

## Capitolo 4

# **MATERIALI E METODI**

### 4.1 RACCOLTA DATI

La raccolta dei dati sul campo è stata effettuata nel periodo settembre- dicembre 2009; l'elaborazione ha riguardato, però, tutti i dati riferiti alla specie lupo raccolti nel territorio della Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino e delle altre Riserve Naturali Biogenetiche Casentinesi, nostre aree di studio, presenti negli archivi dell'UTB e del Parco Nazionale a partire dall'anno 2002. Gran parte dei dati utilizzati nel presente lavoro provengono da campagne di monitoraggio finalizzate alla caratterizzazione genetica della popolazione di lupo del Parco Nazionale, e sono stati raccolti dal personale del Corpo Forestale dello Stato, e da collaboratori specializzati.

Le metodologie applicate nel lavoro di campo si basano su tecniche di rilievo indirette: raccolta e georiferimento di deposizioni fecali (“fatte”) e segni di presenza attribuibili alla specie in esame, su percorsi standard; tracciatura su neve di impronte e piste (“snow-tracking”); rilievi di presenza effettuati per stimolazione acustica (“wolf-howling”). Queste tecniche sono state descritte nel presente capitolo in quanto effettuate nel periodo di tesi, ma, in sede di elaborazione dati, per le finalità che ci eravamo prefisse, abbiamo considerato unicamente le risultanze relative alla raccolta fatte.

#### 4.1.1 RACCOLTA FATTE

La raccolta delle fatte e dei segni di presenza del lupo è stata effettuata su percorsi standardizzati scelti, dentro e intorno alla Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino, con lunghezze fra i 5 e 10 Km in modo da coprire più uniformemente possibile il territorio di indagine, oltre a comprendere tutti i punti di marcatura importanti già noti (spesso punti esposti, crinali o bordi strada). I 6 percorsi così individuati si sviluppano per una lunghezza complessiva di 41 km.

#### Percorso PW1 (5,319 km)

Questo percorso segue la “Giogana”, il sentiero del crinale appenninico principale, confine tra Emilia-Romagna e Toscana. La compagine forestale prevalente è la faggeta, intervallata da piccole radure, praterie di tipo secondario.

Dal Gioghetto (1239 m s.l.m.) si sale fino al Giogo Seccheta (1383 m s.l.m.) attraversando la radura di Prato al Soglio. Si scende al valico de la Scossa (1331 m s.l.m.), poi si risale verso Passo Porcareccio (1453 m s.l.m.) per arrivare a Poggio Scali (1520 m s.l.m.), punto più elevato sul confine di Sasso Fratino.

#### Percorso PW2 (5,448 km)

Prosegue, da Poggio Scali, lungo la Giogana. La vegetazione è sempre costituita da faggete, le aree aperte sono assenti. Qua e là incontriamo aree rocciose e “buche” di crollo nel substrato marnoso-arenaceo; sul versante romagnolo, all’interno della Riserva Integrale, le pendenze sono estreme, con canali pressoché verticali in località “Pentolino” e “Pian Tombesi”.

Si scende, seguendo il sentiero fra la Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino e la Riserva Integrale Regionale “La Pietra”, fino a Poggio Pian Tombesi (1465 m s.l.m.). Passando dal Poggione (1424 m s.l.m.) si scende fino al Passo della Calla (1295 m s.l.m.).

#### Percorso PW3 (8,266 km)

Questo percorso è, in parte, interno alla Riserva ed è completamente forestato. Le tipologie boschive prevalenti sono: faggete ed abieti-faggete, misti di latifoglie.

Dalla Casa Forestale della Lama (694 m s.l.m.) si sale attraverso la valle del Fosso degli Acuti fino a quota 1169 m, poi si lascia la strada sterrata e si entra nella Riserva Integrale di Sasso Fratino a livello della località denominata “Pozza del cervo”, un’area umida forestale molto importante per alcune specie di anfibi. Da qui si scende lungo il crinale detto Poggio della Cornioleta, fino a Poggio Ghiaccione (730 m s.l.m.), che si trova sul confine settentrionale della Riserva. Questo percorso presenta una deviazione: dalla cascata degli Acuti si raggiunge un altro punto di marcatura potenziale che si trova sulla sella tra il poggio Acutoli e il versante E del Poggio Cornacchia.

#### Percorso PW4 (9,390 km)

Percorso lungo il confine della Riserva che se ne allontana lungo un crinale secondario in direzione ENE: Poggio Pratovecchio. La vegetazione è composta da boschi misti di latifoglie, con specie prevalente il cerro, con alcuni rimboschimenti di conifere alloctone. Nella parte

conclusiva del percorso sono presenti ampie zone aperte con arbusti di ginepro e ginestra dei carbonai.

Da Ponte alla Sega (648 m s.l.m.) si segue una strada sterrata che dopo 2 km si lascia per “Campominacci”, poi lungo il crinale di Poggio Pratovecchio fino ad arrivare a Poggio della Gallona (829 m s.l.m.). Per arrivare al punto 4.12, conclusivo del percorso, si scende sul versante S del Poggio Pratovecchio fino alla strada sterrata proveniente dall'Ammannatoia, vecchio nucleo abitativo nella valle del Bidente di Ridracoli, ora occupata dal lago omonimo.

#### Percorso PW5 (7,993 km)

Percorre la strada di servizio forestale lungo il confine settentrionale della Riserva, completamente ricoperto da boschi misti di latifoglie e da abieti-faggete.

Dalla Lama (694 m s.l.m.) si segue la strada sterrata sul confine della Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino fino al Ponte alla Sega (648 m s.l.m.). Al ritorno si ripercorre lo stesso tracciato fino al Poggio della Seghettina (820 m s.l.m.). Da qui si scende lungo un crinale, attraversando zone aperte ed ex cedui di cerro, poi, dopo aver attraversato il Fosso degli Altari, si raggiunge la sella sotto Poggio Ghiaccione ed infine la strada sotto Sasso Fratino già percorsa all'andata.

#### Percorso PW6 (4,642 km)

Percorso nel nucleo centrale della Riserva, caratterizzato da fustaie vetuste disetanee di faggio ed abete bianco.

Si entra nella Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino dall'accesso della “Bucaccia” e si risale l'omonimo vallone. Poi si gira a destra fino ad arrivare su Poggio Piano (996 m s.l.m.). Da qui si scende a Quota 900, da dove, lungo il Fosso delle Macine, si arriva alla Fonte del Maresciallo, ingresso principale di Sasso Fratino da N.

Tutti i punti di marcatura già noti, presenti sui percorsi appena descritti, sono stati georeferenziati tramite apparecchiatura Global Position System Garmin GPSMAP 60 CSx. Abbiamo usato come sistema di coordinate di riferimento l'Universale Trasverso di Mercatore ED50-zona 32T. (**Tab. 4.1.1.1, Fig. 4.1.1.1**).

<b>N.</b>	<b>Denominazione sito</b>	<b>Coord. UTM</b>	<b>Percorso</b>	<b>Caratteristiche sito</b>
W 1.1	Gioghetto	0727085 - 4855309	PW1	punto di sella - incrocio
W 1.2	Prato Bertone	0726551 - 4855937	PW1	incrocio
W 1.3	Prato al Soglio	0726102 - 4856473	PW1	slargo (radura)
W 1.4	Giogo Seccheta	0725762 - 4856715	PW1	slargo (radura)
W 1.5	La Scossa	0725375 - 4857073	PW1	punto di sella - incrocio
W 1.6	Passo Porcareccio	0724604 - 4857681	PW1	punto di sella - incrocio
W 1.7	Poggio Scali	0724274 - 4858337	PW1	crinale
W 2.1	Passo della Calla	0720606 - 4859950	PW2	slargo (radura)
W 2.2	Pian Carbonaie	0721076 - 4859791	PW2	incrocio (radura)
W 2.3	Pian Tombesi	0721808 - 4859412	PW2	punto di sella - crinale
W 2.4	Madonna del fuoco	0724108 - 4858483	PW2	slargo (radura) - crinale
W 3.1	Inizio Svolte	0727394 - 4855871	PW3	slargo - incrocio
W 3.2	Acuti (tornante)	0726503 - 4856717	PW3	incrocio
W 3.3	Pozza del cervo	0726508 - 4856884	PW3	slargo (radura) - crinale
W 3.4	Sellone P. Ghiaccione	0726741 - 4857268	PW3	punto di sella
W 3.5	Incrocio sentiero P. Fico	0727109 - 4857680	PW3	incrocio
W 3.6	Poggio Cornioleta (sella)	0727320 - 4858121	PW3	punto di sella
W 3.7	Poggio Cornioleta (p.to scosceso)	0727446 - 4858258	PW3	punto di sella
W 3.8	Poggio Cornioleta (primo crinale II°)	0727583 - 4858382	PW3	punto di sella
W 3.9	Sella Acutoli	0727412 - 4856310	devPW3	punto di sella
W 4.1	Fonte del Maresciallo	0725653 - 4859165	PW4	slargo (radura)
W 4.2	Frana Campominacci	0725448 - 4859636	PW4	slargo
W 4.3	Campominacci	0725727 - 4859807	PW4	incrocio
W 4.4	Incrocio Butriali	0726273 - 4859983	PW4	punto di sella - incrocio
W 4.5	Poggio Pratovecchio	0726474 - 4860211	PW4	bordo sentiero
W 4.6	Poggio Pratovecchio	0726634 - 4860291	PW4	punto di sella
W 4.7	Poggio Pratovecchio	0726845 - 4860397	PW4	punto si sella
W 4.8	Poggio Pratovecchio	0726925 - 4860455	PW4	bordo sentiero
W 4.9	Poggio Pratovecchio	0727020 - 4860562	PW4	crinale
W 4.10	Poggio Pratovecchio	0727084 - 4860561	PW4	crinale - insoglio ungulati
W 4.11	Poggio della Gallona	0727414 - 4860635	PW4	punto di sella
W 4.12	Ponte alla macchia		PW4	slargo - incrocio
W 4.13	Incrocio Ammannatoia	0725990 - 4859249	PW4	incrocio
W 5.1	Fosso della Spazzola	0727762 - 4857457	PW5	slargo (valle)
W 5.2	Fosso dei Pianelli	0727578 - 4857889	PW5	slargo (valle)
W 5.3	Poggio Ghiaccione	0727789 - 4858683	PW5	slargo - incrocio - crinale
W 5.4	Slargo prima Segarine	0727164 - 4858245	PW5	slargo
W 5.5	Slargo Segarine - Bucaccia (salita)	0727012 - 4858233	PW5	slargo
W 5.6	Bucaccia	0726675 - 4858239	PW5	slargo (valle)
W 5.7	Poggio della Seghettina	0726977 - 4858624	PW5	slargo - incrocio - crinale
W 5.8	Crinale Seghettina (p.to scosceso)	0726387 - 4859113	PW5	crinale
W 5.9	Crinale Altari	0727493 - 4859054	PW5	crinale
W 5.10	Poggio Ghiaccione (lago)	0728000 - 4858975	PW5	incrocio - crinale - sella
W 6.1	Poggio Piano	0726301 - 4858316	PW6	incrocio - crinale - sella

**Tab. 4.1.1.1** Siti di marcatore potenziali sui percorsi standard



Questi percorsi standard sono stati effettuati con cadenza mensile, e ogni segno di presenza del lupo (in particolare deposizioni fecali) è stato individuato e georiferito.

Le fatte sufficientemente fresche sono state raccolte per poter eseguire le analisi genetiche. Questo è possibile grazie alla presenza di cellule dell'epitelio intestinale spesso presenti nel muco che può essere rinvenuto sulla fatta. Di queste cellule si isola il DNA con enzimi di restrizione specifici e, tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) si replicano, in laboratorio, le poche e danneggiate sequenze ottenibili dal materiale a disposizione. Si vanno ad analizzare, in seguito a PCR, particolari sequenze genetiche con variabilità nota (marcatori genetici): esse sono uguali per tutti i lupi ma diverse tra cane, lupo e volpe, quindi permettono la determinazione della specie poiché, considerando il solo aspetto delle fatte, l'identificazione può risultare ingannevole (ad esempio molti cani pastore di razza maremmana, considerabili come "vaganti" durante il periodo estivo di permanenza delle greggi sui pascoli, non hanno alimentazione così dissimile da quella di un lupo). Altre sequenze del DNA mitocondriale invece, contenenti microsatelliti, sono diverse per ogni individuo di lupo (impronta genetica), e ci permettono di identificare ogni singolo animale tramite l'analisi dei multiloci. Inoltre la presenza o meno del cromosoma Y permette la determinazione del sesso dell'animale. Queste analisi sono state eseguite dal Dipartimento di Genetica (Prof. E. Randi) dell'ISPRA, l'ex Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica di Ozzano (BO).

Dalle fatte si può anche determinare la dieta del lupo, poiché in esse sono presenti peli e pezzi di osso delle prede. Peli di cinghiale e di cervide sono facilmente distinguibili anche ad un'analisi macroscopica, mentre per la determinazione della specie di cervide, o delle classi di età delle prede, si usano "peloteche" di raffronto, ovvero raccolte di peli, provenienti da varie parti del corpo, delle diverse specie che possono essere paragonate, in seguito ad analisi di determinate bande di colore presenti tramite stereoscopio, ai peli trovati.



Per eseguire la raccolta, dalle fatte stimate vecchie meno di una settimana, quindi potenzialmente contenenti frammenti di DNA analizzabili, si prende un campione di circa 3 cm di lunghezza, preferibilmente ricoperto da muco (sostanza prodotta dalla ghiandola anale dell'animale essenziale per l'analisi genetica), con guanti in lattice e si mette in un contenitore di plexiglass in etanolo al 95%, per conservare eventuali cellule epiteliali.

La raccolta di ogni campione segue uno specifico protocollo; i dati inseriti sono:

- Coordinate UTM;

- Codice identificativo (annotato anche sull'etichetta del contenitore) con data di raccolta;
- Rilevatore, territorio comunale e denominazione della località di raccolta;
- Stima di deposizione (di giornata, più o meno di una settimana);
- Tipologia del sito di marcatura (ricorrente o non ricorrente);
- Priorità di analisi genetica (alta, media, bassa; a seconda della stima di freschezza della fatta eseguita visivamente dal rilevatore);
- Tipologia di habitat del ritrovamento (foresta, zona aperta, ecc.);
- Caratteristiche del luogo di ritrovamento (strada, incrocio, crinale, ecc.);
- Substrato (prato, foglie, ghiaia, ecc.);
- Dimensioni della fatta (diametro e lunghezza in cm);
- Stima delle proporzioni di composizione della fatta in peli (annotando la specie preda supposta), ossa e materiale amorfo;
- Condizioni meteo.

Sono state usate due specifiche e distinte schede per il rilevamento genetico e per il rilevamento visivo della dieta (**Fig. 4.1.1.2**).

 <p style="text-align: center;">ID: 02/PN/αn _____ data _____</p> <p>Condizioni meteo: _____</p> <p>Habitat ritrovamento: Bosco Conifere Faggeta Bosco Latifoglie Zona aperta</p> <p>Luogo ritrovamento: Bordo strada Centro strada Crinale/P.to esposto Incrocio strade/sentieri</p> <p>Substrato: erba cespuglio foglie ghiaia/asfalto</p> <p>Dimensioni fatta (valori max): Diametro (cm) _____ Lunghezza (cm) _____</p> <p>Composizione fatta: Materiale amorfo (+) (++) (+++) Peli (+) (++) (+++). Specie supposta: _____ Ossa (+) (++) (+++). Tipi riconosciuti: _____</p> <p>NOTE:.....</p>	 <p style="text-align: center;">Coord. UTM N _____ UTME _____</p> <p style="text-align: center;">ID: 02/PN/αn _____ data _____</p> <p>Rilevatore/i _____</p> <p>Comune _____ località _____</p> <p>Campione raccolto: Tracciatura su neve n. Lungo il transetto n. Sito di rendez-vous n. nei pressi della carcassa n.</p> <p>Stima deposizione: un giorno &lt; di una settimana &gt; di una settimana</p> <p>Sito di marcatura: ricorrente possibile non ricorrente</p> <p>Priorità di analisi genetica: alta media bassa</p> <p>NOTE:.....</p>
---	---

**Fig. 4.1.1.2** Schede per il rilievo della dieta (a sinistra) e per il rilevamento genetico (a destra) della specie lupo

Anche gli altri segni di presenza ritrovati lungo il percorso standard sono stati segnalati e georeferenziati, annotando, nel caso di predazioni: la specie, l'età dell'animale, il grado di consumo e segni particolari quali morsi ed evidenti ferite; nel caso di impronte, se possibile,

si fa una stima del numero di individui del branco (obiettivo principale delle sessioni invernali di snow-tracking, trattato nel prossimo paragrafo). Sia le fatte sia gli altri segni di presenza sono stati fotografati.

#### 4.1.2 SNOW-TRACKING

In presenza di substrato nevoso sono state effettuate uscite allo scopo di intercettare e seguire le supposte piste di lupo. Tale attività di campo è definita “snow-tracking” quando si standardizza in modo da ottenere stime demografiche del branco seguito e dei branchi presenti nell’area di studio.

La ricerca delle tracce dei lupi inizia 24-48 ore dall’ultima nevicata, per aumentare la probabilità di rilevare le piste più recenti lasciate dagli animali. La ricerca di impronte inizia in genere lungo strade sterrate, utilizzate dai lupi in spostamento per motivi di risparmio energetico (Fritts e Mech, 1981), oppure nei territori invernali di ungulati, particolarmente frequentati dai lupi. Una volta ritrovate delle impronte attribuibili al lupo (**Fig. 4.1.2.1**), esse sono seguite il più a lungo possibile, considerando che, spesso, il territorio è difficile da percorrere in sicurezza, e tracciate tramite GPS.

Nei punti di “apertura a ventaglio”, ovvero negli slarghi delle strade, dove gli animali si separano per ispezionare le circostanze, si riesce a contare il numero di individui che compongono il branco. Tale operazione è abbastanza difficile al di fuori di questi “ventagli”, in quanto i diversi componenti del branco seguono in modo pressoché perfetto le impronte dell’individuo che li precede, rendendo impossibile una stima minima del numero degli animali che hanno percorso la pista considerata. Si annotano la data, una stima dell’età delle tracce, provenienza e direzione della traccia, i chilometri seguiti, altri segni di presenza ritrovati lungo la pista ed eventuali comportamenti dei lupi, come perlustrazioni del territorio, caccia, riposo, gioco, marcatura ecc. Nei luoghi di riposo, “covi”, o dove gli animali transitano sotto recinzioni o filo spinato, è possibile trovare peli, anch’essi utili per le analisi genetiche. Le tracciature effettuate con il GPS sono poi trasferite in appositi database in ambiente G.I.S.



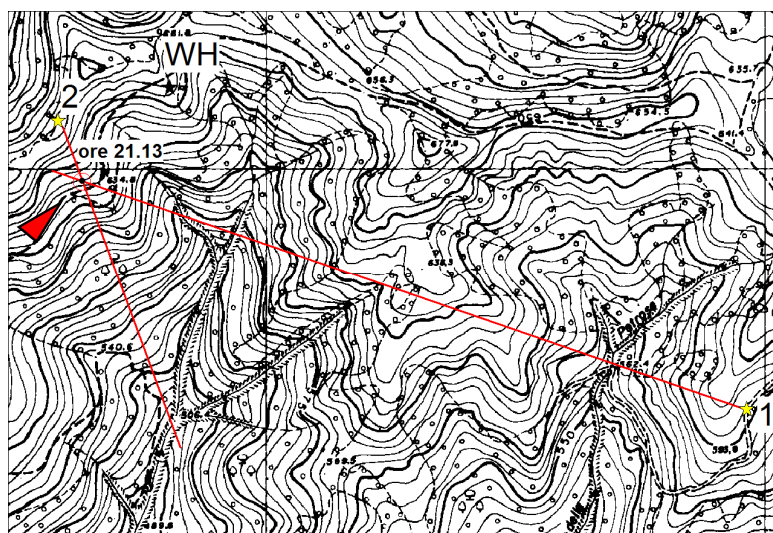
**Fig. 4.1.2.1** Piste di lupi sulla neve

#### 4.1.3 WOLF-HOWLING

Questa tecnica consiste nell'indurre la risposta di un branco di lupi tramite ululato previa stimolazione, in seguito ad emissione notturna di un ululato registrato. Tramite ascolto dell'ululato di risposta si può stimare il numero di individui e accertare la presenza di cuccioli all'interno del branco, poiché l'ululato di questi ultimi presenta una "tonalità" molto più acuta rispetto a quella degli adulti, ed un andamento irregolare, intervallato da uggliolii e brevi latrati.

Per eseguire una sessione di wolf-howling è necessario usare per l'emissione, un lettore mp3 o un lettore CD portatile contenente una o più registrazioni di ululati di branco (con individui alfa, helper ed eventualmente cuccioli) collegato ad un amplificatore e ad un altoparlante a megafono. Due "equipaggi" di operatori si suddividono il territorio, seguendo diversi percorsi con mezzi fuoristrada. Un gruppo eseguirà l'emissione ed uno, detto di "ascolto", registrerà l'eventuale risposta da un'altra angolazione rispetto al gruppo di emissione. E' stato dimostrato, che la distribuzione giornaliera degli ululati naturali è concentrata nella notte (i picchi più elevati tra le 21.00 e le 23.00, tra le 4.00 e le 5.00) (Harrington e Mech, 1979), quindi le operazioni di wolf-howling si eseguono dopo le 21.00, e comunque con un buio completo. Le condizioni meteorologiche devono essere ottimali (assenza di precipitazioni, scarsa umidità ambientale, vento con velocità inferiore ai 12 Km/h) per minimizzare i disturbi acustici (rumore di fondo). I due gruppi si collocano in punti diversi, scelti per la possibilità di

effettuare una bi-angolazione dell'eventuale risposta. L'emissione, idealmente cinque ululati con latrati, è eseguita prima a basso volume, nel caso in cui un branco si trovasse nelle immediate vicinanze. La durata dell'emissione è di 2-3 minuti, l'ascolto successivo di 3-5 minuti. Con mancata risposta si procede con volume più alto, eseguendo fino a tre emissioni. Nel caso di risposta i due gruppi annotano: posizione propria con GPS, orario esatto e direzione rispetto al Nord della risposta; inoltre si annota una stima minima del numero di individui del branco, la presenza/assenza di cuccioli, la durata della risposta ed eventualmente altre informazioni supplementari. Con il metodo della bi-angolazione è così possibile determinare approssimativamente la posizione del branco (**Fig.4.1.3.1**).



**Fig. 4.1.3.1** Posizione approssimativa di un nucleo determinata con il metodo della bi-angolazione (i numeri corrispondono alle posizioni dei due equipaggi al momento dell'emissione; la risposta del branco è segnalata dall'orario riportato in figura)

Per ogni sessione sono generalmente eseguite diverse emissioni da punti diversi, in modo da coprire tutto il territorio di studio. La sessione termina con la risposta del branco di cui si suppone la presenza nel territorio esaminato.

Questo tipo d'indagine è usato per localizzare la tana o i *rendez-vous sites*. Il censimento con questa tecnica, si effettua di solito alla fine di agosto, quando i "cuccioloni" sono in grado di seguire gli altri componenti del branco e le attività sono concentrate sui già nominati siti di *rendez-vous* (Harrington e Mech, 1979). In tal caso si copre il territorio in esame per due - tre notti consecutive, a seconda della superficie dello stesso e del personale disponibile, con diversi equipaggi doppi (emissione più ascolto) che escono in contemporanea, in modo da evitare errori di sottostima o sovrastima causati da una non simultaneità delle emissioni.

Come per tutte le attività di censimento faunistico, anche in questo caso si parla di stima del numero minimo di individui, poiché non si ha la certezza di una risposta da parte di tutti i branchi dell'area di studio, della presenza di tutti gli individui del singolo branco al momento della risposta, ed inoltre gli individui solitari (giovani in dispersione, animali anziani o "reietti") spesso non rispondono all'emissione di un ululato di branco. Sia per le sessioni mensili "routinarie" di wolf-howling che per le attività annuali di censimento, la precisione e l'accuratezza delle stime possono essere massimalizzate tramite registrazione, delle eventuali risposte, con apparecchiature munite di microfono direzionale e successive analisi delle tracce sonore con specifici softwares usati nella bioacustica (es. Avisoft), in grado di distinguere frequenze e lunghezze d'onda di emissione degli ululati dei diversi individui evincibili dal sonogramma globale.

Nel presente studio l'attività è stata svolta nei mesi di ottobre, quando è possibile una risposta anche da parte degli individui dell'anno, e di gennaio, precedentemente al periodo riproduttivo, quando la probabilità di una risposta è moderatamente elevata. La scelta dei punti di emissione nelle vicinanze della Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino è avvenuta in base all'assenza di ostacoli morfologici - orografici alla ricezione del suono, assenza di disturbi acustici esterni (strade trafficate, nuclei abitativi ecc.) e la supposta presenza di lupi "noti" in determinate aree, sulla base del ritrovamento di fatte o altri segni di presenza.

## 4.2 ELABORAZIONE DATI

### 4.2.1 ARCHIVIAZIONE FATTE GEOREFERENZIATE - TASSO DI CAMPIONAMENTO

Tutti i dati relativi a ritrovamenti di fatte del lupo sul territorio delle Riserve Naturali Biogenetiche Casentinesi dal 2002 al 2010 sono stati archiviati su foglio di calcolo Excel. Per ogni singolo dato è stato specificato l'anno di ritrovamento, la data esatta, la località, le coordinate Est e Nord nel sistema di riferimento Gauss-Boaga (Roma 1940) ed è stato aggiunto un numero progressivo. Per le fatte per le quali è stato possibile eseguire le analisi genetiche e quindi attribuire il genotipo, è stato aggiunto quest'ultimo e il sesso dell'animale. Inoltre è stato calcolato il numero di campioni presenti per ogni anno.

Successivamente è stato calcolato il *tasso di campionamento annuo* rispetto ai km percorsi nel corso dei rilievi standardizzati. In una tabella Excel sono stati inseriti per ogni anno preso

in esame, il numero totale delle fatte ritrovate e il numero complessivo dei km percorsi dagli operatori impiegati. Quest'ultimo valore è stato evinto dagli archivi del CFS.

Il tasso di campionamento è stato semplicemente calcolato con la formula riportata di seguito:

$$TC = n^{\circ} \text{fatte} / \text{km percorsi.}$$

Il TC annuo è stato diagrammato per apprezzare le variazioni di tale basilare parametro nel corso degli anni di monitoraggio.

#### 4.2.2 SPOSTAMENTO DEGLI INDIVIDUI GENOTIPIZZATI

In un nuovo foglio Excel sono stati copiati tutti i dati relativi alle fatte genotipizzate, con l'anno e la data di ritrovamento e le loro coordinate Gauss-Boaga X e Y. Per ogni genotipo che è stato ritrovato più di una volta sono state calcolate le distanze in metri fra i diversi punti di ritrovamento:

$$\sqrt{[(\text{prima coordinata } X - \text{seconda coordinata } X)^2 + (\text{prima coordinata } Y - \text{seconda coordinata } Y)^2]}.$$

Per i valori di spostamento ottenuti per ogni genotipo abbiamo indicato il massimo, la media e la deviazione standard; è stato aggiunto anche il valore di spostamento massimo e medio per ogni anno nel quale l'individuo è stato ritrovato più di una volta.

#### 4.2.3 USO DELLO SPAZIO

Per effettuare ipotesi riguardo l'uso dello spazio operato dalla popolazione di lupo che insiste nell'area di studio, abbiamo analizzato i dati geografici delle deposizioni fecali tramite le estensioni "Animal Movement" e "Spatial Analyst" dei softwares GIS ArcView 3.2 e ArcGis 9.0. Tali programmi sono in grado di operare con il complesso di analisi statistiche noto come "metodo di Kernel". Questo metodo considera i dati spaziali (variabili: "Coord X" – "Coord Y") nei records che riassumono gli attributi di ogni segno di presenza, nel nostro caso le fatte, archiviato come dei "fix", ovvero punti dello spazio inseriti in un sistema binario di coordinate geografiche, nei quali è stato presente l'animale. Il metodo Kernel converte le nuvole di punti, ove ciascun punto corrisponde ad un fix, ovvero ad una fatta geo-riferita, ovvero ad una localizzazione spaziale di un lupo indeterminato, in curve di isoprobabilità dette "isoplete",

entro le quali è possibile con una determinata probabilità ritrovare segni corrispondenti alla specie in esame. In pratica esso permette il passaggio da una distribuzione discontinua di punti in una distribuzione continua di curve. La probabilità massima impostata è del 95% del totale ed esclude quindi il 5% degli fix, i più esterni che possono essere interpretati come deposizioni dovute a singoli movimenti dispersivi. All'interno di questa area ricadono quindi il 95% degli fix, ovvero delle fatte ritrovate. Diminuendo la probabilità al 90%, all'85% e così via fino al 5% e aggiungendo tutte queste isoplete allo stesso grafico, si ottiene una serie di curve circolari che aumentano verso l'interno la probabilità di ritrovare delle fatte. Interpretando il diagramma secondo le informazioni note in bibliografia circa il comportamento spaziale e la biologia del lupo, si arriva ad ipotizzare una rappresentazione nello spazio, per il territorio considerato, dei diversi branchi presenti, identificati con nuclei distinti di "concentrazione fix (fatte)". Da ciò si arriva a definire, anche dal punto di vista dimensionale, l'*home range* di ciascun branco. Distinguendo i diversi "centri" di concentrazione ed incrociando tali informazioni con i dati ottenuti dalle analisi genetiche, ovvero inserendo nei diversi nuclei di concentrazione i genotipi ottenuti, si può confermare o meno la probabile presenza di determinati branchi nell'area di studio.

Il diagramma finale ottenuto con Kernel è stato successivamente caricato sulla cartografia a disposizione tramite il software "GoogleEarth", insieme ai confini delle Riserve Naturali Biogenetiche ed ai confini del Parco Nazionale. L'analisi è stata eseguita per tutti gli anni del monitoraggio, quindi sul totale dei campioni disponibili, e per gli anni con un maggior numero di dati, ovvero dal 2004 al 2009, in modo da apprezzare eventuali variazioni nel tempo e formulare ipotesi sulla distribuzione spaziale dei branchi.

Un'analisi più fine è stata eseguita, per il territorio della Riserva Integrale, considerando le isoplete di probabilità 50%, evidenziando quindi porzioni di territorio all'interno delle quali si trova la metà delle localizzazioni spaziali della specie. Queste porzioni si chiamano anche "*core area*" e sono interpretabili come le zone dell'*home range* più intensamente frequentate dal branco. Su ogni diagramma annuale e sui diagrammi delle *core area* di Sasso Fratino sono stati evidenziati i fix corrispondenti agli individui genotipizzati; tali informazioni, insieme ai TC annuali ci hanno consentito un'interpretazione delle risultanze riferibili all'uso dello spazio operato dalla specie nell'area di studio.

#### 4.2.4 STIMA DEMOGRAFICA DELLA POPOLAZIONE

Infine si è cercato di stimare la consistenza della popolazione presente nell'area di studio. A questo scopo è stato usato il metodo di "cattura-marcatura-ricattura", o Indice di Lincoln-Petersen. Questo metodo si fonda sui seguenti presupposti teorici: in una popolazione chiusa (con tassi di immigrazione/emigrazione nulli e tassi di mortalità e natalità che si bilanciano) si cattura un numero  $N_1$  di individui che, dopo essere stato marcato, è rilasciato; in seguito si cattura un secondo campione  $N_2$  di individui, del quale  $M$  risultano marcati, pertanto è valida la seguente equazione:

$$\frac{M}{N_2} = \frac{N_1}{N}$$

dove  $N$  consiste nel numero di individui stimati che compongono la popolazione. Quindi:

$$N = \frac{N_1}{M} \cdot N_2$$

Nel nostro caso, la marcatura consiste nell'attribuire ad un deposito fecale, ovvero ad un individuo, il genotipo; quindi  $N_1$  corrisponde al numero di genotipi individuati sul territorio, che si cumulano nel tempo;  $M$  corrisponde al numero di genotipi ritrovati già "marcati"; e  $N_2$  corrisponde al numero di fatte genotipizzate ogni anno, di individui "catturati" ogni anno, poiché la stima della popolazione è stata fatta per tutti gli anni per i quali sono presenti dati genetici.

Su un foglio Excel sono stati inseriti, per ogni anno dal 2002 al 2008:

- il numero di genotipi cumulati ( $N_1$ ): individui "marcati";
- il numero di genotipi ritrovati anno per anno ( $M$ ): individui "ricatturati", valore non presente per il 2002 poiché primo anno d'indagine;
- il numero totale di fatte genotipizzate ogni anno ( $N_2$ ): individui "catturati" ogni anno.

Con questi dati, è stato quindi possibile ottenere una stima della popolazione per gli anni dal 2003 al 2008, oltre ai valori di consistenza e densità medie per il territorio delle Riserve Biogenetiche Casentinesi.