicamente a piedi (e/o mediante apposizione di fototrappole) dagli operatori del *Network Lupo* (Capitolo 5). In queste celle deve essere applicato un campionamento sistematico di minima che comprenda almeno tre repliche (nei periodi ottobre-novembre, dicembre-gennaio, febbraio-marzo). Le attività di campionamento estensivo consistono quindi nella combinazione di un:

A) **campionamento estensivo sistematico, fondamentale** per la raccolta di dati utili all'applicazione dei modelli di *occupancy* per la stima accurata della distribuzione. Questo tipo di disegno campionario si svolge con uscite programmate spazialmente e temporalmente per la verifica di transetti e/o punti di marcatura, dove vengono raccolti segni di presenza che saranno in grande maggioranza gli escrementi ed in minima

parte tracce su neve. All'interno di ogni cella della griglia oggetto del campionamento vengono predisposti dai tecnici (Capitolo 5) transetti che coprono tutto il territorio da campionare sistematicamente (in modo ridotto perché estensivo). Questi transetti vengono percorsi nei mesi invernali dagli operatori del *Network Lupo* garantendo almeno tre repliche. La relativa attività di campo descritta nei protocolli (Capitolo 6) è quindi quella del controllo sistematico di transetti e/o punti di marcatura per la raccolta di segni di presenza con minimo tre repliche invernali (Protocollo 6.1). Il posizionamento di fototrappole all'interno della griglia, con quantificazione delle giorni-trappola di attività, potrà coadiuvare il monitoraggio sistematico tramite transetti (Capitolo 7).

Questo disegno di studio, organizzato con repliche successive a breve termine, permette di quantificare con precisione la distribuzione del lupo sul territorio grazie alla quantificazione dello sforzo (analisi di *occupancy*, si veda in proposito anche § 3.4) e nel tempo consentirà inoltre di valutare il *trend* della distribuzione e la presenza di eventi di nuova ricolonizzazione, o di estinzione locale (McKenzie *et al.* 2006; Molinari *et al.* 2017). La sua applicazione permette allo stesso tempo di ottenere una base più robusta per stimare la dimensione della popolazione (§ 3.4).

In conclusione, per la stima della distribuzione del lupo, ed il *trend* nel tempo, il campionamento sistematico è organizzato tramite **3 repliche consecutive che prevedono la perlustrazione di tutti i transetti/punti di marcatura/fototrappole posizionate nelle celle selezionate del territorio peninsulare (Figura 10) e alpino**. In particolare, per i transetti si prevede almeno una replica per ciascuno nei seguenti bimestri: **ottobre-novembre (1), dicembre-gennaio (2), febbraio-marzo (3)**. **In ogni caso più repliche, se possibile, possono migliorare la stima.**

B) **campionamento estensivo opportunistico** continuo nel tempo, volto ad aumentare il numero di dati di segni di presenza nella cella, utili per la valutazione dell'indice di densità dei segni per cella e per l'identificazione dei branchi presenti a scala locale. Qualsiasi dato opportunistico raccolto al di fuori delle celle selezionate dovrà comunque essere archiviato per contribuire alla definizione del protocollo di monitoraggio a lungo termine.

Quindi, le relative attività di campo del campionamento estensivo, descritte nei protocolli nel Capitolo 6, sono:

- la percorrenza sistematica dei transetti/punti di marcatura per la raccolta dei segni di presenza, quali principalmente escrementi e più raramente le tracce su neve (Protocollo 6.1),
- fototrappolaggio (Protocollo 6.2);
- raccolta di qualsiasi segno di presenza opportunistico, anche derivato da terzi purché verificato come da protocollo, in particolare per quanto riguarda documentazione fotografica casuale (Protocollo 6.3);
- attività di *snow-tracking* dove attuabile, sia opportunistica che sistematica a partire dalla percorrenza dei transetti (Protocollo 6.4);
- attività di *wolf-howling*, se valutata necessaria per una migliore individuazione di transetti efficienti (Protocollo 6.5);
- archiviazione di dati dei lupi morti rinvenuti e di categoria C2/C3 opportunistici (Capitolo 4).

3.2 Campionamento intensivo

L'obiettivo del campionamento intensivo della Fase *b* è la produzione di una stima dell'abbondanza dell'intera popolazione peninsulare, e in modo indipendente della popolazione alpina, sulla base della stima della densità dei lupi ottenuta in aree campione. Poiché una stima della densità dei lupi non è ricavabile per tutto il territorio in esame, nell'Italia peninsulare sono state selezionate, secondo l'approccio probabilistico di seguito descritto (§ 3.2.1), delle aree campione distribuite sull'intero territorio italiano, da sottoporre ad indagine intensiva descritta nel § 3.2.2, seguendo i criteri e protocolli standard proposti nel Capitolo 6. Nel campionamento intensivo, **la raccolta dati sarà realizzata con un maggiore sforzo, sia per maggiore densità di transetti che di repliche, e la raccolta di segni di presenza sarà coadiuvata da analisi genetiche non invasive** per ottenere una stima locale della densità della popolazione, anche attraverso analisi di cattura e ricattura spazialmente esplicite (*Spatial Capture Recapture model, SCR*) (Chandler e Royle 2013; Royle *et al.* 2014). Nelle regioni della zona Alpi il campionamento intensivo sarà condotto in tutte le celle di presenza stabile della specie documentata l'anno antecedente la *survey* 2020-2021, nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU, per arrivare a una stima minima del numero di branchi e a una stima della dimensione della popolazione basata su modelli di cattura-ricattura spaziale.

In queste aree l'unità di campionamento per la stima della densità/abbondanza è l'individuo. In aggiunta si otterrà una stima minima del numero di branchi presenti per l'individuazione delle unità riproduttive e della densità dei branchi. Questo dato è fondamentale per selezionare in modo efficiente i campioni per le analisi genetiche per condurre i modelli di cattura-ricattura ed interpretarli al meglio (Marucco *et al.* 2009; Cubayanes *et al.* 2010).

3.2.1 Numero e selezione delle celle da campionare nell'Italia peninsulare

La definizione delle aree in cui effettuare il campionamento intensivo nell'Italia peninsulare, finalizzato alla stima delle densità, come già anticipato nel § 1.2, avviene nell'ambito della Fase *b*. In tali aree l'obiettivo è quello di ottenere una stima locale della densità della popolazione, anche attraverso analisi di cattura e ricattura spazialmente esplicite (Chandler e Royle, 2013; Royle *et al.* 2014; per dettagli si rimanda al § 3.4) basate sulla raccolta di segni di presenza coadiuvata da analisi genetiche non invasive. Le aree considerate devono perciò soddisfare una serie di requisiti fondamentali, sia per quanto riguarda la loro estensione, sia per quanto riguarda la loro numerosità e localizzazione nel contesto peninsulare. Per garantire l'attendibilità della stima finale a scala nazionale, è assunto irrinunciabile, come già ricordato, che queste aree campione siano individuate in modo da risultare rappresentative della variabilità di condizioni ecologiche e demografiche della popolazione di riferimento (in questo caso la popolazione di lupo dell'Italia peninsulare).

Per questo motivo, si è optato per l'individuazione di 11 aree distribuite in modo spazialmente bilanciato nell'Italia peninsulare (all'incirca 1 per ogni regione). Come per il campionamento della Fase *a*, anche in questo caso è stato adottato un disegno di campionamento GRTS (*Generalized Random Tessellation Stratified*) che sfrutta la suddivisione dell'area di studio in celle di 10×10 km (tessellazione) e seleziona quindi le celle da campionare in modo *random* sistematico, tenendo conto sia dell'ordinamento spaziale delle celle, sia, in questo caso, della loro classificazione nelle diverse Regioni amministrative.

Utilizzando il disegno GRTS, sono state selezionate 11 celle di 10×10 km, tra quelle già individuate per il campionamento estensivo. A partire da queste 11 celle, le aree campione sono quindi state delimitate identificando le 8 celle più vicine, purché rientranti negli strati A, B, C, o D di continuità di presenza. Al momento, questi strati rappresentano l'unico *proxy* per un indice categorico di densità della specie disponibile a livello peninsulare. Per questo motivo, anche nella Fase *b*, si è generato uno sforzo di campionamento maggiore negli strati con maggior continuità di presenza (A e B), e minimo negli strati C e D (Appendice 3b).

Dato il bilanciamento spaziale del campione, l'effettiva rappresentatività delle aree rispetto alla popolazione di riferimento dipende anche dalla dimensione campionaria, fissata in questo caso a 11 quale compromesso tra la necessità di assicurare un campione di dimensioni adeguate per catturare la variabilità del parametro di interesse (abbondanza) e le limitazioni di carattere logistico (sforzo attuabile per la raccolta dati sul campo e per le successive analisi di laboratorio dei campioni biologici raccolti). Queste 11 aree corrispondono a 99 celle, 44 delle quali coincidenti con quelle del campionamento estensivo.

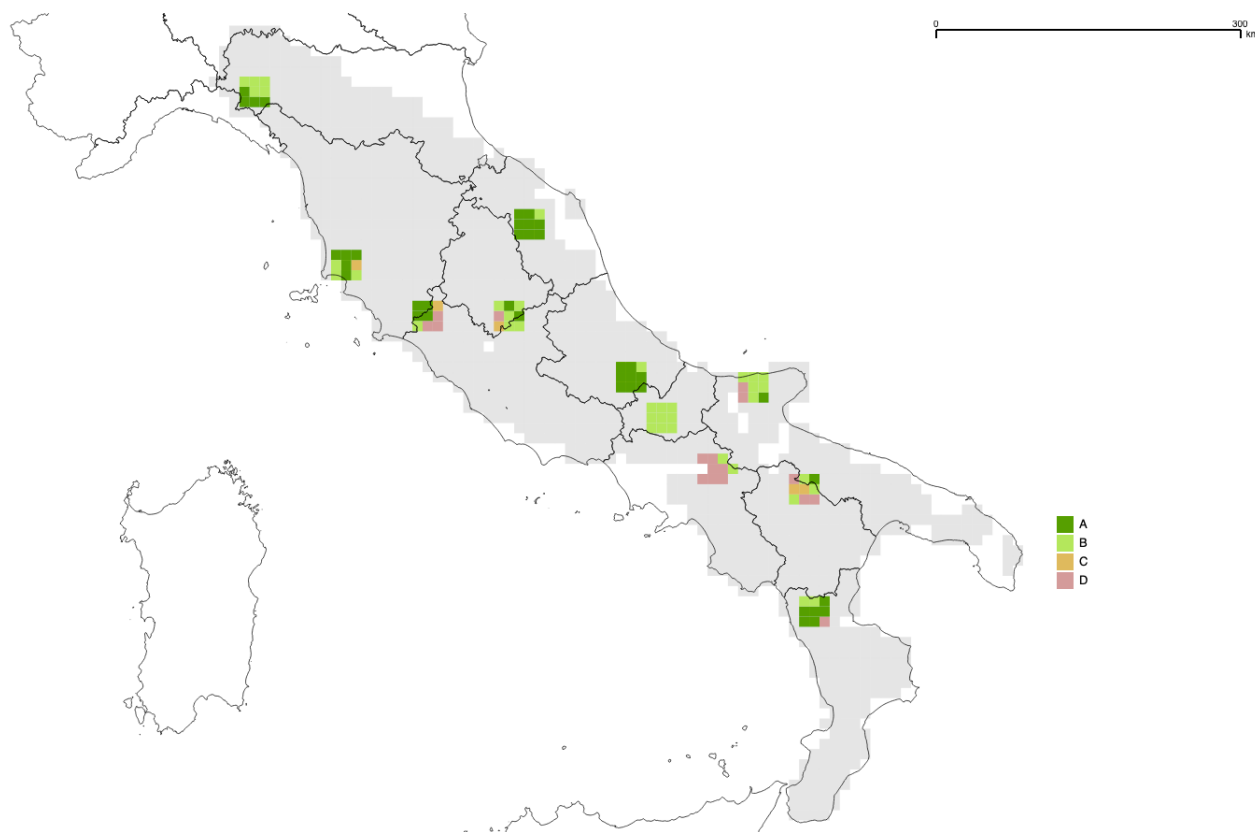


Figura 12. Celle selezionate per il campionamento intensivo raggruppate nelle relative aree campione, in totale 11, e classificate in base allo strato di continuità di presenza (A, B, C, D). In grigio tutte le altre celle 10×10 km dell'Italia peninsulare, non interessate dal campionamento intensivo.

3.2.2 Descrizione delle attività di campionamento intensivo nelle aree campione

All'interno di ogni area campione individuata su base probabilistica nell'Italia peninsulare (§ 3.2.1), e su tutte le celle delle regioni alpine di presenza stabile della specie, verrà svolta un'attività di raccolta dati

intensiva con l'obiettivo di stimare la densità/abbondanza locale basata su modelli di cattura ricattura spaziale nelle zone di più alta densità, dove l'unità di campionamento è l'individuo. In aggiunta si otterrà una stima minima del numero di branchi presenti per l'individuazione delle unità riproduttive, e la stima minima di individui dove la bassa densità locale non permetterà l'applicazione di modelli.

Nel campionamento intensivo, la raccolta dati sarà simile al campionamento estensivo, basata principalmente su **un campionamento sistematico coadiuvato da un campionamento opportunistico**, ma **realizzato con un maggiore sforzo, sia per maggiore densità di transetti che di repliche**. Inoltre, solo nelle celle di campionamento intensivo, la raccolta di segni di presenza sarà seguita **da analisi genetiche non invasive su campioni selezionati** (§§ 6.8 e 6.9), per ottenere una stima locale della densità della popolazione, anche attraverso analisi di cattura e ricattura spazialmente esplicite (Chandler e Royle, 2013; Royle *et al.* 2014).

Il campionamento di tipo intensivo è quindi condotto nelle 11 aree campione selezionate nelle regioni dell'Italia peninsulare e su tutte le celle delle regioni alpine di presenza stabile della specie e prevede in particolare i seguenti obiettivi generali:

- verifica di presenza di un branco/ coppia grazie alla combinazione di fototrappolaggio/genotipizzazione degli individui e analisi di *pedigree*/tracciature su neve dove possibile;
- stima **minima** del numero dei branchi e stima **minima** della dimensione del branco, grazie alla combinazione della genotipizzazione degli individui e analisi di *pedigree*/fototrappolaggio/tracciature su neve dove possibile (il solo fototrappolaggio/*snowtracking* non coadiuvato da analisi genetiche non può portare alla stima minima dei branchi a scala locale);
- accertamento della riproduzione nei branchi tramite *wolf-howling* nel periodo estivo prima del campionamento sistematico, solo con l'obiettivo di allocare al meglio i transetti per raggiungere una maggiore efficienza di raccolta dei segni di presenza;
- raccolta di tutti i segni di presenza sia tramite campionamento sistematico che opportunistico per la valutazione della densità spaziale dei segni, con maggiore sforzo rispetto al campionamento estensivo, ossia con più repliche e con una maggiore densità di transetti;
- ricampionamento efficiente di tutti i lupi presenti tramite la raccolta e selezione degli escrementi su cui verranno eseguite le analisi genetiche, sulle base delle informazioni dei branchi acquisite e il campionamento sistematico e opportunistico condotto, privilegiando escrementi contemporanei, per la stima dell'abbondanza locale.

Come per il campionamento estensivo, il campionamento intensivo viene condotto sia con un **campionamento sistematico**, per quantificare al meglio lo sforzo utile per stimare la *detection probability*, che **opportunistico**, per aumentare significativamente la quantità di dati. Per le informazioni generali sui due tipi di campionamento si rimanda al § 3.1.2. Grazie all'impiego di un adeguato sforzo di campionamento sistematico, e provvedendo accuratamente al suo monitoraggio, sarà possibile stimare la densità dei lupi per area (§ 3.3.). Ovviamente, tutti i dati raccolti saranno anche utilizzati per coadiuvare la stima dell'area di distribuzione a livello nazionale (§ 3.1.1).

La definizione delle tempistiche del campionamento sistematico con uscite programmate per la verifica di transetti e/o punti di marcatura è fondamentale per l'applicazione di modelli di SCR (Chandler e Royle 2013) e per la stima accurata della dimensione di popolazione e della densità (Latham *et al.* 2014). Infatti, in una stima della popolazione basata su modelli di cattura-ricattura (CR) per modellare adeguatamente l'eterogeneità individuale nella probabilità di ricattura sono richieste più sessioni di cattura e campioni di grandi dimensioni (Otis *et al.* 1978; Williams *et al.* 2002; Cubaynes *et al.* 2010). Quindi, **all'interno di ogni cella selezionata per il campionamento intensivo vengono predisposti transetti sistematici e/o punti di marcatura, con una rete più fitta rispetto al campionamento estensivo e da visitare più frequentemente (con 4-6 repliche in questo caso, quindi idealmente una al mese da ottobre a marzo)**. Questo disegno di studio, organizzato con repliche successive a breve termine, permette di stimare la densità locale della popolazione tramite applicazione di SCR per la quale è fondamentale raccogliere i segni di presenza indiretta su tutta l'area anche in maniera opportunistica (es. gli escrementi, le tracce, etc.) per ottenere aree concentriche con diversa densità di segni, che potrebbero anche risultare utili per ricavare delle correlazioni con indici di densità ottenuti nella Fase *a*, ossia su tutte le celle selezionate dell'estensivo. Campioni raccolti opportunisticamente nei periodi di campionamento intensivo tra ottobre e marzo possono anche essere inseriti e selezionati per le analisi genetiche. In conclusione, la raccolta deve essere fortemente standardizzata a scala nazionale, coordinata tra tutte le aree campione e le celle intensive, ed estesa in modo continuativo su due periodi, uno nei primi mesi invernali (da ottobre a dicembre), l'altro negli ultimi mesi invernali (da gennaio a marzo), per **un totale di 6 repliche nei mesi di ottobre (O), novembre (N), dicembre (D), gennaio (G), febbraio (F), marzo (M)**. I due campionamenti intensivo e estensivo sono così abbinati, con le 3 delle 6 repliche dell'intensivo che coincidono con le 3 preventivate nell'estensivo. Monitorando tutti i transetti con delle repliche da ottobre a marzo, si concentra così tutto il monitoraggio sistematico del lupo unicamente nel periodo invernale e si riesce quindi a stimare con un unico campionamento sistematico tutti i parametri che tengono conto di una contattabilità della specie inferiore a 1, per le quali l'analisi dello sforzo e la relativa raccolta dati è fondamentale (§ 3.3). L'abbinamento temporale dei due campionamenti consente anche un'ottimizzazione delle attività, considerando la parziale sovrapposizione spaziale del campionamento estensivo e di quello intensivo.

Quindi, le attività di campo del campionamento intensivo, da realizzare secondo i protocolli descritti nel Capitolo 6, sono:

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

- archiviazione di dati dei lupi morti rinvenuti e di categoria C2/C3 opportunistici (Capitolo 4);
- raccolta di escrementi ed altri campioni biologici, sia tramite l'attività sistematica che opportunistica sopra descritte, e selezione dei campioni su cui svolgere le analisi genetiche per l'identificazione individuale dei lupi e la loro ricattura nei 6 mesi di campionamento (Protocolli 6.8 e 6.9).

3.3 Monitoraggio dello sforzo di campionamento

In questa strategia di campionamento, basata su analisi e modelli di *occupancy* (MacKenzie *et al.* 2006) e modelli di cattura-ricattura spaziali (Royle *et al.* 2014) (§ 3.4.), diventa indispensabile realizzare un accurato monitoraggio dello sforzo di campionamento, con una raccolta del dato dello sforzo altamente pianificata, così come la registrazione del dato di "insuccesso" (i.e., nelle matrici di dati sono gli "zero" che equivalgono a un transetto percorso senza rilevamento di segni di presenza). In questo contesto, il dato di percorrenza di un transetto senza nessun segno raccolto è un dato fondamentale, così come la presenza di una fototrappola attiva in un dato giorno che non ha ripreso immagini di lupo. Questi dati, raccolti come dati "0", permettono la stima della probabilità di contatto (*detection probability*), che a sua volta permette di stimare la dimensione della popolazione e la distribuzione sulla base della probabilità di *occupancy*. Ne consegue la necessità che vi sia una forte presa di coscienza da parte di ogni operatore dell'importanza di registrare precisamente ogni uscita e posizionamento di fototrappola e gli eventuali dati "0", oltre che i segni rilevati durante questi eventi.

Quindi, sulla base dei transetti e delle celle della griglia da campionare, a loro volta selezionate sulla base della presunta presenza del lupo, è necessaria una valutazione e una quantificazione dello sforzo effettivamente applicato per cella della griglia e per transetto, e che questo sia monitorato nel tempo. Al fine di misurare lo sforzo (*effort*) totale applicato i tecnici e gli operatori in campo dovranno registrare ogni operazione di campionamento per ottenere:

1. il numero delle celle della griglia effettivamente campionate;
2. per cella: il numero e i km di transetti individuati ed effettivamente percorsi o il numero dei siti di posizionamento delle trappole fotografiche o dei punti di emissioni *wolf-howling* utilizzati, a seconda dell'approccio utilizzato;
3. il numero di sessioni di campionamento sistematico eseguite (bisogna considerare che le repliche nel tempo sono necessarie per valutare la contattabilità incompleta, tuttavia, se per qualche motivo una replica non viene eseguita, è importante registrarla);
4. per transetto: ossia l'effettiva percorrenza di ogni transetto previsto da parte dell'operatore incaricato, sia che questa abbia portato alla raccolta di qualche segno sia che non sia stato rilevato alcun dato (scheda nel Capitolo 7);
5. per trappola fotografica: registrare il giorno di inizio e fine della sessione di fototrappolaggio per ciascuna fototrappola posizionata, indicando eventuali giorni di malfunzionamento, e il numero di contatti (i.e., fotografie o video di lupo) (scheda nel Capitolo 7)

6. il numero di escrementi genotipizzati sul numero di escrementi analizzati e il numero di campioni analizzati rispetto a quelli rilevati sul territorio, questo può essere utile in futuro in fase di pianificazione per la valutazione più accurata dello sforzo necessario e i costi, sia per la raccolta dei campioni sia per le analisi genetiche.

Ovviamente la logistica e i finanziamenti disponibili sono il principale limite all'*effort* applicabile in un'indagine (*survey*), infatti bisogna considerare che l'aumento dell'*effort* incrementa considerevolmente la qualità di una *survey*, perché permette di avere una maggiore dimensione del campione e, quindi, l'aumento della probabilità di contatto della specie e la precisione delle stime (*i.e.*, diminuisce l'errore standard e l'intervallo di confidenza delle stime ottenute tramite CR e analisi di *occupancy*) (Marucco *et al.* 2009; 2011; 2012). In particolare, la misurazione di (1) è condotta a scala italiana nel §§ 3.1.1 e 3.2.1, ed è riferita al numero di celle della griglia dove la *survey* è stata effettuata, quindi ogni cella potrà essere 1 oppure 0 a seconda che sia stata monitorata con campionamento intensivo-estensivo o non sia stata affatto campionata, e il suo campionamento sarà monitorato nel tempo. In particolare, per il campionamento estensivo si incoraggia il campionamento di livello più alto, con un maggior numero di celle campionate nelle regioni del sud. Invece, (2) e (4) sono misurazioni in dettaglio dell'*effort* all'interno di ogni cella della griglia dove la *survey* è stata effettuata, mentre (4) è la misura dello sforzo realizzato per ogni transetto. L'importante è che ogni Ente e/o operatore del *Network Lupo* registrino non solo i dati raccolti, ma anche l'*effort* sostenuto per raccogliarli. Frequentemente, maggiore è lo sforzo di campionamento a parità di presenza, più grande sarà il campione ottenuto, e maggiore la precisione dei risultati, ma questo deve essere di volta in volta valutato da ogni Ente in base alle proprie possibilità logistiche ed economiche. **Si ribadisce come fondamentale comunque il monitoraggio dello sforzo di campionamento per cella, transetto e fototrappola da parte di ogni Ente partecipante al monitoraggio**, informazione utile per ottenere stime accurate della dimensione della popolazione e di distribuzione della specie. Specifiche schede sono predisposte per la raccolta dei dati relativi all'*effort* (Capitolo 7).

3.4 Analisi dei dati e modellizzazione

L'identificazione delle due fasi di campionamento è stata effettuata inquadrando la raccolta dei dati in un *double sampling framework* (Pollock *et al.* 2002; Nichols e Williams 2006; Thompson, 2012). Il *double sampling*, e più in particolare il campionamento a due fasi con campioni nidificati (*two-phase sampling*), è una tecnica potente ed efficace nella quale la prima fase fornisce un'informazione ausiliaria (x) relativamente facile da ottenere, mentre la seconda fase si focalizza sulla variabile (attributo) di effettivo interesse, rappresentata in questo caso dall'abbondanza (o meglio dalla densità) della specie.

Per quanto riguarda il lupo, la prima fase di raccolta dati (Fase α) implica la realizzazione di un campionamento estensivo finalizzato alla stima della distribuzione, basata a sua volta sulla stima dell'*occupancy* tramite modelli statistici (MacKenzie *et al.* 2006). In questi modelli, l'*occupancy* è definita come la probabilità che una cella nell'area di interesse sia occupata dalla specie ed è stimata con metodi basati su visite ripetute alle celle campione. L'unità di campionamento non è quindi qui un individuo, ma piuttosto un "sito" definito in base all'obiettivo di studio (qui appunto la cella 10x10 km). I modelli di *occupancy* consentono di stimare la probabilità di presenza di una specie tra i siti campionati, tenendo

conto della contattabilità (*detectability*) della specie ed esplorando contemporaneamente le ipotesi su fattori (ad es. habitat, condizioni ambientali, ecc.) che si ritiene influenzino la presenza della specie. In questi modelli, nei quali sarà anche tenuta in considerazione la stratificazione del campione, la stima della *detectability*, indispensabile per la stima finale dell'*occupancy*, è realizzata grazie alle visite ripetute (o repliche, di cui al § 3.1.2), e alla registrazione dello sforzo di campionamento (§ 3.3). I modelli di *occupancy* forniscono anche un metodo estremamente flessibile per chiarire le associazioni tra la presenza della specie e l'ambiente, associazioni che debbono essere necessariamente quantificate per l'extrapolazione dei risultati alle celle non campionate. Nello specifico, l'analisi quantitativa delle relazioni specie-ambiente avviene tramite l'inserimento di covariate ambientali nelle analisi di *occupancy* (ad esempio, la stima dell'*occupancy* e della *detectability* sono effettuate tramite analisi di regressione che prevedono variabili esplicative ambientali).

Nel campionamento a due fasi, l'informazione ausiliaria stimata con l'*occupancy* e correlata alla densità dei segni di presenza (Latham *et al.* 2014) raccolta nella Fase *a* può essere usata in modi diversi, per migliorare il processo di stima della variabile di interesse. L'approccio classico al campionamento a due fasi prevede ad esempio l'utilizzo di stimatori col metodo della regressione, sfruttando il fatto che la variabile ausiliaria è misurata a scala nazionale e quindi anche per le aree campione sottoposte a campionamento intensivo per la stima diretta di densità locale. Adottando questo approccio, in ogni caso l'obiettivo delle analisi dovrà essere quello di sfruttare la relazione che intercorre tra l'attributo di interesse (abbondanza/densità, misurata direttamente nelle aree di campionamento intensivo tramite la Fase *b*) e la variabile ausiliaria, misurata nel corso della prima fase (Fase *a*). L'integrazione in un unico modello dei dati di *occupancy* con quelli di abbondanza ottenuti nelle aree campione con metodi di cattura marcatura ricattura (Blanc *et al.* 2014; Miller *et al.* 2019) permetterebbe la stima finale dell'abbondanza della popolazione a scala italiana, sulla base dei dati raccolti nelle Fasi *a* e *b*. Affinché questo sia possibile, è però necessaria la pianificazione dettagliata di *survey* distribuite nel tempo all'interno dell'anno di campionamento (si vedano i §§ 3.1.2 e 3.2.2). Tale pianificazione permetterà la quantificazione della contattabilità sia in relazione all'*occupancy* (McKenzie *et al.* 2006), come già specificato, ma anche in relazione all'approccio di cattura-marcatura spaziale (SCR) (Royle *et al.* 2014), proposto per la stima della densità all'interno delle aree campione e per il quale il monitoraggio dell'*effort* nel tempo e nello spazio è comunque necessario per una più accurata stima dei parametri di interesse.

In alternativa a questo approccio, nel caso in cui la variabile ausiliaria non risulti stimabile, la stima dell'abbondanza potrà comunque essere realizzata grazie ai dati aggiornati ottenuti nelle 11 aree campione dell'Italia peninsulare e nelle celle di campionamento intensivo della zona Alpi, relativamente alla dimensione media dei territori minimi e numerosità dei branchi, applicando il metodo di Santini *et al.* (2015), o Erb *et al.* (2019), ed utilizzando la stima della distribuzione ottenuta con l'*occupancy* durante la Fase *a*. Per quanto riguarda la Fase *b*, occorrerà, per la valutazione del monitoraggio nazionale a lungo termine, valutare con attenzione il grado di rappresentatività delle aree campione selezionate rispetto al contesto nazionale, relativamente alla densità della specie, tenendo conto dei nuovi dati raccolti.

4 CRITERI STANDARD PER CLASSIFICARE E INTERPRETARE I DATI

4.1 Criteri per classificare i dati raccolti sulla presenza del lupo (criteri C1-C2-C3)

La maggior parte dei programmi di monitoraggio sui grandi carnivori in Europa (e.g. Kaczensky *et al.*, 2009; Molinari-Jobin *et al.*, 2012; Marucco *et al.*, 2014) utilizzano i criteri definiti “SCALP” per classificare la qualità dei dati raccolti sui grandi carnivori. Lo SCALP (Status and Conservation of the Alpine Lynx Population) è un’iniziativa di conservazione della lince sull’arco alpino (www.kora.ch), che per prima ha sviluppato dei criteri standardizzati per l’interpretazione dei dati di monitoraggio della lince. Questi criteri sono stati adattati anche per le altre specie di grandi carnivori, tra cui il lupo (Kaczensky *et al.*, 2009; Marucco *et al.*, 2014; WAG, 2018). Di seguito vengono ridefiniti questi criteri nelle categorie C1, C2 e C3, riadattati per essere utilizzati nel monitoraggio del lupo in Italia e già standardizzati fra i diversi Paesi dell’arco alpino ed Enti diversi. La lettera “C” corrisponde a “categoria”. I numeri 1, 2 e 3 non indicano la qualifica dell’osservatore, ma sono utilizzati per indicare il livello di verifica dell’osservazione intrinseco alla tipologia dell’osservazione stessa. La verifica nell’ambito di queste linee guida sarà fatta da “operatori qualificati” che dovranno aver superato il test previsto nel corso di formazione (Capitolo 5), e successivamente verificate dai coordinatori di zona individuati da ISPRA per la zona dell’Italia peninsulare e dal Centro di riferimento regionale Grandi Carnivori in Piemonte per la zona Alpi (Capitolo 5). In particolare:

C1: “Hard evidence” = evidenza certa, che senza ambiguità e con certezza conferma la presenza del lupo (cattura dell’animale vivo, ritrovamento di un lupo morto, prova genetica, localizzazione telemetrica, fotografia di alta qualità dove si vede con chiarezza l’intero animale ed è riconoscibile, ed è stato verificato con certezza il territorio dove l’animale è stato fotografato, questo anche per escludere fotografie false). Ogni dato deve essere archiviato e/o fotografato per potere essere rivalutato/riconfermato se necessario.

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

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

Escluse: osservazioni non considerate = ogni osservazione e segno di presenza verificato e non attribuito a lupo, per i quali quindi si può escludere che si tratti di lupo con certezza o con alta probabilità.

Falso: osservazioni false = osservazioni eliminate per le quali si è valutata la manomissione delle informazioni, ad esempio fotografie ritoccate o falsificate in quanto a luogo, periodo o specie.

I segni di presenza del lupo sono generalmente difficili da distinguere dai segni del cane. Questa distinzione diventa molto difficile quando sono presenti cani vaganti sul territorio, con comportamento selvatico, che possono produrre segni di presenza, quali tracce sulla neve ed escrementi, molto simili a quelli prodotti dal lupo. Inoltre la recente diffusione di cani fenotipicamente simili al lupo, quali ad esempio la razza di cane lupo cecoslovacco, rende la distinzione difficile non solo dai segni indiretti raccolti sul campo, ma anche dalle fotografie o video ripresi direttamente e da animali ritrovati morti o feriti. Quindi per qualificarsi come prove di presenza di categoria C1, le fotografie di lupo dovrebbero mostrare l'intero animale, comprese tutte le caratteristiche specifiche del lupo ed essere validate dall'operatore qualificato sulla base dei protocolli standard (Capitolo 7), ed archiviate in caso di successiva rivalutazione, altrimenti diventano prove di presenza di categoria C3. Tracce, escrementi e predazioni di lupo sono anche particolarmente facili da confondere con i corrispondenti segni lasciati da cani con simile comportamento e dimensione, è quindi fondamentale porre particolare attenzione nell'interpretarli e attribuirli al lupo. Per questo motivo è necessario un numero maggiore di osservazioni C2 per confermare la presenza del lupo in un'area rispetto ad esempio a quelli richiesti per documentare la presenza della lince o di un orso (Molinari *et al.*, 2012; Kaczensky *et al.*, 2009). Vengono di seguito dettagliati i criteri sulla base dei quali i segni di presenza raccolti sul lupo in Italia verranno definiti come C1, C2, e C3 (Tabella 1). In ogni caso, per ogni dato C1, C2, e C3 l'esatta localizzazione in coordinate geografiche e la data di raccolta devono essere specificate altrimenti il dato non è considerabile. Inoltre ogni singolo dato deve essere archiviato con una foto abbinata, in modo che una qualsiasi rivalutazione sia possibile nel tempo.

In Tabella 1 sono riassunti i criteri standard da adottare, alcuni più specificatamente dettagliati in seguito:

Categoria C1:

- Le Fotografie ed i video per essere considerati nella categoria C1, dopo valutazione di un operatore qualificato, devono essere di buona qualità, riprese a breve distanza dove sia possibile riconoscere tutte le caratteristiche fenotipiche tipiche del lupo e dove sia possibile riconoscere l'ambiente ed escludere con certezza la possibilità di una fotografia artefatta. Le fotografie da terzi devono essere verificate e archiviate secondo il protocollo descritto nel § 6.3. Ovviamente fotografie o video ricavati da foto trappole posizionate su base di un campionamento operato dal *Network Lupo* o nell'ambito di altri monitoraggi su grandi carnivori escludono quest'ultima casistica a priori. Le fotografie di "fenotipi anomali" non riconducibili al lupo devono essere comunque archiviate con tale dicitura, purché sia verificata la veridicità della fotografia e del luogo, ed esclusi falsi. Qualsiasi campione raccolto su cui viene effettuata un'analisi genetica che verifica l'appartenenza alla specie lupo viene automaticamente considerato un dato C1.
- Segni di presenza certificati indirettamente da evidenza di DNA: ad esempio se la traccia di lupo seguita viene confermata dalla raccolta di un escremento/pelo/urina lungo la traccia per il quale l'analisi genetica conferma l'attribuzione al lupo; automaticamente tutti i segni di presenza correlati con certezza a quello provato, in questo caso la traccia di lupo, sono considerati anch'essi in C1.

Categoria C2:

- L'ululato dei lupi diventa riconoscibile con buona probabilità quando è rilevata la presenza dei cuccioli, oppure quando è indotto in modo programmato tramite sessione di *wolf-howling* (Cap. 6); richiede tuttavia sempre la valutazione di un operatore qualificato.

Categoria C1		Categoria C2		Categoria C3	
Segno presenza	Caratteristiche e Documentazione necessaria	Segno presenza	Caratteristiche e Documentazione necessaria	Segno presenza	Caratteristiche e Documentazione necessaria
Animali catturati o recuperati vivi	Test genetici standardizzati e/o valutazione da operatore qualificato/ rivalutabile per le fotografie	Tracce sulla neve	Tracce con tipico comportamento documentate da operatore qualificato per almeno 500 m	Tracce	Se seguite < 500 m
Animali morti		Escrementi	Se raccolti lungo una traccia C2 e/o valutazione operatore qualificato	Singole impronte	
Localizzazioni radiocollare		Peli		Escrementi non valutati da operatore qualificato e non fotografati o recuperati	
Fotografie e video di buona qualità				Peli	
Qualsiasi evidenza di DNA conferma il campione biologico (i.e. escrementi, peli, urine, saliva).				Avvistamenti	Non corredati da materiale fotografico o video
Segni di presenza certificati indirettamente da evidenza di DNA (e.g. tracce su neve, predazioni)		Ululati	Come risposta ad una sessione di <i>wolf-howling</i> , e/o se con presenza dei cuccioli, e/o con valutazione di un operatore qualificato	Predazione di selvatico o domestico senza conferma genetica	
				Ululati singoli e casuali	
				Documentazione inadeguata fornita da terzi e Informazioni non più verificabili	

Tabella 1. Segni di presenza del lupo e loro valutazione sulla base della documentazione presente e delle caratteristiche dei dati raccolti e documentati (da Kaczensky et al. 2009, Marucco et al. 2014).

4.2 Criteri per l'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti

Il coordinamento e la definizione dei criteri per l'interpretazione dei dati raccolti sono fondamentali per integrare i risultati su scala italiana e creare degli output comuni. In quest'ottica è necessaria la definizione dei criteri comuni per l'individuazione sia di un branco sia di una coppia di lupi (Tabella 2), sulla base dei dati raccolti:

- **Branco:** un gruppo di più di due lupi documentati muoversi insieme in un territorio stabile tramite dati C1 e C2. In particolare per documentare la presenza del branco è necessario un minimo di una fotografia di branco C1 (in cui appaiono un numero di lupi > 2), oppure di due tracce di branco (> 2 lupi) di categoria C2 documentate in modo indipendente, ed almeno due dati C1 (analisi genetica di un escremento lungo una traccia di più di due animali, fotografia o video di branco). Per definire la dimensione minima del branco sono necessari dati C1 (massimo numero di genotipi individuati, massimo numero di lupi presenti contemporaneamente in un video/fotografia), oppure una traccia su neve con il numero massimo di lupi seguiti in contemporanea, di categoria C2. La riproduzione è documentata tramite un dato C1 che evidenzia la presenza dei cuccioli, oppure tramite *wolf-howling* che abbia confermato la presenza della cucciolata preferibilmente registrato (quindi due dati di *wolf-howling* C2 che evidenzino la presenza dei cuccioli, oppure un dato di *wolf-howling* C2 registrato).

- **Coppia stabile:** coppia di due lupi di sesso opposto documentati muoversi insieme in un territorio stabile tramite dati C1 e C2. In particolare è necessario un minimo di due tracce della coppia rilevate insieme, di categoria C2, documentate in modo indipendente, ed almeno due dati C1 che documentino la presenza di due lupi di sesso opposto che si muovono insieme (analisi genetiche su due escrementi lungo una traccia di due animali, fotografia o video della coppia). Per segni C2 "indipendenti" si intende segni indiretti raccolti spazialmente e temporalmente in modo indipendente. Ad esempio 4 escrementi raccolti tutti nello stesso punto ed allo stesso momento non sono indipendenti.

Anche per la stima della **distribuzione** è necessaria la definizione di criteri comuni che permettano l'unificazione dei risultati e la comune interpretazione dei dati. In particolare per la valutazione 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 3 segni di presenza C2 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 quando possibile. Sulle Alpi (WAG, 2018) tale territorio è simbolicamente rappresentato da un cerchio di 200 km² centrato nel punto di più alta frequenza di dati C1 e C2 raccolti per quel branco/coppia/individuo. La dimensione indicativa del cerchio per l'areale dell'Italia peninsulare, puramente indicativa, sarà definita in seguito ad analisi dei dati pregressi disponibili.

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

Tabella 2. Criteri standard per l'interpretazione dei dati (da Kaczensky et al. 2009, Marucco et al. 2014).

5 COORDINAMENTO DEL LAVORO PER IL MONITORAGGIO DEL LUPO IN ITALIA

La produzione di linee guida per il monitoraggio della distribuzione e consistenza della popolazione di lupo a livello nazionale rientra tra i compiti di ISPRA, in ragione del mandato istituzionale e dell'incarico ricevuto dal MATTM attraverso una convenzione specifica.

ISPRA avrà pertanto un ruolo di coordinamento e di responsabilità decisionale in tutte le fasi di attuazione del piano di lavoro necessario all'ottenimento di una stima aggiornata, adottando in tutti gli ambiti opportuni un approccio di condivisione/consultazione con gli Enti territorialmente competenti al fine di ottimizzare le risorse disponibili ed ottenere i dati necessari evitando duplicazioni di sforzi e inutili sovrastrutture.

Le istituzioni che hanno la responsabilità del monitoraggio della specie sono invece le Regioni, le Province Autonome e i Parchi Nazionali, ai sensi dell'art. 7 del DPR 357/97 di applicazione della Direttiva Habitat. Alcuni di questi spesso delegano altri enti, con i quali si coordinano opportunamente.

All'attuazione del piano di lavoro concorrono molti altri soggetti, di diversa natura (pubblici e privati), che nello svolgimento delle loro attività istituzionali sono a diverso titolo coinvolti nella raccolta e gestione di dati utili per una analisi integrata e strutturata che possa fornire una immagine coerente e contemporanea della presenza del lupo sull'intero territorio nazionale.

In considerazione della molteplicità di approcci e la frammentazione amministrativa che ha caratterizzato le molte iniziative svolte in passato (Capitolo 2 e Appendice 1) è ora necessario compiere uno sforzo particolare per rendere omogenei gli approcci e realizzare in simultanea la prima *survey* coordinata della presenza del lupo in Italia, da considerarsi come punto di partenza per un piano di monitoraggio a lungo termine. Il contributo che viene chiesto a tutti gli Enti che hanno operato in passato per il monitoraggio del lupo, insieme ai nuovi che manifesteranno interesse a contribuire, è quello di seguire fedelmente il piano di lavoro, forse meno specifico di molti progetti di ricerca locali, ma sicuramente applicabile su grande scala. **L'importante novità consiste, non nel singolo protocollo proposto per la raccolta dei dati, probabilmente in parte già in uso a scala locale, ma nella sua applicazione contemporanea a scala nazionale, con l'obiettivo di ottenere un'unica stima di distribuzione e consistenza a livello di popolazione.**

Nello svolgimento di alcune fasi previste dalla convenzione con il MATTM, ISPRA si avvale della collaborazione e del supporto di Federparchi, attraverso una convenzione specifica. Per l'ambito alpino, considerata la presenza del progetto LIFE WolfAlps EU, ISPRA ha stipulato opportuna convenzione con il beneficiario coordinatore (Centro Grandi Carnivori, CGC, presso il Parco Naturale delle Alpi Marittime) al fine di integrare le attività svolte e garantire un coordinamento a livello nazionale.

Si individuano pertanto una serie di Enti che nell'attuazione del piano di lavoro hanno ruoli definiti, descritti nel paragrafo 5.1. L'organizzazione del lavoro per l'area Appenninica e l'area Alpina verrà descritta nei paragrafi 5.2 e 5.3.

Si ricorda, infine, che le presenti linee guida hanno un carattere sperimentale, essendo il primo esempio di monitoraggio nazionale svolto simultaneamente in tutte le regioni in cui si è rilevata la presenza del lupo. La validità verrà confermata attraverso la valutazione della fattibilità del piano di lavoro (§ 5.5), che verrà effettuata alla fine del percorso, utilizzando una serie di indicatori (Tabella 3), e integrando i risultati al fine di produrre le linee guida per il monitoraggio nazionale del lupo a lungo termine.

5.1 Enti interessati dal monitoraggio della specie

Le Amministrazioni che hanno per mandato istituzionale la conduzione del monitoraggio della specie sono le Regioni, le Province Autonome e le Aree Protette Nazionali, che quindi saranno direttamente coinvolte nell'implementazione del piano di lavoro e nella valutazione delle linee guida. Anche altre istituzioni pubbliche hanno competenze collegate al monitoraggio della specie e saranno coinvolte direttamente nella diffusione delle linee guida e nell'applicazione del monitoraggio nazionale, inclusa la formazione (§ 5.4). Ci sono inoltre associazioni private senza scopo di lucro il cui statuto include la conservazione delle specie e degli habitat naturali che spesso hanno la capacità di fornire contributi significativi alla raccolta di dati utili. Le istituzioni coinvolte sono quindi:

- le Aree protette nazionali
- Regioni e Province Autonome
- Aree Protette Regionali
- Enti delegati dalle Regioni: es. enti gestori delle aree Natura 2000, Province e Città Metropolitane, Comprensori Alpini, ATC, Agenzie Regionali e Provinciali per l'Ambiente (ARPA, APPA)
- Comando Unità Forestali, Ambientali e Agroalimentari dell'Arma dei Carabinieri (CUFAA)
- Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS)
- ASL
- Istituti Universitari
- Laboratori di genetica
- Associazioni private senza scopo di lucro (ONG)

Ciascuno di questi soggetti potrà contribuire anche in modo significativo all'attuazione del piano di lavoro previsto, e fornire un contributo alla valutazione della validità delle linee guida proposte. Se dal punto di vista tecnico-scientifico la sfida è stata quella di definire un disegno di studio unitario, con campionamento (§§ 3.1.2, 3.2.2) finalizzato a raccogliere dati rappresentativi per la stima dei parametri di interesse (distribuzione, consistenza/densità), dal punto di vista operativo la grande sfida è quella di coordinare centinaia di operatori che sul campo raccolgono i dati e assicurarsi che questi ultimi siano in formato utile per le analisi statistiche proposte. La selezione delle aree in cui effettuare i rilievi è cruciale ed **è pertanto necessario attenersi al disegno campionario** (descritto nei §§ 3.1.2, 3.2.2) sviluppato su base probabilistica. È inoltre fondamentale, per la corretta analisi dei dati, **la continua quantificazione dello sforzo di campionamento (*effort*)** che richiede un lavoro accurato da parte di tutti gli operatori (§ 3.3). **Le scelte effettuate e le indicazioni fornite in relazione alla distribuzione spaziale e temporale dello sforzo non possono pertanto essere modificate.**

Su una serie di altri aspetti, invece, sarà possibile apportare aggiustamenti, e per questo, durante l'attuazione del programma di lavoro per la stagione 2020-2021, si assicurerà un processo consultivo, attraverso le seguenti azioni:

- condivisione della selezione dei referenti regionali, provinciali e delle Aree Protette che abbiano funzione di referenti degli Enti per un dialogo continuo con il gruppo di lavoro ISPRA, per un continuo aggiornamento e per la risoluzione di problematiche locali (§§ 5.2 e 5.3);
- dialogo costante con i gruppi di ricerca e monitoraggio presenti a scala locale, per adattare al meglio gli approcci proposti;
- considerazione dei protocolli già applicati e in uso a scala locale, avendo cura di ridurre il più possibile le modifiche da apportare al fine di applicare quanto proposto (anche attraverso incontri presso gli enti o le amministrazioni), valorizzando, quanto più possibile, l'esperienza locale;
- raccolta dei commenti e indicazioni sull'applicazione pratica del protocollo di raccolta dati, sulla sua valutazione e sull'applicazione a lungo termine delle linee guida.

5.1 Organizzazione del lavoro per le regioni dell'Italia peninsulare

Quindi, l'organizzazione del lavoro per l'Italia peninsulare ha l'obiettivo non solo di raccogliere dati di presenza della specie, ma anche e soprattutto di valutare la fattibilità del piano di lavoro coordinato a lungo termine. L'organizzazione del lavoro viene rappresentata dal diagramma in Figura 13, ed illustrata di seguito.

Lo svolgimento delle attività di raccolta dati per l'Italia peninsulare sarà coordinato da **ISPRA** in collaborazione con **Federparchi** e richiede un ruolo fondamentale di partecipazione delle Regioni, Province, Aree Protette Nazionali e Regionali, CUFAA, IZS, ASL, Università, e Associazioni. Il coordinamento da parte di ISPRA avverrà tramite il supporto tecnico di un gruppo di lavoro istituito *ad hoc* (Dr.ssa Paola Aragno, Dr.ssa Valentina La Morgia, Dr. Romolo Caniglia, Dr.ssa Francesca Marucco e Dr.ssa Valeria Salvatori), che ha sviluppato le presenti linee guida e il piano di lavoro per il 2020-2021. Nell'ambito della convenzione tra ISPRA e Federparchi è stata inoltre costituita una squadra di **20 tecnici**, individuati sulla base dell'esperienza e della conoscenza dei diversi contesti territoriali. Questi ultimi garantiscono il coordinamento tecnico a livello territoriale della rete di operatori per la raccolta dei dati a supporto degli Enti coinvolti.

Viene richiesto **agli Enti** territorialmente competenti di fornire **un nominativo di referenza** per le attività da svolgere nel territorio di competenza. Tale persona dovrà avere competenze tecniche attinenti e si coordinerà con la dirigenza degli uffici di competenza nel proprio Ente.

CUFAA fornisce anche un referente per ogni regione e area protetta nazionale e contribuisce alla raccolta dei dati con il personale presente nelle aree da sottoporre a campionamento.

Le **Province e le Aree Protette Regionali** sono coordinate direttamente dalla Regione di riferimento, in collaborazione con i tecnici incaricati. Se la Regione ritiene che la loro partecipazione diretta sia necessaria, anche queste dovranno fornire il nominativo di referenza.

È previsto anche il coinvolgimento di **Associazioni** che diano disponibilità a collaborare al monitoraggio in forma volontaria. Eventuali singoli volontari aggiuntivi, opportunamente formati (§ 5.4), andranno indicati dall'Amministrazione territorialmente competente. Anche le Associazioni interessate a partecipare al monitoraggio nazionale andranno indicate dall'Amministrazione territorialmente

competente, che dovrà identificare un **referente dell'Associazione** che opererà sotto il coordinamento del referente della medesima Amministrazione competente.

Gli **Istituti Universitari o centri di ricerca** che intenderanno collaborare individueranno un referente che si coordinerà con l'Amministrazione territorialmente competente con cui eventualmente già collaborano e/o con ISPRA.

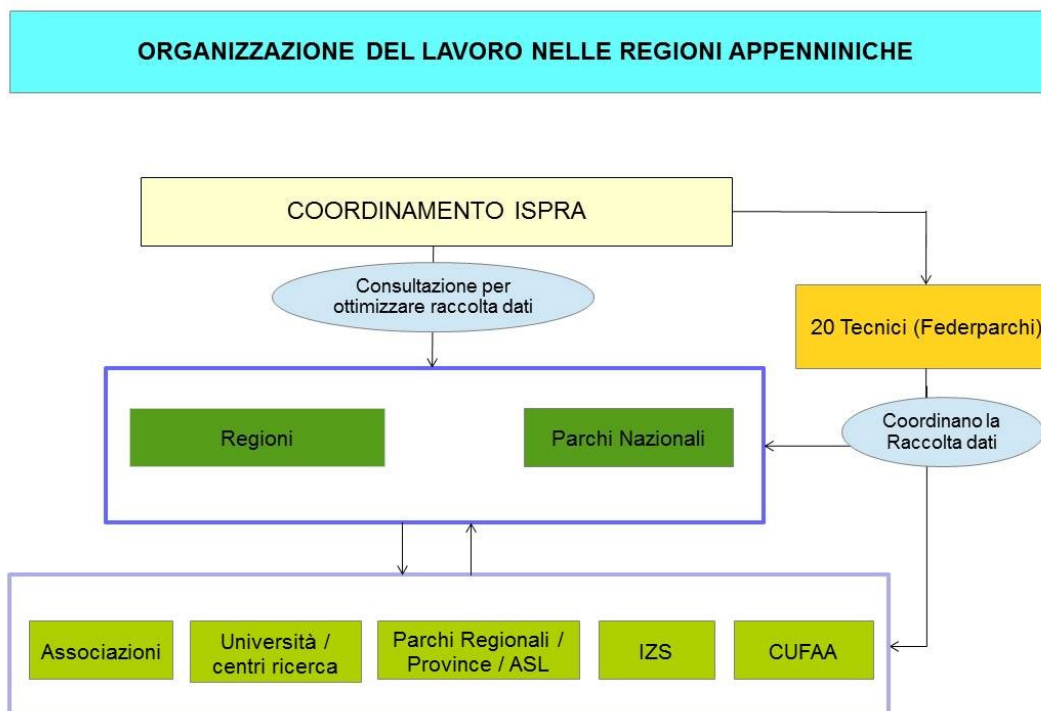


Figura 13. Diagramma rappresentativo dei rapporti di coordinamento e flusso di informazioni per lo svolgimento del piano di lavoro per l'indagine del 2020-2021. Nel quadrato blu sono inseriti gli Enti territorialmente competenti, che avranno un rapporto diretto con ISPRA per il coordinamento, con i tecnici incaricati da Federparchi per la raccolta dei dati e con gli altri Enti a vario titolo coinvolti e che operano sul loro territorio.

5.3 Organizzazione del lavoro per le regioni alpine

Al fine di ottimizzare l'impiego di risorse assicurando al contempo la più efficace sinergia con le attività di monitoraggio già previste per l'area alpina, **il coordinamento del monitoraggio sarà assicurato dal Centro di riferimento Regionale Grandi Carnivori (CGC) nell'ambito del nuovo LIFE WolfAlps EU (2019-2024), in stretta collaborazione con ISPRA.** Il CGC, istituito dalla Regione Piemonte presso l'Ente di Gestione delle Aree Protette delle Alpi Marittime, coordinerà l'impostazione per una raccolta dati univoca e centralizzata, **che rimane a capo di ogni Regione e Provincia Autonoma**, anche in coordinamento con il monitoraggio dell'Italia peninsulare, per arrivare alla stima della distribuzione e consistenza di lupo **a scala italiana coordinata da ISPRA.** Gli obiettivi e la strategia di campionamento nazionale saranno gli stessi su entrambe le zone (§ 1.2). Le differenze di applicazione sono dettagliate nel Capitolo 3.

Lo sforzo per migliorare la frammentazione gestionale non sarà scontato neanche per le Regioni della zona Alpi, in quanto alcune aree non erano state incluse nel precedente Progetto LIFE WolfAlps, come ad

esempio la Regione Liguria, o alcune province. Quindi si dovrà estendere il piano di lavoro a queste nuove aree non indagate nel precedente LIFE, impegno previsto nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU. Inoltre, sempre nell'ambito del LIFE WolfAlps EU, verranno coinvolte nel piano nazionale di monitoraggio le Regioni e Province Autonome che pur non essendo partner del progetto europeo, da sempre collaborano al monitoraggio alpino anche con convenzioni specifiche con il CGC. Il Progetto LIFE WolfAlps EU, oltre al partenariato, ha sviluppato una rete di 101 Enti supporters alpini implicati ufficialmente nella rete di monitoraggio. Infine, considerando gli innumerevoli branchi transfrontalieri condivisi con le Nazioni confinanti, è anche previsto un approccio internazionale per la condivisione e per il coordinamento della strategia di monitoraggio transalpina. Occorre evidenziare quindi che il percorso che si intende avviare con questo documento non sarà certamente privo di difficoltà neanche per le regioni alpine e richiederà un elevato sforzo di coordinamento generale per rendere efficiente la raccolta di dati in contemporanea in aree anche spazialmente molto lontane e con caratteristiche ecologiche diverse.

L'attuazione del monitoraggio per l'anno 2020-2021 richiede quindi un ruolo fondamentale di partecipazione delle **Regioni, Province, Aree Protette Nazionali e Regionali, CUFAA, IZS, ASL, Università, e Associazioni**. Il CGC, nell'ambito del LIFE WolfAlps EU, garantirà il coordinamento grazie al supporto tecnico di un gruppo di lavoro ISPRA istituito *ad hoc* (Dr.ssa Paola Aragno, Dr.ssa Valentina La Morgia, Dr. Romolo Caniglia, Dr.ssa Francesca Marucco e Dr.ssa Valeria Salvatori), che ha sviluppato le presenti linee guida e il piano di lavoro per il 2020-2021 (Figura 14).

Viene richiesto **agli Enti** territorialmente competenti di fornire **un nominativo di referenza** per le attività da svolgere nel territorio di competenza. Tale persona dovrà avere competenze tecniche attinenti e si coordinerà con la dirigenza degli uffici di competenza nel proprio Ente.

CUFAA fornisce anche un referente per ogni regione e area protetta nazionale e contribuisce alla raccolta dei dati con il personale presente nelle aree da sottoporre a campionamento.

Le **Province e le Aree Protette Regionali** sono coordinate direttamente dalla Regione di riferimento, in collaborazione con i tecnici incaricati. Se la Regione ritiene che la loro partecipazione diretta sia necessaria, anche queste dovranno fornire il nominativo di referenza.

È previsto anche il coinvolgimento di **Associazioni** che diano disponibilità a collaborare al monitoraggio in forma volontaria. Eventuali singoli volontari aggiuntivi, opportunamente formati (§ 5.4), andranno indicati dall'Amministrazione territorialmente competente. Anche le Associazioni interessate a partecipare al monitoraggio nazionale andranno indicate dall'Amministrazione territorialmente competente, che dovrà identificare un **referente dell'Associazione** che opererà sotto il coordinamento del referente della medesima Amministrazione competente.

Gli **Istituti Universitari o centri di ricerca** che intenderanno collaborare individueranno un referente che si coordinerà con l'Amministrazione territorialmente competente con cui eventualmente già collaborano e/o con ISPRA.

L'organizzazione del lavoro viene quindi rappresentata dal diagramma in Figura 14. Nell'ambito di ciascuna regione alpina i dati saranno centralizzati presso le Regioni e Province autonome, ed infine uniti e archiviati presso il CGC, che garantirà la valutazione totale della distribuzione/consistenza per le Regioni della zona Alpi in coordinamento con ISPRA, nell'ambito del monitoraggio nazionale, a beneficio di tutte le Regioni.

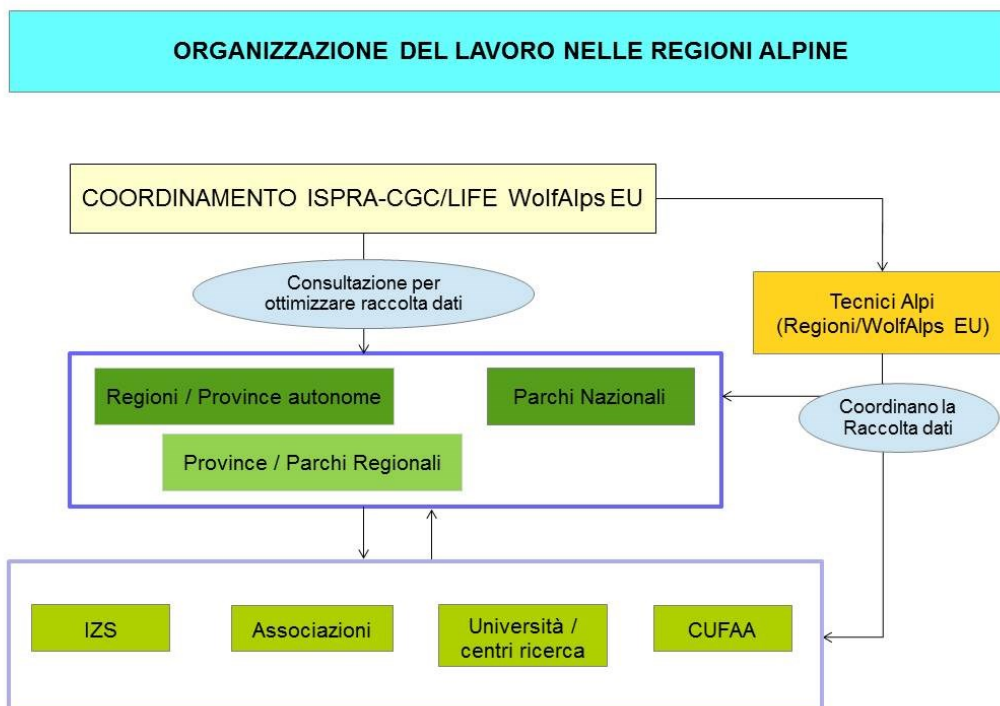


Figura 14. Diagramma rappresentativo dei rapporti di coordinamento e flusso di informazioni per lo svolgimento del piano di lavoro per l'indagine del 2020-2021. Nel quadrato blu sono inseriti gli Enti territorialmente competenti, che avranno un rapporto diretto con ISPRA ed il CGC per il coordinamento, e con gli altri Enti a vario titolo coinvolti per la raccolta dei dati.

5.4 La formazione del Network di operatori per una raccolta standardizzata dei dati

Al fine di perseguire l'obiettivo di standardizzazione degli approcci, garantendo coerenza alla strategia di raccolta dei dati e ai protocolli e metodi di campionamento proposti nelle presenti linee guida, verrà programmata da ISPRA e dal CGC, nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU, una formazione specifica rivolta agli operatori coinvolti nel monitoraggio della specie, rispettivamente per la zona dell'Italia peninsulare e per la zona Alpina. Si andrà così a creare un *Network Lupo*, ossia una rete di operatori afferenti ai diversi Enti coinvolti, specificatamente preparati per il monitoraggio nazionale della specie e distribuiti su tutto il territorio italiano, che rappresenta un elemento fondante e di grande rilevanza del progetto. Nello specifico, la formazione sarà dedicata al personale di Aree Protette, Regioni e Province, Città Metropolitane, Carabinieri Forestali, Università, ed anche ai volontari e operatori del mondo associazionistico interessati. La formazione riguarderà tutti gli aspetti trattati nelle presenti linee guida e i protocolli di monitoraggio.

5.4.1 Corsi di Formazione

Sono previsti sia corsi in modalità *e-learning*, realizzati in collaborazione con il Centro Nazionale Educazione, Formazione e Reti Bibliotecarie e Museali per l'Ambiente di ISPRA (CN-EDU), sia corsi frontali,

coordinati a scala nazionale. Tutti gli operatori del *Network Lupo* saranno incentivati a seguire la formazione in e-learning. Per la finalità della prima indagine sarà data priorità ai referenti degli Enti e secondo una distribuzione omogenea sul territorio nazionale. Gli operatori formati potranno quindi operare come moltiplicatori della formazione.

Per la zona dell'Italia peninsulare ISPRA assicura la supervisione della formazione e coordina la realizzazione di incontri formativi frontali (o in modalità remota, tipo webinar) per l'implementazione del monitoraggio, che verranno organizzati da Federparchi tra settembre e ottobre 2020 presso 3 Aree Protette: uno per le regioni meridionali (Calabria, Puglia, Basilicata, Campania), uno per le regioni centrali (Molise, Abruzzo, Lazio) e uno per le regioni settentrionali (Umbria, Marche, Toscana, Emilia-Romagna). La struttura del corso prevede una parte "introduttiva", in cui verranno affrontati i concetti generali; una parte "tecnica" relativa alle tecniche di campo per il monitoraggio; e una "applicativa", che avrà la funzione chiave di entrare nel merito della specifica strategia di raccolta dati a livello nazionale e diffonderla, al fine di renderla applicativa. L'obiettivo della formazione è sia formare operatori totalmente inesperti, sia portare avanti un processo di standardizzazione delle metodologie e un coordinamento nazionale, che deve quindi coinvolgere anche gli operatori già competenti. Durante i corsi verrà anche presentata la logica della raccolta dati, che dovrà necessariamente essere supportata da un coordinamento generale e dai tecnici incaricati come descritto al § 5.2. Inoltre sarà cura dei 20 tecnici incaricati occuparsi in dettaglio della formazione della rete locale, anche realizzando incontri *ad hoc*.

Per la zona Alpi verranno organizzati almeno 8 corsi di formazione/workshops nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU, in coordinamento con ISPRA, dove verrà presentato il sistema di campionamento e il coordinamento a scala di regioni alpine. I corsi saranno rivolti ai guardaparco, agli agenti delle Amministrazioni Provinciali ed al personale del CUFAA, insieme al personale dei Comprensori Alpini, volontari, operatori di associazioni, cacciatori, veterinari delle ASL, etc. Verranno illustrati gli obiettivi ed i protocolli di monitoraggio, insieme ai risultati del precedente progetto LIFE WolfAlps, in modo che tutti gli operatori sul territorio, adeguatamente informati, possano essere a loro volta portatori di una corretta informazione e potenzialmente raccoglitori di tutte le informazioni utili al monitoraggio del lupo. La raccolta di tutti i dati dovrà necessariamente essere supportata da un coordinamento generale descritto anche attraverso i corsi di formazione/workshops, come descritto al § 5.3.

5.4.2 L'Applicazione per la raccolta dei dati e il flusso dei dati a scala nazionale

In collaborazione tra ISPRA, Federparchi, il Progetto LIFE WolfAlps EU/CGC e la piattaforma lupo Grosseto¹, verrà realizzata una applicazione (APP), intesa come supporto alla raccolta dei dati di campo. La trasmissione dei dati raccolti sul campo privilegerà l'uso dell'APP, ma non verrà escluso l'uso di altri metodi, anche se scoraggiati, come ad esempio le schede cartacee (Capitolo 7) o altro. Le istruzioni per l'uso dell'APP verranno illustrate nel dettaglio durante i corsi di formazione e workshop già descritti nel § 5.4.1. Tutti i dati confluiranno in un database nazionale che sarà gestito da ISPRA e che potrà essere consultato da tutti gli Enti che avranno aderito al programma di lavoro. Per le regioni alpine nell'ambito del LIFE WolfAlps

1

https://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/carnivores/regional_platforms_Italy.htm

EU, la gestione dati avverrà prima tramite un database comune coordinato dal CGC con dati già elaborati dalle Regioni, che poi confluirà nel database nazionale ISPRA.

Nella Figura 15 viene rappresentato il flusso di dati, con coordinamento e supervisione ISPRA. Durante i corsi di formazione sarà illustrata in dettaglio l'organizzazione a scala regionale o provinciale della raccolta schede, dati, e campioni, con delle differenze tra la zona dell'Italia peninsulare e della zona delle regioni alpine.

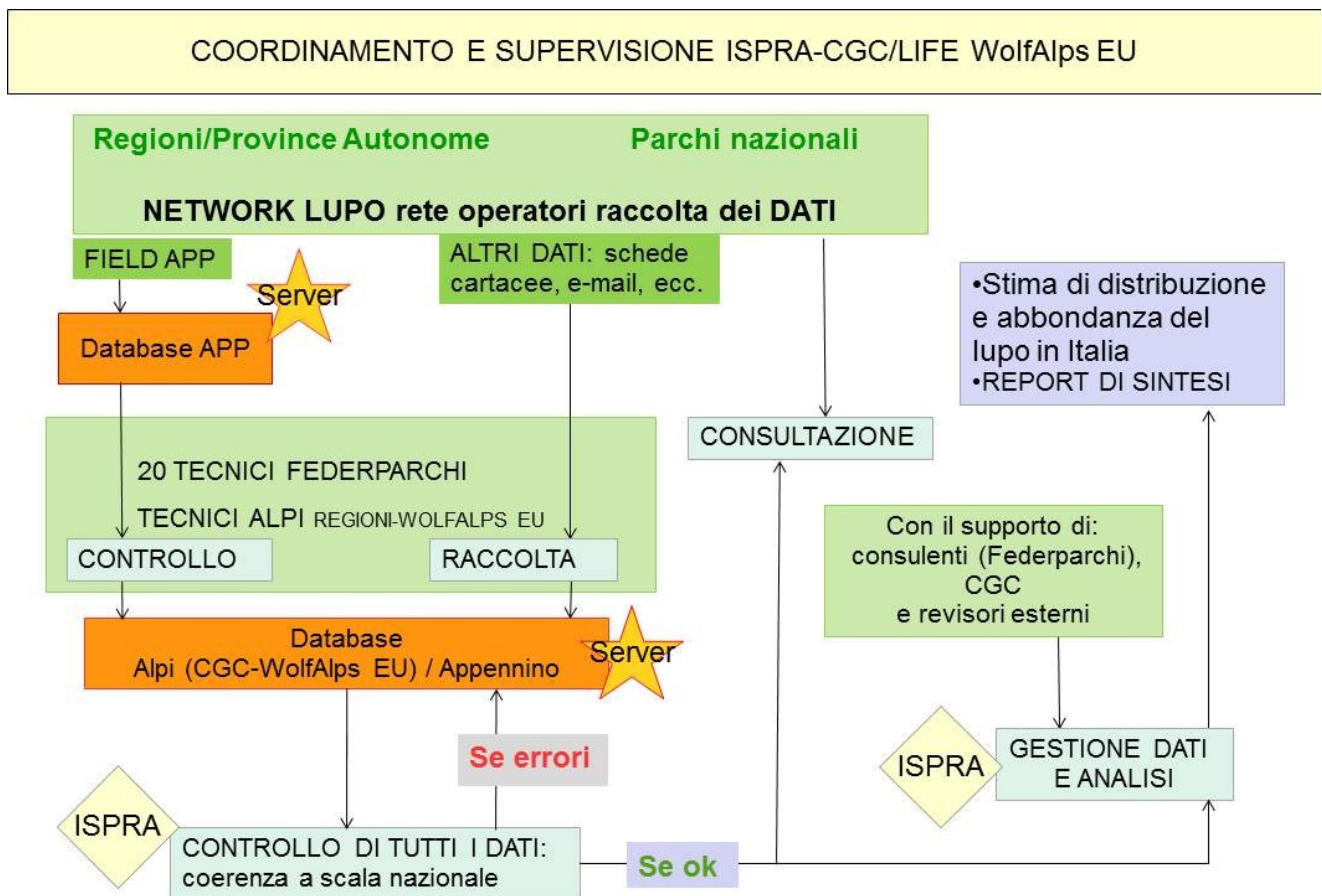


Figura 15. Diagramma del flusso dei dati

I dati raccolti sul campo verranno archiviati automaticamente in un Database attraverso l'APP, mentre quelli provenienti attraverso altre forme (es. schede cartacee) saranno inseriti dai tecnici di riferimento per l'area considerata.

Per le regioni dell'Italia peninsulare, il controllo dei dati viene eseguito dai 20 tecnici incaricati da Federparchi, in costante contatto con i referenti delle Regioni e delle Aree Protette per i territori di competenza e ISPRA. I dati confluiranno quindi nei database regionali, saranno sottoposti ad un ulteriore controllo di coerenza a scala interregionale, sotto la supervisione di ISPRA, e saranno quindi accorpati nel database nazionale. I dati necessari per le analisi statistiche, tese alla elaborazione di una stima della distribuzione e consistenza della popolazione a scala nazionale, saranno preparati da un tecnico specificamente incaricato da Federparchi, e che opererà sotto la diretta responsabilità di ISPRA.

Per le Regioni Alpine, nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU, la singola Regione/Provincia autonoma gestisce il controllo dei dati per il territorio di competenza con i propri tecnici, incaricati o meno nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps EU. I dati confluiranno poi nei database regionali, subiranno una prima elaborazione sempre a carico dei tecnici regionali e/o incaricati nell'ambito del LIFE WolfAlps EU, per poi confluire nel database delle regioni alpine gestito dal CGC che si occuperà dell'accorpamento per l'analisi finale dei dati.

Le analisi dei dati verranno svolte dal gruppo di lavoro ISPRA e il CGC per la porzione Alpina, con il supporto esterno di un biostatistico opportunamente incaricato da Federparchi, e ci si avvarrà della collaborazione volontaria di alcuni esperti che hanno già fornito un contributo rivedendo alcune parti del presente documento.

5.5 Valutazione della funzionalità del piano di lavoro e della fattibilità di estensione a lungo termine

Al fine di valutare la funzionalità del piano di lavoro proposto per una sua prosecuzione a lungo termine, è opportuno valutare ex post alcuni indicatori chiave delle diverse funzioni. Questa valutazione è utile nella prospettiva di una continuazione negli anni a venire di una raccolta di dati che permetta il monitoraggio degli attributi sottoposti ad indagine: distribuzione e consistenza della popolazione. I diversi Enti che aderiscono al piano di lavoro saranno invitati a fornire dei commenti di valutazione e spunti che possano migliorare quanto proposto. Per la valutazione della funzionalità del piano di lavoro si individuano i seguenti indicatori (Tabella 3):

Attività	Indicatore	Misura da rilevare
Coordinamento	- Disponibilità degli Enti a partecipare - Distribuzione degli Enti sul territorio nazionale - Presenza dei referenti per ciascun Ente	N di Enti che collaborano N di Enti per Regione N Referenti/N Enti
Creazione del Network Lupo	-Numerosità della Rete -Distribuzione sul territorio nazionale -Operatori sul campo	N operatori totale N operatori regione/N totale N operatori in campo/N totale
Formazione	- Accessibilità ai corsi - Capacità tecniche sufficienti per il numero di persone	- N persone iscritte - Capacità piattaforma (numero massimo di persone che possono accedere rispetto al numero di richieste)

Attività	Indicatore	Misura da rilevare
Sviluppo APP	- Utilità nel creare il DataBase	- % dati raccolti con APP utilizzabile per analisi
Raccolta dati	- Capacità del <i>Network Lupo</i> - Sforzo compatibile con risorse disponibili	- N dati raccolti nei tempi prestabiliti - % celle coperte
Consultazione DB	- Accessibilità DB - Facilità di uso del DB	- N richieste chiarimenti per accedere ai dati da parte di esterni

Tabella 3. Lista degli indicatori da rilevare per la valutazione dell'applicabilità del piano di lavoro e validità delle linee guida a lungo termine.

6 PROTOCOLLI

Il monitoraggio della presenza del lupo si effettua attraverso l'applicazione integrata di diversi protocolli di campionamento, definiti sulla base di obiettivi e disegni di campionamento (vedi Capitoli 1 e 3).

I metodi di campionamento si dicono **invasivi** se implicano la cattura fisica dell'animale. La cattura di un lupo è un'attività molto delicata e complessa, indispensabile per munire l'individuo di radio-collare, seguirlo nei suoi movimenti e studiarne l'ecologia. La tecnica è considerata intrusiva ed è criticata per il potenziale disturbo esercitato sui lupi oggetto di studio. Si prevede quindi di catturare un lupo e munirlo di collare solo se strettamente necessario e se i dati ricercati non possono essere raccolti in altro modo. Ad esempio, gli studi intensivi sulle dinamiche preda-predatore, del tasso di predazione, dell'analisi della selezione dell'habitat o di dati comportamentali specifici, richiedono l'utilizzo di radio-collari per avere informazioni dettagliate su questi aspetti. Le tecniche invasive hanno un alto costo, principale limite per il loro utilizzo, e comportano difficoltà ed elevati impegni logistici. Quindi le applicazioni della tecnica devono essere scrupolosamente valutate sia in termini di fattibilità, sia tenendo conto delle risorse disponibili e delle priorità di ricerca, nel più ampio contesto della conservazione della specie a livello nazionale. Per catturare un lupo è necessario un'approvazione sia a livello Ministeriale, valutazione che si esprime previa acquisizione di un parere tecnico da parte di ISPRA, sia a livello locale che regionale (Regione o Provincia). Non in ultimo, il lupo è una specie protetta per la quale è meglio evitare i rischi di cattura a meno che la tecnica invasiva non sia indispensabile. I metodi invasivi non sono oggetto della presente strategia, ma nel caso venissero applicati per obiettivi specifici a scala locale, i dati raccolti potranno contribuire all'implementazione di questa strategia di monitoraggio quanto agli obiettivi del Capitolo 1, fornendo indicazioni importanti per aumentare l'efficacia del campionamento delle Fasi *a* e *b* (Capitolo 3), contribuendo alla individuazione di transetti efficienti (§ 6.1) o ad un efficiente posizionamento delle fototrappole (§ 6.2), o anche fornendo informazioni aggiuntive in quanto a dimensione del territorio dell'individuo e sulla eventuale riproduzione del branco (§ 6.4).

I metodi di campionamento si dicono **non invasivi** se 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 e la distribuzione, perché sono di facile applicazione su larga scala e sull'intera popolazione di interesse ed utili per una specie elusiva e difficile da catturare 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 di indagine genetica e le foto trappole, o anche le fotografie provenienti da terzi verificate. Spesso il migliore risultato si ha 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, parametri di interesse per il monitoraggio del lupo in Italia ed obiettivi della presente strategia (distribuzione e abbondanza, Capitolo 1).

Tenuto conto di questo, vengono di seguito descritti i protocolli relativi a tecniche non-invasive che dovranno essere applicati in sinergia da tutti gli operatori specializzati del *Network Lupo* italiano (Capitolo 5) definiti **sulla base dei vari protocolli già adottati in Italia in innumerevoli progetti locali e regionali, elencati in Appendice 1**. I protocolli di seguito descritti vogliono includere le esperienze decennali

sviluppate in Italia, ma allo stesso tempo essere conformi agli obiettivi e al disegno di campionamento descritti nel Capitolo 1 e Capitolo 3. La frequenza con cui devono essere svolte le attività di monitoraggio descritte nei successivi protocolli di applicazione dipende dal tipo di campionamento, se intensivo o estensivo (Capitolo 3), tenendo conto delle disponibilità ed esigenze degli Enti di gestione del personale coinvolto. E' fondamentale evidenziare ancora che le indicazioni fornite in relazione alla distribuzione spaziale e temporale dello sforzo minimo da effettuare, descritte in dettaglio nel Capitolo 3, non possono essere modificate.

6.1 Controllo sistematico di transetti e/o punti di marcatura per la raccolta di segni di presenza

Obiettivi

Lo scopo del monitoraggio sistematico del territorio tramite controllo programmato di transetti e/o punti di marcatura è accertare la presenza del lupo tramite ritrovamento di escrementi o altri segni di presenza riconducibili alla specie (*presence sign survey*). L'attività è da condurre nel periodo di ottobre-marzo (Capitolo 3), con 3 repliche bimestrali per il campionamento estensivo (§ 3.1), e 6 repliche mensili per il campionamento intensivo (§ 3.3). E' fondamentale controllare regolarmente il territorio lungo transetti e/o punti di marcatura, tenendo traccia dello sforzo di campionamento con regolarità (§ 3.3), anche e soprattutto nei casi in cui non si documenta la presenza. L'obiettivo è infatti stimare nel tempo e nello spazio non solo la presenza, ma anche la contattabilità della specie (*detection probability*). I campioni raccolti, escrementi ed altro materiale organico (es. peli, urine, tracce), vengono analizzati successivamente a livello genetico (cap. 6.8), solo nelle aree di campionamento intensivo, per identificare i genotipi dei singoli lupi e valutare la densità della popolazione nell'area campione tramite l'applicazione di modelli di cattura-ricattura spaziale (SCR) (§ 3).

Attività

La metodologia di indagine prevede una pianificazione sistematica, tramite la definizione di transetti disegnati sul territorio all'interno delle celle selezionate (§§ 3.1.2 e 3.2.2) e la loro regolare perlustrazione definita con tempistiche prestabilite già citate negli obiettivi (§§ 3.1 e 3.2). La prima attività sarà quella di disegnare i transetti sistematici all'interno di ogni cella in modo da coprire zone più frequentemente percorse dai lupi (es. fondovalle, creste, strade sterrate, passi, sentieri e zone di svernamento degli ungulati in inverno). Questi transetti e/o punti di marcatura sono da individuare all'interno delle celle selezionate della griglia di riferimento (Figura 10 e Figura 12), in maggior numero nelle aree intensive rispetto alle estensive, ed in maggior numero nelle aree di presenza di branchi. Gli operatori degli Enti individuati dai corsi di formazione (Capitolo 5) dovranno percorrere sistematicamente con ripetizioni questi transetti per la raccolta prevalentemente di escrementi. La prima attività da intraprendere da parte dei tecnici in collaborazione con il *Network Lupo* locale, con la supervisione da ISPRA per l'Italia peninsulare e del CGC per le regioni alpine (Capitolo 5), sarà quella di definire la rete dei transetti e/o punti di marcatura, anche riutilizzando quelli già tracciati in anni precedenti.

Transetti sistematici per la raccolta escrementi ed altri segni di presenza: la raccolta degli escrementi od il ritrovamento delle tracce di lupo (§ 6.4) avviene attraverso una serie di percorsi standard dislocati a rete nelle celle, in modo da coprire in modo omogeneo l'area di interesse. Il numero e i km di transetti sono maggiori nelle celle di campionamento intensivo. Ogni circuito viene percorso sulla base di tempistiche prestabilite (§ 3.1.3, 3.2.3.) e sulla base dell'effort disponibile e preventivato (§ 3.3). Lo sforzo di campionamento è strutturato nel tempo per permettere di identificare variazioni di presenza del lupo sul territorio non dovute a variazioni di campionamento. Anche il posizionamento dei transetti all'interno di una cella dovrebbe essere rappresentativo della diversità dei parametri che influenzano la presenza della specie, tra cui ad esempio gli habitat caratteristici della cella. Durante il periodo invernale, in celle con presenza di neve, i transetti-lupo possono anche essere controllati nell'ambito di uscite in simultanea di più operatori, finalizzate a ricercare tracce di lupo e individuare il numero di branchi presenti, tramite la tecnica dello *snow-tracking* (§ 6.4), la cui realizzazione dipende dal verificarsi di condizioni di innevamento adeguate. Invece, in celle posizionate in pianura o collina, con presenza di centri urbani, dove innumerevoli strade e sentieri sono presenti, l'individuazione di transetti può essere sostituita con l'individuazione di punti di marcatura utili da controllare sistematicamente anche in macchina sulla base di un percorso veicolare che li connette. Le istruzioni per l'identificazione dei transetti e dei punti di marcatura ottimali viene affrontata nei corsi di formazione (Capitolo 5).

Tutti gli escrementi di lupo ritrovati devono essere fotografati, schedati con tutte le informazioni associate, o tramite App (Capitolo 5) o tramite scheda cartacea (Capitolo 7), e quelli abbastanza freschi devono essere raccolti nelle aree di campionamento intensivo e devono essere collezionati secondo le indicazioni del § 6.8. Se al momento del ritrovamento, il rilevatore non è dotato di materiale per il campionamento genetico come al punto 6.8, i campioni devono essere conservati in freezer fino al momento del campionamento genetico, che deve essere condotto alla fine di ogni mese. A ogni escremento ritrovato deve essere attribuito un codice univoco (Capitolo 7) e deve essere associato il sito del ritrovamento. Questo sarà rilevato in automatico se il dato è raccolto tramite App, in alternativa dovrà essere rilevato tramite GPS e riportato su scheda cartacea relativa, specificando le coordinate geografiche e il sistema di riferimento utilizzato (Capitolo 7). Una scheda riassuntiva delle uscite mensili deve essere compilata per ogni transetto sistematico, al fine di quantificare e monitorare lo sforzo di campionamento a livello di singola cella e area campione. In tale scheda viene riportata la data di percorrenza del transetto e i segni di presenza del lupo rilevati (escrementi, carcasse, etc.); dovrà essere registrato anche in assenza di segni (Capitolo 7).

Criteri di selezione del campione: attraverso l'applicazione contemporanea di un insieme di criteri è possibile diminuire la probabilità di errore nella determinazione di appartenenza dell'escremento (contenuto, località, etc.), e la loro applicazione è importante al fine di mantenere un approccio conservativo. L'identificazione corretta di escrementi di lupo migliora con l'esperienza dell'operatore, per questo viene richiesto ad ogni operatore di fotografare comunque l'escremento e raccoglierlo se in dubbio, per permetterne un'ulteriore valutazione se necessaria. Le competenze necessarie agli operatori per effettuare una corretta attribuzione dei segni di presenza vengono forniti tramite corsi specifici di formazione (vedi Capitolo 5).

6.2 Protocollo per l'utilizzo delle trappole fotografiche

Il fototrappolaggio è una tecnica di raccolta dati che ha recentemente avuto una notevole diffusione e che ha indubbiamente notevoli potenzialità e vantaggi per il monitoraggio della fauna. Esso si basa sull'utilizzo di Trappole Video-Fotografiche (TVF), strumenti generalmente di piccole dimensioni e alimentati a batteria (interna o esterna) che associano un dispositivo di ripresa video-fotografica ad un sensore di movimento e/o temperatura. In seguito al rilevamento, da parte del sensore, di un movimento o del passaggio di un corpo a temperatura diversa da quella dello sfondo, le TVF possono scattare una fotografia o registrare un video. Le immagini o i video sono archiviati in formato digitale in una scheda SD posta all'interno della TVF stessa e possono essere ottenuti sia di giorno (a colori), sia di notte (in bianco e nero) grazie ad un illuminatore invisibile a led infrarossi. Esistono in commercio ormai diverse tipologie di TVF, con specifiche tecniche differenti (e.g., ampiezza dell'angolo e distanza di rilevamento, numero di led a infrarossi, presenza di flash, invio dati tramite MMS). In ogni caso, in generale tutte le TVF possono essere programmate in modo da impostarne la sensibilità, gli orari di funzionamento, la durata delle riprese e gli intervalli tra le stesse. Oramai Enti e singoli operatori sono dotati di TVF il cui utilizzo nell'ambito della presente strategia è altamente consigliato. È importante ricordare che l'uso delle TVF deve essere svolto nel rispetto della normativa vigente in materia di privacy e accesso ad aree non pubbliche, ed è consigliato dotarsi di cartelli di segnalazione.

Obiettivi

Le TVF sono principalmente utilizzate per il rilevamento della presenza di una specie in un dato territorio. Anche nel caso del lupo, l'obiettivo principale del fototrappolaggio è costituito dalla valutazione/verifica della presenza della specie, ed alla valutazione/verifica della presenza di branchi (documentata con foto/video di più di due individui insieme, Capitolo 4), ed eventualmente anche dall'identificazione e monitoraggio di individui fenotipicamente riconoscibili (es., potenziali ibridi o fenotipi anomali, individui incidentati, cuccioli, femmine in gravidanza). Poiché, a differenza di quanto avviene per altri carnivori (ad esempio per la lince), gli individui di lupo non sono di norma riconoscibili individualmente da una foto, a meno che non abbiano appunto menomazioni o caratteristiche particolari, le TVF non sono utili per analisi di cattura-marcatura-ricattura (CMR) su questa specie e non permettono di ottenere, almeno con questo tipo di analisi, stime della dimensione delle popolazioni. Invece le TVF sono utili per le analisi di occupancy (fase a), solo se dati precisi sulla durata della sessione (date di inizio e fine) ed dell'effettivo funzionamento, vengono raccolti (come da scheda Capitolo 7). E' altamente consigliato fissare il dato di inizio (e fine) attivazione della TVF scattando una foto di "inizio" dell'operatore sul campo con in mano una lavagnetta o un taccuino con indicate le seguenti informazioni: ID della TVF (come da Capitolo 7), data di inizio dell'attivazione, l'ora e il nome dell'operatore (Rovero e Zimmerman, 2016). Nel caso in cui la TVF, quando disattivata, fosse scarica, la data di "Fine attivazione" corrisponderà all'ultima foto effettuata. In ogni caso per il lupo le TVF permettono quindi di perseguire i seguenti obiettivi:

- verifica della presenza della specie;
- verifica della presenza di un branco;
- individuazione di esemplari fenotipicamente anomali;
- documentazione della riproduzione;
- raccolta di alcune informazioni su condizioni individuali e patologie (es. rogna).

Nell'ambito del Piano nazionale di monitoraggio, che utilizza uno schema di lavoro basato sul double sampling, l'uso delle TVF è previsto in tutte le celle selezionate sia nel campionamento estensivo che nel campionamento intensivo, sulla base della disponibilità degli Enti di utilizzare le TVF allo scopo, con **l'obiettivo primario di verificare la presenza degli animali** in occasioni ripetute e spazialmente distribuite, al fine di ottenere quindi dati utili anche allo sviluppo di modelli di occupancy per la specie.

Attività e Disegno sperimentale

Per ciascuna cella selezionata nell'ambito della griglia nazionale, sarà necessario disporre e controllare le TVF seguendo una specifica strategia di campionamento, più intensiva in quanto a numero e frequenza di utilizzo nelle celle con presunta presenza di branchi. In ogni caso, il posizionamento delle TVF sarà effettuato sulla base delle disponibilità degli Enti a partecipare, tenendo conto del fatto che nel contesto del campionamento di base il fototrappolaggio rappresenta soltanto una, e non l'unica tecnica adottabile per verificare la presenza degli animali. Inoltre, spesso il fototrappolaggio viene utilizzato per confermare la presenza della specie, a seguito del rilevamento di altri segni di presenza (Canu et al., 2017; Reinhardt et al., 2015). La raccolta dei dati può avvenire nel corso di tutto l'anno, ma dovrebbe essere intensificata e assicurata soprattutto nel periodo ottobre-marzo per le celle con presunta presenza di branchi. Nell'ambito del monitoraggio estensivo, nel caso fosse possibile applicare solo uno sforzo limitato è invece opportuno concentrare l'attività nella prima parte dell'inverno ottobre-gennaio, quando i branchi sono più facilmente fotografabili in gruppo (Marucco et al. 2018), puntando in tal modo anche a documentare con dati C1 la presenza di branchi nella cella.

Posizionamento delle TVF all'interno delle celle 10x10 km selezionate

All'interno di ciascuna cella 10x10 km selezionata, il posizionamento delle TVF dovrà avvenire individuando siti con più elevata probabilità di contatto. Le esperienze sino ad ora condotte in Italia (es. Caniglia et al., 2006; Canu et al., 2017) e all'estero (e.g., WAG Report 2015-2016) suggeriscono che le TVF dovrebbero essere collocate lungo i percorsi potenzialmente più utilizzati dai lupi, in prossimità di piazzole, incroci o passaggi obbligati (o in corrispondenza di marcature recenti, se l'obiettivo è quello di verificare dati raccolti con altre metodologie). In questo modo si massimizza la probabilità di rilevamento e il tempo di permanenza degli animali nel campo della fototrappola (Mattioli et al., 2018). È però da evitare qualsiasi ricorso ad attrattivi chimici o biologici che potrebbero alterare il comportamento degli animali. In effetti, le TVF rappresentano un sistema di rilevamento non invasivo il cui utilizzo, per quanto si è potuto rilevare, non influisce sul comportamento dei lupi a meno che non si usino delle esche o non si manipolino delle carcasse, la cui cosa deve essere limitata a casi di effettiva necessità (Marucco et al., 2014). Le TVF possono essere installate su paletti di castagno o su tronchi di alberi, fissati con fascette di plastica e se necessario mimetizzati per limitare il rischio di furto. La collocazione ottimale delle trappole è in genere compresa tra 30 e 100 cm dal suolo, con la macchina sempre leggermente inclinata, in modo variabile a seconda dalla morfologia del sito e della distanza focale, ma indicativamente posizionata in modo che l'area target (di presunto passaggio degli animali) sia tra 3 e 5 m dalla macchina (Caniglia et al., 2006; Galaverni et al., 2012). In aree in cui siano possibili atti di vandalismo, si possono utilizzare lucchetti ove possibile e si può optare per un posizionamento ad altezza maggiore, 2/3 m, accorgimento che evidentemente necessita di inclinare le macchine verso l'area target molto più della disposizione standard (Manghi et al., 2012; Mattioli et al., 2018; Rovero e Zimmermann, 2016; Torretta et al., 2017). Inoltre è consigliato testare il corretto funzionamento della TVF e la corretta posizione rispetto al target scattandosi nel momento dell'attivazione

delle immagini di prova e visualizzandole (è possibile ad esempio usare un semplice cavetto che collega la scheda SD allo smartphone) (Rovero e Zimmerman 2016). In questo modo è possibile aggiustare il posizionamento della TVF per ottimizzare le riprese del passaggio di lupi sul sito di interesse.

Nell'ambito di una stessa cella, il numero di siti da monitorare tramite TVF dovrebbe essere compreso tra 1 (Torretta et al., 2017) e 6/7 (AA VV, 2013; Caniglia et al., 2006; Mattioli et al., 2018). Il numero esatto sarà tuttavia funzione della cella considerata (se con campionamento intensivo, quindi con più siti, o estensivo, con meno), delle caratteristiche ambientali per evitare aree eccessivamente antropizzate e del numero di trappole disponibili (es., nell'ambito del progetto LIFE MEDWOLF, 35 fototrappole sono state utilizzate per monitorare 43 siti differenti, Ricci et al., 2017; si veda in proposito anche paragrafo successivo). In ogni caso si incentiva una distribuzione omogenea del numero delle fototrappole per cella. Nel posizionamento della TVF, occorre anche tenere conto del fatto che l'angolo di ripresa spesso non coincide con l'angolo di rilevamento dei sensori, che è comunque più piccolo e indirizzato al centro dell'area inquadrata. L'angolo di campo inquadrato è variabile da un modello all'altro e nello stesso modello può esserlo in base ai differenti settaggi che differiscono anche da un formato video ad un altro (4:3; 16:9), con formati più panoramici di altri. La scelta è a discrezione dell'Ente o dell'operatore. In ogni caso informazioni di dettaglio verranno fornite nei corsi di formazione sia in formato e-learning che frontali (dettagli al Capitolo 5).

Durata delle sessioni, modalità di registrazione e tempi di attivazione:

In seguito alla individuazione dei siti di fototrappolaggio, si dovrà prevedere:

- una uscita sul campo per il montaggio (anche contestuale all'identificazione del sito), preventivamente valutata sulla base di altre informazioni di presenza;
- una eventuale uscita per controllo del funzionamento della TVF e/o per sostituire le batterie e/o le schede di memoria;
- una uscita per il recupero della TVF.

La sessione di fototrappolaggio ("sessione") in termini di sforzo dovrà essere pari ad almeno circa giorni 30 notti (dalla data di attivazione verificata alla data di recupero finale), cercando anche di utilizzarle per l'intero periodo di campionamento della cella (come da cap. 3). In ogni caso, essa non dovrà essere inferiore a 5 notti (AA VV, 2013; Canu et al., 2017; Mattioli et al., 2018). Fondamentale è la registrazione nelle schede apposite delle notti di effettiva attivazione.

La frequenza di controllo dalle TVF (sostituzione delle batterie e svuotamento della scheda SD) varia a seconda del numero di attivazioni effettuate per registrare foto e/o filmati, delle condizioni climatiche e della stagione (es. minore durata delle batterie in inverno). Generalmente viene eseguito un controllo periodico ogni 15 giorni per garantire il corretto funzionamento della macchina e l'adeguata manutenzione (Ancrenaz et al., 2012). Se la durata della sessione di fototrappolaggio si protrae oltre i 10-15 giorni, può rendersi necessaria una uscita per la sostituzione delle batterie e/o delle schede di memoria (Torretta et al., 2017). Per garantire la copertura territoriale richiesta (di cui al paragrafo precedente), una stessa TVF può essere spostata e utilizzata per monitorare più siti, e.g., 2 siti monitorati da una stessa TVF nell'arco di uno stesso mese. Per quanto riguarda le impostazioni delle TVF, si raccomanda di utilizzare la **modalità video** di durata tra i 10-20 secondi eventualmente programmando la macchina ad effettuare 3 scatti fotografici consecutivi con avvio successivo del video (AA VV, 2013; Mattioli et al., 2018; Meriggi et al., 2013), impostando una risoluzione 1280x720 pixel. Il **tempo di latenza** (tempo di reazione tra rilevazione del movimento e scatto o registrazione video) è una caratteristica intrinseca della TVF, ovviamente TVF di

migliori qualità hanno un tempo di latenza inferiore (da 0.1-0.2 s per le migliori a 1-2 s per quelle lente). In genere il tempo di latenza (*trigger time*) in modalità foto è leggermente minore rispetto al video. E' possibile invece impostare un ritardo minimo tra registrazioni successive, ed è consigliato impostare il minimo possibile per la TVF in dotazione, che può anche essere zero. Le TVF possono inoltre essere regolate per la **sensibilità** dei sensori, solitamente con tre distinti livelli (basso, medio, alto). La sensibilità più bassa garantisce minori o assenti attivazioni accidentali dovute a correnti d'aria in orari diurni che facciano muovere oggetti colpiti dal sole, mentre la sensibilità maggiore può consentire di rilevare anche altre specie, soprattutto quelle di piccole dimensioni. L'alta sensibilità rappresenta perciò l'impostazione più rischiosa per le attivazioni accidentali e non è quindi raccomandata per il monitoraggio del lupo, in ogni caso si consiglia di settarla per valori medi. Tuttavia l'impostazione dei parametri potrà essere valutata con precisione tenendo conto delle caratteristiche tecniche dell'attrezzatura disponibile, effettuando anche una valutazione del contesto di applicazione e valutazioni empiriche.

Per la corretta gestione ed analisi dei dati, è **fondamentale prevedere che ciascuna foto/video riporti l'ora e la data di registrazione**. In relazione ai **tempi di attivazione**, sebbene si possa prevedere di attivare le TVF soltanto di notte, per risparmiare le batterie (Galaverni *et al.*, 2012) e considerando le abitudini prevalentemente notturne della specie, **ai fini del piano di monitoraggio si suggerisce di mantenerle attive h 24** (Canu *et al.*, 2017; Mattioli *et al.*, 2018) per ottenere il maggior numero possibile di dati di presenza e per garantire maggiore omogeneità nel dato raccolto a scala nazionale e un'adeguata analisi. Si ribadisce come fondamentale il completare regolarmente le schede sia della presenza documentata, sia dell'*effort* della fototrappola (Capitolo 7). I dati potranno essere raccolti anche grazie all'App (Capitolo 5).

6.3 Protocollo per la raccolta di documentazione video-fotografica da terzi

Obiettivi e Attività

La documentazione video-fotografica di lupi, realizzata da terzi in modo casuale e totalmente occasionale, anche grazie all'utilizzo di telefoni cellulari, è oggi un'opportunità da sfruttare, tenuto conto che questo tipo di dato, se accuratamente verificato, facilmente ricade nella categoria C1 (Capitolo 4). Gli obiettivi, come per le fototrappole (§ 6.2), riguardano principalmente la verifica della presenza della specie, la verifica della presenza di branchi, l'individuazione di esemplari fenotipicamente anomali e la eventuale documentazione della riproduzione.

Documentazione di questo tipo potrà riguardare qualsiasi cella della griglia del territorio italiano (Figura 1) e non è preventivabile, costituendo quindi un dato opportunistico. Data la natura totalmente casuale e imprevedibile, questo dato può essere facilmente falsificato e prodotto dalle oramai diffuse "*fake news*". Le foto/video possono essere false, oppure più frequentemente può essere falso il luogo e/o la data di attribuzione della foto/video. Al fine di sfruttare comunque al meglio questa fonte di informazione, è necessario creare con il *Network* di operatori formato (Capitolo 5) una rete solida di verifica di queste immagini, le quali, una volta verificate accuratamente, possono diventare dati preziosi di presenza della specie, specialmente nelle aree più antropizzate dove gli incontri con il lupo possono essere più frequentemente documentati da terzi mentre altri segni di presenza sono meno rilevabili, ed al tempo stesso possono essere uno strumento importante di "*debunking*". Il lavoro degli operatori del *Network Lupo* (Capitolo 5) è quindi fondamentale e consiste nel:

- creare un *networking* locale, coinvolgendo pubblico generico e di categoria, per ricevere regolarmente le fotografie-video che ritraggono lupi;
- verificare direttamente la provenienza della fotografia o video, in quanto a localizzazione, esecutore e veridicità dell'evento. In particolare, per validare il dato, è necessario che l'operatore:
 1. si rechi personalmente sul luogo per verificare la localizzazione dell'avvistamento attraverso il riconoscimento accurato degli elementi del paesaggio;
 2. contatti direttamente la persona che ha scattato la fotografia/video per una descrizione dell'evento.

Solo se l'operatore è in grado di verificare con certezza la veridicità del dato, questo verrà archiviato mediante compilazione della scheda dell'avvistamento video-fotografico (Capitolo 7) o eventualmente tramite App (Capitolo 5), insieme all'archiviazione del video/foto associato. Si richiede un approccio estremamente rigoroso da parte degli operatori formati nella verifica dell'evento video/fotografico, pertanto:

- nel caso in cui la foto/video ricevuta non sia verificabile, non dovrà essere catalogato il dato;
- nel caso in cui la foto/video ricevuta sia un falso, anche solo riguardo alla localizzazione, sarà importante contribuire al processo di *debunking*, informando in primis i diffusori dell'immagine.

6.4 Protocollo per l'attività di Snow-tracking

Obiettivi

Il ritrovamento delle tracce di lupo avviene attraverso la percorrenza dei transetti sistematici (§ 6.1) dislocati a rete nelle celle, unicamente dove è presente la copertura nevosa. Le tracce di lupo una volta contattate vengono seguite come descritto nel paragrafo successivo. Nelle celle di campionamento estensivo questo dato di presenza si somma a quello degli escrementi ritrovati lungo il transetto, utile per la stima della distribuzione della specie. L'attività di *snow-tracking* inoltre fornisce informazioni sulla presenza di un branco, e la stima minima di individui associati. Queste informazioni sono particolarmente utili nelle celle di campionamento intensivo, dove l'attività di *snow-tracking*, se conducibile, è particolarmente importante per valutare, tramite la ricostruzione degli spostamenti, la struttura sociale dei lupi residenti in un'area (e.g. branchi e numerosità del nucleo). Ovviamente è una tecnica utilizzabile solo in zone montane e pedemontane, in presenza di copertura nevosa, ma dove applicabile risulta fondamentale nelle celle di campionamento intensivo per rilevare:

- il numero minimo di branchi e individui presenti sul territorio, per coadiuvare la stima di densità locale;
- incrementare la raccolta nelle celle di campionamento intensivo, di escrementi freschi, o altri campioni biologici, quali peli/urine con sangue, associati alla traccia, dato particolarmente importante per le aree in cui si prevede di applicare analisi SCR in combinazione ad analisi genetiche non-invasive per la stima della densità della popolazione di lupo.

Attività

L'attività può essere eseguita solo in presenza di neve, per questo è limitata solo alle aree montane e pedemontane. Questa attività è da considerarsi comunque estremamente utile nel caso in cui la copertura nevosa sia uniforme in una cella o area di campionamento intensivo, e da utilizzarsi in abbinamento alla percorrenza dei transetti sistematici disegnati sulla cella (§ 6.1).

- Procedura di indagine: al fine di intercettare le tracce dei lupi si percorrono i transetti sistematici individuati all'interno della cella come al § 6.1, con l'utilizzo se necessario di racchette da neve e/o sci d'alpinismo. I transetti sistematici devono essere percorsi con tempistiche prestabilite (Capitolo 3). Una volta individuate lungo il transetto, le tracce vengono seguite dal punto in cui sono state intercettate, prima a ritroso (per non disturbare gli animali) e poi nel loro senso di avanzamento, riprendendo anche il giorno successivo dal punto in cui la traccia è stata abbandonata, se necessario. In questo modo tutto il tragitto dei lupi rilevabile viene percorso in più giorni successivi e viene considerato un'unica "sessione di tracciatura". Il percorso esatto viene registrato tramite GPS attribuendogli un nome che viene poi riportato sulla scheda di rilevamento (vedi scheda *snow-tracking* Capitolo 7), oppure tramite l'App (Capitolo 5). Nelle aree di campionamento intensivo, lungo le tracciature vengono raccolti escrementi e vengono catalogate urine/peli secondo le procedure per prelevare campioni utili alle analisi genetiche solo per le regioni alpine (§ 6.8).

- Surveys simultanee: le uscite in simultanea di più operatori possono essere utili in caso di presenza di copertura nevosa uniforme sulla cella/area di campionamento intensivo, e sono da effettuarsi sulla base di tempistiche prestabilite definite da calendario e sulla base della percorrenza dei transetti sistematici definiti a priori (§ 6.1). Quest'attività, dove e quando possibile, è utile nell'ambito del campionamento intensivo relativo alle aree campione montane dove la presenza di un branco è stata rilevata, e particolarmente utile nel campionamento delle regioni alpine nei luoghi dove la densità della specie è alta. L'esecuzione prevede appunto la collaborazione di più operatori che effettuano una ricerca simultanea delle tracce sul territorio, suddiviso in più settori adiacenti, in modo da riuscire a monitorare una vasta area contemporaneamente ed individuare più rapidamente la presenza del branco e ricostruire più velocemente l'intera traccia. E' fondamentale per questo identificare settori di indagine, generalmente corrispondenti all'area di uno o due branchi. Nelle celle montane di monitoraggio estensivo non è necessario applicare questa tecnica.

- Limitazioni: uno dei maggiori problemi è la possibilità di confondere i segni di presenza rinvenuti (impronte e tracce) con quelli lasciati da un cane di dimensioni o comportamento simili a quello di un lupo, per questo ogni dato rinvenuto deve essere giudicato in senso conservativo attraverso l'applicazione dei criteri già sopra menzionati, in merito ai quali gli operatori verranno adeguatamente formati nell'ambito dei corsi di formazione (Capitolo 5). In merito a questi criteri si ritiene opportuno evidenziare in particolare che una traccia di lupo non è distinguibile solo in base alla singola impronta della zampa mentre è necessario considerare anche e soprattutto l'andatura, rilevabile tramite il susseguirsi delle singole impronte. La tecnica dello *snow-tracking* è la più valida per la valutazione della presenza/assenza della specie su vasta scala come dato C2, tuttavia sfortunatamente la sua applicazione è condizionata dalla presenza di neve. Nell'applicazione di questa tecnica è fondamentale seguire le tracce intercettate il più possibile ed effettuare più uscite durante l'inverno per poter stimare la dimensione del branco, tenendo conto che le associazioni dei membri del branco possano variare continuamente e i lupi possano compiere in breve tempo distanze molto ampie. Questi ultimi aspetti rendono particolarmente difficile individuare soluzioni di continuità tra territori di branchi adiacenti.

6.5 Protocollo per l'attività di Wolf-howling – Ululati indotti

Obiettivi

Obiettivi di tale attività, da condurre in estate unicamente nelle aree di campionamento intensivo prima della fase di campionamento sistematico invernale, sono l'eventuale conferma della presenza di un branco, e la valutazione del successo riproduttivo del branco con la localizzazione del sito di rendez-vous.

Tale localizzazione può favorire una locazione di transetti efficienti per la raccolta sistematica dei segni di presenza del branco e degli escrementi, da condurre nel periodo successivo di ottobre-marzo (§ 6.1). L'obiettivo non è la stima dei branchi presenti, impossibile se non con uno sforzo molto elevato e non realizzabile nell'ambito di questa strategia nazionale, ma solo la raccolta di dati utili per migliorare l'efficienza del campionamento sistematico invernale nell'ambito delle celle di campionamento intensivo (Capitolo 3).

Attività

Il monitoraggio attraverso l'uso di ululati simulati consiste nell'induzione di risposte vocali da parte dei lupi mediante la riproduzione degli ululati (tramite strumentazione idonea) al fine di individuare la presenza della specie e stimare la composizione del branco, ossia il numero minimo di individui e soprattutto la presenza di cuccioli (Harrington e Mech 1982). Sarà quindi realizzata durante il periodo estivo (luglio-settembre), solo nelle aree di campionamento intensivo, per fornire informazioni utili al disegno dei transetti del campionamento invernale (§ 6.1). I tecnici incaricati (Capitolo 5) svolgeranno tale attività prevalentemente in collaborazione con gli operatori degli Enti locali. Sarà fondamentale una accurata fase di pianificazione, all'inizio della stagione estiva, al fine di indirizzare correttamente lo sforzo solo se valutato necessario, per individuare le stazioni di emissione e stabilire un adeguato calendario di uscite che permetta di coprire adeguatamente il territorio, tenuto conto che non è possibile estendere la tecnica su aree vaste.

- Limitazioni: la tecnica del *wolf-howling* è ottimale solo se applicata in modo rigoroso, e non sarà l'obiettivo primo di questa strategia non essendoci i presupposti. Può, infatti, fornire informazioni utili riguardo la presenza di più branchi se nella sua applicazione vengono contemporaneamente rilevate più cucciolate (es. si hanno diverse risposte corali con cuccioli, riconducibili, per dislocazione sul territorio, a più siti di rendez-vous/branchi). Il *wolf-howling* deve essere preceduto da una pianificazione attenta delle emissioni nel tempo e nello spazio al fine di evitare possibili errori di doppia conta. Questa pianificazione può essere condotta solo da persona esperta, che abbia ricevuto un adeguato training. Inoltre l'efficienza della tecnica è alta solo se all'applicazione della tecnica viene precedentemente svolto un lavoro di monitoraggio sul campo che permette di indirizzare gli sforzi di *wolf-howling* in modo strategico ed efficiente. Nell'ambito di queste linee guida, e specialmente nell'ambito del campionamento estensivo, non ci sono i presupposti per svolgere adeguatamente questa tecnica a scala nazionale, che non può essere applicata su vaste zone, portando ad un rapporto costi-benefici sfavorevole. Può essere invece applicata precedentemente al campionamento invernale, unicamente nelle aree di campionamento intensivo, dove la valutazione locale del rapporto costi-benefici è invece favorevole, per individuare dove possibile dei siti di rendez-vous e indirizzare il campionamento sistematico che si svolgerà in seguito. In questi casi, è utile una doppia conferma di risposta dei cuccioli al sito di rendez-vous, per migliorare la valutazione ed essere più critici sul risultato. La stima del numero di individui è comunque sempre minima, in quanto non si può

essere certi della presenza di ogni individuo del branco al momento della risposta. Può succedere inoltre che non tutti i membri del branco rispondano, quindi anche se registrati ed analizzati grazie a spettro acustico del branco, rimangono stime minime anche se più precise. Di conseguenza l'obiettivo unico e robusto è la valutazione del successo riproduttivo del branco e la localizzazione del sito, per una più efficiente raccolta dei segni di presenza (§ 6.1). Infine è importante ricordare, dove la tecnica verrà applicata, la necessità delle tre ripetizioni dell'emissione degli ululati per almeno 3 notti consecutive sullo stesso punto di emissione, come da protocollo di Harrington e Mech (1982) e il fatto che l'eventuale presenza di eco potrebbe indurre ad errore nell'individuare la fonte di emissione della risposta, pertanto è necessario condurre una triangolazione per la localizzazione del sito.

6.6 Protocollo per la documentazione di carcasse di ungulati selvatici e domestici

Occasionalmente, e generalmente sotto segnalazione, è possibile ritrovare carcasse di ungulati sul territorio riconducibili a predazione da canide, oppure predazioni da canide su domestici. In questi casi, dopo un'adeguata analisi della preda, è fondamentale valutare la probabilità di predazione da parte del lupo, seguendo le indicazioni fornite nei corsi di formazione (cap. 5). Se si interviene nella verifica di una predazione su animale domestico, normalmente di competenza dell'ASL o di veterinari incaricati per gli accertamenti, e si valuta con buona probabilità l'attribuzione dell'attacco al lupo, si documenta l'evento rilevando coordinate geografiche e data (Scheda carcassa Capitolo 7), e comunque si segnala l'evento a chi di competenza se non già avvisato. In particolare nelle zone interessate da campionamento intensivo, in presenza di una carcassa fresca, si provvede al campionamento della saliva del predatore rilevabile sui morsi inferti nella zona delle regioni alpine (§ 6.8) e si eseguono delle perlustrazioni nei dintorni della predazione per cercare campioni biologici al fine di realizzare analisi genetiche-non invasive (§ 6.8). Inoltre, se dotati di TVF, è possibile posizionarle nei pressi di una predazione per acquisizione di informazioni opportunistiche, seguendo le indicazioni del § 6.2.

- Limitazioni: l'attribuzione di un evento di predazione al lupo è difficile da diagnosticare con certezza (senza ricorrere alla genetica-non invasiva), soprattutto in assenza di copertura nevosa nella quale siano presenti tracce che permettono di comprendere la dinamica dell'attacco. L'attribuzione al predatore responsabile avviene dunque in termini di probabilità e in base a diversi elementi diagnostici, quindi i dati si riferiscono quasi sempre a dati di categoria C3 (Capitolo 4), quindi non rilevanti nell'ambito delle presenti linee guida, ma importanti solo se utilizzabili per la ricerca successiva di dati C1 e C2 (Capitolo 4). Le competenze necessarie per effettuare diagnosi in merito all'opportunità per rilevamenti di dati C1 e C2 vengono fornite agli operatori nei corsi di formazione (Capitolo 5).

6.7 Protocollo per l'archiviazione di dati dei lupi morti rinvenuti

Ciascuna Regione, Provincia Autonoma e Parco Nazionale, è incoraggiato a dotarsi di un protocollo regionale di recupero dei lupi morti e di archiviazione dei dati in un database regionale, con il coordinamento degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS). Tale database regionale dovrebbe essere messo a disposizione del *Network Lupo* locale e regolarmente condiviso. Risulta fondamentale avere un'archiviazione regolare e coordinata tra gli IZS a scala nazionale, almeno nell'ambito delle due zone, Alpi e Italia peninsulare (Figura 1). È inoltre necessaria una regolare condivisione del database con i tecnici di

ISPRA per l'Italia peninsulare ed il CGC, in collaborazione con ISPRA, per la zona delle regioni alpine, come da organizzazione descritta nel Capitolo 5). Nell'ambito delle presenti linee guida, le informazioni necessarie per il monitoraggio della presenza della specie, consistono nella localizzazione, data, causa di morte, sesso ed età dell'individuo (vedi Capitolo 7 schede). Le informazioni sanitarie sono di pertinenza degli IZS e finalizzate ai monitoraggi sanitari, non sono pertanto necessarie per le presenti linee guida. Risulta invece fondamentale inviare regolarmente un campione di tessuto al laboratorio di genetica di ISPRA o al laboratorio di riferimento alpino, come descritto nel § 6.8.

6.8 Protocollo per la raccolta di campioni biologici non-invasivi e conferimento del campione al laboratorio

Per quanto riguarda l'assegnazione del "Codice di campo" e la compilazione della scheda relativa ai diversi tipi di campioni biologici si rimanda ai § 7.1 e 7.2. Nella zona delle regioni Alpine (Figura 1) i laboratori di genetica interessati dalle analisi sono individuati nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU, in collaborazione con il laboratorio di genetica ISPRA (Capitolo 5), e le procedure per la collezione dei campioni sono definite dai singoli laboratori di riferimento.

Invece, nella zona delle regioni dell'Italia peninsulare (Figura 1), per quanto riguarda invece in particolare i campioni fecali da destinare alle analisi genetiche solo per **le aree di campionamento intensivo**, la raccolta avverrà seguendo il protocollo ISPRA basato sull'utilizzo di **Faecal Swab** (tamponi fecali). Recenti studi condotti proprio dal Personale dell'Area per la Genetica della Conservazione (BIO-CGE) ISPRA hanno, infatti, dimostrato che non sussistono significative differenze tra le rese di genotipizzazione dei DNA estratti da campioni fecali collezionati tramite tamponi e quelle ottenute dai DNA estratti da campioni collezionati con le classiche soluzioni di conservazione come ad esempio l'alcool etilico al 96% (Velli *et al.*, 2019). Inoltre, i tamponi fecali risultano sicuramente più facili da manipolare, trasportare, spedire e stoccare rispetto ai classici contenitori con l'alcool e rappresentano degli strumenti molto più sicuri per la salute degli operatori sia nelle fasi di campionamento che in quelle di laboratorio poiché i tempi di manipolazione dei campioni biologici risultano notevolmente ridotti. Il protocollo ISPRA di campionamento tramite *Faecal Swabs* prevede l'utilizzo di *cotton fioc* sterili in confezione singola e provette *safe-lock* da 2.0 ml contenenti 275 µl di ATL Lysis Buffer Qiagen, uno speciale reagente di conservazione commercializzato dalla ditta Qiagen (Qiagen Inc., Hilden, Germany). Durante il campionamento, per ciascun campione fecale trovato è fondamentale annotare, in una apposita scheda fornita da ISPRA, preziose informazioni di campo come ad esempio la data ed il luogo di raccolta, il cognome del raccoglitore, le coordinate geografiche del punto di ritrovamento, l'area di campionamento, e la freschezza del materiale biologico rinvenuto che andrà descritta secondo la seguente scala di qualità:

- **qualità 1:** il campione fecale appare umido e lucente (tempo di deposizione < 1 giorno)
- **qualità 2:** il campione fecale appare secco, ma con pochi peli affioranti in superficie (tempo di deposizione < 1 settimana)
- **qualità 3:** il campione fecale è completamente secco e costituita prevalentemente da pelo residuo, oppure ha un aspetto argilloso (tempo di deposizione > 1 settimana).

I campioni fecali con qualità 3 non dovranno essere campionati in quanto le probabilità di estrarre da essi DNA integri e quindi di ottenere dati completi ed affidabili sarebbero piuttosto scarse, mentre sarebbero notevoli i rischi di elevati tassi di errori di genotipizzazione.

I campioni fecali di qualità 2, se necessario, dovranno essere reidratati con acqua sterile prima di procedere.

I campioni fecali di qualità 2 reidratati e quelli di qualità 1, una volta individuati, andranno strofinati ripetutamente con il *cotton fioc* monouso in varie porzioni della loro superficie, senza entrare in profondità, prediligendo, se possibile, le porzioni caratterizzate dalla presenza dello strato di muco intestinale.

Durante il campionamento del materiale biologico non-invasivo sarà necessario indossare sempre guanti monouso e mascherine protettive per evitare l'inalazione accidentale di parassiti, come ad esempio *Echinococcus spp*, che possono causare gravi patologie agli operatori.

Il *cotton fioc* dovrà quindi essere inserito nella provetta *safe-lock* da 2.0 ml contenente il reagente di conservazione e l'asta del tampone dovrà essere tagliata a meno di 2 cm di altezza per favorire la corretta chiusura della provetta stessa fino al momento delle analisi genetiche (**attenzione**: deve essere inserito un solo *cotton fioc* per provetta.). La provetta andrà etichettata, con un pennarello indelebile, con un codice univoco secondo la scheda di raccolta dati (le provette possono essere anche siglate in anticipo ed utilizzate progressivamente sul campo).

Una volta eseguito il campionamento, i guanti ed i residui del *cotton fioc* andranno smaltiti in un idoneo contenitore di raccolta rifiuti e le forbici utilizzate per tagliare l'asta del tampone dovranno essere sterilizzate brevemente utilizzando la fiamma di un accendino da campo.

La provetta contenente il tampone fecale immerso nel liquido di conservazione dovrà essere conservata a temperatura ambiente o in frigorifero ma non dovrà per nessuna ragione essere congelata. Per ogni realtà di campionamento sarà fondamentale, per ragioni logistico-organizzative del personale dedicato alle analisi genetiche, spedire al Laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione ISPRA lotti di 48 o 96 campioni fecali insieme al relativo database in formato elettronico.

Data l'importanza del progetto di monitoraggio a scala nazionale, sarà opportuno collezionare, per ciascun campione fecale trovato utile per le analisi, due **Faecal Swab** (di cui uno da destinare subito alle analisi ed uno di scorta) ed una porzione (1 cm³) di matrice biologica fecale conservata in alcool etilico al 96% (metodo classico) in modo da poter disporre nel breve e lungo termine sia di una banca del campione biologico che di una banca del DNA.

Anche per eventuali carcasse di animali predati verrà effettuato un prelievo utilizzando i *cotton fioc* (**Salivary Swab**) per collezionare eventuali tracce di saliva lasciate dal predatore sulla carcassa dell'animale predato in corrispondenza di morsi e lesioni, coinvolgendo anche le ASL locali. I **Salivary Swab** verranno prelevati e conservati con le medesime modalità ed accortezze utilizzate per i Faecal Swab, prestando però particolare attenzione alla freschezza della carcassa predata perché il DNA salivare ha tempi di degradazione notevolmente più rapidi del DNA fecale e quindi sarebbe opportuno effettuare il campionamento entro le 24-36 ore dall'attacco.

Per i campioni di tessuto, che possono essere prelevati da carcasse rinvenute morte, la modalità di raccolta e conservazione del materiale biologico prevede invece il prelievo (con un bisturi sterilizzato) di circa 1 cm³ di tessuto muscolare integro da conservare in etanolo 96%. L'alcool ha infatti la funzione di disidratare i campioni biologici evitando così che le DNA si possano degradare il DNA in essi contenuto.

6.9 Protocollo delle analisi genetiche del laboratorio ISPRA: dal conferimento del campione biologico all'identificazione del genotipo

Le analisi genetiche sui campioni che verranno raccolti durante l'attività di campionamento intensivo della Fase *b* (§ 3.2), permetteranno di identificare i genotipi dei lupi presenti nelle aree campione per permettere di stimare la densità locale, anche tramite modelli di SCR. Nella zona delle regioni Alpine (Figura 1) i laboratori di genetica interessati dalle analisi sono individuati nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU, e lavoreranno in collaborazione tra loro e coordinandosi con il laboratorio di genetica ISPRA (Capitolo 5). Invece, nella zona delle regioni dell'Italia peninsulare (Figura 1), per quanto riguarda in particolare i campioni fecali da destinare alle analisi genetiche solo per le aree di campionamento intensivo, la raccolta avverrà seguendo dettagliatamente il protocollo ISPRA (6.8).

Quindi, **nell'ambito delle presenti linee guida il laboratorio di genetica di riferimento nazionale per il monitoraggio della specie è il laboratorio di genetica dell'ISPRA**, che si ribadisce condurrà direttamente le analisi genetiche sui campioni collezionati durante il campionamento intensivo solo per le aree selezionate in Italia peninsulare (§ 3.2) e che lavorerà in collaborazione con i laboratori alpini, individuati nell'ambito del Progetto LIFE WolfAlps EU, che si occuperanno in coordinamento delle analisi genetiche necessarie al monitoraggio della specie e che saranno coinvolti nel processo di standardizzazione e calibrazione dei protocolli, sulla base del protocollo di analisi fornito di seguito da ISPRA. Nei successivi capitoli vengono descritti i dettagli delle tecniche di laboratorio di ISPRA per l'individuazione dei genotipi e l'individuazione di ibridi, con dettaglio dell'iter da seguire per i campioni dell'Italia peninsulare.

6.9.1 Arrivo dei campioni in laboratorio e compilazione del DataBase ISPRA

I campioni collezionati e spediti al Laboratorio dell'Area per la Genetica della Conservazione ISPRA (BIO-CGE) saranno inseriti nel database ISPRA con un codice (Lab_ID) caratterizzato da una sigla identificativa dell'area di provenienza e da un numero progressivo di arrivo. Il database, che viene scambiato con i referenti di ogni area di Progetto, contiene, per ciascun campione, i dati di raccolta (località e data di rinvenimento, coordinate geografiche sotto forma di lat e long, eventuali note), la cui compilazione è a cura dei referenti delle aree, e i dati di genetica risultanti dalle analisi (a cura del personale del Laboratorio BIO-CGE di ISPRA). Ogni campione, oltre al codice ISPRA (Lab_ID) sarà caratterizzato da un codice di raccolta ("Codice di campo" descritto nel § 8.1) affisso dal coordinatore dell'area. La combinazione dei due identificativi (Lab_ID e "Codice di campo") costituirà il codice univoco di identificazione del campione (non possono esistere due campioni con lo stesso codice) e permetterà agli operatori di laboratorio e a quelli di campo di risalire in ogni momento a tutti i dati (genetici e di campo) associati ad un determinato campione.

Le informazioni di raccolta associate al campione ed al genotipo (una volta che il campione è stato analizzato geneticamente) sono di fondamentale importanza per dedurre informazioni sulla distribuzione degli individui nonché sulla dispersione e sulle relazioni parentali esistenti fra loro. Per questo motivo la corretta compilazione del database ed il suo scambio tra il personale del Laboratorio ed i coordinatori delle aree di Progetto sarà parte fondamentale per il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

6.9.2 Analisi del DNA

Estrazione del DNA non-invasivo - La manipolazione dei campioni non-invasivi e l'estrazione del DNA in essi contenuto saranno realizzate in appositi locali del Laboratorio BIO-CGE di ISPRA, adibiti a questo scopo, al fine di evitare eventuali contaminazioni tra campioni e DNA amplificato. Poiché il DNA contenuto nelle feci è spesso degradato, di scarsa qualità e tali campioni contengono potenziali inibitori delle analisi, verrà utilizzato il kit commerciale di estrazione *Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit* che permette di ottenere una soluzione "pulita" di DNA e che consente l'automatizzazione del procedimento di estrazioni in apposite piastre da 96 campioni su di una piattaforma robotica per la dispensazione dei reagenti riducendo così notevolmente i possibili errori umani.

Determinazione del genotipo multilocus e discriminazione degli individui - Il protocollo di analisi ISPRA prevede l'utilizzo di una porzione (250-500 paia di basi) ipervariabile del DNA mitocondriale (D-Loop) per l'identificazione preliminare della specie di appartenenza del campione attraverso la ricostruzione di un aplotipo ereditato per via materna e sei *loci* microsatellite per la determinazione dell'individuo (Tabella 4): CPH2, CPH8, FH2004, FH2088, FH2096, FH2137 (Fredholm e Wintero, 1995; Francisco *et al.*, 1996), i quali sono risultati essere sufficientemente variabili nella popolazione italiana di lupo da consentire di discriminare tra loro gli individui, anche se strettamente imparentati (Caniglia *et al.*, 2010). In questo modo ogni individuo nella popolazione presenta un univoco profilo genetico *multilocus* e questo implica che quando due o più campioni presentano lo stesso profilo genetico appartengono allo stesso animale. Il profilo genetico *multilocus* verrà poi completato analizzando un *locus* (*zinc-finger protein ZFX/ZFY*; Garcia-Muro *et al.*, 1997) localizzato sui cromosomi sessuali che permette di discriminare il sesso degli individui (Lucchini *et al.*, 2002). Il DNA fecale è spesso frammentato e di conseguenza le amplificazioni che si ottengono possono non essere completamente attendibili. Pertanto sarà necessario replicare le singole analisi e confrontare fra loro i risultati ottenuti dalle repliche indipendenti (protocollo *multi-tube*). Il protocollo *multi-tube* ISPRA, validato attraverso numerose pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali (Caniglia *et al.*, 2014; Fabbri *et al.*, 2018), prevede inizialmente 4 repliche per *locus* per campione e, dopo una verifica dell'affidabilità, condotta tramite software e procedure statistiche opportune, eventuali successive altre quattro repliche. Il protocollo interno di qualità del Laboratorio BIO-CGE di ISPRA prevede inoltre una doppia verifica dei profili genetici ottenuti che verranno analizzati visivamente ad uno ad uno in maniera indipendente da due operatori diversi.

Dalla combinazione/confronto delle 4 o 8 repliche ottenute verrà costruito il genotipo *multilocus* di consenso tramite il programma GIMLET v.1.3.3. (Valiere, 2002) considerando definitivi solo i genotipi che rispettano il seguente criterio: un genotipo omozigote deve essere osservato (nelle repliche) almeno quattro volte, mentre un genotipo eterozigote deve essere osservato almeno due volte. I genotipi di consenso così ottenuti verranno confrontati fra di loro e con la banca dati *Canis* di ISPRA, sempre utilizzando il programma GIMLET, permettendo di identificare eventuali *match* (cioè campioni che presentano lo stesso profilo genetico e che quindi appartengono allo stesso individuo).

I campioni genotipizzati con successo e quindi risultati affidabili, verranno amplificati ad altri sei *loci* microsatellite (CPH4, CPH5, CPH12, FH2079, C09.250, C20.253), per aumentare la risoluzione nella ricostruzione delle parentele e nell'individuazione di eventuali tracce di ibridazione, e ad un frammento localizzato sul gene CBD 103 (*K locus*), per identificare gli individui dal mantello melanico; ed infine gli individui maschi saranno tipizzati a 4 *loci* microsatellite localizzati sul cromosoma Y che restituiscono un aplotipo ereditato per via paterna (Tabella 4).

6.9.3 Analisi dei loci microsatellite

I 12 *loci* microsatellite autosomici e i 4 *loci* microsatellite localizzati sul cromosoma Y sono amplificati attraverso 6 reazioni multiple di amplificazione (M1, M2, M3, M4, M5, M6) utilizzando il QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen Inc, Hilden, Germany), i termociclatori Applied Biosystems (ABI GeneAmp® PCR System 9700 or Veriti) ed il seguente programma di amplificazione: 94°C/15 min, 94°C/30 sec, 57°C/90 sec, 72°C/60 sec (45 cicli), seguito da uno step di estensione finale di 72°C/10 min. Le reazioni di amplificazione sono realizzate in un volume finale di 10 µl total che include 2 µl di DNA estratto dai campioni fecali, 5 µl del QIAGEN Multiplex PCR Kit, 1 µl di soluzione QIAGEN Q, 0.2 µl di 10 µM primer mix (forward and reverse) e RNase-free water (acqua distillata) con quantità variabili fino ad ottenere il volume finale desiderato. La regione di controllo del DNA mitocondriale viene amplificata in un volume di PCR finale di 10 µl, che include 1 o 2 µl di DNA e 0.3 pmol dei primer WDloopH254 e WDloopL (Caniglia *et al.*, 2013), utilizzando il seguente programma di amplificazione: 94°C/2 min, 94°C/15 sec, 55°C/15 sec, 72°C/30 sec (45 cicli), seguito da uno step di estensione finale di 72°C/5 min. I prodotti di amplificazione vengono purificati utilizzando il reagente Exo-Sap (Amersham) e sequenziati in entrambe le direzioni usando il kit ABI Big Dye Terminator kit ed il seguente programma di amplificazione: 96°C/10 sec, 55°C/5 sec, 60°C/4 min di estensione finale (25 cicli).

6.9.4 Identificazione della specie e degli individui con tracce di ibridazione

I genotipi *multilocus* ottenuti dall'analisi dei 12 *loci* microsatellite consentono la discriminazione tra lupo e cane, nonché l'individuazione di eventuali individui recanti tracce di ibridazione. Infatti lupo e cane possono presentare gli stessi alleli, ai *loci* studiati, ma con frequenze differenti, oppure possono essere presenti alleli privati, cioè esclusivi per l'una o l'altra popolazione. ISPRA effettua l'assegnazione dei campioni raccolti e tipizzati geneticamente alle popolazioni di lupo o di cane utilizzando un modello Bayesiano implementato nei programmi STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000, Falush *et al.*, 2003) e PARALLEL STRUCTURE (Besnier e Glover, 2013). STRUCTURE e PARALLEL STRUCTURE usano i genotipi *multilocus* per evidenziare la presenza di gruppi geneticamente distinti e contemporaneamente assegnare gli individui ai gruppi. Quindi tali software sono utilizzati per assegnare i campioni analizzati ai *loci* microsatellite ai due gruppi: "lupo" o "cane", e, nel caso di individui ibridi, ad entrambe. Questo ultimo passaggio può realizzarsi grazie al fatto che il Laboratorio BIO-CGE di ISPRA dispone di una adeguata e cospicua banca dati genetici relativa alla intera popolazione italiana di lupo e al cane, perché è importante sottolineare che tali metodi di assegnazione statistica sono affidabili solo se le popolazioni di riferimento sono ben caratterizzate geneticamente.

Informazioni aggiuntive sul livello di purezza genetica degli individui identificati possono essere ottenute verificando la presenza di varianti domestiche ai marcatori molecolari uniparentali e a quelli codificanti per il colore del mantello.

I marcatori uniparentali permettono infatti di evidenziare tracce di ibridazioni o passate introgressioni lungo la linea materna (attraverso l'analisi del DNA mitocondriale: mtDNA) e paterna (attraverso l'analisi di loci microsatellite localizzati sul cromosoma Y: Y-STR).

Infine, attraverso l'analisi di una delezione di 3 paia di basi del gene CBD103 localizzato sul cromosoma 16 dei canidi è possibile identificare la colorazione nera del mantello anche in campioni di tipo

non-invasivo, quindi anche non disponendo di informazioni fenotipiche circa gli animali cui tali campioni appartengono.

Ricetta per le amplificazioni multiple dei *loci* microsatellite utilizzando il QIAGEN Multiplex PCR Kit

MasterMIX	5,0µL
Q-SOL	1,0 µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,00
DNTPs (2.5 mM)	0,00
Taq polymerase (5 U/µL)	0,00
Primer Mix F+R (10 µM) locus1	0,20 µL
Primer Mix F+R (10 µM) locus2	0,20 µL
Primer Mix F+R (10 µM) locus3	0,20 µL
RNA-Free- H ₂ O	Until 10 µL
DNA	2

Ricetta per le amplificazioni single del DNA mitocondriale e dei *loci* microsatellite utilizzando la Taq 5 Prime ed il Buffer Advanced 10X Reaction Buffer

10X Reaction buffer	1,0 µL
BSA (0,2%)	2,0 µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,0
DNTPs (2.5 mM)	0,40 µL
Primer mix F+R (10 µM)	0,20 µL
Taq polymerase (5 U/µL)	0,05 µL
H ₂ O mQ	Until 10 µL
DNA	2 µL

LN	CH	RMS	AR	DL	M	Sequenza Forward	Sequenza Revers	Bibliografia
FH2096	CFA11	tetra	86-110	FAM	M1	CCGTCTAAGAGCCTCCCAG	GACAAGGTTTCCTGGTCCCA	Francisco <i>et al.</i> 1996
FH2137	CFA3	di	140-192	HEX	M1	ATTCCAACATGACTAGTGCCA	ATGAATTGCCCAAGTTTTG	Francisco <i>et al.</i> 1996
CPH8	CFA13	di	191-219	FAM	M1	AGGCTCACAAATCCCTCTCATA	TAGATTTGATACCTCCCTGAGTC	Fredholm & Wintero 1995
FH2004	CFA11	tetra	104-202	HEX	M2	TCATTGCCTGATACAGACTGAG	TTGAGCTTAGTACTCAAAGCATA	Francisco <i>et al.</i> 1996
CPH2	CFA32	di	88-106	FAM	M2	TTCTGTTGTTATCGGCACCA	TTCTTGAGAACAGTGCCTTCG	Fredholm & Wintero 1995
FH2079	CFA24	tetra	246-282	HEX	M3	CCG AGC ACA TGG TTT GTT TT	TGATTCTGATATGCCAGCTAA	Francisco <i>et al.</i> 1996
FH2088	CFA15	di	91-139	FAM	M3	CCCTCTGCCTACATCTCTGC	TTCATAGGGCATGCATATAACC	Francisco <i>et al.</i> 1996
K-locus	CFA16	tetra	147-151	FAM	M3	TCCGGCACGTTCTGTTTT	TTCGGCCAGTGAAGAAC	Candille <i>et al.</i> 2007
CPH4	CFA15	di	130-155	FAM	M4	ACTGGAGATGAAAAGTGAAGATT	TTACAGGGGAAAGCCTCATT	Fredholm & Wintero 1995
CPH5	CFA15	di	102-124	HEX	M4	TCCATAACAAGACCCCAAAC	GGAGGTAGGGGTCAAAAGTT	Fredholm & Wintero 1995
CPH12	CFA8	di	188-214	HEX	M5	GGC ATT ACT TGG AGG GAG	GATGATTCTATGCTTCTTTGAG	Fredholm & Wintero 1995
C09.250	CFA9	di	121-145	HEX	M5	TTAGTTAACCCAGCTCCCCCA	TCACCCTGTTAGCTGCTCAA	Ostrander <i>et al.</i> 1993
C20.253	CFA20	di	90-120	HEX	M5	AATGGCAGGATTTCTTTTGC	ATCTTTGGACGAATGGATAAGG	Ostrander <i>et al.</i> 1993
MSY34A	CFAY	di	160-190	FAM	M5	AGCCATTCTGGCCGAGTGG	GGTCCCTTTTGCCATAGTGT	Sundqvist <i>et al.</i> 2001
MSY41A	CFAY	di	90-150	HEX	M5	TCCTCTAATTTCCCTCTA	CAGACCACACTACCATCACA	Sundqvist <i>et al.</i> 2001
MSY34B	CFAY	di	167-177	HEX	M5	AGCCATTCTGGCCGAGTCC	GGTCCCTTTTGCCATAGTGT	Sundqvist <i>et al.</i> 2001
MSY41B	CFAY	di	109-137	FAM	M5	TCCTCTAATTTCCCTCTC	CAGACCACACTACCATCACA	Sundqvist <i>et al.</i> 2001
WDloopH519	mtDNA CR1		500			CGTTGCGGTCATAGGTGAG	TCCCTGACACCCCTACATTC	Fabbri <i>et al.</i> 2014
WDloopH254	mtDNA CR1		250			GTTTCTCGAGGCATGGTGAT	TCCCTGACACCCCTACATTC	Caniglia <i>et al.</i> 2013

Tabella 4. Lista dei markers utilizzati nelle analisi di genotipizzazione ISPra: loci microsatellite autosomici (CFA) e loci localizzati sul cromosoma Y (CFAY), K-locus, and regione di controllo del DNA mitocondriale (con relativa bibliografia). LN = Nome del locus; CH = numero di cromosoma; RMS = motivo del repeat (di = dinucleotide; tetra = tetranucleotide); AR = range allelico in paia di basi; DL = tipo di marcatura del primer; M = numero identificativo della reazione di amplificazione multipla.

7 SCHEDE DI RILEVAMENTO

7.1 Codici univoci per il monitoraggio del lupo in Italia

L'elevato numero di rilevatori coinvolti nel monitoraggio del lupo in Italia e l'ampiezza delle zone da monitorare, hanno reso indispensabile elaborare un criterio che renda univoco il codice da apporre su ogni scheda, anche rilevata tramite App (Capitolo 5) e identifichi senza ambiguità l'elemento corrispondente. Il criterio utilizzato nell'ambito del progetto LIFE WolfAlps, testato su larga scala dal 2013 al 2018, viene di seguito proposto su scala nazionale. Questo codice permette di generare un codice alfanumerico univoco di almeno 13 caratteri nel momento dell'archiviazione del dato, così composto:

COMPOSIZIONE DEL CODICE	LUNGHEZZA	DESCRIZIONE/FORMATO
TIPO DI DATO	1 lettera	E: escremento A: avvistamento video/fotografico di lupo C: carcassa ungulato selvatico o domestico U: campione urina S: campione saliva P: campione pelo T: traccia di lupo H: rilevamento <i>wolf-howling</i> M: ritrovamento lupo morto F: fototrappola posizionata
DATA	6 numeri	aammgg Indica la data del rilievo nel formato anno-mese-giorno

COMPOSIZIONE DEL CODICE	LUNGHEZZA	DESCRIZIONE/FORMATO
CODICE ENTE	3-4 lettere	(Codici Ente) Ad ogni Ente e Comando Stazione Carabinieri-Forestale coinvolto nel monitoraggio è assegnato un codice univoco di 3 lettere. Nel caso delle Province il codice è composto da P+sigla della Provincia.
SIGLA RILEVATORE	2 lettere	NC (Nome Cognome) Corrisponde alla sigla (in genere iniziali del nome e cognome) delle persone formate per la raccolta dati e per la compilazione delle schede individuate all'interno di ogni singolo Ente, NOS, Posto Fisso UTB e Comando Carabinieri-Forestale. La sigla deve essere univoca per ogni codice ente.
NUMERO PROGRESSIVO (nell'arco della stessa giornata)	2 numeri	A partire da 01 per il primo della giornata e poi a seguire. Riparte da 01 con una nuova DATA.

Esempio:

Secondo escremento della giornata trovato il 6/3/14 da Gianni Rossi del Parco Naturale Alpi Marittime (abbreviato EAM)

E140306EAMGR02

Primo avvistamento fotografico del 6/3/14 di Luca Bianchi del Parco Naturale Alpi Marittime (EAM)

A140306EAMLB01

Inoltre per i **codici dei transetti a scala provinciale**, questi acquisiscono un codice composto dalla sigla della Provincia di due lettere, seguito dal numero progressivo dei transetti disegnati sul territorio provinciale.

Esempio: *CN_01 per il primo transetto in provincia di Cuneo, e numeri crescenti a seguire; TO_01 per il primo transetto in provincia di Torino, e numeri crescenti a seguire.*

7.2 Schede di rilevamento dati

SCHEMA EScremento

<p>CODICE EScremento: E _____</p> <p>DATA ____ / ____ / ____</p> <p><input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO OPPORTUNISTICO</p> <p><input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO SISTEMATICO :</p> <p>Codice Transetto _____</p> <p>Se campionata lungo traccia di lupo:</p> <p>Codice Traccia su neve associata: T _____</p>	<p style="text-align: center;">STIMA DI DEPOSIZIONE</p> <p><input type="checkbox"/> fresca</p> <p><input type="checkbox"/> vecchia</p> <p><input type="checkbox"/> con matrice</p> <p><input type="checkbox"/> senza matrice (solo pelo/ossa)</p>	<p style="text-align: center;">TIPO DI PRELIEVO</p> <p><input type="checkbox"/> raccolto</p> <p><input type="checkbox"/> non raccolto</p> <p><input type="checkbox"/> campione per analisi genetica</p> <p style="text-align: center;">DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA</p> <p><input type="checkbox"/> fotografia allegata con stesso codice</p>
<p>LOCALITÀ _____ PROVINCIA _____ REGIONE _____</p> <p>Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____</p> <p>in Sistema di coordinate: UTM WGS84 (se diversa indicare: _____)</p>		
<p>NOTE _____</p> <p style="text-align: center;">RILEVATORE _____</p>		

Istruzioni per la compilazione della SCHEMA EScremento:

- **CODICE EScremento:** scrivere il codice dell'escremento come definito nel § 7.1;
- **DATA:** inserire la data del ritrovamento dell'escremento;
- **CAMPIONAMENTO:** indicare se si tratta di campionamento opportunistico o sistematico (Cap. 3); nel caso di campionamento sistematico, indicare il codice del transetto; se campionata su una traccia di lupo, indicare il codice della sessione di snow-tracking (§ 7.1);
- **STIMA DI DEPOSIZIONE:** indicare fra le opzioni disponibili quelle che meglio definiscono l'escremento in base allo stato e alla composizione;
- **TIPO DI PRELIEVO:** indicare se l'escremento è stato raccolto e se è stato prelevato il campione per l'analisi genetica;
- **DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA:** viene allegata una fotografia nominata con lo stesso codice del campione possibilmente associato a righello metrico
- **LOCALITÀ, PROVINCIA, REGIONE:** indicare il toponimo della località di ritrovamento (possibilmente indicando il Comune fra parentesi), la Provincia e la Regione;
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione aggiuntiva che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;
- **RILEVATORE:** scrivere il nome del compilatore della scheda

SCHEDA AVVISTAMENTO VIDEO/FOTOGRAFICO DI LUPO

(Codici uguali con riferimento progressivo numerico se più fotografie/video riferite ad un unico avvistamento)

CODICE AVVISTAMENTO VIDEO/FOTO: A _____	
DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA: <input type="checkbox"/> foto/video allegato con stesso codice	DATA: ____ / ____ / ____
FOTO: <input type="checkbox"/> n _____	VIDEO: <input type="checkbox"/> n _____
	ORA ____ : ____
LOCALITÀ _____	PROVINCIA _____
	REGIONE _____
Coordinata EST (E): _____	Coordinata NORD (N): _____
in Sistema di coordinate: UTM 32N WGS84 (se diversa indicare: _____)	
RILEVAMENTO TRAMITE:	
<input type="checkbox"/> AVVISTAMENTO VIDEO/FOTOGRAFICO DIRETTO: <input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO CASUALE DA TERZI VERIFICATO DA RILEVATORE FORMATO con documentazione da: <input type="checkbox"/> Cellulare Altro: _____	<input type="checkbox"/> TRAPPOLA FOTOGRAFICA: Codice Fototrappola: F _____ Se su carcassa, codice carcassa: C _____
N° INDIVIDUI AVVISTATI: _____	<input type="checkbox"/> PRESENZA FENOTIPI ANOMALI <input type="checkbox"/> PRESENZA CUCCIOLI
NOTE: _____	
RILEVATORE/VERIFICATORE _____	
OSSERVATORE _____	RECAPITO _____

Istruzioni per la compilazione della SCHEDA AVVISTAMENTO VIDEO/FOTOGRAFICO LUPO/CANIDE

I dati raccolti nella scheda derivano dall'osservazione delle immagini registrate:

- **CODICE AVVISTAMENTO VIDEO/FOTOGRAFICO:** inserire il codice dell'avvistamento video/fotografico come definito nel §7.1; nel caso di più immagini riferite allo stesso avvistamento indicare, dopo il numero progressivo, 1-n dove n è il numero delle immagini consecutive (vedi secondo esempio del § 7.1).
- **DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA:** viene allegata la foto/video nominata con lo stesso codice
- **DATA, ORA:** indicare la data e l'ora di inizio dell'osservazione fotografica. Indicare anche la durata dell'avvistamento documentato;
- **LOCALITÀ, PROVINCIA, REGIONE:** indicare il toponimo della località di ritrovamento (possibilmente indicando il Comune fra parentesi), la Provincia e la Regione;
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa
- **RILEVAMENTO TRAMITE: TRAPPOLA FOTOGRAFICA:** indicare se è stata utilizzata una trappola fotografica, e in caso indicare il codice relativo, come da cap. 7.1. **AVVISTAMENTO DIRETTO** tramite **CAMPIONAMENTO CASUALE DA TERZI VERIFICATO DA RILEVATORE FORMATO** come da protocollo al cap. 6.3. Indicare se avvenuto con foto/video da cellulare, o altro come videocamere fisse, etc.
- **N° INDIVIDUI OSSERVATI:** indicare se si tratta di un individuo singolo o di un numero di lupi osservati insieme. E indicare se sono osservati fenotipi anomali in quanto a dimensioni, colorazione, etc, e cuccioli presenti.
- **RILEVATORE/VERIFICATORE:** indicare il nome del compilatore della scheda che coincide con chi ha visualizzato le foto/video rilevate con fototrappola mentre in caso di osservazione video/fotografica ricevuta da terzi è la persona che ha confermato la veridicità del dato (cap. 6.3)
- **OSSERVATORE:** indicare il nome dell'autore delle immagini ed un eventuale recapito per maggiori informazioni.
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione addizionale che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;

SCHEDA TRACCE DI LUPO SU NEVE

CODICE TRACCE DI LUPO SU NEVE (ATTIVITA' SNOW-TRACKING): T _____		DATA ____ / ____ / ____
<input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO OPPORTUNISTICO <input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO SISTEMATICO : Codice Transetto _____ LOCALITÀ _____ PROVINCIA _____ REGIONE _____ STIMA MINIMA N° INDIVIDUI: _____ GIORNI TRASCORSI DA NEVICATA : _____ CAMPIONATI: <input type="checkbox"/> ESCREMENTI <input type="checkbox"/> CARCASSE <input type="checkbox"/> URINE CON SANGUE	RILEVAMENTO TRACCIA: <input type="checkbox"/> riportata su carta allegata <input type="checkbox"/> digitalizzata su GIS (shp nominato con stesso codice) <input type="checkbox"/> rilevata con GPS (gpx nominato con stesso codice) in Sistema di coordinate: UTM WGS84 (se diversa indicare: _____) <input type="checkbox"/> fotografia traccia allegata con stesso codice	
NOTE _____ <div style="text-align: center;"> RILEVATORE _____ </div>		

Istruzioni per la compilazione della SCHEDA SNOW-TRACKING

- **CODICE TRACCE DI LUPO SU NEVE (ATTIVITA' SNOW-TRACKING):** scrivere il codice della sessione di snow-tracking come definito nel § 6.4. Se la traccia di lupi viene ricostruita attraverso più giorni successivi di tracciatura su neve, la scheda è unica di una sola traccia;
- **DATA:** indicare la data del rilevamento del primo giorno;
- **LOCALITA', PROVINCIA e REGIONE:** indicare il principale toponimo del percorso delle tracce seguite nella sessione di snow-tracking. Indicare inoltre il Comune (fra parentesi nella località) e la Provincia/Regione;
- **CAMPIONAMENTO:** indicare se si tratta del ritrovamento della traccia tramite campionamento opportunistico o sistematico; nel caso di campionamento sistematico, indicare il codice del transetto (Cap. 3).
- **RILEVAMENTO TRACCIA:** indicare se la traccia è stata disegnata su carta o è stata digitalizzata su GIS con shape file allegato con stesso codice, o tramite GPS con traccia gpx scaricata e allegata con stesso codice;
- **SISTEMA DI COORDINATE:** indicare la proiezione cartografica e il Datum utilizzati se diverso da UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84;
- **STIMA MINIMA N° INDIVIDUI:** indicare il numero minimo certo di individui seguiti.
- **GIORNI TRASCORSI DALL'ULTIMA NEVICATA:** indicare il periodo intercorso dall'ultima nevicata nella zona;
- **CAMPIONATI: ESCREMENTI/CARCASSE/URINE CON SANGUE:** indicare il numero degli escrementi, carcasse e urine con sangue campionati lungo le tracce di lupo;
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione addizionale che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;
- **RILEVATORE:** indicare il nome del compilatore della scheda

SCHEDA CARCASSA UNGULATI SELVATICI/DOMESTICI

(OGNI SCHEDA È RIFERITA AD UN UNICO ANIMALE)

CODICE CARCASSA: C _____ DATA ____/____/____
<input type="checkbox"/> Ungulato selvatico <input type="checkbox"/> Animale domestico (attivare procedura regionale)
SPECIE: _____ ETA': _____ SESSO: _____
LOCALITÀ _____ PROVINCIA _____ REGIONE _____
Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____ in Sistema di coordinate: UTM 32N WGS84 (se diversa indicare: _____)
Se campionata lungo transetto: Codice Transetto: _____
Se campionata lungo la traccia di un lupo: Codice Traccia su neve associata: T _____
DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA: <input type="checkbox"/> fotografia carcassa allegata con stesso codice
SEGNI DI IDENTIFICAZIONE DEL LUPO: _____ _____
ESEGUITO TAMPONE DI SALIVA: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
NOTE _____ _____
_____ RILEVATORE _____

Istruzioni per la compilazione della SCHEDA CARCASSA UNGULATI SELVATICI / DOMESTICI

Ogni scheda è riferita ad un unico animale consumato:

- **CODICE CARCASSA:** inserire il codice della carcassa come indicato nel § 7.1;
- **DATA:** indicare la data del ritrovamento;
- Indicare se si tratta di un ritrovamento di carcassa avvenuto in seguito ad attività di snow-tracking, lungo una traccia di lupo (ed in questo caso indicare il codice della traccia), oppure se il ritrovamento è avvenuto lungo un transetto (indicare il codice del transetto);
- **LOCALITÀ, PROVINCIA, REGIONE:** indicare il toponimo della località di ritrovamento (possibilmente indicando il Comune fra parentesi), la Provincia e la Regione;
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa
- **DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA:** viene allegata una fotografia della carcassa nominata con lo stesso codice.
- **SPECIE, ETA', SESSO:** indicare la specie dell'animale consumato e, se possibile, l'età (o la classe di età) e il sesso;
- **SEGNI DI IDENTIFICAZIONE DEL LUPO:** indicare se nella zona sono state rinvenute tracce riconducibili al lupo e la modalità di predazione. Scrivere il numero di escrementi e urine con sangue raccolte, indicando i codici definiti corrispondenti alle rispettive schede;
- **ESEGUITO TAMPONE DI SALIVA:** indicare se è stato eseguito un tampone di saliva per le analisi genetiche,
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione addizionale che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;
- **RILEVATORE:** indicare il nome del compilatore della scheda

SCHEDA CAMPIONI BIOLOGICI PER ANALISI GENETICHE

Solo per la zona delle Regioni alpine (OGNI SCHEDA SI RIFERISCE AD UN SINGOLO CAMPIONE PRELEVATO PER LE ANALISI GENETICHE)

SCHEDA CAMPIONE URINA CON SANGUE

CODICE CAMPIONE URINA CON SANGUE: U _____ DATA ____ / ____ / ____		
CODICE TRACCIA SU NEVE associata: T _____		
LOCALITÀ _____	PROVINCIA _____	REGIONE _____
Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____ in Sistema di coordinate: UTM 32N WGS84 (se diversa indicare: _____)		
NOTE _____		
_____ RILEVATORE _____		

SCHEDA CAMPIONE TAMPONE DI SALIVA

CODICE CAMPIONE SALIVA: S _____ DATA ____ / ____ / ____		
CODICE CARCASSA Associata: C _____		
LOCALITÀ _____	PROVINCIA _____	REGIONE _____
Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____ in Sistema di coordinate: UTM 32N WGS84 (se diversa indicare: _____)		
NOTE _____		
_____ RILEVATORE _____		

SCHEDA CAMPIONE PELO CON BULBO

CODICE CAMPIONE PELO: P _____ DATA ____ / ____ / ____		
LOCALITÀ _____	PROVINCIA _____	REGIONE _____
Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____ in Sistema di coordinate: UTM 32N WGS84 (se diversa indicare: _____)		
MODALITA' RITROVAMENTO: _____		
_____ RILEVATORE _____		

Istruzioni per la compilazione della SCHEDA CAMPIONE URINA/SALIVA/PELI:

Ogni scheda è riferita ad un singolo campione prelevato per le analisi genetiche:

- **CODICE CAMPIONE URINA/SALIVA/PELI:** scrivere il codice del campione di urina/saliva/pelo come indicato nel § 7.1;
- **DATA:** indicare la data del ritrovamento;
- **CODICE TRACCIA su neve Associata (per urine) o Carcassa associata (per tampone saliva):** scrivere il codice delle tracce su neve o carcassa associata (§ 7.1) in cui è stata campionata rispettivamente l'urina o il tampone di saliva;
- **LOCALITA', PROVINCIA, REGIONE:** indicare il toponimo della località di ritrovamento (possibilmente indicando il Comune fra parentesi), la Provincia e la Regione;
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione aggiuntiva che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;
- **RILEVATORE:** indicare il nome del compilatore della scheda

SCHEMA RILEVAMENTO WOLF-HOWLING

CODICE RILEVAMENTO W-H: H _____ DATA ____ / ____ / ____ ORA ____ : ____	ULULATO: <input type="checkbox"/> spontaneo <input type="checkbox"/> indotto DURATA _____ RIPETUTO: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI n° _____
<input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO CASUALE <input type="checkbox"/> CAMPIONAMENTO SISTEMATICO : Codice Stazione W-H _____ Replica _____ LOCALITÀ _____ COMUNE: _____ PROVINCIA _____ REGIONE _____ Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____ <small>in Sistema di coordinate: UTM WGS84 (se diversa indicare: _____)</small>	
STIMA MINIMA N° INDIVIDUI: _____ <input type="checkbox"/> cuccioli presenti <input type="checkbox"/> SITO Rendezvous / tana CONDIZIONI METEO: <input type="checkbox"/> SERENO <input type="checkbox"/> VENTO <input type="checkbox"/> NEBBIA altro _____	
NOTE _____ <div style="text-align: center;">RILEVATORE _____</div>	

Istruzioni per la compilazione della SCHEMA WOLF-HOWLING:

- **CODICE RILEVAMENTO WOLF-HOWLING:** scrivere il codice del rilevamento wolf-howling come indicato nel § 7.1;
- **DATA, ORA:** indicare la data e ora di inizio del rilevamento;
- **ULULATO:** specificare se si tratta di ululato spontaneo o indotto, la durata complessiva e, nel caso di ululato ripetuto, indicarne il numero;
- in caso di **CAMPIONAMENTO SISTEMATICO** indicare il codice della stazione assegnato e il numero della replica (cap. 6.5);
- **STIMA MINIMA N INDIVIDUI:** indicare se la risposta proviene da uno o più lupi (indicare numero minimo certo) e se fra questi ci sono cuccioli; **SITO:** indicare se si è documentato il sito di rendezvous o tana;
- **CONDIZIONI METEO:** indicare se serata serena, oppure se presenza di vento o nebbia,
- **VENTO:** indicare la direzione e l'intensità del vento utilizzando una scala con valori da 1 (debole) a 4 (vento molto forte)
- **NEBBIA:** indicare l'intensità della nebbia (se presente) utilizzando una scala con valori da 1 (tenue) a 4 (molto fitta);
- **LOCALITÀ, PROVINCIA, REGIONE:** indicare il toponimo della località di ritrovamento (possibilmente indicando il Comune fra parentesi), la Provincia e la Regione;
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione addizionale che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;
- **RILEVATORE:** indicare il nome del compilatore della scheda

SCHEDA SEGNALAZIONE RITROVAMENTO LUPO MORTO

CODICE LUPO MORTO: M _____ DATA RITROVAMENTO ____ / ____ / ____ SESSO: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F ETA' : _____ PESO (kg): _____ CAUSA DI MORTE (da autopsia): _____ _____	RILEVATORI _____ _____ UPG Intervenuti: _____ ASL intervenuta e IZS di RIFERIMENTO per conferimento carcassa e autopsia: _____ _____
LOCALITÀ DI RITROVAMENTO: _____ COMUNE: _____ PROVINCIA _____ REGIONE _____ Coordinata EST (E): _____ Coordinata NORD (N): _____ <small>in Sistema di coordinate: UTM WGS84 (se diversa indicare: _____)</small>	
NOTE: _____ _____	

Istruzioni per la compilazione della SCHEDA SEGNALAZIONE RITROVAMENTO LUPO MORTO :

- **CODICE LUPO MORTO:** inserire il codice del lupo rinvenuto morto come definito nel § 7.1
- **DATA RITROVAMENTO:** indicare la data in cui la carcassa è stata ritrovata o segnalata;
- **SESSO, ETA', PESO:** indicare il sesso, il peso e l'età dell'animale;
- **RILEVATORI:** indicare il nome del compilatore della scheda intervenuto; indicare anche l' **ENTE DI APPARTENENZA**
- **LOCALITÀ DI RITROVAMENTO:** indicare il toponimo della località di ritrovamento, il Comune, la Provincia la Regione;
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa
- **MODALITÀ DI RITROVAMENTO:** descrivere brevemente come si è giunti al ritrovamento della carcassa. Indicare eventualmente se si tratta di ritrovamento autonomo o se la carcassa è stata segnalata da altri;
- **GRADO DI CONSUMO DELLA CARCASSA:** in base ai resti ritrovati, determinare il grado di consumo della carcassa;
- **UPG intervenuti:** contattare immediatamente gli ufficiali di polizia giudiziaria (UPG) referente della zona (Carabinieri Forestali, Guardiaparco di Parchi Regionali o Nazionali, Polizia Provinciale). Sarà cura delle UPG operante applicare il protocollo operativo regionale per il ritrovamento di lupi morti in caso di illecito.
- **ASL intervenuta e IZS di RIFERIMENTO per conferimento carcassa e autopsia:** contattare immediatamente l'ASL di competenza per il recupero della carcassa e l'eventuale valutazione di avvelenamento, e successivo conferimento della carcassa secondo i protocolli regionali alla IZS di competenza per autopsia;
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione addizionale che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;

SCHEDA SFORZO DI CAMPIONAMENTO FOTOTRAPPOLE

Codice Fototrappola	Coord X/Y	Data Inizio Attivazione	Data Fine Attivazione	Giorni NON funzionamento	Foto/Video di Lupo	Codice	Rilevatore
F_____	X: Y:				<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
					<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI		
NOTE:							

Istruzioni per la compilazione della SCHEDA RIASSUNTIVA DELLO SFORZO DI CAMPIONAMENTO DELLE FOTOTRAPPOLE:

Si tratta di una scheda riepilogativa da compilare mensilmente per documentare l'utilizzo delle fototrappole. Ad ogni riga corrisponde il posizionamento di una fototrappola. Tutte le volte che viene spostata, la fototrappola acquisisce un nuovo codice, sempre sviluppato seguendo le indicazioni al § 7.1.

- **CODICE FOTOTRAPPOLE:** inserire il codice della fototrappola, come da § 7.1
- **COORDINATE e SISTEMA DI COORDINATE:** indicare le coordinate in metri, utilizzando il sistema di coordinate UTM 32N (oppure 33N o 34N, a seconda delle zone d'Italia) WGS84, specificando un'altra proiezione/datum se diversa nelle note
- **Data Inizio e Fine Attivazione:** indicare la data (giorno, mese, anno) in cui è stata posizionata e rimossa la fototrappola;
- **Giorni non funzionamento:** indicare le date dei giorni precisi in cui la fototrappola non ha funzionato (ad esempio perché le batterie si sono scaricate, o la memoria piena, etc.)
- **FOTO e VIDEO di LUPO:** indicare se sono stati rilevati video o foto di lupo;
- **CODICE:** indicare il codice di ogni foto/video rilevata (si veda anche la descrizione del campo CODICE della scheda AVVISTAMENTO VIDEO/FOTOGRAFICO DI LUPO);
- **RILEVATORE:** indicare il nome di chi ha posizionato la fototrappola.
- **NOTE:** scrivere qualsiasi informazione aggiuntiva che possa essere di aiuto nell'interpretazione dei dati;

8 BIBLIOGRAFIA

- AA VV, 2013. Convivere con il lupo, conoscere per preservare. Il sistema dei Parchi nazionali dell'Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo. Relazione tecnica. Progetto Convivere con il lupo, conoscere per preservare
- Abi, N., Moradi, M., Salehi, M., Brown, J., Al-Khayat, J.A., Moltchanova, E., 2017. Application of Balanced Acceptance Sampling to an Intertidal *Survey*. *Journal of Landscape Ecology* 10, 96–107. doi:10.1515/jlecol-2017-0012
- Ancrenaz, M., Hearn, A.J., Ross, J., Sollmann, R., Wilting, A., 2012. Handbook for wildlife monitoring using camera-traps. BBEC II Secretariat.
- Aragno, P., La Morgia, V., Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Mucci, N., Genovesi P., 2019. Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo. Seconda relazione. Aprile 2019. Convenzione ISPRA-MATTM.
- Besnier, F. e Glover, K. A., 2013. Parallel Structure: a R package to distribute parallel runs of the population genetics program Structure on multi-core computers. *PLoS One* 8, e70651 (2013).
- Bassing, S. B., Ausband, D. E., Mitchell, M. S., Lukacs, P., Keever, A., Hale, G., e Waits, L., 2019. Stable pack abundance and distribution in a harvested wolf population. *Journal of Wildlife Management*, 83(3), 577–590. <https://doi.org/10.1002/jwmg.21616>
- Becker, E.F., Spindler, M.A., e Osborne, T.O., 1998. A population estimator based on network sampling of tracks in the snow. *Journal of Wildlife Management* 62:968-977.
- Bischof, R., Milleret, C., Dupont, P., Chipperfield, J., Åkesson, M., Brøseth, H., e Kindberg, J., 2019. Estimating the size of the Scandinavian wolf population with spatial capture-recapture and conversion factors. Norwegian University of Life Sciences (NMBU), MINA fagrapport 57. 80 pp. https://static02.nmbu.no/mina/publikasjoner/mina_fagrapport/pdf/mif57.pdf
- Blanco, J. C., e Cortés, Y., 2012. *Surveying wolves without snow: A critical review of the methods used in Spain*. *Hystrix*. <https://doi.org/10.4404/hystrix-23.1-4670>
- Blanc, L., Marboutin, E., Gatti, S., Zimmermann, F., e Gimenez, O., 2014. Improving abundance estimation by combining capture–recapture and occupancy data: example with a large carnivore. *Journal of Applied Ecology*, 51(6), 1733-1739.
- Boitani, L., 2000. Action plan for the conservation of wolves in Europe (*Canis lupus*). Council of Europe Publishing.
- Boitani, L. e Powell, R. A., 2012. *Carnivore Ecology and Conservation. A Handbook of techniques*. Oxford University Press.
- Boitani L. e Salvatori V., 2015. Piano di conservazione e gestione del Lupo in Italia. Prima Bozza.
- Brown, J.A., Robertson, B.L., McDonald, T., 2015. Spatially Balanced Sampling: Application to Environmental *Surveys*. *Procedia Environmental Sciences* 27, 6–9. doi:10.1016/j.proenv.2015.07.108
- Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Randi, E., 2006. Ricerca scientifica e strategie per la conservazione del lupo (*Canis lupus*) in Italia. *Quad. Cons. Natura*, 33, Min. Ambiente - ISPRA, Bologna.
- Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Randi, E., 2010. Monitoraggio della presenza del lupo (*Canis lupus*) in Emilia-Romagna tramite campionamento genetico non-invasivo. In *Atti del convegno: Ricerca*

- scientifica e strategie per la conservazione del lupo in Italia. Quad. Cons. Natura 33, Min. Ambiente –ISPRA.
- Caniglia, R., Fabbri, E., Mastrogiuseppe, L., Randi, E., 2013. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 397–404.
- Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Randi, E., 2014. Pack structure and dynamics in an expanding wolf population. *Journal of mammalogy*, 95:41–59.
- Canu, A., Mattioli, L., Santini, A., Apollonio, M., Scandura, M., 2017. “Video-scats”: combining camera trapping and non-invasive genotyping to assess individual identity and hybrid status in gray wolf. *Wildlife Biology* 2017, wlb.00355–10. doi:10.2981/wlb.00355
- Chandler, R.B., Royle, J.A., 2013. Spatially explicit models for inference about density in unmarked or partially marked populations. *Ann. Appl. Stat.* 7, 936–954. doi:10.1214/12-AOAS610
- Chapron, G., Wikenros, C., Liberg, O., Wabakken, P., Flagstad, O., Milleret, C., Sand, H., 2016. Estimating wolf (*Canis lupus*) population size from number of packs and an individual based model. *Ecological Modelling*, 339, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.08.012>
- Ciucci, P., e Boitani, L., 2011. Il monitoraggio del lupo (*Canis lupus*) in Italia: Inquadramento, finalità, obiettivi. Università la Sapienza, Roma.
- Ciucci, P., 2012. Ibridazione con il cane come minaccia per la conservazione del lupo: status delle conoscenze e criteri per l’identificazione degli ibridi. LIFE10 NAT/IT/265 IBRIWOLF. Relazione tecnica. Azione A2 – Messa a punto delle migliori strategie per l’identificazione degli ibridi.
- Ciucci, P., Genovesi P. e Guberti, V., 2002. Linee guida per il monitoraggio del lupo. Pages 77-88. Quaderni di Conservazione della Natura n. 13.
- Ciucci, P., e Boitani L., 2011. Il monitoraggio del lupo (*Canis lupus*) in Italia: inquadramento, finalità e obiettivi. Università La Sapienza, Roma.
- Claire, K., Nathalie, C.-M., Noëlle, B., Frank, D., 2019. Optimizing cost-efficiency of long term monitoring programs by using spatially balanced sampling designs: The case of manila clams in Arcachon bay. *Ecological Informatics* 49, 32–39. doi:10.1016/j.ecoinf.2018.11.005
- Cochran, W.G., 1977. Sampling techniques. Third edition. John Wiley and Sons, New York, New York, USA.
- Cubaynes, S., Pradel, R., Choquet, R., Duchamp, C., Gaillard, J., Lebreton, J.M., Marboutin, E., Miquel, C., Reboulet, A., Poillot, C., Taberlet, P., e Gimenez, O., 2010. Importance of Accounting for Detection Heterogeneity When Estimating Abundance: the Case of French Wolves. *Conservation Biology* 24:621-626.
- Duchamp, C., Boyer, J. , Briaudet, P.-E., Leonard, Y., Moris, P., Bataille, A., Dahier, T., Delacour, G., Millisher, G., Miquel, C., Poillot, C., e Marboutin, E., 2012. A dual frame *survey* to assess time– and space–related changes of the colonizing wolf population in France. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 23:14-28.
- Duchamp, C., Chapron, G., Gimenez, O., Robert, A., Sarazin, F., Beudel-Jamar, R., e Le Maho, Y. (2017). Expertise collective scientifique sur la viabilité et le devenir de la population de loups en France à long terme : démarche d’évaluation prospective à l’horizon 2025/2030 et viabilité à long terme. Paris, France. 92pp.

- Erb, J., Humpal, C., e Sampson, B., 2019. Distribution and abundance of wolves in Minnesota, 2017-18, Minnesota Department of Natural Resources, St. Paul.
- Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J.-M., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P., e Randi, E., 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology* 16:1661-1671.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.
- Francisco, L.V., Langston, A.A., Mellersh, C.S., Neal, C.L., Ostrander, E.A., 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7, 359-362.
- Fredholm, M., Winterø A.K., 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome*, 6, 11-18.
- Fumagalli, L. e Stoffel, C. 2013. Individual genetic monitoring: how to compare microsatellite data among different labs. *Proceedings in 7th WAG Workshop, 19th-20th March 2013, Jausiers, France.*
- Galaverni, M., Palumbo, D., Fabbri, E., Caniglia, R., Greco, C., Randi, E., 2012. Monitoring wolves (*Canis lupus*) by non-invasive genetics and camera trapping: a small-scale pilot study. *Eur J Wildl Res* 58, 47–58. doi:10.1007/s10344-011-0539-5
- Galaverni, M., Caniglia, R., Fabbri, E., Milanese, P. e Randi, E., 2016. One, no one, or one hundred thousand: how many wolves are there currently in Italy? *Mammal Research*, 61: 13-24. doi 10.1007/s13364-015-0247-8
- Garcia-Muro, E., Aznar M.P., Rodellar, C., Zaragoza, P., 1997. Sex specific PCR/RFLPs in the canine ZFX/ZFY loci. *Animal Genetics*, 28, 156.
- Genovesi, P., 2002. Piano d'azione nazionale per la conservazione del Lupo (*Canis lupus*).
- Genovesi, P., 2006. Manuale per il monitoraggio del lupo. Documento interno. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, INFS.
- Grafström, A., Matei, A., 2018. Spatially Balanced Sampling of Continuous Populations. *Scand J Statist* 45, 792–805. doi:10.1111/sjos.12322
- Guarte, J. e Barrios, E. 2006. Estimation Under Purposive Sampling. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*. 35. 277-284. doi 10.1080/0361091060059161
- Horne, J.S., Ausband, D.E., Hurley, M.A., Struthers, J., Berg, J.E., Groth, K., 2018. Integrated population model to improve knowledge and management of Idaho wolves. *Journal of Wildlife Management*. <https://doi.org/10.1002/jwmg.21554>
- Inman, B., Podruzny, K., Smucker, T., Nelson, A., Ross, M., Lance, N., Parks, T., Boyd, D., e Wells, S., 2019. Montana Gray Wolf Conservation and Management 2018 Annual Report. Montana Fish, Wildlife & Parks. Helena, Montana. 77 pages. Montana Fish, Wildlife and Parks. 2018. Montana Gray Wolf Conservation and Management. 2017 Annual Report. Montana Fish, Wildlife & Parks. Helena, Montana. 87 pages. <http://fwp.mt.gov/fishAndWildlife/management/wolf/>
- Jiménez, J., García, E. J., Llaneza, L., Palacios, V., López-bao, J. V., 2018. Multimethod , multistate Bayesian hierarchical modeling approach for use in regional monitoring of wolves, 1–23. <https://doi.org/10.1111/cobi.12685>

- Kaczensky, P., Kluth, G., Knauer, F., Rauer, G., Reinhardt, I., e Wotschikowsky, U., 2009. Monitoring of large carnivores in Germany. BfN-Skripten 251. <https://doi.org/10.1111/cobi.1268>
- Koen, E.L., Ray, J.C., Bowman, J., Dawson, F.N., e Mgoun A.J., 2008. *Surveying and monitoring wolverines in Ontario and other lowland, boreal forest habitats: Recommendations and protocols*. Ont. Min. Natur. Resour., Northwest Sci. and Info. Thunder Bay, Ont. NWSI Field Guide FG-06 94
- Latham, M.C., Latham, A.D.M., Webb, N.F., Mccutchen, N.A., Boutin, S., 2014. Can Occupancy–Abundance Models Be Used to Monitor Wolf Abundance? PLoS ONE 9, e102982–9. doi:10.1371/journal.pone.0102982
- Linnell, J. D. C., Salvatori, V., e 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., Gimenez, O., 2017. Mapping and explaining wolf recolonization in France using dynamic occupancy models and opportunistic data. *Ecography*. <https://doi.org/10.1111/ecog.02874>
- Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L., Randi, E., 2002. Non-invasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11, 857-868.
- MacKenzie, D.I., Nichols, J.D., Royle, J.A., Pollock, K.H., Bailey, L.L. e Hines, J.E., 2006. *Occupancy estimation and modeling: inferring patterns and dynamics of species occurrence*. Elsevier, San Diego, California, USA.
- Manghi, L., Tosoni, E., Masi, M., 2012. Progetto LIFE IBRIWOLF. Relazione tecnica Azioni A3-A4. Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Università di Roma "La Sapienza."
- Manly, B.F.J., 2004. Two-phase adaptive stratified sampling, in: Thompson, W.L. (Ed.), *Sampling Rare or Elusive Species*. Island Press, pp. 123–133.
- Manly, B.F.J., 2004. Using the bootstrap with two-phase adaptive stratified samples from multiple populations at multiple locations. *Environmental and Ecological Statistics* 11, Issue 4, pp 367–383.
- Marucco, F., Pletscher, D.H., Boitani, L., Schwartz, M.K., Pilgrim, K.L. e 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., Boitani, L., Pletscher, D. e Schwartz, M. K., 2011. Bridging the gaps between non-invasive genetic sampling and population parameter estimation. *European Journal of Wildlife Research* 57:1-13. doi 10.1007/s10344-010-0477-7
- Marucco, F., Vucetich, L.M., Peterson, R.O., Adams, J.R., Vucetich, J.A., 2012. Evaluating the efficacy of non-invasive genetic methods and estimating wolf survival during a ten-year period. *CONSERVATION GENETICS*, vol. 13, p. 1611-1622, ISSN: 1566-0621, doi: 10.1007/s10592-012-0412-4
- Marucco, F., Avanzinelli, E., Boitani, L., 2012. Non-invasive Integrated Sampling Design to Monitor the Wolf Population in Piemonte, Italian Alps. *HYSTRIX*, vol. 23, p. 5-13, ISSN: 0394-1914, doi: 10.4404/hystrix-23.1-4584
- 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., 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., Avanzinelli, E., Bassano, B., Bionda, R., Bisi, F., Calderola, S., Chioso, C., Fattori, U., Pedrotti, L., Righetti, D., Rossi, E., Tironi, E., Truc, F., Pilgrim, K., 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.
- Mattioli, L., Canu, A., Passilongo, D., Scandura, M., Apollonio, M., 2018. Estimation of pack density in grey wolf (*Canis lupus*) by applying spatially explicit capture-recapture models to camera trap data supported by genetic monitoring 1–15. doi:10.1186/s12983-018-0281-x
- McDonald, L.L., 2004. Sampling rare populations. In W.L. Thompson (Ed.), Sampling rare and elusive species. Island Press, Washington, DC, pp. 11-42.
- Meriggi, A., Milanese, P., Schenone, L., Signorelli, D., Serafini, M., Torretta, E., Puopolo, F., Zanzottera, M., Magliano, M., Imbert, C., Caniglia, R., Fabbri, E., Randi, E., 2013. Status ed ecologia del lupo in Liguria. Dal monitoraggio alla gestione dei conflitti. Regione Liguria, Parco Naturale Regionale dell'Antola, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Terra (D.S.T.A.), Università di Pavia, Laboratorio di Genetica.
- Miller, D. A., Pacifici, K., Sanderlin, J. S., e Reich, B. J., 2019. The recent past and promising future for data integration methods to estimate species' distributions. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(1), 22-37.
- Molinari-Jobin, A., Kéry, M., Marboutin, E., Molinari, P., Koren I., Fuxjäger C., Breitenmoser-Würsten C., Wölfl, S., Fasel, M., Kos, I., Wölfl, M., Breitenmoser, U., 2012. Monitoring in the presence of species misidentification: the case of the Eurasian lynx in the Alps. *Animal Conservation* (early view) doi:10.1111/j.1469-1795.2011.00511.x
- Molinari-Jobin, A., Kery, M., Marboutin, E., Marucco F., Zimmermann, F., Molinari, P., Frick, H., Fuxjager, C., Wolf, S., Bled, F., Breitenmoser-Wursten, C., Kos, I., Wolf, M., Cerne, R., Muller, O., Breitenmoser, U., 2017. Mapping range dynamics from opportunistic data: spatiotemporal modelling of the lynx distribution in the Alps over 21 years. *ANIMAL CONSERVATION*, ISSN: 1367-9430, doi: doi:10.1111/acv.12369
- Moeller, A.K., Lukacs, P.M., Horne, J.S., 2018. Three novel methods to estimate abundance of unmarked animals using remote cameras. *Ecosphere* 9, e02331–15. doi:10.1002/ecs2.2331
- Nichols, J. D., e K. Williams. 2006. Monitoring for conservation. *Trends in Ecology e Evolution* 21:668-673.
- Pagliarella, M.C., Corona, P., Fattorini, L., 2017. Spatially-balanced sampling versus unbalanced stratified sampling for assessing forest change: evidences in favour of spatial balance. *Environmental e Ecological Statistics* 25, 111–123. doi:10.1007/s10651-017-0378-y
- Peakall, R. e Smouse, P.E., 2012 GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching e research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Pollock, K.H., Nichols, J.D., Simons, T.R., Farnsworth, G.L., Bailey, L.L., Sauer, J.R., 2002. Large scale wildlife monitoring studies: statistical methods for design e analysis. *Environmetrics*, Volume 13, Issue2, Pages 105-119.

- Reinhardt, I., Kluth, G., Nowak, S., Myslajek, R.W., 2015. Steards for the monitoring of the Central European wolf population in Germany e Pole. Bundesamt für Naturschutz (BfN), Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany.
- Rich, L.N., Russell, R.E., Glenn, E.M., Mitchell, M.S., Gude, J.A., Podruzny, K.M., Sime, C.A., Laudon, K., Ausbe, D.E., Nichols, J.D., 2013a. Estimating occupancy e predicting numbers of gray wolf packs in Montana using hunter *surveys*. *The Journal of Wildlife Management* 77, 1280–1289. doi:10.1002/jwmg.562
- Ricci S., Salvatori, V., P. Ciucci, P., 2018. Assessment of wolf presence in Province of Grosseto. LIFE MEDWOLF technical report for action D4. Istituto di Ecologia Applicata, Rome.
- Robertson, B.L., Brown, J.A., McDonald, T., Jaksons, P., 2013b. BAS: Balanced Acceptance Sampling of Natural Resources. *Biometrics* 69, 776–784. doi:10.1111/biom.12059
- Robertson, B.L., McDonald, T., Price, C.J., Brown, J.A., 2017. A modification of balanced acceptance sampling. *Statistics e Probability Letters* 129, 107–112. doi:10.1016/j.spl.2017.05.004
- Robertson, B., McDonald, T., Price, C., Brown, J., 2018. Halton iterative partitioning: spatially balanced sampling via partitioning. *Environmental e Ecological Statistics* 25, 305–323. doi:10.1007/s10651-018-0406-6
- Royle JA, Cheler RB, Sollman R, Gardner B. 2014. *Spatial Capture-Recapture*. Elsevier, Inc.
- Rovero, F. e Zimmerman, F., 2016. *Camera Trapping for Wildlife Research*. Pelagic Pub Ltd Editor. 293 pp.
- Salvatori V, C. Braschi, L. Boitani. R. Godinho e P. Ciucci. 2019. High levels of recent wolf x dog introgressive hybridization in agricultural lescapes of Central Italy. *European Journal of Wildlife Research*. doi.org/10.1007/s10344-019-1313-3.
- Santini, L., Salvatori, V., Boitani, L., 2015. Metodo di stima della distribuzione e abbondanza del lupo in Italia. Appendice 1 al Piano di Conservazione e Gestione del Lupo in Italia (a cura dell’Unione Zoologica Italiana).
- Santostasi, N.L., Ciucci, P., Caniglia, R., Fabbri, E., Molinari, L., Reggioni, W., Gimenez, O., 2019. Use of hidden Markov capture–recapture models to estimate abundance in the presence of uncertainty: Application to the estimation of prevalence of hybrids in animal populations. *Ecology e Evolution*. doi.org/10.1002/ece3.4819
- Stevens, D.L., Jr., Olsen, A.R., 2004. Spatially Balanced Sampling of Natural Resources. *Journal of the American Statistical Association* 99, 262–278. doi:10.1198/016214504000000250
- Thompson, W.L., White, G.C., Gowan, C. 1998. *Monitoring vertebrate populations*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Thompson W.L., (ed.) 2004. *Sampling rare or elusive species, concepts, designs e techniques for estimating population parameters*. Isle Press, Washington DC.
- Thompson, S.K., 2012. *Sampling*. John Wiley & Sons.
- Torretta, E., Serafini, M., Imbert, C., Milanesi, P., Meriggi, A., 2017. Wolves e wild ungulates in the Ligurian Alps (Western Italy): prey selection e spatial-temporal interactions. *Mammalia* 81, 537–551.
- Valière N., 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2, 377-379.
- Van Dam-Bates, P., Gansell, O., Robertson, B., 2018. Using balanced acceptance sampling as a master sample for environmental *surveys*. *Methods Ecol Evol* 9, 1718–1726. doi:10.1111/2041-210X.13003

- Velli, E., Fabbri, E., Galaverni, M., Mattucci, F., Mattioli, L., Molinari, L., Caniglia, R., 2019. Ethanol versus swabs: what is a better tool to preserve faecal samples for non-invasive genetic analyses? *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 30:24-29.
- Williams, B.K., Nichols, J.D., Conroy, M. J., 2002. *Analysis e management of animal populations*. Academic Press, San Francisco.
- WAG (Wolf Alpine Group), 2014. Wolf population status in the Alps: pack distribution e trend in 2012. Available at <http://www.lcie.org>.
- WAG (Wolf Alpine Group), 2018. Wolf population status in the Alps: pack distribution e trend in 2015-2016. Available at <http://www.lcie.org>

APPENDICI

APPENDICE 1: Rapporti tecnici sul monitoraggio del lupo in Italia

Italia

- AA.VV., 2010. Atti del convegno "Lupi, genti e territori". Torino, 24-26 maggio 2010.
- AA.VV., 2013. Improving the Conditions for Large Carnivore Conservation: a transfer of best practices. Final report. Annex XXIV. Report of action E5. LIFE 07/NAT/IT/000502 EXTRA. Final report.
- Fabrizio M., D'Amico S., Lucci V. (a cura di) 2010. Atti del convegno "Bentornato lupo: convegno sul lupo appenninico". 23 agosto 2008 - Pettorano sul Gizio (AQ). I quaderni del Centro Studi per le Reti Ecologiche. Volume 2: 36 pp.
- Grottoli L., Molinari L., Baldi A., Canestrini M., 2011. Monitoraggio del lupo su neve nell'Appennino Tosco-Emiliano: rilevamento estensivo in simultanea marzo 2011. Sintesi e risultati dell'attività.

Alpi

- 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., 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., Avanzinelli E., Bassano B., Bionda R., Bragalanti N., Calderola S., Chioso C., Martinelli L., Fattori U., Pedrotti L., Righetti D., Tironi E., Truc F., 2017. Lo Status della popolazione di lupo sulle Alpi Italiane 2014-2016. Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4.
- Marucco F., Avanzinelli E., Bassano B., Bionda R., Bisi F., Calderola S., Chioso C., Fattori U., Pedrotti L., Righetti D., Rossi E., Tironi E., Truc F., e Pilgrim K., 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.

Appennino meridionale

- AA.VV., 2013. Convivere con il lupo, conoscere per preservare. Il sistema dei Parchi nazionali dell'Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo. Relazione tecnica.
- AA.VV., 2016. Convivere con il lupo conoscere per preservare. Il sistema dei Parchi nazionali dell'Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo. Relazione finale.
- Sorino R., Gaudiano L., Bartolomei R., Caniglia R., Correro G., Crispino F., Fabbri E., Fava V., Frassanito A.G., Gervasio G., Nicoletti A., Provenzano M., Raimondi S., Rei E., Sangiuliano A., Sgroso S., Serroni P., Siclari A., Strizzi C., Troisi S., 2013. Convivere con il lupo, conoscere per preservare. La tutela del lupo nell'Appennino meridionale.

Abruzzo

- Antonucci A. et al (fauna), 2013. Piano di Gestione dei Siti Natura 2000. Parco Nazionale della Majella.
- AAVV, 2014. Piano di Gestione SIC e ZPS del Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga.
- Ciucci P., Boitani L., 2010. Conservation of large Carnivore in Abruzzo. A Research Program integrating Species, Habitat e Humane Dimension. Annual report 2009.
- Di Marzio et al, 2015. Mammalofauna. In Piano di Gestione del SIC "Lecmeta Litoranea di Torino di Sangro e Foce del Fiume Sangro". Regione Abruzzo.
- Di Nino O., Morini P., Logiudice L., 2014. Fauna. In Piano di Gestione SIC e ZPS del Parco Naturale Regionale Sirente Velino. Regione Abruzzo.
- Grottoli L., 2011. Assetto territoriale ed ecologia alimentare del lupo (*Canis lupus*) nel Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise. Tesi di dottorato. In Sulli et al, 2015. Piano di Gestione dei Siti Natura 2000 del Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise. Mammiferi.
- Masciovecchio et al, 2014. Monitoraggio del Lupo. In Piano di Gestione del SIC "Lago di Serranella e Colline di Guarenna". Regione Abruzzo.
- Masciovecchio et al, 2014. Monitoraggio del Lupo. In Piano di Gestione del SIC "Monte Pallano e Lecmeta di Isca d'Archi". Regione Abruzzo.
- Pinchera F. e Pellegrini M., 2015. Mammalofauna. In Piano di Gestione del SIC "Monte Silvano". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2014. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Monte Sorbo (Monti Frentani)". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2014. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Monti Frentani e Fiume Treste". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2015. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Bosco di Mozzagrogna (Sangro)". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2015. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Calanchi di Bucchianico (Ripe dello Spagnolo)". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2015. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC " Fiume Tordino (medio corso)". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2014. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Gineprete a Juniperus macrocarpa e Gole del Torrente Rio Secco". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2015. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Fiume Trigno (medio e basso corso)". Regione Abruzzo.
- Pellegrini M. e Pinchera F., 2014. Aspetti faunistici. In Piano di Gestione del SIC "Abetina di Rosello e Cascate del Rio Verde". Regione Abruzzo.

Basilicata

- Bartolomei R., Sgrosso S., 2013. Convivere con il lupo conoscere per preservare. Il sistema dei Parchi nazionali dell'Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo. Parco Nazionale Appennino Lucano Val D'Agri Lagonegrese. Relazione finale.

Rizzardini G., Quinto F., 2014. Il lupo nel Materano: Censimento e stima della popolazione di *Canis lupus* nell'area della Provincia di Matera. Report 2013 – 2014.

Rizzardini G., Quinto F., 2016. Il lupo nel Materano. Report finale 2013-2015. Progetto: “ Il lupo nel materano: Censimento e stima della popolazione di *Canis lupus* nell'area della Provincia di Matera”

Calabria

Bremayr et al, 2017. PAN LIFE - NATURA 2000 ACTION PROGRAMME - LIFE13 NAT/IT/001075. Protocolli di Monitoraggio della Rete Natura 2000 in Calabria. Marzo 2017, versione 1.0

Gervasio G., Crispino F., Scaravelli D., Priori P., 2019. Servizi tecnico-scientifici finalizzati al monitoraggio ambientale. Servizio 2 - macro e micro mammiferi, micro Chiroteri. Report Parco Nazionale della Sila. Soc. Coop. Greenwood

Siclari A., Ciuti F., 2019. Relazione sull'attività di monitoraggio 2018. Progetto Convivere con il lupo, Conoscere per Preservare, Ente Parco Nazionale dell'Aspromonte

Siclari A., 2016. CONVIVERE CON IL LUPO, CONOSCERE PER PRESERVARE. Il sistema dei Parchi nazionali dell'Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo. RELAZIONE SUL TRIENNIO DI RACCOLTA DATI(2013-2016)

Siclari A., Ciuti F., 2018. CONVIVERE CON IL LUPO, CONOSCERE PER PRESERVARE. Il sistema dei Parchi nazionali dell'Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo RELAZIONE SULL' ATTIVITA' DI MONITORAGGIO 2013-2018.

Tripepi S., Crispino F., Gervasio G., Giardinazzo E., Barca A., 2008. Monitoraggio del lupo nel Parco Nazionale dell'Aspromonte. <http://www.parcoaspromonte.gov.it/studi-e-ricerche/> (consultabile online).

Campania

Fulgione D. (a cura di), 2017. Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni. Rapporto Lupo 2017.

Emilia Romagna

AA.VV., 2004. LIFE 00NAT/IT/7214 LUPO 2000 “Azioni di conservazione del lupo in 10 SIC di tre parchi della Regione Emilia-Romagna”. Rapporto finale.

Rei E., Caniglia R., Fabbri E., Galaverni M., Greco C., Milanese P., Zanni M.L., 2012. Il lupo in Emilia-Romagna. Strategie di convivenza e gestione dei conflitti.

Friuli Venezia-Giulia

Fattori U., Rucli A., Zanetti M. (a cura di), 2010. Grei carnivori ed ungulati nell'area confinaria italo-slovena. Stato di conservazione. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, seconda edizione rivista, Udine: 1-80.

Lazio

- Adriani S., Bellezza P., Bonanni M., Cavagnuolo L., Di Biagio M., Di Loreto A., Felici G., Mazzilli A., Morelli E., Rossi L., Ruscitti V., Sacco L., Sterpi L., Valentini A., Amici A., 2016. Monitoring program of wolf (*Canis lupus*) in the areas of natural reserve of laghi Lungo e Ripasottile e in the mountain of Rieti.
- Ciucci P. (a cura di), 2012. Monitoraggio e gestione del lupo in provincia di Roma. Provincia di Roma – Servizio Aree Protette e Parchi Naturali. Dipartimento IV.
- Guj I, 2008. Piano di monitoraggio del lupo (*Canis lupus*) nel Parco Naturale Regionale dei Monti Simbruini. Parco Naturale Regionale dei Simbruini.

Liguria

- Ciuffardi L., Cottalasso R., 2018. Attività di monitoraggio della presenza del lupo (*Canis lupus* linnaeus, 1758) sul territorio dell’A.T.C. Genova 2 Levante. Risultati dell’attività svolta nel periodo Settembre 2017 – Gennaio 2018.
- Meriggi A., Milanese P., Schenone L., Signorelli D., Serafini M, Torretta E., Puopolo F., Caniglia R., Fabbri E., Rei E., 2015. La presenza del lupo in Liguria : approccio integrato per la gestione dei conflitti.
- Meriggi A., Milanese P., 2008. Distribuzione e stato del lupo (*Canis lupus*) in Liguria.
- Meriggi A., Milanese P., Schenone L., Signorelli D., Serafini M, Torretta E., Puopolo F., Zanzottera M., Magliano M., Imbert C., Caniglia R., Fabbri E., Rei E. 2013. Status ed ecologia del lupo in Liguria. Dal monitoraggio alla gestione dei conflitti.

Lombardia

- Righetti D., Bisi F., Carlini E., Pedrotti L., Rossi E., Tironi E. e Marucco F., 2018. Lo Status del lupo sulle Alpi lombarde 2014-2018. Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4 e D1.
- Meriggi A., Milanese P., Crotti C., Mazzoleni L., 2011. Monitoraggio dei grandi predatori nel parco delle Orobie Bergamasche.
- Torretta E., Binetti C., Meriggi A., 2018. LIFE GESTIRE 2020 Nature Integrated Management to 2020. Azione A16 – Strategia regionale sui grandi carnivori. Distribuzione, dieta e impatto del lupo sulla zootecnica e previsione del rischio di predazione nell’Appennino Pavese.
- Torretta E., Meriggi A., 2018. LIFE GESTIRE 2020 Nature Integrated Management to 2020. Azione A16 - Monitoraggio della presenza del lupo nell'Appennino.

Marche

- Giacchini P., Scotti M., Zabaglia C. (a cura di), 2012. Il lupo nelle Marche. Ieri, oggi..... e domani? Regione Marche, Assessorato Ambiente.

Piemonte

- Marucco F., Avanzinelli E., Dalmaso S., Tropini A., 2005. Progetto Lupo - Regione Piemonte. “Il lupo in Piemonte: azioni per la conoscenza e la conservazione della specie, per la prevenzione dei danni al

bestiame domestico e per l'attuazione di un regime di coesistenza stabile tra lupo ed attività economiche". Report 2005.

Marucco F., Avanzinelli E., Orleo L., Dalmaso S., Tropini A., 2007. Progetto Lupo - Regione Piemonte. "Il lupo in Piemonte: azioni per la conoscenza e la conservazione della specie, per la prevenzione dei danni al bestiame domestico e per l'attuazione di un regime di coesistenza stabile tra lupo ed attività economiche". Rapporto 2007 (Risultati dell'attività svolta nel periodo 1999 – 2007).

Marucco F., Avanzinelli E., Orleo L., Dalmaso S., Tropini A., 2009. Progetto Lupo - Regione Piemonte. "Il lupo in Piemonte: azioni per la conoscenza e la conservazione della specie, per la prevenzione dei danni al bestiame domestico e per l'attuazione di un regime di coesistenza stabile tra lupo ed attività economiche". Report 2009

Marucco, F., E. Avanzinelli, S. Dalmaso, L. Orleo, 2010. Progetto Lupo - Regione Piemonte. Rapporto 1999-2010.

Marucco F., Avanzinelli E., 2011. Progetto Lupo - Regione Piemonte. Stato, distribuzione, e dimensione della popolazione di lupo in Regione Piemonte. Il Monitoraggio del lupo - Aggiornamento inverno 2010-2011.

Marucco F., e E. Avanzinelli, 2018. Lo status del lupo in Regione Piemonte 2014-2018. Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione A4 e D1.

Puglia

Frassanito A.G., 2011. Quaderno di Campo n.3. Il lupo nel Parco Nazionale dell'Alta Murgia.

Gaudiano L, Sorino R., Corroero G., Frassanito A.G., Strizzi C., Notarnicola G., 2016. Stato delle conoscenze del lupo in Puglia.

Gaudiano L., Pinto R., Chiatante G., Grassi G., Chiatante P., de Bellis S., 2019. Monitoraggio della popolazione di lupo (*Canis lupus*) nel Parco Naturale Regionale Terra delle Gravine. Progetto "Uppark! Strategie di rete per il Parco Terra delle Gravine" del WWF Trulli e Gravine. Beo Ambiente 2015 di Fondazione con il Sud.

Marzano G, Crispino F., Ruge M, Gervasio G., 2017. The Wolf, *Canis lupus* Linnaeus, 1758 (Mammalia Canidae): re-colonization is still ongoing in Southern Italy: a breeding pack documented through camera traps in the Salento Peninsula.

Toscana

Apollonio M. (coordinatore), 2016. Attività di monitoraggio del lupo in Toscana.

Apollonio M., Mattioli L. (a cura di), 2006. Il lupo in provincia di Arezzo.

Ciuti F., 2015. Il monitoraggio del lupo nella provincia di Pistoia. Anno 2015. Relazione finale.

Gallo O., Pagliaroli D., Zingaro M., 2015. Valutazione ex post della presenza di canidi vaganti (lupi, ibridi e cani reagi) nella Provincia di Grosseto. Azione E2. Progetto LIFE IBRIWOLF LIFE10NAT/IT/265.

Gazzola A., Viviani A. (a cura di), 2006. Indagine sulla presenza storica e attuale del lupo in Toscana. Regione Toscana.

Gazzola A., Zingaro M., Geolfi M., 2013. Indagine conoscitiva sulla presenza del lupo nell'area del Monte Amiata tramite la tecnica dell'ululato indotto. Relazione finale. Progetto LIFE+10NAT/IT/265 IBRIWOLF.

Manghi L., Tosoni E., Masi M., 2012. LIFE+10NAT/IT/265 IBRIWOLF. Relazione tecnica AZIONI A3-A4.

Ricci S., Salvatori V., Ciucci P., 2018. Indagine sulla presenza del lupo in provincia di Grosseto. Progetto LIFE MEDWOLF. Istituto di Ecologia Applicata, Roma.

Trentino

Groff C., Angeli F., Asson D., Bragalanti N., Pedrotti L., Rizzoli R., Zanghellini P. (a cura di), 2018. Rapporto Grey carnivori 2017 del Servizio Foreste e fauna della Provincia Autonoma di Trento.

Groff C., Angeli F., Asson D., Bragalanti N., Pedrotti L., Zanghellini P. (a cura di), 2019. Rapporto Grey carnivori 2018 del Servizio Foreste e fauna della Provincia autonoma di Trento.

Veneto

Avanzinelli E., Calderola S., Giombini V. e Marucco F., 2018. Lo Status del lupo in Veneto 2014- 2018. Relazione tecnica, Progetto LIFE 12 NAT/IT/00080 WOLFALPS – Azione D1.

APPENDICE 2: criteri applicati per l'aggiornamento della carta di distribuzione da dati pregressi

REGIONE-ZONA-AREA PROTETTA	REFERENTE-PUBBLICAZIONE	PRESENZA STABILE (A)	PRESENZA SPORADICA (B)
Toscana	Massimo Scandura - Apollonio M. (coordinatore), 2016. Attività di monitoraggio del lupo in Toscana.	Celle in cui è stata documentata la riproduzione o sono stati rilevati segni di presenza per almeno 3 anni da 2013 a 2019. Oppure cella coperta per almeno metà della sua estensione dal territorio di un branco	Celle in cui è stato rilevato almeno un segno di presenza. Oppure cella interessata parzialmente dal territorio di un branco
Toscana – Alpi Apuane	Emanuele Guazzi – shapefile dei branchi	Cella coperta per almeno metà della sua estensione dal territorio di un branco	Cella coperta solo parzialmente dal territorio di un branco
Lazio	Luciana Carotenuto	Celle in cui è stata documentata la riproduzione o sono stati rilevati segni di presenza per almeno 3 anni da 2013 a 2019	Celle in cui è stato rilevato almeno un segno di presenza
Abruzzo - SIC	Francesco Pinchera	Cella interessata da un SIC in cui è stata rilevata la riproduzione tramite wolf-howling o è stato individuato un sito di rendez vous nel periodo 2013-2019	Celle in cui è stato rilevato almeno un segno di presenza

REGIONE-ZONA-AREA PROTETTA	REFERENTE-PUBBLICAZIONE	PRESENZA STABILE (A)	PRESENZA SPORADICA (B)
Abruzzo – Sirente Velino	Paola Morini	Celle in cui è stata documentata la riproduzione o sono stati rilevati segni di presenza per almeno 3 anni da 2013 a 2019	Celle in cui è stato rilevato almeno un segno di presenza
Puglia	Lorenzo Gaudio - Gaudio L, Sorino R., Corro G., Frassanito A.G., Strizzi C., Notarnicola G., 2016. Stato delle conoscenze del lupo in Puglia.	Celle in cui è stata documentata la riproduzione o sono stati rilevati segni di presenza per almeno 3 anni da 2015 a retrocedere.	Celle in cui non sono mai stati documentati eventi riproduttivi, ma presenza stabile di nuclei o individui solitari. Celle con presenza di individui solitari e/o dispersivi documentata sporadicamente (documentata tramite carcasse o predazioni)
Puglia - Salento	Marzano G, Crispino F., Ruge M, Gervasio G., 2017. The Wolf, <i>Canis lupus</i> Linnaeus, 1758 (Mammalia Canidae): re-colonization is still ongoing in Southern Italy: a breeding pack documented through camera traps in the Salento Peninsula.	Celle in cui è stata documentata la riproduzione (foto di cucciolo)	Celle in cui è stato rilevato almeno un segno di presenza (foto)

REGIONE-ZONA-AREA PROTETTA	REFERENTE-PUBBLICAZIONE	PRESENZA STABILE (A)	PRESENZA SPORADICA (B)
Basilicata - Matera	Rizzardini G., Quinto F., 2016. Il lupo nel Materano. Report finale 2013-2015. Progetto: “ Il lupo nel materano: Censimento e stima della popolazione di <i>Canis lupus</i> nell’area della Provincia di Matera”	Celle in cui è stata documentata la riproduzione	Celle in cui non sono mai stati documentati eventi riproduttivi, ma presenza stabile
Calabria - Aspromonte	Siclari A., Ciuti F., 2018. CONVIVERE CON IL LUPO, CONOSCERE PER PRESERVARE Il sistema dei Parchi nazionali dell’Appennino meridionale per lo sviluppo di misure coordinate di protezione per il lupo RELAZIONE SULL’ATTIVITA’ DI MONITORAGGIO 2013-2018.	Cella coperta per almeno metà della sua estensione dal territorio di un branco	Celle in cui è stato rilevato almeno un segno di presenza

REGIONE-ZONA-AREA PROTETTA	REFERENTE-PUBBLICAZIONE	PRESENZA STABILE (A)	PRESENZA SPORADICA (B)
Calabria – Sila e Pollino	<p>Gervasio G. Crispino F. Scaravelli D. Priori P., 2019. Servizi tecnico-scientifici finalizzati al monitoraggio ambientale. Servizio 2 - macro e micro mammiferi, micro Chiroteri. Report Parco Nazionale della Sila. Soc. Coop. Greenwood</p> <p>Bremayr <i>et al.</i> (2017) PAN LIFE - NATURA 2000 ACTION PROGRAMME -</p> <p>LIFE13 NAT/IT/001075. Protocolli di Monitoraggio della Rete Natura</p> <p>2000 in Calabria. Marzo 2017, versione 1.0</p>	Cella interessata da un gruppo di almeno tre segnalazioni (in quanto quelle presenti nella pubblicazione sono presumibilmente riferibili a più anni)	Cella interessata da almeno una segnalazione o più segnalazioni ma sicuramente dello stesso anno
Italia	ISPRA	Cella in cui è stato rilevato e assegnato a lupo tramite genetica un campione per almeno 3 anni nel periodo 2013-2019	Cella in cui è stato rilevato e assegnato a lupo tramite genetica almeno un campione nel periodo 2013-2019

APPENDICI 3: selezione delle celle di campionamento estensivo e selezione delle aree di campionamento intensivo in Italia peninsulare

- a. Algoritmo di campionamento spazialmente bilanciato (Stevens e Olsen, 2004) utilizzato per la selezione delle celle da campionare con approccio estensivo, a seguito della stratificazione descritta.
html di riferimento in allegato "sampling-occupancy.nb"

- b. Algoritmo di campionamento spazialmente bilanciato (Stevens e Olsen, 2004) utilizzato per la selezione delle celle da campionare con approccio intensivo, a seguito della stratificazione descritta.
html di riferimento in allegato "rappresentatività aree campione.nb"