

**Progetto di sistema dei Parchi Nazionali
per la conservazione della lepre italiana
(*Lepus corsicanus*)**



Parco Nazionale d'Abruzzo Lazio e Molise

Relazione attività 2019

A cura di

Servizio Scientifico PNALM

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	2
1. METODI.....	2
1.1 Area di studio.....	2
1.2 Metodi di raccolta e analisi	3
2. RISULTATI.....	4
2.1 Transetti: sforzo e resa	4
2.2 Esito delle analisi genetiche su pellet raccolti lungo i transetti	4
2.3 Esito di analisi genetiche su carcasse di lepre	5
3. DISCUSSIONE	5
3.1 Stato delle indagini sulla lepre italiana nel PNALM 2017-2017 e prosecuzione del lavoro nel 2020.....	5
4. BIBLIOGRAFIA	7

1. INTRODUZIONE

Nel 2019 nel PNALM sono proseguite le indagini sulla presenza della Lepre italiana nel PNALM mediante analisi genetica su pellet fecali, condotte nell'ambito del Progetto di sistema sulla conservazione della (*Lepus corsicanus*). L'obiettivo specifico delle indagini di seguito presentate è quello di verificare la presenza di lepre italiana nelle aree già investigate a partire dal 2015 ma in cui non era stata riscontrata la presenza ed espandere le indagini in ulteriori aree, non precedentemente investigate.

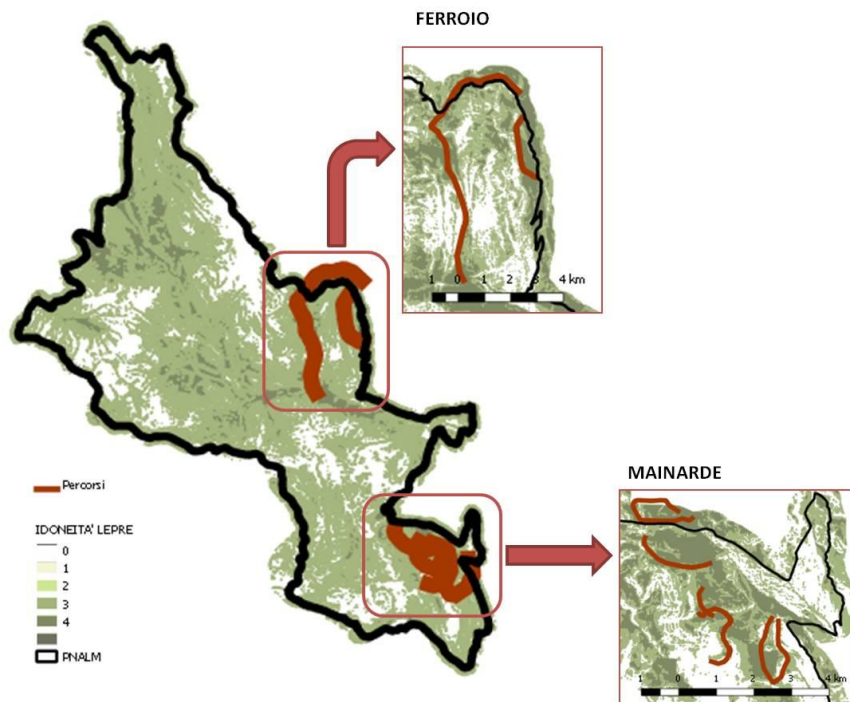
1. METODI

1.1 Area di studio

La ricerca dei campioni da destinare all'analisi genetica è stata effettuata lungo transetti all'interno di 2 aree di indagine: Mainarde molisane e Ferroio (Figura 1). L'area delle Mainarde molisane è stata selezionata per le seguenti ragioni: i) esito negativo del monitoraggio fotografico nel 2017 per lepre italiana; ii) assenza di dati recenti di presenza di lepre italiana in tutte le Mainarde molisane. L'area di Ferroio è stata altresì selezionata poiché adiacente ad un'area già investigata nel 2016 con esito negativo. Nelle 2 aree indagate sono stati tracciati rispettivamente 5 e 2 transetti (Figura 1). I percorsi sono stati individuati lungo sentieri e/o sterrate che attraversano le aree di maggiore

idoneità della presenza della lepre definite dal modello di idoneità prodotto da ISPRA e includendo il maggiore numero di ambienti possibile.

Figura 1. Transetti per la ricerca di pellet di lepre percorsi su neve nell'inverno 2019 nelle aree di campionamento di Ferroio e Mainarde molisane.



1.2 Metodi di raccolta e analisi

La ricerca di tracce di lepre lungo i percorsi viene effettuata entro 2-5 giorni da una nevicata, al fine di consentire la raccolta di escrementi freschi. Nel momento in cui lungo il percorso vengono individuate tracce di lepre, queste si seguono fino ad un eventuale sito di deposizione di pellet. Per ogni traccia viene prelevato un campione, ovvero 1 pellet fecale ed una eventuale replica dello stesso qualora deposti a distanza ravvicinata. Una volta individuata una traccia e raccolto un singolo campione di feci, nessun'altra traccia viene seguita nei 30 metri successivi (Murray et al. 2002, Buglione et al., 2017), ciò al fine di aumentare la probabilità di campionare individui diversi. In assenza di precipitazioni, gli escrementi vengono raccolti esclusivamente da tracce con contorni ben visibili sullo strato di neve vecchia (Rehnus & Bollmann, 2015). I campioni sono stati analizzati: a) per l'assegnazione a livello di specie mediante l'analisi High Resolution Melting (HRM)(Wittwer et al., 2003); b) mediante sequenziamento Sanger per l'identificazione dell'aplotipo nel caso in cui le analisi HRM indicavano lepre europea (*Lepus europaeus*); infine c) le sequenze nucleotidiche dei campioni di lepre europea sono state allineate e clusterizzate con i principali cladi europei di questa specie (Kasapidis et al., 2005)

2. RISULTATI

2.1 Transetti: sforzo e resa

Le attività di ricerca di pellet di lepre lungo transetti sono state svolte dal 26 febbraio al 15 marzo 2019. Per ogni percorso mediamente sono state seguite $7,5 \pm 3,6$ tracce e la percentuale di tracce in cui sono stati rilevati pellet è in media ($\pm DS$) del 62,6% ($\pm 34,5$).

Nell'area delle Mainarde tutti i percorsi hanno dato esito positivo e sono stati raccolti 23 pellet, per 11 dei quali si dispone di 1 replica. Nell'area di Ferroio ha dato esito positivo 1 percorso, lungo il quale sono stati raccolti 8 campioni, per 2 dei quali si dispone di 1 replica (Tabella 1; Figura 2). Tutti i campioni, comprese le repliche ($n=44$) sono stati inviati per le analisi al Dipartimento di Biologia dell'Università di Napoli Federico II. Per 10 campioni di DNA non è stato ottenuto alcun risultato nonostante la ripetizione della prova. La resa delle analisi genetiche risulta dunque del 77,2%.

Tabella 1. Transetti per la ricerca di pellet di lepre percorsi nell'inverno 2019 nelle aree di campionamento di Ferroio e Mainarde molisane; sforzo ed esito.

¹ Lo sforzo è calcolato come il tempo necessario a percorrere il transetto e seguire le tracce (ora fine transetto-ora inizio transetto) ² Lungo il transetto Casone del Medico la neve era presente solo a tratti e in cattive condizioni per discriminare le tracce. Per questa ragione non è possibile stabilire il numero di tracce presenti lungo il transetto.

Area	Transetto	Data	Km percorsi	Sforzo (ore) ¹	N tracce	% tracce con pellet	N pellet	N repliche
Mainarde	Forme	26/2	3,7	2,1	6	66,6	4	1
	Cerita-Altare	27/2	3	2	8	87,5	7	4
	Cerita - Ura	27/2	1,5	0,9	4	100	4	1
	Campitelli	28/2	5,5	2,6	10	60	6	5
	Casone medico ²	01/3	3	0,8	*	*	2 ²	0
Ferroio	Ziomas	15/3	10	4,5	4	0		0
	P.sso Godi	15/3	1,7	3	13	61,5	8	2
	totale		28,4	15,9	45		31	13
	media		4,1	2,3	7,5	62,6%		
	ds		2,9	1,3	3,6	34,5%		

2.2 Esito delle analisi genetiche su pellet raccolti lungo i transetti

In entrambe le aree investigate è stata accertata la presenza di lepre italiana (Tabella 2). Nelle Mainarde la presenza di lepre italiana è stata rilevata lungo tutti i percorsi effettuati. Altresì, in entrambe le aree è stata riscontrata anche la presenza di lepre europea. In particolare, dei 27 escrementi analizzati con esito positivo nell'area delle Mainarde il 70,4 % sono attribuibili a lepre italiana ($n=19$). Dei 7 campioni analizzati con esito positivo nell'area di Ferroio il 14,3% risulta attribuibile a lepre italiana ($n=1$). Per 11 campioni di lepre europea è stato possibile procedere

anche con l'analisi per la determinazione dell'aplotipo. Le sequenze nucleotidiche dei campioni di lepre europea sono state allineate e clusterizzate con i principali cladi europei di questa specie. Tutte le sequenze di lepre europea caratterizzate in questa procedura ricadono nei cladi dell'Europa occidentale (Clade B). In particolare, tutti i campioni ricadono nel clade B-VII (che include aplotipi provenienti dall'Italia, Germania, Ungheria, Austria, Serbia e Romania). Nessuno dei campioni analizzati può essere dunque assegnato all'aplotipo arcaico *meridiei*, autoctono della penisola italiana.

Tabella 2. Risultati delle analisi genetiche effettuate su pellet di lepre rinvenuti lungo i transetti percorsi nell'inverno 2019 nelle aree di campionamento di Ferroio e Mainarde molisane.

Area	Transetto	N pellet	N pellet	NR	Totale complessivo
		L. corsicanus	L. europea		
Mainarde molisane	17 - Campitelli	4	2	5	11
	3 A- Cerita-Altare	8	3		11
	3 B Cerita - Ura	5			5
	4 - Forme	1	3	1	5
	Casone del medico	1		1	2
Ferroio	7 - p.sso Godi	1	6	3	10
Totale		20	14	10	44

2.3 Esito di analisi genetiche su carcasse di lepre

Sono stati inviati al Dipartimento di Biologia dell'Università di Napoli Federico II anche campioni biologici prelevati dalle carcasse di 8 individui rinvenuti tra il 2012 e il 2019 nel territorio del Parco e sua Zona di Protezione Esterna. Tre individui in 2 diverse aree risultano lepre italiana; 6 individui rinvenuti in 4 diverse aree risultano lepre europea. Tutti i campioni di lepre europea sono stati analizzati per la determinazione dell'aplotipo.

In questo caso 3 individui rinvenuti in 3 diverse aree, sono riconducibili all'aplotipo autoctono della nostra penisola *meridiei*. I restanti individui ricadono nel clade B-VII (che, come detto, include aplotipi provenienti dall'Italia, Germania, Ungheria, Austria, Serbia e Romania).

3. DISCUSSIONE

3.1 Stato delle indagini sulla lepre italiana nel PNALM 2017-2017 e prosecuzione del lavoro nel 2020

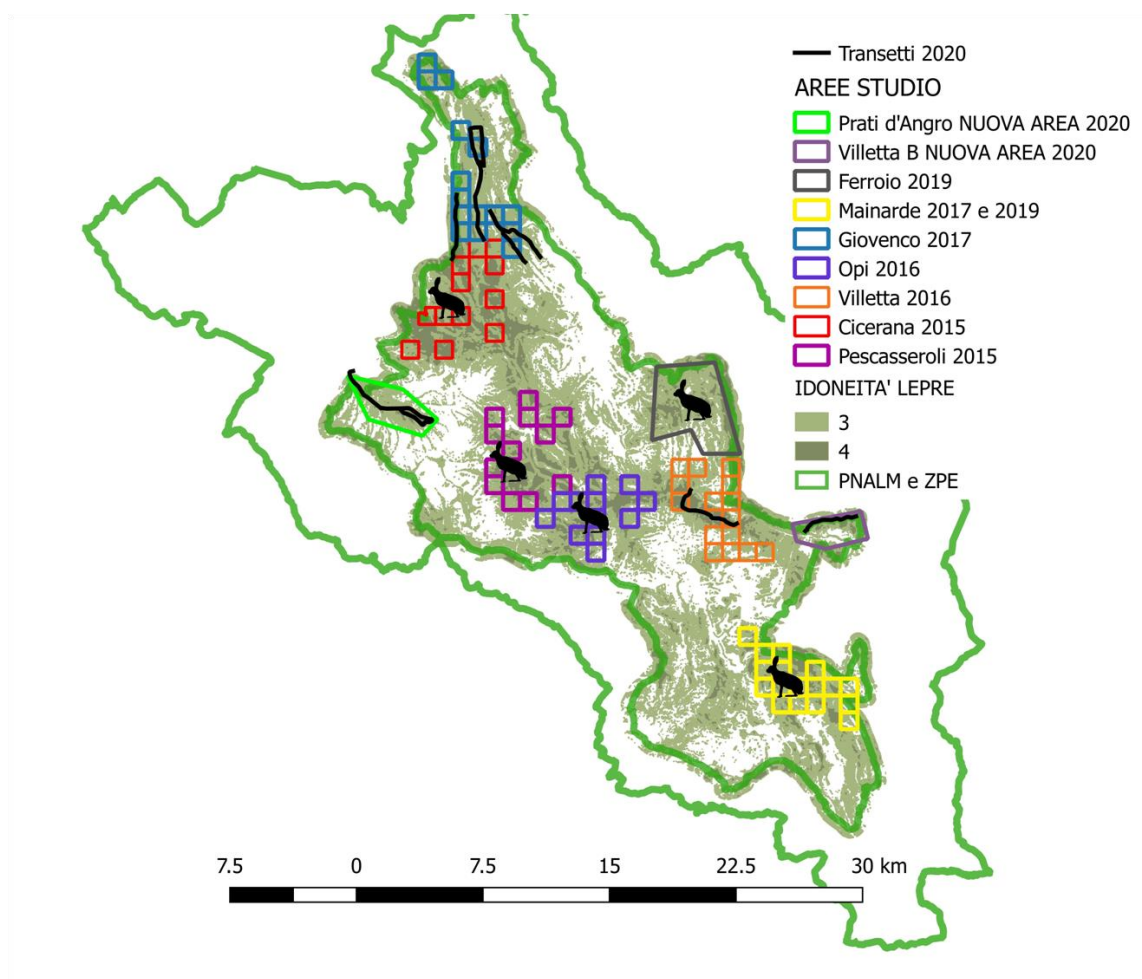
Unendo tutti i dati acquisiti a partire dal 2015 tramite analisi genetica e fototrappolaggio,, la lepre italiana risulta presente in 5 delle 7 aree indagate (Tabella 5; Figura 8). Nell'inverno 2019-2020, si

ritiene di proseguire le indagini in aree in cui il fototrappolaggio abbia dato esito negativo (Giovenco; Villetta Barrea) e in almeno una nuova area (Prati d'Angro).

Tabella 5. Esito delle indagini su lepre italiana nel PNALM dal 2015 al 2019

Area	Anno	Tecnica di indagine			
		Genetica		Fototrappolaggio	
		<i>L.italica</i>	<i>L.europea</i>	<i>L.italica</i>	<i>L.europea</i>
Cicerana	2015-2016	NO	SI	SI	SI
Pescasseroli	2015-2016	SI	SI	SI	SI
	2018	-	-	SI	SI
Opi	2016	-	-	SI	SI
Villetta	2016	-	-	NO	SI
Mainarde	2017	-	-	NO	SI
	2019	SI	SI	-	-
Giovenco	2017	-	-	NO	SI
Ferroio	2019	SI	SI	-	-

Figura8. Aree monitorate dal 2015 al 2019 tramite foto-trappole e/o genetica per la determinazione della presenza di lepre italiana nel PNALM e aree in cui sono previste le indagini nel 2020. L'icona della lepre rappresenta le aree in cui è stata rilevata la presenza di lepre italiana. La lepre europea è stata invece rilevata in ogni area indagata.



4. BIBLIOGRAFIA

- Buglione M, Maselli V, Ripa D, de Filippo G, Trapanese M, Fulgione D. (2017). A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis for the Italian hare. *Mammalian Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.10.010>.
- Murray, D. L., Roth, J. D., Ellsworth, E., Wirsing, A. J., & Steury, T. D. (2002). Estimating low-density snowshoe hare populations using fecal pellet counts. *Canadian Journal of Zoology*, 80(4), 771-781.
- Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. 2005. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34(1): 55-66.
- Rehnus, M., & Bollmann, K. (2016). Non-invasive genetic population density estimation of mountain hares (*Lepus timidus*) in the Alps: systematic or opportunistic sampling?. *European journal of wildlife research*, 62(6), 737-747.
- Santini A, Lucchini V, Fabbri E and Randi E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes* 7:955-961.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG and Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49: 853-860