



WORKSHOP UNITÀ CINOFILE PER LA CONSERVAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italica

Mario Fortebraccio

Coordinatore beneficiario



Beneficiari associati



Realizzato con il contributo dello strumento finanziario LIFE dell'Unione Europea



Milano, 4 aprile
2024

Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Lo status di *Lepus corsicanus*

Denominazione: *Lepus corsicanus*, De Winton 1898
Riconosciuta come “buona specie” (Palacios, 1996)



IUCN Red List >>
of Threatened
Species 2019



IUCN Red List of European mammals

Order	Family	Scientific name	Common name	Red List Category	Endemic?
LAGOMORPHA	LEPORIDAE	<i>Lepus corsicanus</i>	Corsican Hare	VU	Yes

IUCN LAGOMORPH SPECIALIST GROUP



Lista Rossa dei
Vertebrati Italiani 2013 >

Tendenza della
popolazione: stabile

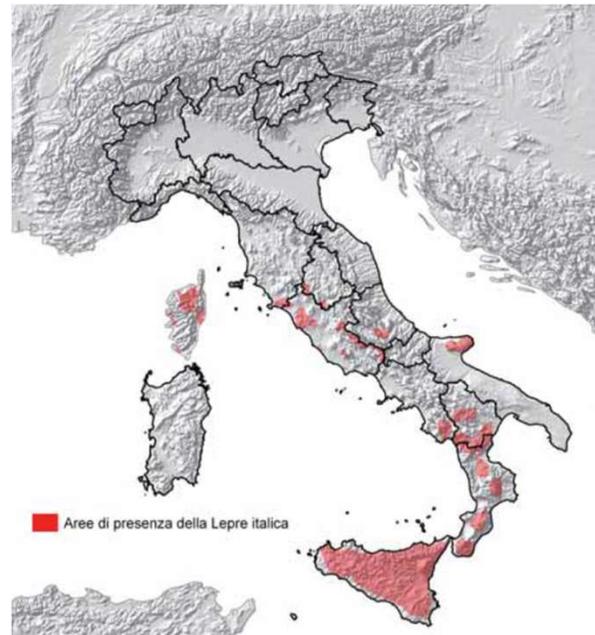


Specie protetta per effetto della L. 157/1992 (ad eccezione della Sicilia dal 2006)

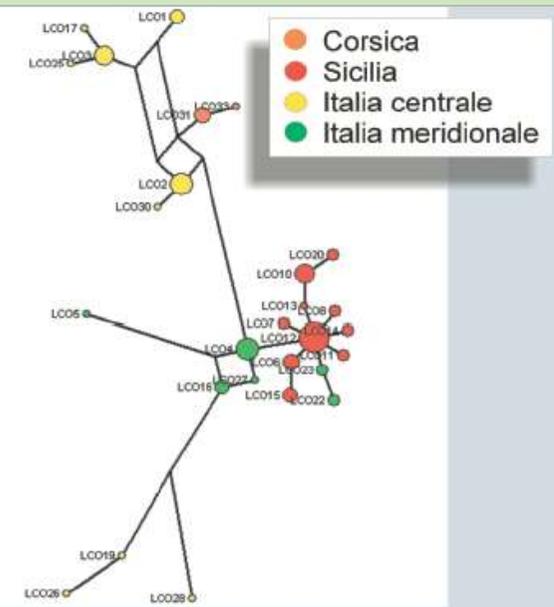
Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana



Aree di presenza della Lepre italiana (ISPRA e Pietri et al., 2010, ridisegnato)



Individui campionati rispettivamente in Italia centrale, meridionale, Sicilia e Corsica mostrano aplotipi mitocondriali distinti e peculiari. (Trocchi e Riga 2005).



Lepus corsicanus (De Winton, 1898) è specie endemica dell'Italia centro-meridionale e della Sicilia, considerata ad elevato interesse biogeografico.

Il “Piano d'Azione Nazionale per la Lepre Italiana” (ISPRA), pubblicato nel 2001, individua le possibili soluzioni teorico-pratiche per la conservazione e gestione di una specie endemica definibile “minacciata” secondo i criteri dell'IUCN.

Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

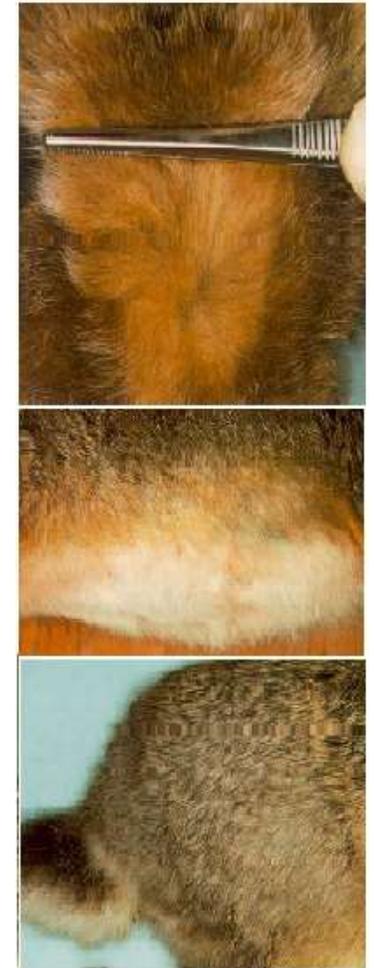
Differenze della colorazione del mantello tra *Lepus corsicanus* e *Lepus europaeus*



L. italica



L. europea



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Scopo del progetto

La lepre italiana *Lepus corsicanus* è endemica dell'Italia centro-meridionale e della Sicilia e il suo areale di distribuzione è stato notevolmente alterato dalle attività umane. Sebbene questa specie sia protetta nell'Italia continentale, è morfologicamente simile alla lepre europea *Lepus europaeus* e le due specie potrebbero essere confuse durante la caccia. Per determinare l'area di presenza della lepre italiana nei **distretti di caccia della provincia dell'Aquila**, abbiamo condotto un campionamento genetico non invasivo utilizzando il rilevamento degli escrementi.



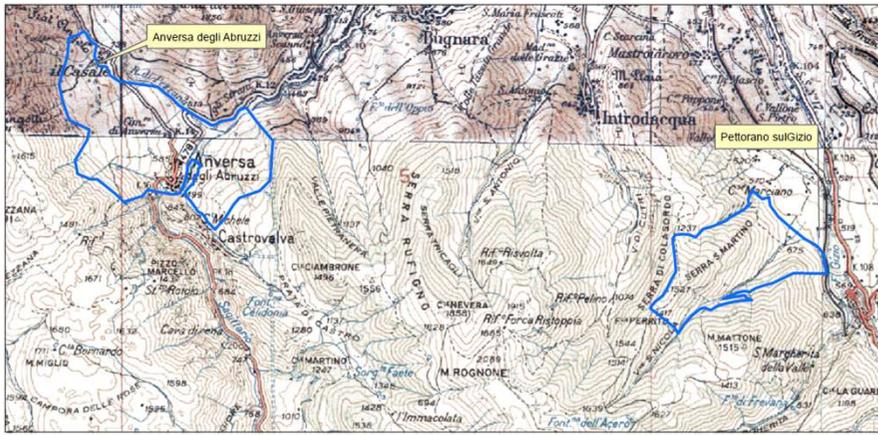
Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Metodi

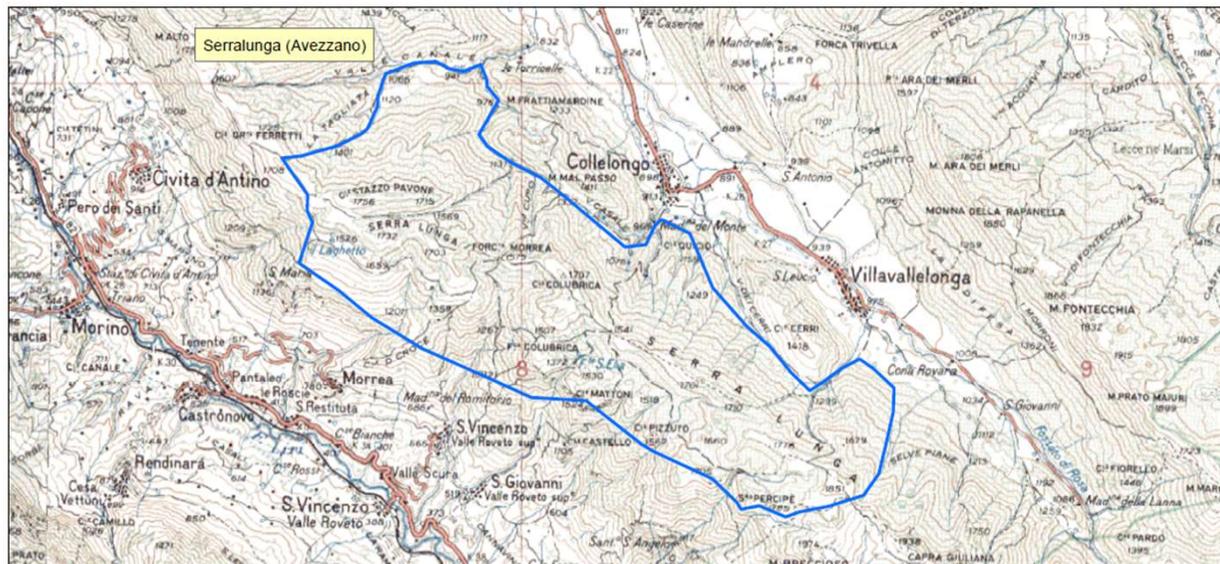
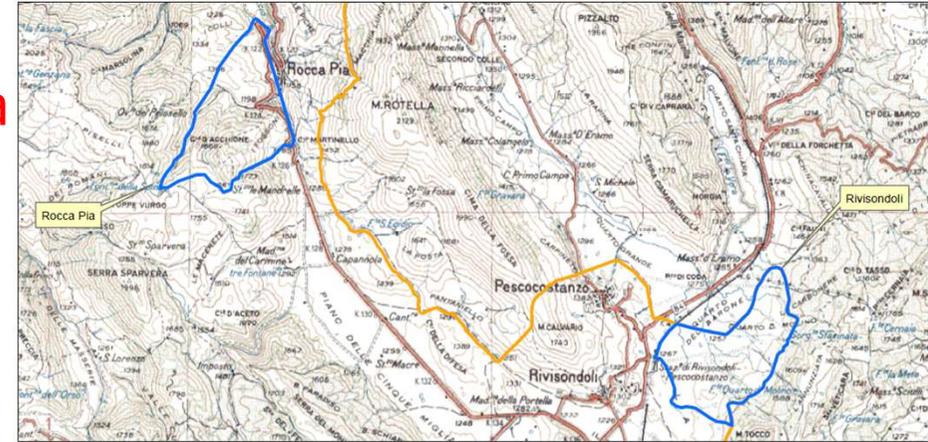
- **Aree di studio:** cinque aree della Regione Abruzzo (che vanno da 400 a 3.600 ha), collocate all'interno della distribuzione storica delle specie. Le aree prescelte sono poste tra i 450 m e i 1800 m s.l.m.;
- **Habitat** principali: boschi di latifoglie, boschi di conifere, praterie naturali, bosco-arbusti di transizione, pascoli e aree agricole con vegetazione naturale;
- Le ricerche per il campionamento di pellet fecali sono state condotte utilizzando uno ***springer spaniel inglese*** addestrato per il riconoscimento degli escrementi di lepre.
- **Caratterizzazione delle specie:** il DNA estratto dai pellet è stata possibile tramite High Resolution Melting Analysis, o HRM, condotta con il Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) e il Type-it HRM PCR Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) a cura di UNINA.



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana



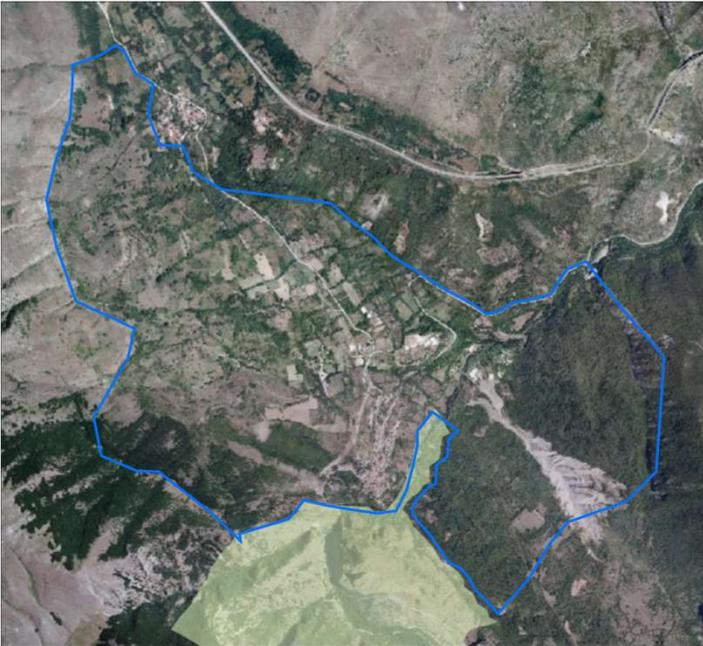
Aree di ricerca



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Aree di ricerca: ATC SULMONA

Area Anversa degli Abruzzi -
contiguità con l'area protetta
Riserva Naturale Gole del Sagittario



Area Pettorano sul Gizio -
contiguità con l'area protetta
Riserva M. Genzana Alto Gizio



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Aree di ricerca: ATC SULMONA

Area Rocca Pia - contiguità con
l'area protetta Riserva M. Genzana
Alto Gizio e Parco Nazionale della
Majella



Area Rivisondoli - contiguità con
l'area protetta Parco Nazionale
della Majella



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche
Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Aree di ricerca: ATC AVEZZANO



Area Villavallelonga

Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Addestramento del cane

Imprinting dell'odore

L'imprinting è stato effettuato con la tecnica dello sniffing. I campioni di escrementi puliti sono stati posti in un contenitore di vetro sterilizzato (20' a 100°). Ogni cane aveva 3 barattoli di vetro sterilizzati (uno per ogni giorno di imprinting) contenenti ciascuno 3 campioni di escrementi. Il conduttore, seduto su una sedia in ambiente domestico, teneva in mano il barattolo. Il cane riceveva il rinforzo ogni volta che annusava l'interno del barattolo. L'odore target è stato utilizzato per tre giorni consecutivi. Il cane ha eseguito 243 ripetizioni di sniffing di odore target ricevendo altrettanti rinforzi.

Test per la discriminazione dell'odore

Easy Test (PF): sei contenitori, uno contiene l'odore target, gli altri cinque sono vuoti.

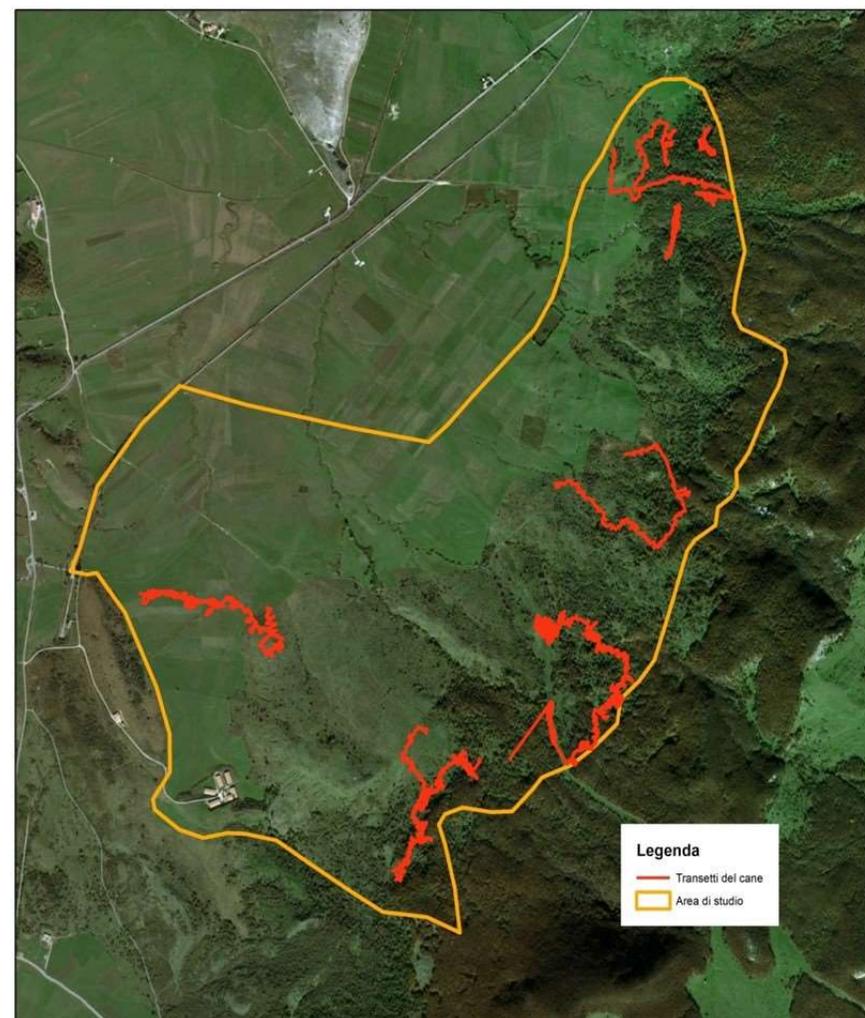
Test Difficile (PD): sei contenitori, uno contiene l'odore target, altri cinque contengono cinque odori distraenti (un oggetto di plastica, l'odore del conduttore, un giocattolo per cani, cibo per cani, erba).



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Risultati

- ❖ Periodo monitoraggio: **settembre – ottobre 2017**
- ❖ In totale sono stati effettuati **31 transetti**. Complessivamente il cane ha percorso circa **72 km**, con un impegno orario medio di **circa 6 ore di lavoro**.
- ❖ Il conduttore invece ha percorso una distanza complessiva di 28 km, relativi alla fase di conduzione del cane, per complessive **10 giornate totali di monitoraggio del binomio**.
- ❖ La durata totale della fase di ricerca è stata di **20 ore 20 minuti e 49 secondi**. L'arresto totale pari a 9 h 31 min 21 sec.
- ❖ **Il tempo totale effettivo di ricerca è stato di 10 h 49 min 28 sec.**
- ❖ I pellet segnalati in totale sono stati **120**, considerando i pellet freschi e quelli vecchi, mentre i **pellet fecali campionati, in quanto idonei per le analisi di estrazione del DNA sono stati in totale 51**.
- ❖ Su 31 transetti percorsi, solo in 5 non sono stati rinvenuti i pellet fecali. **La velocità media del cane registrata, su 31 transetti, è pari a 6,70 km/h.**

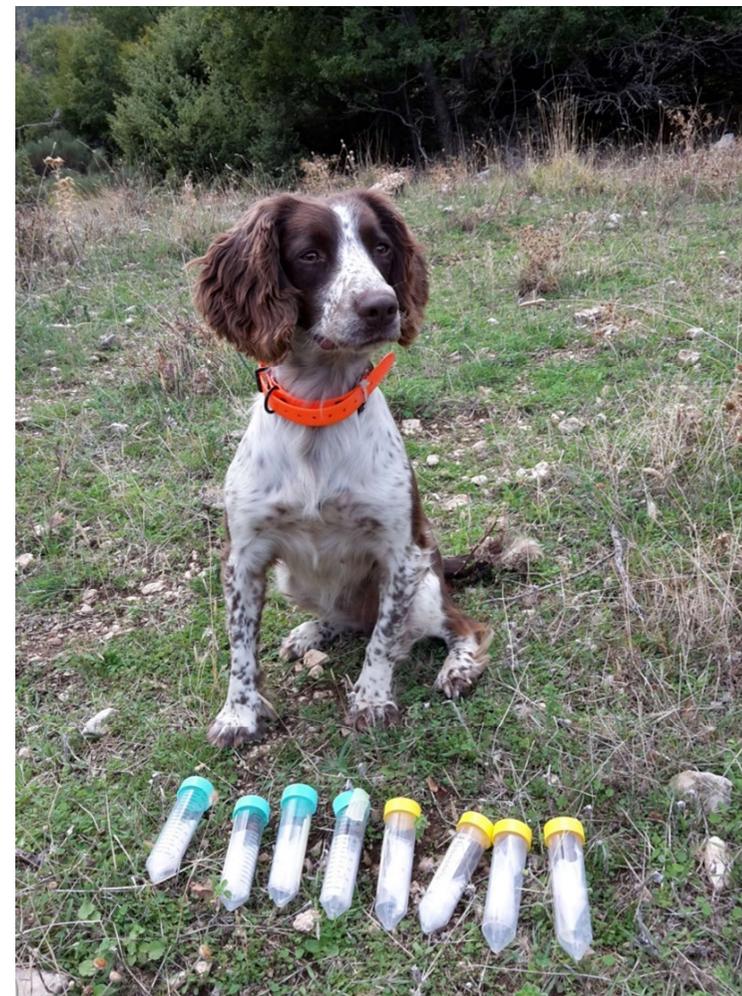
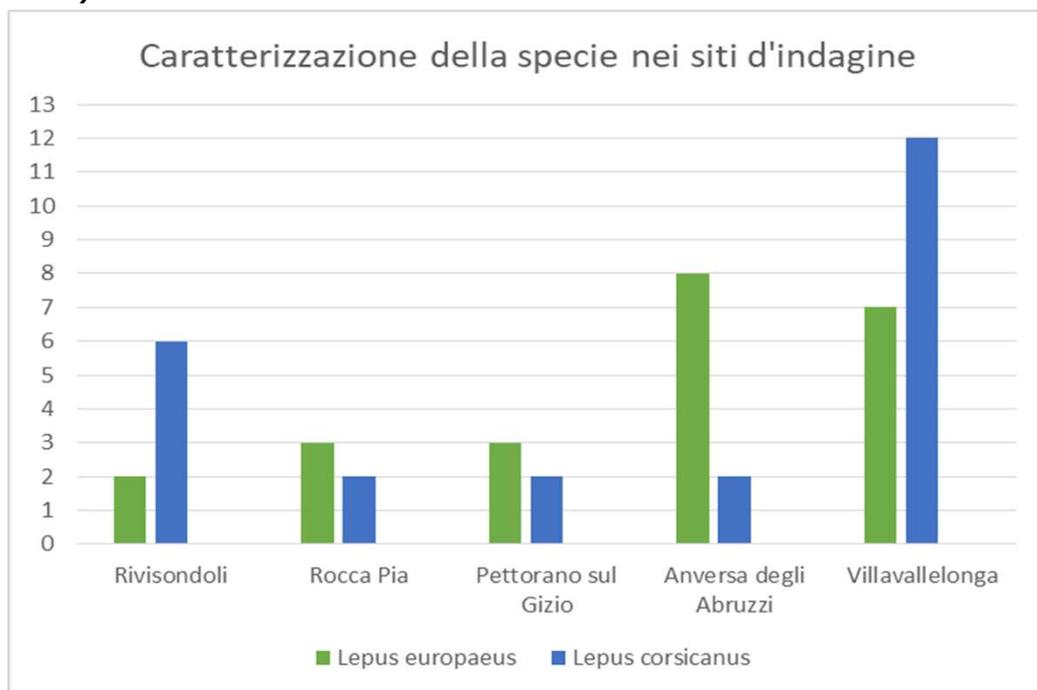


Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Risultati

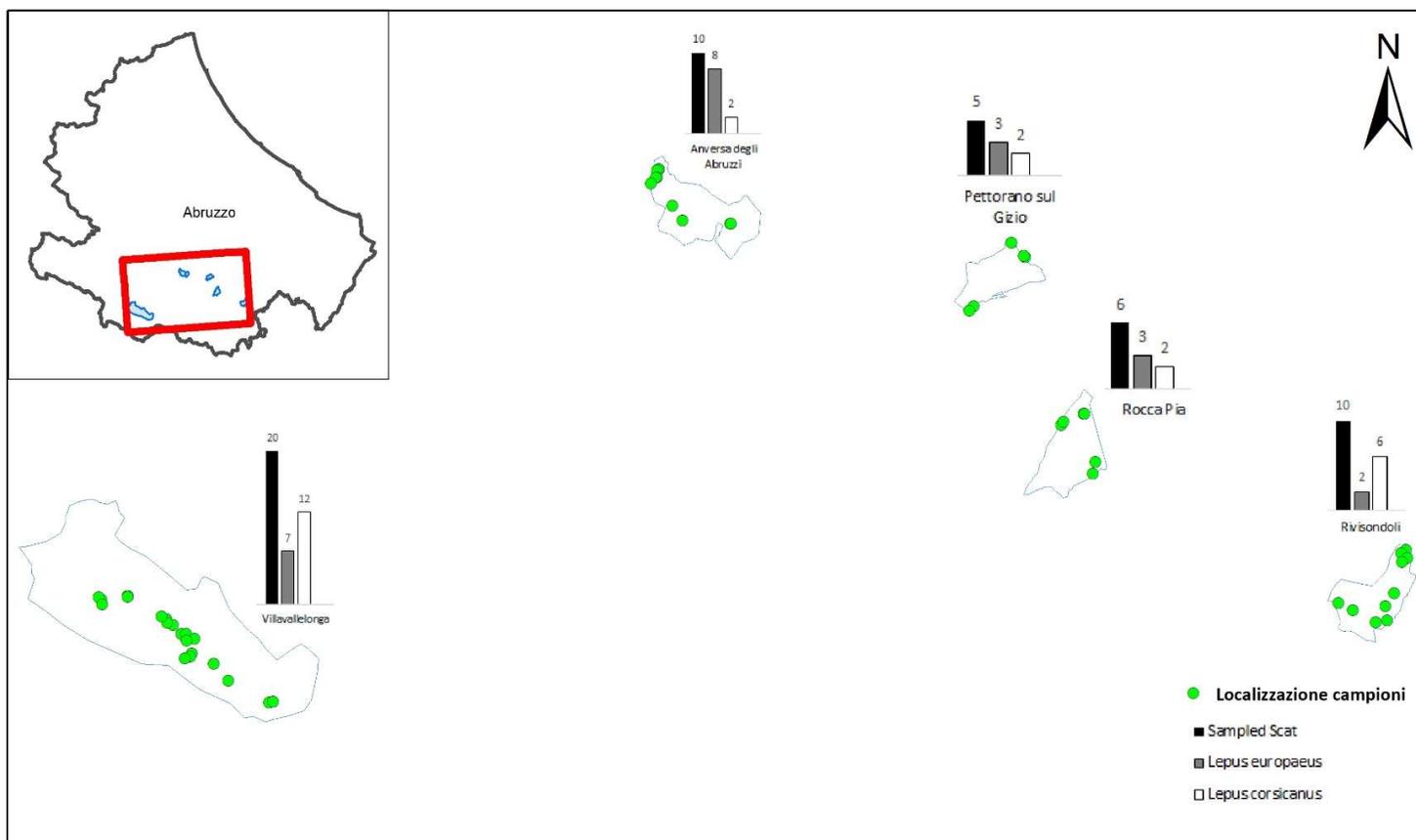
Su un totale di 51 campioni, la caratterizzazione della specie è stata effettuata con successo per 47 di essi: 24 sono stati assegnati a lepre italiana (*Lepus corsicanus*) e 23 a lepre europea (*Lepus europaeus*). 4 campioni non sono stati caratterizzati geneticamente.

La resa di caratterizzazione della specie è stata del 92% (analisi con esito positivo di 47 campioni su 51).



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

ATC SULMONA ed ATC AVEZZANO Localizzazione dei pellet campionati



Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche Il progetto ENCI sulla Lepre italiana

Take it easy: scat detection dog and conservation of Italian hare (*Lepus corsicanus*)



XI CONGRESSO ITALIANO DI TERIOLOGIA – FLORENCE 20 – 22 June 2018

Take it easy: scat detection dog and conservation of Italian hare (*Lepus corsicanus*)

Fortebraccio M.¹, Riga F.², Bottaro R.³, Donnini S.³

¹ Freelande, Potenza, Italy
² ISPRA, Italian Institute for Environmental Protection and Research
³ Ente Nazionale Cinofilia Italiano
Corresponding author Francesco Riga: e-mail francesco.riga@isprambiente.it

ASPRA
Associazione Nazionale Cinofila Italiana

Introduction

The Italian hare *Lepus corsicanus* is endemic to central-southern Italy and Sicily, and its distribution range has been greatly altered by human activities. Although this species is protected in continental Italy, it is morphologically similar to European hare *Lepus europaeus* and the two species could be confused during hunting. To determine the geographical range of Italian hare in the hunting districts of L'Aquila province, we conducted non-invasive genetic sampling using scat detection.

Detection dog training

Subject involved in the experiment is a springer spaniel trained for twelve months in scent detection. The dog is a female, and she started training at 12 months old. For the stimuli, we used sample of scat of Italian Hare collected from the environment and genetically checked. The training procedure used is the odour imprinting. The preliminary phase of the experiment consisted of the imprinting of target scent. The imprinting was done with the sniffing technique: Clean scat samples were placed in a sterilized glass container (20 x 100°). Each dog had 3 sterilized glass jars (one for each day of imprinting) containing each 3 samples of scat. The handler, sitting on a chair in domestic environment, held the jar in his hand. The dog received the reinforcement each time he sniffed inside the jar. All the dogs involved in the experiment were already conditioned to this method of training. The target scent was imprinted on three consecutive days. The dog performed 243 target odor sniffing and received 243 reinforcements.

All tests were conducted in blind modality where only the experimenter knew the target odour position. The position of the lineup corresponding to the target odour is randomly extracted using a nut. For the lineup, clean scat samples were used. After each test, the PVC containers are cleaned with 50% water and 10% vinegar solution. Dogs works on the lineup off leash, in a familiar training environment without environmental distractions. For each test the dog has two minutes to identify the target scent, once the time expires the test is considered as non-response. The handler can get the dog's attention by touching each box with his hand. The alert behaviour of the target smell is not imposed by the experimenter, the dog can show the learned behaviour (sitting, lay down, freezing).

Each dog has to perform two different tests:

- Easy Test (PF): it is a lineup made by six containers, one contains the target scent, other five are empty.
- Difficult Test (PD): it is a lineup made by six containers, one contains the target scent, other five contains five distraction scents (a plastic object, the scent of the handler, one dog toy, dog food, grass).

Methods

From September to October 2017 we surveyed five areas of Abruzzi Region (ranging from 400 to 3,600 ha), located within the species historical distribution. The chosen areas are placed between 450 m and 1800 m a.s.l., principal habitat were: broad-leaved forest, coniferous forest, natural grasslands, transitional woodland-brush, pastures and agriculture area with natural vegetation. The study areas were adjacent are to three protected areas. Searches for faecal pellet sampling were conducted using a scat detection dog. The dog was a English springer spaniel trained by positive reinforcement for hare scats recognition. Faecal pellets indicated by dog were collected for genetic analysis if they were free from mould and not crushed or broken; scat position, dog path, temperature and humidity were also recorded. DNA was extracted with QIAamp DNA Stool Mini Kit. The determination of the species for the DNA extracted from the pellets was done through High Resolution Melting Analysis, conducted with the Italian-Gene Q and the Type-It HRM PCR Kit. We develop a *L. corsicanus* suitability model using MaxEnt, occurrence data were basing on Italian hare's scat position (20 m grid).

Results

In total, 31 transects were made. Overall, the dog travelled 72 Km (about 6 hours per day), the driver 28 km. The survey lasted 10 days. The duration of the search phase was 20 hours 20 minutes, the resting time (i.e. the time in which the dog remained stationary because in the resting phase or in the phase of passive alert), was 9 h 31 min. The total effective search time was 10 h 49 min. Dog indicated 120 hare pellets, considering the fresh and old samples. The faecal pellets sampled, as suitable for the DNA extraction analyzes were a total of 51. Out of all samples analyzed, the characterization of the species was successfully carried out for 47 of them: 24 were assigned to Italian hare and 23 to Brown hares. For 4 samples it was not possible to carry out the characterization probably due to the bad state of DNA conservation.

Discussion

Use of detection dog greatly improved scat collection (short searching time and survey in difficult habitat and substrates) and genetic analysis success (92% characterization rate). In every the surveyed areas, we assessed the presence of both Italian and European hare. On the basis of our results we proposed the ban of hare hunting in the simplicity areas (green areas in the suitability model picture) and the ban of restocking of *L. europaeus* in the suitable area of *L. corsicanus*, as predicted by species distribution model. We have demonstrated the importance of incorporating traditional field techniques with non-invasive sampling and sophisticated molecular tools to elucidate geographical range, extent of occurrence, and areas with the highest suitability for occupancy by the Italian hare. Such information is essential in designing strategies for species conservation focused on: brown hare repopulation, poaching or accidental hunting, suitable habitat fragmentation.

**Ricerca dei campioni biologici per le analisi genetiche
Il progetto ENCI sulla Lepre italiana**

Grazie per l'attenzione

