

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA  
(XXIX CICLO)

**STUDIO SULLA NICCHIA ECOLOGICA  
DI LEPRE ITALICA  
(*LEPUS CORSICANUS*)**

TUTOR  
PROF. DOMENICO FULGIONE

DOTTORANDA  
DOTT. MARIA BUGLIONE

COORDINATORE  
PROF. SALVATORE COZZOLINO

2014-2017



# INDICE

---

<b>Sintesi</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>5</b>
<b>Capitolo 1: Introduzione</b>	<b>9</b>
<b>1.1 La lepre italica</b>	<b>10</b>
<i>1.1.1. Geonemia</i>	<b>10</b>
<i>1.1.2. Sistematica</i>	<b>11</b>
<i>1.1.3. Stato di conservazione</i>	<b>13</b>
<i>1.1.4. Caratteristiche morfologiche</i>	<b>15</b>
<i>1.1.5. Ecologia ed etologia</i>	<b>17</b>
<b>1.2. Finalità del progetto</b>	<b>20</b>
<b>Capitolo 2: Materiali e Metodi</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Area di studio</b>	<b>23</b>
<b>2.2. Campionamento</b>	<b>29</b>
<b>2.3. Georeferenziazione dei segni di presenza</b>	<b>33</b>
<b>2.4. Caratterizzazione genetica della specie</b>	<b>33</b>
<i>2.4.1. Estrazione del DNA</i>	<b>33</b>
<i>2.4.2. Sequenziamento Sanger</i>	<b>34</b>
<i>2.4.3. High Resolution Melting (HRM)</i>	<b>35</b>
<b>2.5. Identificazione di habitat idonei</b>	<b>37</b>
<b>2.6. Analisi della dieta</b>	<b>38</b>
<i>2.6.1. Estrazione del DNA da pellet</i>	<b>40</b>
<i>2.6.2. Amplificazione del DNA con primer universali per vegetali</i>	<b>40</b>
<i>2.6.3. Sequenziamento di nuova generazione e analisi bioinformatica dei dati</i>	<b>42</b>
<i>2.6.4. Analisi di rarefazione</i>	<b>45</b>
<b>2.7. Caratterizzazione floristico-vegetazionale della Sotto-area 2b</b>	<b>45</b>
<b>2.8. Plasticità ecologica</b>	<b>46</b>
<b>2.9. Analisi di sovrapposizione di nicchia</b>	<b>47</b>

---

<b>Capitolo 3: Risultati</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Assegnazione della specie</b>	<b>50</b>
<b>3.2. Analisi dell'ecologia spaziale</b>	<b>51</b>
<i>3.2.1. Distribuzione del genere Lepus nel Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni (Sotto-area 1)</i>	<b>51</b>
<i>3.2.2. ENFA</i>	<b>52</b>
<b>3.3. Analisi della dieta</b>	<b>55</b>
<i>3.3.1. Caratterizzazione delle preferenze alimentari di lepre italica</i>	<b>57</b>
<i>3.3.2. Variazione stagionale della dieta di lepre italica</i>	<b>65</b>
<i>3.3.3. Caratterizzazione delle preferenze alimentari di lepre europea</i>	<b>68</b>
<i>3.3.4. Sovrapposizione trofica tra lepre italica e lepre europea</i>	<b>75</b>
<i>3.3.5. Plasticità di lepre italica in presenza di neve</i>	<b>86</b>
<i>3.3.6. Plasticità di lepre italica in di altri disturbi</i>	<b>88</b>
<b>3.4. Sovrapposizione di nicchia ecologica tra lepre italica e lepre europea</b>	<b>88</b>
<hr/>	
<b>Capitolo 4: Discussione</b>	<b>90</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>95</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>96</b>
<hr/>	

## **Sintesi: Studio sulla nicchia ecologica di lepre italiana (*Lepus corsicanus*)**

Lo *status* di lepre italiana non sembra sostanziato da un'indagine ecologica tale che definisca la sua collocazione e preferenza ambientale. Gli scarsi dati disponibili, infatti, suggeriscono conclusioni contrastanti: la presenza della specie in contesti ambientali molto diversificati e in simpatria con popolazioni stabili di lepre europea, male si sposa con la categorizzazione di specie minacciata.

Probabilmente, gli studi sinora sviluppati non hanno focalizzato una caratterizzazione ecologica tale da giustificare la sua condizione di vulnerabilità.

Il seguente progetto di ricerca è finalizzato ad approfondire ed incrementare le conoscenze relative alle caratteristiche ecologiche (spaziali e trofiche) della lepre italiana, nonché descrivere la sua capacità adattativa in presenza di diverse pressioni ambientali, che definiremo "plasticità ecologica".

Le analisi ecologiche sono state sviluppate in contesti geografici differenti, al fine di indagare l'ecologia trofica, l'ecologia spaziale e le interazioni con il competitore (la lepre europea) o elementi di disturbo (pascolo equino/bovino, fauna impattante, presenza di neve).

Durante i censimenti state raccolte informazioni dirette (osservazione dell'animale) ed indirette (es. escrementi, peli, orme, resti), riconducibili alla specie.

Data la simpatria tra lepre italiana ed europea nei siti indagati, è stato necessario caratterizzare il DNA estratto dalle fonti biologiche, al fine di risalire alla distribuzione delle lepri, georeferenziando ogni reperto e riportando le sue coordinate in ambiente GIS (Geographic Information System).

Questa mappa di distribuzione, è stata utile all'elaborazione di mappe di idoneità di habitat attraverso il metodo ENFA (Ecological Niche Factor Analysis, Hirzel *et al.*, 2002).

In accordo con i risultati di Fulgione *et al.* (2009), lepre italiana sembra sia meglio adattata al contesto territoriale in cui si è evoluta rispetto alla lepre europea (marginalità=1.98 e 2.42, rispettivamente). Infatti, le popolazioni di lepre europea sono composte da individui alloctoni reintrodotti (Fulgione *et al.*, pers. comm) e individui autoctoni naturalmente dispersi (es. Galende & Raffaele 2008; Bertolino *et al.*, 2007).

Per la caratterizzazione delle abitudini alimentari di lepre italiana e lepre europea, è stato utilizzato, per la prima volta su queste specie, un approccio molecolare di DNA

*metabarcoding* accoppiato a Tecnologie di Sequenziamento di Nuova Generazione (HTS, High Throughput Sequencing) su pellet fecali (Valentini et al., 2009a; 2009b; Taberlet et al., 2012; 2014; Pompanon et al., 2012; De Barba et al., 2014).

Dall'analisi è emerso che la dieta di lepre italiana include 215 taxa vegetali.

In risposta alla disponibilità temporale delle risorse trofiche, che si determina ad esempio in dipendenza delle stagioni, o della presenza di fattori di disturbo, la lepre italiana è in grado di variare la sua alimentazione, evidenziando un comportamento estremamente plastico. Utilizzando l'indice di Roughgarden (1978) è stato misurato il livello di specializzazione trofica individuale (*TNWs*), sotto queste differenti condizioni ambientali.

La variazione stagionale della dieta di lepre italiana, mostra che le *Fabaceae* rappresentano l'elemento trofico principale sia in primavera (75.65%) sia in estate (84.42%) che in autunno (98.43%). In inverno, invece, sono le *Fagaceae* ad essere le più consumate, sebbene costituiscano solo per il 32.02%. Infatti, a differenza delle altre stagioni, dove si registra una esclusiva dominanza delle *Fabaceae*, in inverno le *Fagaceae*, le *Poaceae* (26.92%) e le *Fabaceae* (23.99%) contribuiscono per l'82.94% alla dieta.

In condizioni di allopatria, sia l'indice di diversità di Roughgarden (*TNWs*=3.02) che la ricchezza in generi (n=56), presentano i valori maggiori, indicando un'ampia nicchia trofica e un comportamento generalista.

Passando da una condizione in cui lepre italiana è in sola simpatria con lepre europea (*TNWs*=1.94; n=24) alla presenza di pascolatori (disturbi) (*TNWs*=1.00; n=57), l'indice di diversità della dieta diminuisce mentre la ricchezza in generi aumenta. Questo suggerisce che, in sola presenza della competitorice, la lepre italiana espande la sua nicchia trofica, generalizzando il suo comportamento alimentare (Van Valen's, 1965; Lister, 1976; Bolnick *et al.*, 2002), considerando anche la minore diversità specifica e fitocenotica del pascolo.

Viceversa, la presenza di bovini ed equini, che adottano strategie di pascolamento e calpestio diversificate, induce un aumento della diversità vegetale (Gusmeroli, 2004; Hickman *et al.*, 2004; Hanke *et al.*, 2014; Komac *et al.*, 2014). In questa condizione, sebbene sia incluso nella dieta un numero maggiore di generi vegetali, aumenta il grado di specializzazione di lepre italiana, che va incontro ad una parziale segregazione trofica.

In presenza di neve, la specie è capace di ridurre a poche essenze vegetali la sua dieta, modificando quasi completamente le sue scelte alimentari. Infatti, i nostri risultati evidenziano un aumento di circa 84% nel consumo di *Fagaceae* passando da una condizione di assenza di neve ad una in cui il pascolo è ricoperto dalla coltre nevosa.

Per valutare eventuali interazioni competitive (trofiche/spaziali) tra lepre italiana e lepre europea è stato misurato il grado di sovrapposizione delle loro nicchie ecologiche, tramite l'indice di sovrapposizione di nicchia, calcolato utilizzando la formula di Pianka (1973). I risultati sembrano suggerire che le due specie vivono una fase di risoluzione di un rapporto competitivo. Infatti, l'indicatore di sovrapposizione di nicchia ecologica restituisce un valore di 98.7%, se calcolato come valore medio tra le variabili considerate, e di 35%, se calcolato attraverso una procedura di randomizzazione delle 15 variabili considerate. Questa discordanza potrebbe essere il segnale di una simile richiesta ecologica che ha trovato una recente segregazione risolvendo la fase competitiva (Gotelli & Graves 1996; Sale, 1974; Connell, 1980).

Questo studio ha permesso di ottenere una prima definizione della nicchia ecologica, dipanando molte incertezze relative alla sua collocazione nell'ambiente e alle sue scelte alimentari. Tali acquisizioni individuano le traiettorie da seguire per futuri approfondimenti e costituiscono un importante punto di partenza per avviare efficaci strategie di intervento volte a preservare questo endemismo dell'Italia centro-meridionale.

L'immagine che emerge della lepre italiana, è di una specie perfettamente calata nel suo ambiente, adattabile e capace di sfruttare un ampio spettro di risorse ecologiche.

L'adattabilità e la plasticità di lepre italiana sembrano suggerire che la vulnerabilità di questa specie non sia connessa alla mancanza di idonee nicchie ecologiche o alla sua incapacità di sostenere la competizione con la lepre europea. I dati qui elaborati sembrano suggerire che la frammentazione del paesaggio rappresenti la reale minaccia alle popolazioni di lepre italiana. Nell'area indagata sono state identificate almeno 5 isole ad alta idoneità disconnesse tra loro.

Quali possano essere le cause che hanno portato le popolazioni di lepre italiana in questa condizione di elevata frammentazione è difficile da determinare, anche se, come per altre specie, possono aver avuto un ruolo rilevante fattori come l'abbandono del piano montano da parte dell'uomo, la persecuzione e il bracconaggio o eventi epidemici

dovuti al contatto con le popolazioni immesse di lepre europea (Angelici & Luiselli 2001; Trocchi & Riga 2005; Ripa *et al.*, 2001).

La condizione attuale deve essere affrontata e risolta, prima che variabili come la riduzione del flusso genico, *inbreeding* ed erosione della diversità genetica (Frankham *et al.*, 2006) possano estinguere localmente questa specie.

I risultati ottenuti con l'analisi delle caratteristiche ecologiche di lepre italiana introducono importanti spunti gestionali. In particolare, sarebbe interessante indagare la composizione genetica delle popolazioni isolate, valutandone il tasso di consanguineità e il grado di flusso genico, cercando di definire il loro reale stato di minaccia. Successivamente, potrebbero essere concepiti corridoi ecologici mirati alla connessione dei nuclei isolati. Inoltre, partendo dai territori con caratteristiche ecologiche idonee alla presenza della specie, potrebbero essere avviate pratiche di reintroduzione di nuovi individui (nel rispetto dell'identità genetica dei diversi aplo-gruppi italiani) per incrementare le densità delle popolazioni. Unitamente questi interventi potrebbero rappresentare un valido contributo per il recupero e la salvaguardia di questo importante tassello della biodiversità.

## **Summary: Study on ecological niche of the Italian hare (*Lepus corsicanus*)**

The *status* of the Italian hare does not seem substantiated by ecological survey that defines its environmental location and preference. The limited available data, in fact, suggest conflicting conclusions: the presence of the species in very different environmental contexts and, often, in sympatry with populations of the European hare, doesn't fit fine with the categorization of *vulnerable* species. Probably, studies exploring its ecology have not focused so far in developing an ecological characterization as to justify its threatened *status*.

This PhD project aims to investigate on the ecological niche of the Italian here and improve the understanding on its spatial and trophic preferences, describing the capacity of the species to adapt in the presence of different environmental pressures, referred as “ecological plasticity”.

The ecological analyses were developed in different geographical contexts, in order to investigate the trophic requirements, spatial requirements and interactions with competitor (the European hare) or some disturbing elements (the presence of horse/cow pasture, invasive wild fauna, and snow).

During the sampling, we collected direct (animal observation) and indirect (eg. stool, hair, footprints, remains) information referable to the species.

Given the sympatry between the Italian and European hare in our study area, we characterized the DNA extracted from biological sources to develop a distribution of the hares, georeferencing every finds and reporting their coordinates in GIS (Geographic Information System) environment.

Thanks to this distribution map, we built habitat suitability maps, based on ENFA (Ecological Niche Factor Analysis, Hirzel *et al.*, 2002).

According to Fulgione et al (2009), the Italian hare seems to be better adapted to the local context in which it evolved than the European hare (marginality 1.98 and 2.42, respectively). In fact, the European hare has populations composed by introduced allochthonous individuals (Fulgione *et al.*, Pers. Comm ) and autochthonous individuals, naturally dispersed (eg. Galende & Raffaele 2008; Bertolino *et al.*, 2007).

To characterize the diet of the Italian and European hare, we used, for the first time on these species, a molecular approach: DNA *metabarcoding* and High Throughput Sequencing(HTS) on fecal pellets (Valentini et al., 2009a; 2009b; Taberlet et al., 2012;

2014; Pompanon et al., 2012; De Barba et al., 2014). The Italian hare diet includes 215 plant taxa.

Temporal availability of trophic resources, due to both seasonal variation and disturbing factors, affects the diet of the Italian hare, that shows an extremely plastic food behavior. Using the Roughgarden index (1978), we measured the level of individual trophic specialization (*TNWs*), under these different environmental conditions.

The seasonal variation of the Italian hare diet, shows that the *Fabaceae* represent the main food elements both in spring (75.65%), in summer (84.42%), and in autumn (98.43%). In winter, the *Fagaceae* are the most consumed item, even if they represent only 32.02% of the diet. In fact, unlike other seasons, characterized by a dominance of *Fabaceae*, in winter *Fagaceae*, *Poaceae* (26.92%) and *Fabaceae* (23.99%) contributed with 82.94% to the diet.

For the Italian hare in allopatry, both the Roughgarden diversity index ( $TNW = 3.02$ ) and number of genera ( $n = 56$ ), presented the highest values, indicating a wide trophic niche and generalized food behavior.

In sympatry with the European hare, the diet of the Italian hare showed a diversity index  $TNWs = 1.94$  and a number of genera  $n = 24$ . In the presence of grazers (disturbing factors),  $TNWs = 1.00$  and  $n = 57$ , thus the diversity index decreases while the number of genera increases.

This suggests that, in the presence of the competitor, the Italian hare extend its trophic niche, generalizing its eating behavior (Van Valen's, 1965; Lister, 1976; Bolnick *et al.*, 2002), also considering the less specific diversity of pasture.

The presence of domestic grazers, which adopt diversified grazing strategies, induces an increase in plant diversity (Gusman, 2004; Hickman *et al.*, 2004; Hanke *et al.*, 2014; Komac *et al.*, 2014). Under this condition, although the diet included a greater number of plant genera, the Italian hare increases its specialization, undergoing a partial trophic segregation.

In presence of snow, the Italian hare changed almost completely its food choices, reducing to a few plant species its diet. Indeed, our results show an increase of about 84% in the *Fagaceae* consumption when the pasture is covered by snow.

To assess competitive interactions (trophic/space) between the Italian and European hare, we evaluated the correlation of their ecological niches by the niche overlap index,

according to Pianka (1973). The results suggest that the two species seem to live a phase of resolution of a competitive relationship. In fact, the ecological niche overlap indicator returns a value of 98.7%, when calculated as an average value between the variables considered, and 35%, if calculated through a process of randomization of the 15 variables considered. This differences could be the signal of a similar ecological demand that has found a recent segregation solving the competitive interaction (Gotelli & Graves 1996; Salt, 1974; Connell, 1980).

This study resulted in a first definition of the ecological niche of the Italian hare, unraveling many uncertainties related to its environment position and its food choices. Learn more about this ecological traits can provide a valuable contribution to develop adequate conservation and management strategies for this endemic species and to preserve biodiversity.

The Italian hare, emerges as an adaptable species, able to exploit a wide range of ecological both spatial and trophic, resources.

These findings suggest that Italian hare actual *status* is not linked to the lack of suitable ecological niches or its inability to compete with the European hare. Our data suggest that the fragmentation of the landscape represents the real threat to the Italian hare populations. In our study area, in fact, the ENFA highlights at least 5 high suitability patches, disconnected from each other.

What may be the causes that led to the Italian hare populations in this highly fragmented condition is difficult to determine. Probably, as for other species, the abandonment of the mountain pastures by man, the poaching, and outbreaks due to the contact with the introduced populations of the European hare, may have had a significant role (Angelici & Luiselli 2001; Trocchi & Riga 2005; Rip *et al.*, 2001).

The current topic must be addressed and resolved before some factors, as reduction of gene flow, inbreeding and genetic diversity erosion (Frankham *et al.*, 2006) bring the Italian hare to the local extinction.

These results introduce relevant research and management suggestions. In particular, we could investigate the genetic composition of isolated populations, assessing the degree of consanguinity and gene flow, defining their real threatened *status*. Then, we could be conceived ecological corridors to connect isolated population. In addition, starting from the ecological suitable area for the Italian hare, we could reintroduce new individuals (in respect of the genetic identity of different Italian aplo-groups) in order to

increase the population density. All together these actions could provide a useful contribution to the restoration and preservation of this important component of biodiversity.

# Capitolo 1

## Introduzione

---

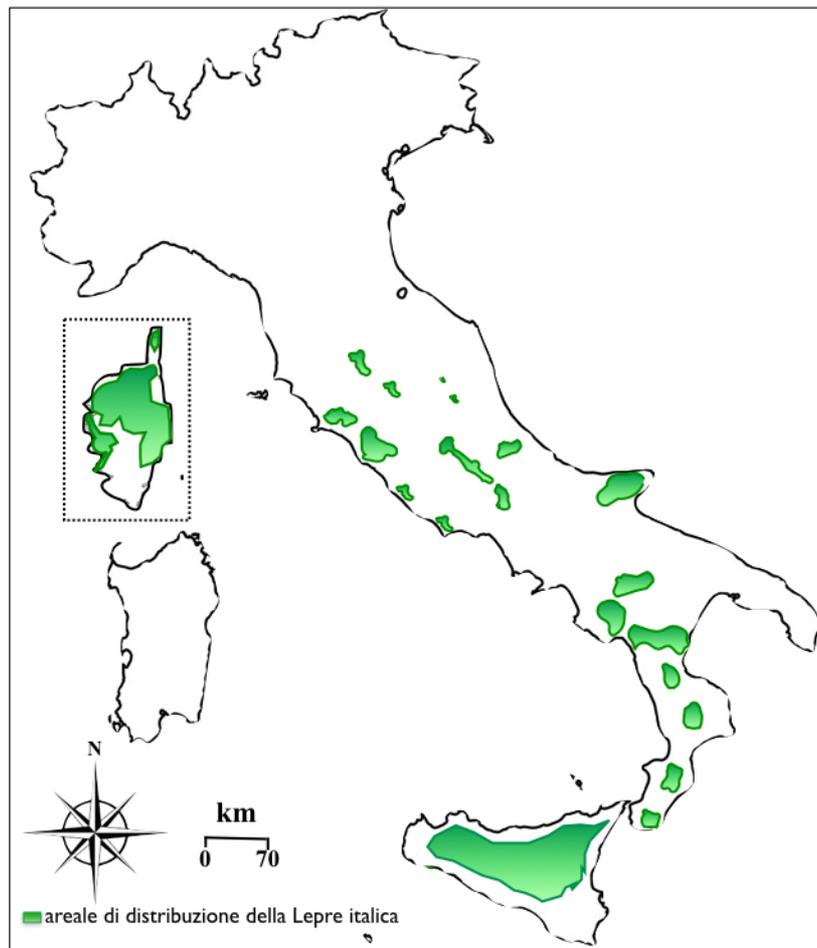


## 1.1. La lepre italica

### 1.1.1. *Geonemia*

La lepre italica (*Lepus corsicanus*, De Winton 1898), è un mammifero lagomorfo appartenente alla famiglia dei Leporidi. E' un endemismo dell'Appennino centro-meridionale e della Sicilia, ed è stata introdotta in Corsica nel XVI secolo (Vigne, 1988). Benché, attualmente i confini del suo areale di distribuzione in Italia siano in via di definizione, sono rappresentati a nord, sul versante tirrenico, dal Monte Aminta nella provincia di Grosseto; sul versante adriatico, sono presenti popolazioni nel Gargano, nella Puglia meridionale e sull'Appennino abruzzese; più a sud, la specie è presente nel Lazio, Campania, Basilicata e Calabria; in Sicilia sembra essere ben diffusa ed è l'unica specie di lepre presente sull'isola (Trocchi & Riga 2001; 2005) (Fig. 1).

La lepre italica si distribuisce sul territorio peninsulare in maniera fortemente frammentata, con popolazioni che mostrano una forte identità geografica e genetica (Pierpaoli *et al.*, 1999), probabilmente a causa di antiche divisioni dell'areale e conseguenti lunghi periodi di isolamento riproduttivo. In particolare, dal sequenziamento del Citocromo b (Cyb) e della Regione di Controllo (CR) del DNA mitocondriale (mtDNA) (Pierpaoli *et al.*, 1999; 2003; Alves *et al.*, 2003) emergono tre diversi aplo-gruppi: uno dell'Italia centrale (Corsica, Toscana e Lazio), quello dell'Italia meridionale (Puglia, Campania e Basilicata) e l'aplo-gruppo comprendente le popolazione della Sicilia (Trocchi & Riga 2001; 2005). La condizione di ridotto flusso genico tra essi è potenzialmente pericolosa per la sopravvivenza della specie, in quanto è causa di fenomeni di erosione della variabilità genetica, incremento del tasso di *inbreeding* e conseguente riduzione della *fitness*.



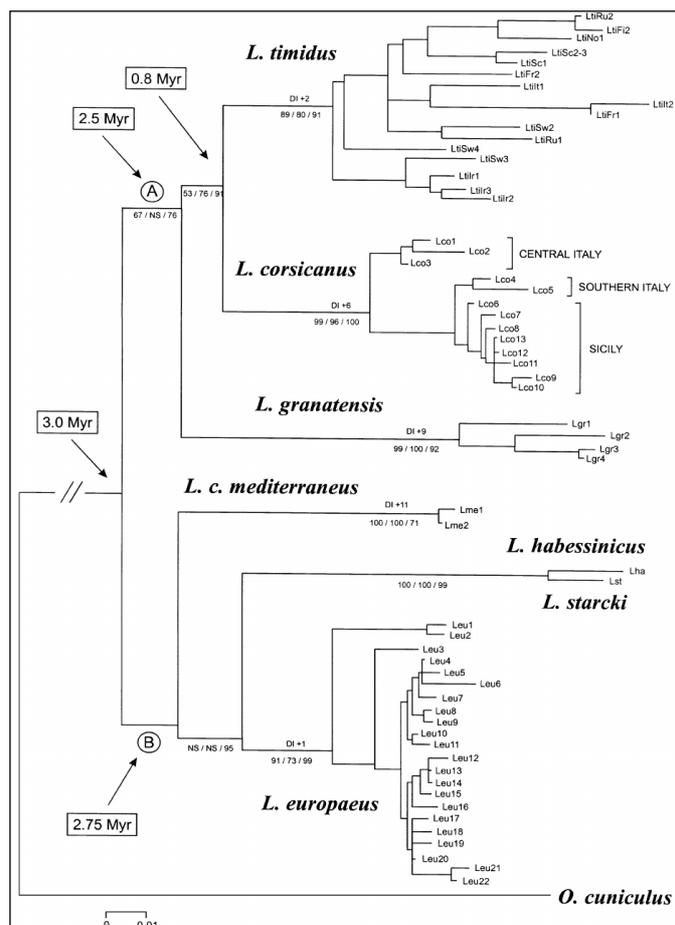
**Figura 1.** Areale di distribuzione della lepre italica.

### ***1.1.2. Sistematica***

La lepre italica è stata descritta per la prima volta da De Winton nel 1898 sulla base di significative differenze morfologiche rispetto alla congenerica lepre europea (*L. europaeus*, Pallas 1778). Ciononostante, le due Lepri sono state considerate per molto tempo due sottospecie conspecifiche (Ellerman & Morrison-Scott 1951; Miller, 1912; Toschi, 1965), probabilmente anche a causa della presunta capacità di ibridare. Successivamente, grazie ad approfondite analisi sulla morfologia, sulla dimensione e sul colore del mantello di reperti museali, la lepre italica è stata eletta a *buona specie* (Palacios, 1996). Le significative differenze tra essa e lepre europea sono state confermate anche da analisi genetiche sull'mtDNA (Pierpaoli *et al.*, 1999; 2003; Alves *et al.*, 2003; 2008; Randi *et al.*, 2007; Sanz-Martín *et al.*, 2007) e più approfondite e recenti analisi morfologiche (Riga *et al.*, 2001). In particolare, dagli studi molecolari, *L. corsicanus* sembra appartenere ad una linea evolutiva indipendente da quella di *L.*

*europaeus* (Pierpaoli *et al.*, 1999). *L. corsicanus*, *L. timidus* e *L. granatensis*, di origine europea, probabilmente confinate ed in seguito speciate in aree di rifugio glaciale, rappresenterebbero un nucleo evolutivo. *L. europaeus*, con *L. capensis mediterraneus*, *L. habessinicus* e *L. starcki*, di origine africana, costituirebbero, invece, una linea evolutiva diversa (Fig. 2). La calibrazione del tasso di evoluzione molecolare ha permesso di stabilire che i due nuclei divergono geneticamente per circa il 12% nella sequenza del Cyb e che l'epoca di separazione tra le forme ancestrali dei due gruppi sembra risalire a circa 3 milioni di anni fa, periodo di transizione fra il Pliocene e il Pleistocene (Pierpaoli *et al.*, 1999). L'ipotesi di un lungo processo di evoluzione indipendente sarebbe confermato anche da ulteriori analisi genetiche

basate sull'utilizzo di marcatori ereditati biparentalmente (microsatelliti) che evidenziano la diversità genetica delle popolazioni di *L. corsicanus* e la mancanza di ibridazione con *L. europaeus* (Mengoni *et al.*, 2015).

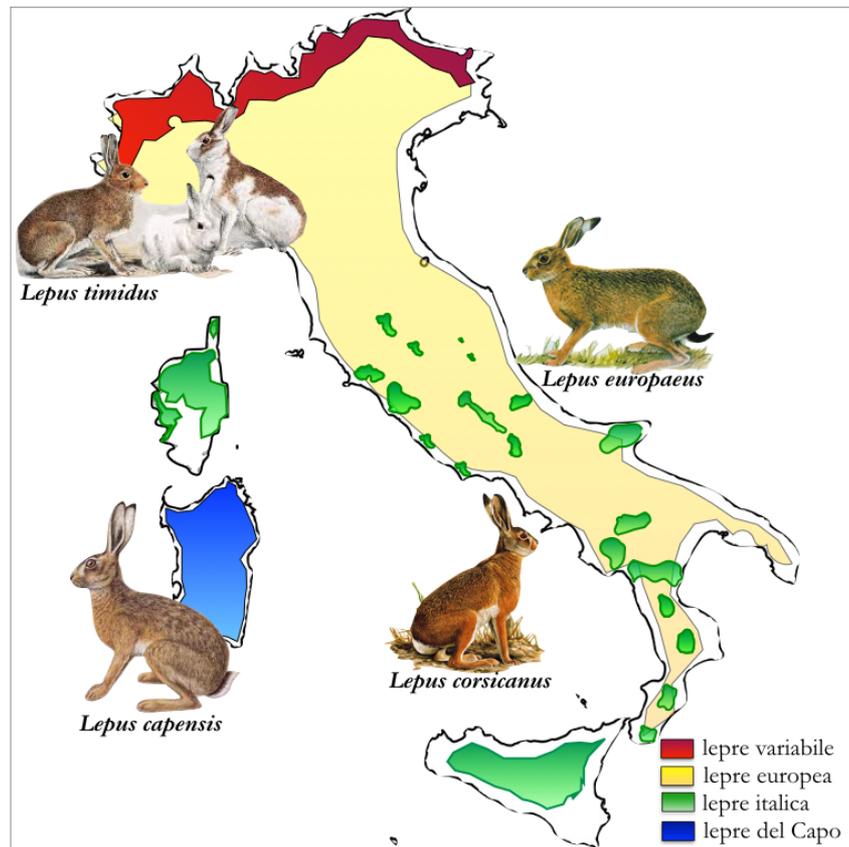


**Figura 2.** Relazioni filogenetiche tra le specie del genere *Lepus*. L'albero è stato costruito attraverso il metodo Neighbour-joining (NJ) analizzando un frammento di 309 nucleotidi della regione di Controllo I del DNA mitocondriale, in sette specie di lepri e utilizzando una corrispondente sequenza di Coniglio come outgroup (da Pierpaoli *et al.*, 1999).

### **1.1.3. Stato di conservazione**

Solo i nuclei peninsulari di lepre italica sono classificati dalla IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*) come vulnerabili (categoria di minaccia Vulnerabile -VU, criterio C2a1) (Angelici & Luiselli 2001). Si individuano, infatti, popolazioni “relicte”, spesso isolate in aree protette o montane di difficile accesso (Angelici, 1998). Sembrerebbe che i principali problemi di conservazione della specie siano rappresentati dall’isolamento riproduttivo, dalla bassa densità delle popolazioni, dall’abbandono delle attività agro-pastorali, dalla frammentazione antropica degli habitat, dalla caccia intensiva e il bracconaggio. Tuttavia, una delle maggiori minacce naturali per la lepre italica è stata identificata nell’introduzione della congenerica lepre europea, in ragione della potenziale interazione competitiva tra le due specie (Pierpaoli *et al.*, 2003) e/o la sottrazione di habitat idonei (Fulgione *et al.*, 2009).

In Italia, infatti, oltre alla lepre italica, il genere *Lepus* comprende altre tre specie, con areali in parte sovrapposti (Vigne, 1992; Palacios, 1996): la lepre variabile (*L. timidus*, Linnaeus 1758), presente lungo l’arco alpino, la lepre del Capo (*L. capensis*, Linnaeus 1758), relegata alla Sardegna e la lepre europea, distribuita in maniera uniforme su tutta la Penisola italiana, sovrapponendo il suo areale, nelle regioni centro-meridionali, a quello della lepre italica (Fig. 3).



**Figura 3.** Distribuzione del genere *Lepus* in Italia. In rosso, lepre variabile (*Lepus timidus*); in giallo, lepre europea (*Lepus europaeus*); in verde, lepre italiana (*Lepus corsicanus*); in blu, lepre del Capo (*Lepus capensis*).

In particolare, nel Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni (PNCVDA), uno dei bacini di presenza più importanti della lepre italiana nell'areale meridionale, sono state elaborate mappe di idoneità di habitat sviluppate con il metodo ENFA (Ecological Niche Factor Analysis, Hirzel *et al.*, 2002), evidenziando che i territori idonei alla presenza della lepre europea sono parzialmente (e in alcuni casi totalmente) sovrapposti a quelli potenzialmente idonei ad ospitare la lepre italiana (Fulgione *et al.*, 2009).

La lepre europea era originariamente segnalata solo in Italia centro-settentrionale con la sottospecie autoctona *L. e. meridiei* (Pierpaoli *et al.*, 1999). Tuttavia, a partire dal 1950, l'intensificarsi di interventi di ripopolamento a scopo venatorio, soprattutto con individui alloctoni, ha comportato l'ampliamento dell'areale storico della specie verso i distretti meridionali, facendo sì che alcune popolazioni divenissero stabili in aree in cui era presente la lepre italiana.

Inizialmente, si riteneva che *L. e. meridiei*, probabilmente isolata durante l'ultima glaciazione, fosse rimasta confinata sulle alture appenniniche (Pierpaoli *et al.*, 1999),

tuttavia, il recentemente ritrovamento di un individuo con aplotipo autoctono sulle montagne del Cilento (dati non pubblicati), ha suggerito che l'espansione dell'areale storico di lepre europea sia avvenuto anche naturalmente, grazie alla capacità di dispersione della specie sul territorio. La scarsità dei campioni impone, tuttavia, una particolare cautela nell'interpretazione di questi dati.

Da quanto detto, emerge che le popolazioni di lepre europea dell'Italia centro meridionale hanno una composizione genetica mista (Fulgione *et al.*, 2009). Questo scenario è stato confermato da studi condotti su popolazioni di lepre italiana e lepre europea nel PNCVDA (Fulgione *et al.*, 2009). Analisi di idoneità del habitat, correlate a studi sulla struttura genetica delle popolazioni, hanno permesso di evidenziare una correlazione significativa tra la distanza genetica ed ecologia solo per le popolazioni di lepre italiana. In questo caso, infatti, è emersa una distribuzione della specie sul territorio in accordo con le barriere e i corridoi ecologici disponibili.

Al contrario, per le popolazioni di lepre europea sembrerebbe che la distribuzione non dipenda dalla naturale storia di dispersione della specie, ma sia stata fortemente condizionata soprattutto dalle pratiche di re-introduzione di individui alloctoni, provenienti ad esempio dall'Europa dell'est e dal Sud Africa (Fulgione *et al.*, pers. comm.), e non completamente adattati alle nuove condizioni ambientali (Bertolino *et al.*, 2007; Galende & Raffaele 2008).

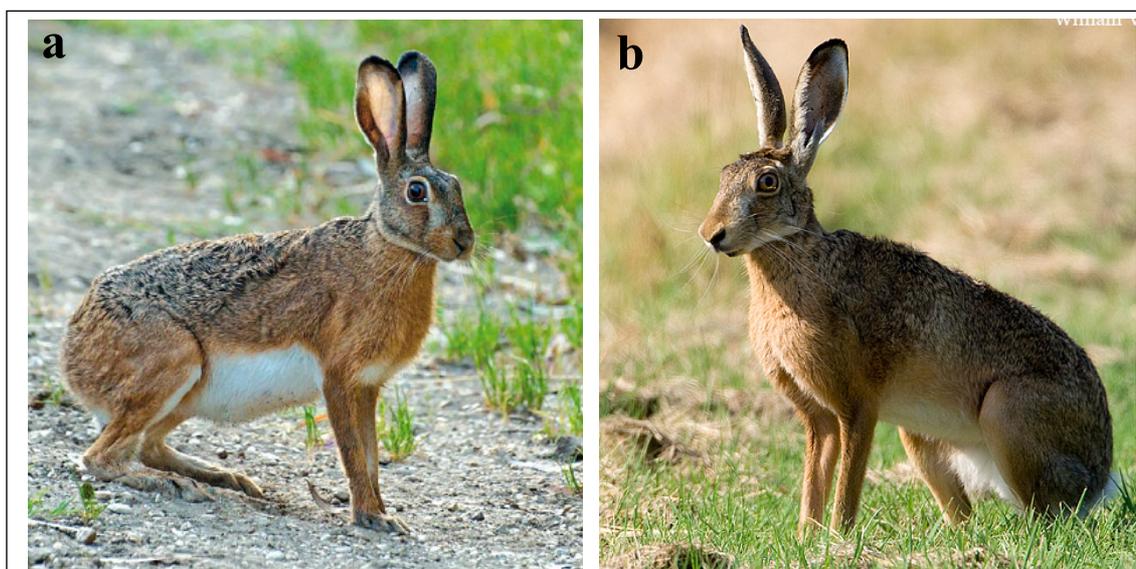
#### ***1.1.4. Caratteristiche morfologiche***

La lepre italiana (Fig. 4a), mostra una testa compressa lateralmente, orecchie molto lunghe, un corpo snello e allungato, di solito tenuto piegato, zampe posteriori molto più lunghe e possenti di quelle anteriori, adattate al salto, e una coda corta. La pelliccia è grigio-brunastra sul collo, spalle e fianchi mentre sul dorso prevale la colorazione grigio-nerastra, il ventre è bianco; le orecchie e la coda sono nere sulla punta e gli occhi sono grandi e marroni.

lepre italiana e lepre europea (Fig. 4b) sono molto simili, tuttavia, la prima appare tendenzialmente più affusolata e gli adulti hanno un peso medio di circa 800 grammi inferiore a quello della lepre europea (Palacios, 1996). Queste caratteristiche sembrano indicare una migliore capacità di termoregolazione ed un adattamento al clima

mediterraneo (Lo Valvo *et al.*, 1997; Trocchi & Riga 2005), differentemente dalla lepre europea, notoriamente bene adattata agli ambienti aperti con clima di tipo continentale.

Il riconoscimento morfologico tra le due specie è basato principalmente sulla diversa colorazione del mantello, più fulvo nella lepre italiana rispetto che in lepre europea, e sulla presenza, nella stessa specie, di una netta separazione tra la colorazione bianca del ventre e la colorazione dei fianchi. Altre differenze si possono riscontrare sia nella colorazione della base del pelame della nuca negli adulti, grigio-nerastra in lepre italiana e bruno-rossiccia in lepre europea, che nella colorazione della coscia e del groppone, bruno-ocra-rossiccia nella lepre italiana e bruno-grigiastra nella lepre europea (Palacios, 1996). Il cranio della lepre italiana è meno massiccio, più arrotondato e significativamente più piccolo; in particolare, i nasali sono corti e ricurvi mentre si presentano lunghi e appiattiti nella lepre europea (Palacios, 1996). La forma, la dimensione e la sezione dei denti sono anch'essi caratteri diagnostici in grado di discriminare tra le varie specie. In lepre italiana la parte aborale degli incisivi superiori arriva alla sutura incisivo-mascellare mentre in lepre europea non arriva alla sutura stessa. È inoltre presente una variabilità nel profilo linguale del dente: rettilineo o convesso, in lepre italiana, e più o meno concavo in lepre europea (Palacios, 1996 modificato).



**Figura 4. a)** lepre italiana; **b)** lepre europea.

### ***1.1.5. Ecologia ed etologia***

Benché le conoscenze relative all'ecologia di lepre italica siano ancora limitate, è stato osservato che è adattata a vivere soprattutto in ambienti e climi di tipo mediterraneo. Riga e collaboratori (2003) hanno condotto un'analisi di idoneità ambientale confrontando le caratteristiche ecologiche e climatiche delle aree di presenza certa della specie con quelle di presenza casuale, evidenziando che i valori medi delle temperature minime costituiscono la principale variabile in grado di influenzare la distribuzione della specie. Studi condotti dall'ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) su piccole popolazioni nella Maremma grossetana rivelano che la lepre italica si colloca in un *range* altitudinale compreso tra 25 m e 335 m sopra il livello del mare (s.l.m.) mentre la lepre europea mostra una distribuzione diffusa su tutto il territorio provinciale (dai 30 m ai 1440 m s.l.m.) (Macchia *et al.*, 2005). Queste informazioni preliminari indicano una "zonazione altitudinale" tra le due specie, riferibile probabilmente ad esigenze ecologiche diverse (Ricci *et al.*, 2007). Tuttavia, la lepre italica è stata individuata anche ad alta quota: nell'Appennino centro-meridionale fino a circa 2000 m s.l.m. e sulle catene montuose della Sicilia fino a 2400 m s.l.m. Preferisce ambienti con spiccate caratteristiche ecotonali ed elevata eterogeneità ambientale (Trocchi & Riga 2005; Fusco *et al.*, 2007; Ricci *et al.*, 2007) come pascoli cespugliati, garighe, boschi di latifoglie con radure e aree coltivate (vigneti ed uliveti). Nell'ambiente mediterraneo, si ritrova nella macchia, anche con densa copertura vegetazionale, comprese le dune costiere (Trocchi & Riga 2001). In Sicilia frequenta ambienti di diversa tipologia, come i prato-pascoli collinari e montani, le radure, i margini di boschi di latifoglie e gli incolti con cespugli (Blondel & Aronson 1999; Trocchi & Riga 2005). A tal proposito, è da sottolineare che la mancanza di una popolazione stabile di lepre europea, nonostante i ripetuti tentativi di introduzione della specie, potrebbe essere correlata all'inabilità da parte di questa specie di sfruttare risorse disponibili in ambienti semi-aridi, al contrario di lepre italica (Lo Valvo *et al.*, 1997).

La lepre italica è una specie fortemente elusiva, con abitudini prevalentemente notturno-crepuscolari. Per l'attività di pascolo utilizza un numero limitato di siti di alimentazione, solitamente gli stessi per l'intera notte, nelle cui vicinanze generalmente è possibile ritrovare i ricoveri per il giorno (Angelici & Spagnesi 2008). Sfrutta spazi

vitali relativamente piccoli che, con tecniche radiotelemetriche, è stato stimato possano essere di dimensioni comprese tra 0.7 e 27.7 ha (Lo Valvo, 2007). In zone di simpatria con lepre europea, sono stati osservati fenomeni di sintopia (Trocchi & Riga 2001).

La lepre italiana non presenta dimorfismo sessuale (Robinson & Dippenaar 1983; 1987; Cervantes & Lorenzo 1997; Riga *et al.*, 2001). La specie è poligama, non forma coppie stabili e i maschi combattono con aggressività e violenza per il possesso delle femmine. Mostra una stagione riproduttiva che interessa tutto l'anno, con un breve periodo di riposo sessuale, in genere di circa 60-70 giorni. L'intensità maggiore si registra durante il periodo primaverile e valori medi durante la stagione autunnale, al contrario della lepre europea che ha una diapausa autunno-invernale piuttosto accentuata. Una femmina si può riprodurre, in media, tre o quattro volte l'anno, anche se sembra che la durata della stagione riproduttiva sia relazionata alla latitudine: nelle regioni con un clima più caldo possono verificarsi fino a 5 nascite (Trocchi & Riga 2001).

L'accoppiamento è spesso preceduto da una sorta di corteggiamento; la femmina prepara un rifugio dove dare alla luce leprotti (da 1 a 5), che nascono dopo una gestazione di circa 41-42 giorni.

Come in tutti i Lagomorfi, si verifica il fenomeno del "ciecotrofismo", finalizzato ad assorbire la maggiore quantità di energia possibile dai vegetali ingeriti. Vengono prodotte due tipi di feci: le feci molli, di consistenza morbida e ricche di muco, e le feci normali, più dure e di forma sferica. Il primo tipo di feci è nuovamente ingerito e processato da microrganismi simbiotici che rendono disponibile la cellulosa digerita dai batteri e permettono l'assorbimento della Vitamina B12.

I dati fino ad ora a disposizione sulle abitudini alimentari della lepre italiana derivano da studi condotti con approcci tradizionali di microistologia (Chapuis, 1980; Butet, 1985) su campioni fecali (De Battisti *et al.*, 2004, Freschi *et al.*, 2015). Alcuni si riferiscono a campioni raccolti nel Parco Regionale dell'Etna (De Battisti *et al.*, 2004). In questo caso emerge una netta preferenza nei confronti delle *Poaceae* (20.0%) ed in misura minore per le *Fabaceae* (10.0%) e le *Asteraceae* (6.9%). In inverno, soprattutto in presenza di neve che limita la disponibilità di *Poaceae*, la gamma di piante utilizzate si riduce notevolmente a vantaggio delle specie arboree, come le *Fagaceae* e le

*Pinaceae* (foglie, gemme, cortecce) (De Battisti *et al.*, 2004). In estate, la scelta alimentare si riduce rispetto alla primavera e si orienta sui taxa più resistenti al clima xerico della zona. Tuttavia, la specificità biogeografica dell'area di studio rende difficile l'estrapolazione dei risultati ai contesti appenninici. Freschi e collaboratori (2015) hanno condotto un analogo studio nel Parco Regionale Cognato Piccole Dolomiti Lucane. I risultati indicano che la lepre italiana (unica specie presente) mostra una dieta molto diversificata e generalista ma caratterizzata da significative variazioni stagionali, probabilmente in dipendenza della fenologia, l'abbondanza, l'appetibilità e il valore nutrizionale delle risorse vegetali a disposizione. In particolare, l'ANOSIM test ha rivelato che le differenze maggiori si registrano nella stagione primaverile. In questo periodo i taxa vegetali più frequentemente ritrovati negli escrementi appartengono alla categoria delle piante erbacee (es. *Brachypodium sylvaticum*, *Trifolium pratense*, *Allium subhirsutum* e *Festuca arundinacea*) e non mancano cibi ad elevato valore nutrizionale (es. *Prunus spinosa*, *Pyrus pyraster* e *Malus sylvestris*). Questa osservazione, data l'abbondante disponibilità trofica nell'area di studio (Westoby, 1974; Belovsky, 1978), ha portato a supporre che la lepre italiana possa essere specializzata nel pascolare piante erbacee in primavera (Freschi *et al.*, 2015). Da entrambi gli studi citati emergerebbe che, pur essendo capace di sfruttare un'ampia gamma di risorse vegetali, la lepre italiana sarebbe abile a specializzarsi, a seconda delle condizioni, nell'uso delle fonti trofiche diverse, in dipendenza della loro disponibilità.

## 1.2. Finalità del progetto

Lo *status* di lepre italiana non sembra sostanziato da un'indagine ecologica tale che definisca la sua collocazione e preferenza ambientale. Gli scarsi dati disponibili, infatti, suggeriscono conclusioni contrastanti: la presenza della specie in contesti ambientali molto diversificati e in simpatria con popolazioni stabili di lepre europea, ma si sposa con la categorizzazione di specie minacciata. Probabilmente, i cambiamenti ambientali sono in rapida evoluzione, oppure gli studi sinora sviluppati non hanno focalizzato una caratterizzazione ecologica tale da giustificare la sua condizione di vulnerabilità.

Il seguente progetto di ricerca è finalizzato ad approfondire ed incrementare le conoscenze relative alle caratteristiche ecologiche (spaziali e trofiche) della lepre italiana, nonché descrivere la sua capacità adattativa in presenza di diverse pressioni ambientali, che definiremo "plasticità ecologica". Tali conoscenze si rivelano cruciali nella gestione di specie vulnerabili ed endemiche, come la lepre italiana, e costituiscono un necessario punto di partenza per avviare efficaci strategie di intervento volte alla tutela e alla preservazione della biodiversità.

Lo studio è stato strutturato con metodi che essi stessi possono rappresentare strumenti innovativi di indagine, come approcci di genetica non invasiva per l'assegnazione dei reperti, metodologie GIS (Geographic Information System) implementate in *software* specifici (ArcView, ArcGIS e BioMapper) per analisi di distribuzione, e tecniche di DNA *metabarcoding*, accoppiate a tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (HTS) sui pellet fecali (Box 1) per caratterizzare la nicchia trofica.

### **Box 1: DNA *metabarcoding* e Tecnologie di Sequenziamento di Nuova Generazione (HTS)**

Il DNA *barcoding*, letteralmente “codice a barre del DNA“, è un metodo molecolare basato sull'utilizzo di una regione di DNA standardizzata come *tag* su larga scala per l'identificazione rapida e accurata di una specie (Hebert & Gregory 2005). Una delle applicazioni più interessanti di questo approccio è lo studio della dieta di un individuo a partire dal DNA estratto dalle sue feci. In questo caso si parla di **DNA *metabarcoding*** (Taberlet *et al.*, 2012), in quanto l'analisi prevede la caratterizzazione di diversi tipi di DNA delle componenti animali/vegetali ingerite dalla specie focale. Tuttavia, essendo il DNA estratto una miscela eterogenea di genomi, la caratterizzazione delle diverse specie non può essere fatta con il classico metodo di sequenziamento Sanger e si ricorre, quindi, alle tecnologie di Sequenziamento di Nuova Generazione (HTS).

Le **HTS** consentono di identificare un composto di ampliconi eterologo, cioè derivante da più taxa (Valentini *et al.*, 2009a; 2009b; Taberlet *et al.*, 2012, De Barba *et al.*, 2014), riducendo notevolmente i costi ed i tempi di analisi di laboratorio.

La caratterizzazione molecolare della dieta tramite DNA *barcoding*, in associazione alle HTS, presenta una serie di vantaggi e permette di superare diversi limiti legati ai classici metodi utilizzati per indagare la dieta degli animali:

- è un approccio **non invasivo** (indicato per specie rare, vulnerabili, elusive);
- permette una caratterizzazione della nicchia trofica della specie senza avere una conoscenza *a priori* delle sue preferenze alimentari (Valiere & Taberlet 2000; Jarman *et al.*, 2002). Prevede, infatti, l'utilizzo di **primer universali** per l'amplificazione del DNA (Valentini *et al.*, 2009a; Pompanon *et al.*, 2012; Taberlet *et al.*, 2014);
- ha una **profondità** (capacità discriminativa) maggiore rispetto ai metodi tradizionali di caratterizzazione macroscopica della dieta (Pompanon *et al.*, 2012), rivelando le componenti che non lasciano resti visibili al microscopio (Deagle *et al.*, 2009) e soprattutto quelle meno rappresentate. Nella tecnologia HTS, infatti, il prodotto di PCR amplifica il segnale in ingresso rendendo leggibili numerose copie di una stessa molecola. In questo modo saranno analizzabili anche le molecole di DNA corrispondenti alle componenti rare dell'alimentazione della specie indagata.
- Consente una stima **semi-quantitativa** delle componenti alimentari. Infatti, la biomassa di una particolare componente alimentare è proporzionale alla quantità di DNA estratta dal campione e rispecchia l'ammontare delle sequenze di DNA identificate al termine dell'analisi. Tuttavia, analisi di DNA *metabarcoding* presenta diversi problemi di applicazione ed i principali sono:
  - 1) la quantità di DNA in ingresso, nel campione originale, non è bilanciata e non esistono modi per standardizzarla;
  - 2) nell'amplificazione i primer non hanno la stessa affinità per tutti i DNA di partenza. Il diverso grado di digeribilità dei composti può alterare la proporzionalità del DNA utile all'analisi.
  - 3) Si possono produrre artefatti di amplificazione, chimere.

Per tali motivi è stato attribuito a questo metodo un carattere semi-quantitativo (Pompanon *et al.*, 2012). Esso fornisce informazioni sulla frequenza con cui compaiono i differenti tipi alimentari nel campione, permettendo di fare inferenze relative alla sua importanza nella dieta, a livello di popolazione o singoli individui (De Barba *et al.*, 2014).

# Capitolo 2

## Materiali e metodi

---



## 2.1. Area di studio

Le analisi sono state sviluppate in contesti geografici differenti, al fine di indagare l'ecologia trofica (Area1), l'ecologia spaziale (Sotto-area 1) e le interazioni con eventuali competitori o elementi di disturbo (Sotto-area 2) (Fig.5).

### *Area 1*

La raccolta di dati utili a definire l'ecologia trofica di lepre italica è stata sviluppata nelle regioni dell'Appennino centro-meridionale (tra il parallelo Nord  $42^{\circ} 18'N$  e il parallelo Sud  $40^{\circ} 03'N$ ), includendo due dei bacini di presenza più importanti della specie nel suo areale peninsulare di distribuzione: i territori del massiccio della Majella e delle montagne del Cilento (Fig. 5).

Gli Appennini centro-meridionali sono un sistema montuoso con una struttura paesaggistica estremamente mosaicizzata e, nella maggior parte dei casi, con un'organizzazione vegetazionale tipicamente mediterranea. Dominano le foreste di faggio, boschi di castagno, quercia, acero, ontano e pino. Alle quote più elevate è ancora possibile rintracciare pascoli primari, anche se i pascoli secondari sono quelli più rappresentati (Pignatti, 1994a; 1994b; 1995; 1998). Essi sono caratterizzati soprattutto da xerobrometi ricchi di entità endemiche inquadrabili nei *Brometalia*. L'aspetto e l'ecologia di queste fitocenosi cambia notevolmente durante le stagioni: paesaggi caledoscopici in primavera ed in estate diventano quasi in bianco e nero d'inverno, quando le piante entrano in quiescenza e la coltre nevosa, soprattutto ad altitudini maggiori, ricopre la cotica erbosa.

### *Sotto-area 1*

Per approfondire aspetti legati all'ecologia spaziale di lepre italica, all'interno dell'Area 1, è stata individuata una sotto-area rappresentativa delle condizioni ecologiche dell'intero areale (Sotto-area 1), corrispondente alle regioni montuose del Cilento ( $40^{\circ} 17' N$ ,  $15^{\circ} 19' E$ ) (Fig. 5). Le zone interne, in particolare, quelle di natura calcarea, quali i Monti Alburni, il Monte Motola, il Monte Vivo, il Monte Faiatella ed il Monte Cervati, sono state identificate come territori stabili della specie (de Filippo,

2007; Fusco *et al.*, 2007). Quasi il 50% dell'area considerata è ricoperta da superfici boscate con foreste a faggete, che abbondano tra i 900-1000 e i 1700-1800 m di altitudine. Sui massicci montuosi che raggiungono le maggiori altitudini (Monte Gelbison, Monte Faiatella, Monte Cervati), le faggete sono a contatto, al loro limite inferiore (mediamente intorno ai 900 m s.l.m.) con boschi misti a dominanza di *Carpinus betulus* e *Ostrya carpinifolia*. A differenza dei boschi misti delle quote più basse, qui il sottobosco è differenziato dalla presenza di *Hepatica nobilis*, *Luzula forsteri*, *Asperula taurina*. Sui Monti Alburni e sul Monte Motola, le faggete sono impreziosite dalla presenza di *Abies alba* e sporadicamente di *Betulla alba* che, in alcune aree ancora molto incontaminate del Monte Cervati e del Monte Faiatella, sono intersperse nelle faggete sotto forma di ceppaie isolate. Tra i 600 e gli 800 m s.l.m si ritrovano i cedui di *Castanea sativa*, mentre a quote più basse quelli a *Quercus cerris*. Tra i 350 e i 500 m s.l.m. si osservano i boschi di *Quercus pubescens*, nei quali, a volte, sono presenti anche *Quercus ilex* e *Fraxinus ornus*. Lo strato arbustivo è composto da specie quali *Crataegus monogyna* e specie lianose come *Clematis vitalba* e *Hedera helix*, mentre nel sottobosco si ritrovano *Vinca minor* e *Buglossoides purpureo-caerulea*. Ai piedi di alcuni massicci calcarei (tra i 500 e gli 800 m s.l.m.) sono presenti estesi lembi di *Quercus ilex*, mentre le specie sciafile dominano lo strato erbaceo. Nella fascia di transizione tra querceti e faggete sono abbastanza diffusi boschi di *Alnus cordata*, di origine probabilmente secondaria. Inoltre, possono essere presenti *Acer campestre*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer lobelii*, *Ilex aquifolium*, *Taxus baccata*. Il sottobosco è formato principalmente da *Brachypodium sylvaticum* ma anche da *Oenanthe pimpinelloides* e *Teucrium siculum*, endemica dell'Appennino centro-meridionale.

Molto estesa è la superficie del pascolo, aumentata anche da antichi disboscamenti. Le comunità vegetali di questi siti sono molto varie e floristicamente molto ricche. Da un punto di vista ecologico-strutturale, si possono distinguere praterie di tipo xerico, alle quali si alternano pascoli mesofili delle depressioni carsiche e delle doline di vetta. Nelle praterie xeriche delle quote più elevate dei Monti Alburni e del Monte Cervati si ritrovano specie come *Bromus erectus*, *Phleum ambiguum*, *Eryngium amethystinum* e *Asphodeline lutea*, *Koeleria splendens*. Alle medie altitudini sul Monte Cervati, sono presenti comunità garigoidi dominate da *Lavandula angustifolia*, una specie che sui terreni ricchi di rocce affioranti, si accompagna a comunità xeriche di *Poaceae* e

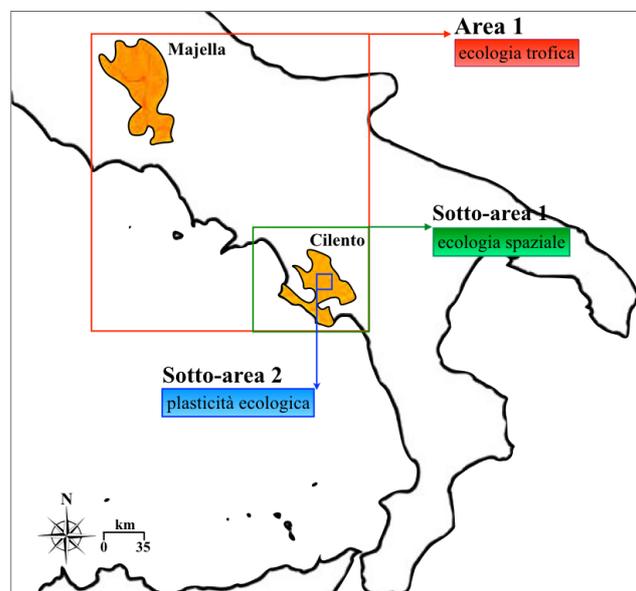
camefite in cui si ritrovano *Thymus longicaulis*, *Tymus striatus* ed *Euphorbia spinosa*. Sulle vette più estreme del Monte Cervati e su alcune sommità degli Alburni si rinvennero anche formazioni primarie, ricche di entità endemiche come *Globularia meridionalis* (AA.VV. 2010. Preliminare del piano del parco).

### ***Sotto-area 2***

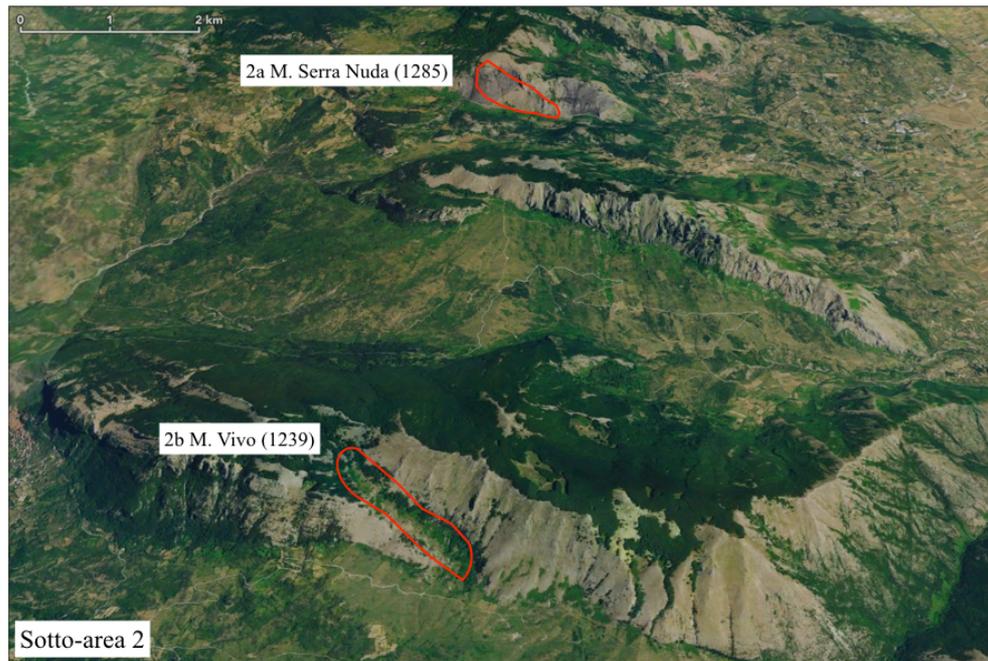
Al fine di sviluppare inferenze relative alla plasticità ecologica di lepre italiana, intesa come la capacità di adattarsi a competitori o fattori di disturbo, è stata analizzata la variazione della dieta in differenti contesti, ovvero:

- con la congenerica lepre europea,
- con il pascolo gestito (bovino e/o equino),
- con la fauna selvatica impattante (in particolare il cinghiale, *Sus scrofa*),
- in presenza di neve.

Per sviluppare tali analisi, nell'ambito dei territori montuosi del Cilento, è stata delineata una Sotto-area 2 (Fig. 5), corrispondente al Monte Serra Nuda (Sotto-area 2a) e al Monte Vivo (Sotto-area 2b) (Fig. 6).

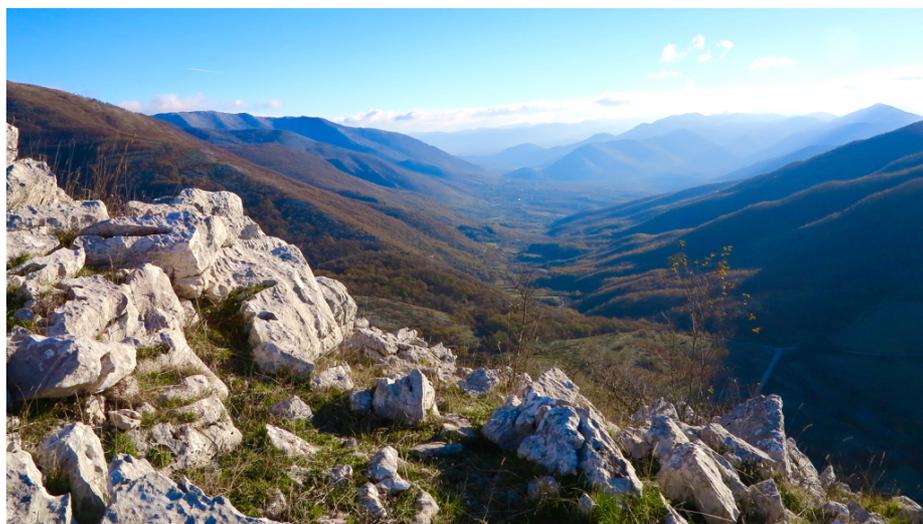


**Figura 5.** Area di studio. **Area 1:** Regioni montuose dell'Appennino cento-meridionale (parallelo Nord  $42^{\circ} 18'N$  e parallelo Sud  $40^{\circ} 03'N$ ), in cui sono stati effettuati campionamenti per lo studio dell'ecologia trofica di lepre italiana. **Sotto-area 1:** Regioni montuose del Cilento ( $40^{\circ} 17' N$ ,  $15^{\circ} 19' E$ ) in cui sono stati effettuati campionamenti per lo studio dell'ecologia spaziale di lepre italiana. **Sotto-area 2:** Regioni montuose del Cilento in cui sono stati effettuati campionamenti per lo studio della plasticità ecologica di lepre italiana.



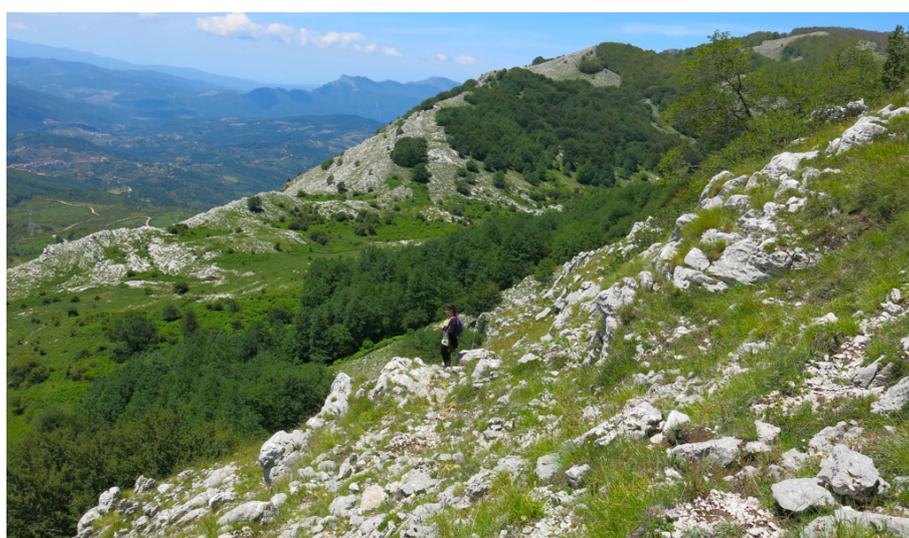
**Figura 6.** Sotto-area 2: **2a**, Monte Serra Nuda (1285 m s.l.m.). **2b**, Monte Vivo (1239 m s.l.m.).

La Sotto-area 2a, Monte Serra Nuda (Fig. 7), accanto agli elementi vegetazionali tipici della macchia mediterranea, si caratterizza soprattutto per la presenza, alle quote più elevate, di pascoli d'altura, praterie secche con vegetazione bassa, interrotta da rocce, pietre, arbusti e macchia bassa con conifere sparse. In questa area, i censimenti hanno messo in evidenza la presenza della sola lepre italiana e attività di pascolamento non significative, sia di animali domestici che del selvatico cinghiale.



**Figura 7.** Sotto-area 2a, Monte Serra Nuda: sito di presenza di lepre italiana, in assenza di lepre europea, e attività di pascolamento di domestici e selvatici non significativa.

La Sotto-area 2b è collocata entro il complesso montuoso del Vivo (Fig. 8). In essa, oltre ad un elemento agricolo residuale, si possono trovare comunità vegetali (o fitocenosi) semi-naturali e a diversa complessità strutturale. Queste comunità non esistono da sempre ma derivano da un lungo processo di interazione con le attività agro-silvo-pastorali, ed ancora oggi alcune di esse dipendono da questa attività. Ad esempio, la presenza di animali domestici al pascolo è fondamentale per il mantenimento del carattere eterogeneo dell'ambiente. L'alternanza di bosco e prateria delinea ambienti con spiccate caratteristiche ecotonali ed elevata diversità ambientale come pascoli cespugliati, garighe, boschi di latifoglie con radure e aree coltivate (AA.VV., 2015. Sulle orme della lepre italiana). A quote comprese tra gli 800 e 1400 metri di altitudine, si individuano fitocenosi di bosco e pre-bosco il cui corteggio floristico ne permette l'inquadramento nella categoria delle faggete termofile, caratteristiche proprio dell'Appennino meridionale (Strumia *et al.*, 2007). Nelle aree a minore pendenza e minore percentuale di rocce affioranti, è possibile individuare pascoli più compatti con un incremento di specie emicriptofitiche che riescono a formare cotiche erbose meno discontinue. Abbondano praterie secondarie di *Festuco-Brometalia* nelle quali è possibile individuare anche elementi di interesse comunitario come alcune specie appartenenti alle *Orchideaceae*. Caratteristica comune a tutti i rilievi di pascolo è l'elevata frequenza di specie nitrofile, come *Urtica dioica*, o impalatabili per la loro tossicità e spinescenza (es. *Eryngium campestre*, *Ononis spinosa*).



**Figura 8.** Sotto-area 2b, Monte Vivo: sito di simpatria tra lepre italiana e lepre europea, attività di pascolamento di domestici e presenza di fauna impattante differenziata a seconda della stagione.

I censimenti hanno permesso di definire la Sotto-area 2b come un sito in cui lepre italica e lepre europea sono in simpatria.

Durante la stagione primaverile (mar-mag), quest'area è caratterizzata da un'intensa attività di pascolamento di domestici (bovini ed equini) (Fig. 9), sottolineata anche dall'esistenza di specie vegetali nitrofile o impalatabili, in associazione all'elevata frequenza di emicriptofite. Evidenti sono i segni di presenza del cinghiale, elemento faunistico fortemente incidente sulla struttura della vegetazione e delle specie animali ad essa associate (Scandurra *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Monte Vivo, durante la stagione primaverile. Sopra, bovini al pascolo; sotto, equini al pascolo.

Durante la stagione estiva (giu-ago), l'utilizzo pastorale di questi ambienti si riduce drasticamente, in osservanza della Legge Regionale n. 16/2014 art. 1 comma 100 lett. e art. 46. Inoltre, si riscontra anche una riduzione della presenza del cinghiale, probabilmente data la natura fortemente carsica del territorio che spinge la specie a spostarsi a quote più basse alla ricerca di fonti idriche.

## 2.2. Campionamento

Le 28 località incluse nell'area di studio (Tab. 1) sono state visitate con cadenza mensile, in tutte le stagioni (inverno: dic-feb; primavera: mar-mag; estate: giu-ago; autunno: sett-nov), nel triennio 2014-2016.

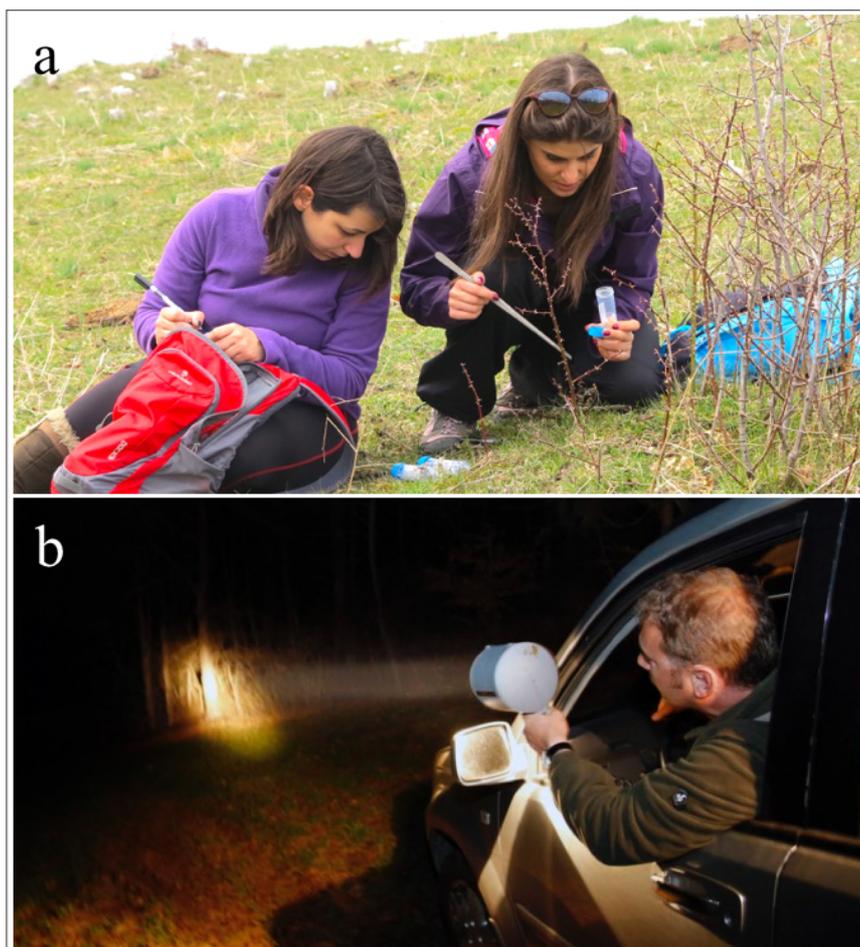
Tabella 1. Siti censiti.

Siti censiti
Corleto
Coste di Campolongo
Monte Alburno
Monte Carmelo
Monte Cervatello
Monte Cervati
Monte Faiatella
Monte Gelbison
Monte Motola
Monte Raia del Pedale
Monte San Giacomo
Monte Serra Nuda
Monte Vivo
Val di Terra
Monte Canale
Polledrara
Monte Faggiola
Tempa dell'Aulecina
Piesco
Le Piazzete
Valle Grande
Colle Perrone
Mandra delle Vacche
Grotta
S. Antonio
Monte Riallunga

Le attività di campionamento sono state sviluppate con transetti giornalieri, di lunghezza variabile da 1 a 5 km (180-200 km/anno), in un intervallo altitudinale compreso tra 100 e 1900 metri s.l.m.

Sono stati condotti sia censimenti diurni che notturni. Nel primo caso, l'operatore ha percorso a piedi il transetto prestabilito annotando e, lì dove possibile, raccogliendo informazioni dirette (osservazione dell'animale) ed indirette (es. escrementi, peli, orme, resti), riconducibili alla specie (Fig. 10a).

I censimenti notturni sono stati fatti a bordo di veicoli fuoristrada, con l'utilizzo di un faro (Ziboni, FARO mm.170 Amplilux IDS 75W), direzionato alternativamente a destra e sinistra del percorso (metodo Spot light – Parkers, 2001) (Fig. 10b). I transetti sono stati interrotti in presenza di condizioni atmosferiche particolarmente avverse (nebbia, vento forte e pioggia forte), fattori limitanti fortemente la visibilità.



**Figura 10.** a) Raccolta di escrementi e annotazione delle informazioni relative al reperto. b) Censimenti notturni mediante metodo Spot light (Parkers, 2001).

Ulteriori informazioni relative all'ecologia della specie sono state ottenute con l'ausilio di foto-video trappole a sensore termico PIR (Ziboni IDS MULTI PRO-12 12 Mpx) (Fig. 11 e Fig 12).



**Figura 11.** Montaggio di foto-video trappole a sensore termico PIR.



**Figura 12.** lepre italiana al pascolo. Fotogramma catturato con foto-video trappolaggio.

I campioni biologici sono stati raccolti con l'ausilio di utensili sterili e collocati in tubi Falcon<sup>®</sup>, in presenza di etanolo 70%, se si trattava di tessuti, e di silica dessiccante

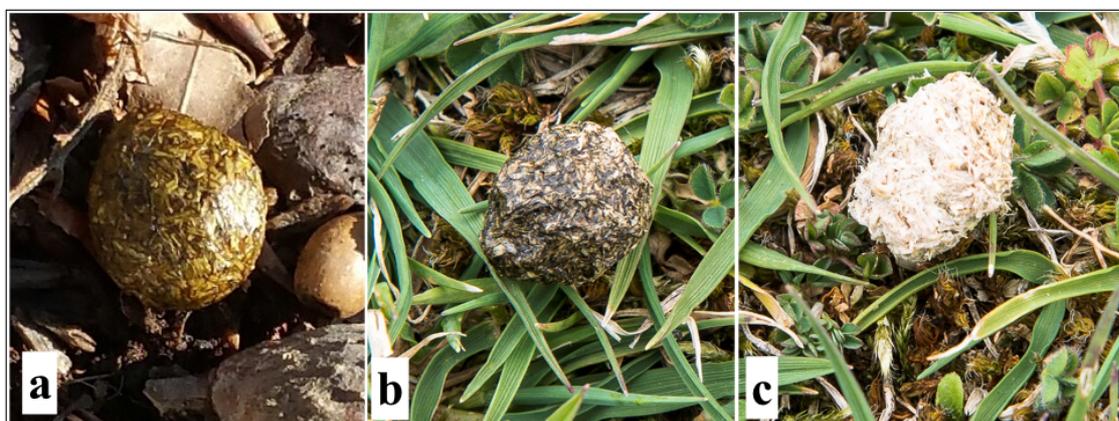
(Wasser *et al.*, 1997), per le altre fonti. Durante il trasporto, i reperti sono stati preservati in specifiche borse refrigerate e, in laboratorio, sono stati posti a  $-20^{\circ}\text{C}$ , fino al processamento.

La maggior parte dei reperti raccolti erano ascrivibili a campioni fecali (pellet) che sono stati utili alla determinazione della specie, alla analisi della distribuzione e alla definizione della dieta.

L'analisi morfologica del pellet consente una prima importante assegnazione a livello di genere, in quanto l'aspetto (forma, dimensioni, colore, consistenza) e l'odore degli escrementi possono essere indicativi del taxon e delle abitudini alimentari di un animale.

I pellet di lepre hanno generalmente una forma sferica, leggermente schiacciata, un diametro di 1.5-2 cm ed un aspetto traslucido, se di recente deposizione (Fig. 13). Non è nota alcuna differenza morfologica significativa tra i pellet di lepre italiana e lepre europea, quindi, l'assegnazione certa della specie è stata fatta attraverso una caratterizzazione del DNA (vedi paragrafo 2.4.).

Il successo delle indagini molecolari a partire dai campioni ambientali dipende dalla qualità e dalla quantità del DNA presente nel reperto. In particolare, nel caso di escrementi, questi parametri sono condizionati dalla freschezza, dal sito di deposizione e da fattori ambientali (Brinkman *et al.*, 2002; 2011). Al fine di aumentare le probabilità di successo delle analisi di laboratorio si è scelto di utilizzare solo i pellet di recente deposizione (1-2 giorni) (Fig. 13a) (Piggott, 2005; Santini *et al.*, 2007), mentre quelli con un'età stimata superiore ai 3 giorni (Fig. 13b e 13c) sono stati utilizzati solo per avere un'indicazione relativa alla presenza del genere *Lepus* nel sito censito.



**Figura 13.** Campioni fecali (pellet) di lepre. Età di deposizione stimata: **a)** 24 ore; **b)** 24-48 ore; **c)** >48 ore.

### **2.3. Georeferenziazione dei segni di presenza**

Per definire i siti di presenza della specie, in ogni censimento è stata effettuata una precisa georeferenziazione con un sistema di localizzazione GPS. Ogni rilevamento corrisponde ad un punto con coordinate metriche X-Y in base al sistema UTM, fuso 33T. Attraverso il *software* QGIS v. 2.18 GIS (Open Source Geospatial Foundation), le coordinate geografiche dei segni di presenza sono state riportate su mappe IGM (Istituto Geografico Militare) o su tematismi di base. Le elaborazioni GIS sono state sviluppate per le analisi distributive delle due specie, per mappe di idoneità, per analisi paesaggistiche e per estrapolazioni ecologiche.

### **2.4. Caratterizzazione genetica della specie**

Partendo da diversi tipi di fonti biologiche (es. peli, sangue, muscolo, escrementi), l'assegnazione certa della specie è stata fatta attraverso sequenziamento Sanger e attraverso l'analisi High Resolution Melting (HRM) (Gundry *et al.*, 2003).

#### **2.4.1. Estrazione del DNA**

L'estrazione del DNA è stata fatta da 1 a 3 giorni dopo la raccolta dei campioni. Sono stati utilizzati kit differenti a seconda del campione biologico di partenza:

- Qiagen DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) per i tessuti;
- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) per i peli;
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) per pellet. In particolare, in questo ultimo caso, per aumentare la probabilità di estrarre il DNA dell'individuo, è stata processata la porzione più esterna del pellet, contenente per la maggior parte, muco e cellule intestinali del soggetto.

Per monitorare potenziali contaminazioni, ad ogni estrazione, sono stati usati sistematicamente controlli negativi (acqua pura).

L'integrità del DNA estratto è stata valutata attraverso corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% e in *Buffer* TBE (Tris, Acido Borico, EDTA) e per confronto con un

marcatore molecolare di peso noto. Per le successive analisi di laboratorio, sono stati usati solo gli estratti con una elevata proporzione di DNA ad alto peso (>20 kb). La concentrazione degli acidi nucleici e il loro grado di purezza da fenoli e proteine sono stati valutati spettrofotometricamente attraverso il Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

#### **2.4.2. Sequenziamento Sanger**

Come riportato in letteratura, *L. corsicanus* e *L. europaeus* sono state distinte geneticamente utilizzando i *primer* LepCyb2L (5-GAAACTGGCTCCAATAACCC-3) e LepD2H (5-ATTTAAGAGGAACGTGTGGG-3) (Pierpaoli *et al.*, 1999). Essi amplificano e delimitano un locus mitocondriale di circa 1200 bp, che comprende la seconda metà della sequenza citocromo b ed il primo tratto della regione di controllo, dalla posizione 14'788 alla 15'998 (Gissi *et al.*, 1998).

La maggior parte dei reperti utilizzati nel suddetto progetto di ricerca sono campioni ambientali e il DNA in essi contenuto è spesso degradato ed organizzato in piccoli frammenti (Deagle *et al.*, 2006; Taberlet *et al.*, 2012; Vynne *et al.*, 2012). Questo fattore limita fortemente la possibilità di amplificare e sequenziare frammenti nucleotidici lunghi. Quindi, per incrementare il successo delle analisi di laboratorio, è stata costruita una coppia di *primer* (LepDloopR/LepDloopF) interni al frammento riportato da Pierpaoli e collaboratori (1999), capace di amplificare un tratto di 237 bp dell'mtDNA, comprendente l'estremità 3' del t-RNA-Pro e una parte del D-loop (Tab. 2). Tale frammento si caratterizza per 12 SNP capaci di discriminare *L. corsicanus* da *L. europaeus*.

La costruzione dei *primer* è stata fatta utilizzando il programma Primer 3, implementato nel *software* Geneious v. 5.5.3 (Kearse *et al.*, 2012) e utilizzando come riferimenti sequenze nucleotidiche di *L. corsicanus* e *L. europaeus* depositate in NCBI (National Center for Biotechnology Information) e in un nostro personale *dataset* (Fulgione *et al.*, 2009).

Prima dell'utilizzo, i *primer* sono stati testati su campioni di tessuto (n=15), di pellet (n=7) e di peli (n=5) di *L. corsicanus* e *L. europaeus* di origine nota.

Per la caratterizzazione della specie, le amplificazioni sono state eseguite in un volume totale di 25 µl, usando 100 ng di DNA, 2.5 µl di *Buffer* B 10X (0.8 M Tris-HCl,

0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2% w/v Tween-20), 2.5  $\mu\text{l}$  di S Solution 10 X, 2.5  $\mu\text{l}$  di  $\text{MgCl}_2$  [25 mM], 4  $\mu\text{l}$  dNTP mix [2.5 mM], 1  $\mu\text{l}$  di ogni *primer* [5 $\mu\text{M}$ ] e 1 U di Taq polimerasi (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). La reazione è stata condotta usando una temperatura di denaturazione iniziale di 95°C per 3 min, seguita da denaturazione a 95°C per 1 min, annealing a 63°C per 1 min e allungamento a 72°C per 30 sec, per un numero totale di cicli pari a 35. La fase finale è stata condotta a 72°C per 3 min. Nelle analisi sono stati inclusi controlli positivi (DNA estratti da campioni certi di *L. corsicanus* e *L. europaeus*) e negativi (acqua pura), per testare l'attendibilità dei risultati ed escludere eventuali contaminazioni, rispettivamente. Il risultato è stato valutato attraverso corsa elettroforetica in gel di agarosio 1.5% e in *Buffer* TBE e per confronto con un marcatore molecolare di peso noto.

I prodotti di PCR sono stati purificati usando l'illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Il tratto amplificato è stato sequenziato in entrambe le direzioni usando la BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e analizzato con il sequenziatore automatico ABI 3100 (Perkin-Elmer, Genetic Analyzer, Foster City, CA, USA). I cromatogrammi sono stati assemblati ed analizzati con il *software* Geneious v. 5.5.3 (Kearse *et al.*, 2012). L'assegnazione di specie è stata fatta attraverso un confronto, a livello degli SNP discriminativi (n=12), tra le *query* e le sequenze di *L. corsicanus* e *L. europaeus* di riferimento.

#### **2.4.3. High Resolution Melting (HRM)**

Parallelemente al sequenziamento Sanger, la caratterizzazione del DNA estratto dai campioni di lepre è stata fatta tramite HRM (Wittwer *et al.*, 2003). Si tratta di una tecnica utilizzata per diversi tipi di applicazioni. come genotipizzazione e identificazione di specie, caratterizzazione di mutazioni genetiche, analisi di variazioni nelle sequenze nucleotidiche (Gudrun *et al.*, 2007). Il principio su cui si basa l'HRM è il comportamento di dissociazione della doppia elica (dsDNA) in singolo filamento (ssDNA), che dipende dalla sua composizione nucleotidica. Frammenti con composizione differente, anche di poche basi, mostrano un comportamento di denaturazione diverso.

Il primo passo è l'amplificazione della regione di interesse in presenza di un

intercalante fluorescente. Esso interagisce con elevata affinità solo con il dsDNA, emettendo, in questo stato, un segnale luminoso (fluorescenza). Dopo l'amplificazione, i prodotti sono gradualmente denaturati con l'innalzamento della temperatura (HRM). Inizialmente, la fluorescenza è alta, dato che il campione è tutto in dsDNA. Con l'incremento della temperatura si assiste alla dissociazione in ssDNA del prodotto amplificato che rilascia l'intercalante, determinando una diminuzione del segnale fluorescente. Il profilo di *melting* è specifico di ciascuno dsDNA, dipendente dalla sua lunghezza, dal contenuto in GC e dalla composizione nucleotidica.

Il DNA estratto dai campioni di lepre è stato sottoposto ad una analisi HRM condotta con il Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA) e il Type-it HRM PCR Kit (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA), in un volume totale di 25 µl, includendo, per ogni reazione, la Rotor-Gene 2X HRM PCR mix (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA), 50 ng di DNA e [0.7 µM] di ciascun *primer*. Per l'analisi HRM sono stati costruiti due *primer reverse* (ReverseLc/ReverseLe) specie-specifici per *L. corsicanus* e *L. europaeus* (Tab. 2), interni alla regione amplificata dalla coppia di *primer* LepDloopF/LepDloopR. Utilizzando una strategia proposta da Ramón-Laca et al (2014), i *primer reverse* sono stati utilizzati, in associazione ad un singolo *primer forward* (LepDloopF), in modo che il risultante prodotto di amplificazione avesse non solo una composizione (12 SNP discriminativi) ma anche una lunghezza diversa a seconda dalle specie (84 bp per *L. corsicanus* e 212 bp per *L. europaeus*). Prima dell'utilizzo, i *primer* sono stati testati su campioni di tessuto (n=15), di pellet (n=7) e di peli (n=5) di *L. corsicanus* e *L. europaeus* di origine nota.

Il programma utilizzato per l'HRM consiste di un'iniziale tappa di attivazione della hot start polimerasi a 95°C per 5 min, seguita da 40 cicli di 95°C per 10 sec (denaturazione), 55°C per 30 sec (*annealing*) e 72°C per 10 sec (allungamento). Il range di temperatura è compreso tra 65°C e 95°C, con un incremento di 0.01°C/2 sec. Per monitorare la riuscita del processo, nell'analisi sono stati inclusi controlli positivi (campioni certi di *L.corsicanus* e *L.europaeus*), e controlli negativi (acqua pura). Tutte le reazioni sono state condotte in duplicato. Infine, per l'analisi dei risultati è stato utilizzato il software Rotor-Gene Q series v. 2.2.3 (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA).

Per definire il valore minimo di fluorescenza al di sopra del quale un DNA poteva essere considerato per l'assegnazione univoca alla specie *L. corsicanus* o *L. europaeus*, sono stati relazionati i parametri che descrivono la curva di *melting*, ovvero il rapporto tra la derivata dell'intensità della fluorescenza e della temperatura ( $dF/dT$ ) e la temperatura di *melting* ( $T_m$ ).

## 2.5. Identificazione di habitat idonei

La spazializzazione dei reperti geneticamente caratterizzati è il punto di partenza per approfondire aspetti legati all'ecologia spaziale di lepre italica (preferenze di habitat, *range* altitudinale, dispersione). In particolare, la nicchia spaziale è stata calcolata attraverso il metodo ENFA (Ecological Niche Factor Analysis, Hirzel *et al.*, 2002), basato sul concetto di nicchia multidimensionale di Hutchinson (1957). ENFA elabora l'idoneità ambientale per una data specie intersecando la distribuzione (sole presenze) con un *set* di variabili eco-geografiche (EGVs; Hirzel *et al.*, 2004; 2006). I primi fattori che sintetizzano la distribuzione della specie in ragione delle EVGs hanno un significato ecologico e possono essere definiti *marginalità* e la *specializzazione* (Hirzel *et al.*, 2002), due parametri che descrivono le modalità con cui una specie sfrutta le risorse ecologiche.

La *marginalità* rappresenta la distanza ecologica tra le condizioni ambientali (*optimum*) utilizzate dalla specie e quelle disponibili nell'intero habitat. La marginalità assume valori tra 0, quando la specie occupa prioritariamente tutti gli ambienti maggiormente rappresentati, e 1, quando la specie sceglie prioritariamente habitat diversi da quelli più rappresentati nell'area considerata (Hirzel *et al.*, 2004; 2006).

La *specializzazione* esprime la porzione di habitat utilizzato dalla specie in relazione a quelli disponibili nell'area considerata. L'indice di specializzazione varia tra 1 e infinito, con l'ampiezza della nicchia che decresce all'aumentare del valore dell'indice. Per un'interpretazione più immediata viene spesso fornito il coefficiente di tolleranza, definito come l'inverso della specializzazione (Hirzel *et al.*, 2004).

La Sotto-area-1 è stata modellizzata dalle EGVs derivanti dalla fisionomia del paesaggio e dalla carta di uso del suolo CORINE LAND COVER (CLC). Attraverso le metodologie GIS, implementate in ArcView e ArcGIS, sono stati proiettati sulla carta di uso del suolo i punti di presenza di lepre. L'area di presenza è stata restituita in una

*raster map* di 9600 celle di 6.25 ha ciascuna ( $250 \times 250$  m). In questo spazio, la distribuzione della specie è stata comparata con le EGV:

- altitudine,
- esposizione,
- pendenza,
- distanza dalle fonti idriche,
- distanza dalle strutture antropiche (CLC),
- distanza da boschi decidui (CLC),
- distanza da prati agricoli (CLC),
- distanza da macchia mediterranea (CLC),
- distanza dai pascoli (CLC).

I dati di altitudine sono stati direttamente ottenuti come variabili quantitative. Tutte le altre variabili sono state rese quantitative seguendo la procedura descritta in Hirzel et al. (2004) convertendo la variabile in distanza (modulo "distanza" del programma IDRISI v. 32.2; Eastman, 2002). La distribuzione delle EGV è stata normalizzata attraverso l'algoritmo Box-Cox (Sokal & Rohlf 1994). L'analisi delle relazioni tra le variabili ambientali e la presenza delle specie è stata ridotta, mediante analisi fattoriale, in una matrice di punteggi. La prima colonna della matrice indica il fattore di marginalità, le altre colonne, i fattori di specializzazione; le righe indicano i contributi di ciascuna variabile a ciascun fattore. Più grande è il punteggio, più alto è il contributo della variabile alla marginalità. In questo modo, sono state identificate le aree idonee alla presenza della specie ed elaborate carte di idoneità ambientale (*Habitat Suitability Map*) attraverso il *software* Biomapper 4 (Hirzel et al., 2004; 2007). L'attendibilità del modello di idoneità dell'habitat è stata valutata utilizzando l'indice di Boyce (Boyce et al., 2002; Hirzel et al., 2006), che può assumere valori compresi tra -1 e 1. Più i valori sono vicini all'unità, migliore è l'affidabilità del modello: cioè c'è corrispondenza tra la reale presenza della specie e quella prevista dal modello.

## **2.6. Analisi della dieta**

Esistono diversi metodi per lo studio delle abitudini alimentari degli animali: l'osservazione diretta dell'esemplare durante il pasto, l'elettroforesi delle proteine del

contenuto intestinale, la NIRS (Near Infrared Spectroscopy) (Kaneko & Lawler 2006), l'analisi al microscopio dei resti non digeriti del pasto (es. peli, ossa, denti, penne o componenti vegetali) presenti nel contenuto stomacale o nelle feci (Symondson, 2002; King *et al.*, 2008; Mattioli *et al.*, 1995, Ciucci *et al.*, 1996). Oltre a diverse limitazioni tecniche, questi approcci sono spesso laboriosi, non esaustivi e mancano di risoluzione. Ad esempio, l'esame microscopico delle feci dipende dall'esperienza dell'osservatore nell'identificazione dei resti, dalla difficoltà di discriminare esemplari appartenenti a specie morfologicamente molto simili, oppure dall'impossibilità di identificare un organismo sulla base delle sue caratteristiche morfologiche perché esse sono andate perdute (Ingerson-Mahar, 2014; Holechek *et al.*, 1982).

I metodi molecolari, attraverso la caratterizzazione del DNA presente nel contenuto stomacale o nei campioni fecali, sono uno degli approcci più accurati a disposizione per incrementare le conoscenze sulle abitudini alimentari, in una vasta gamma di reti trofiche, superando molti problemi dei classici metodi morfologici e/o invasivi (Hebert *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2005; Valentini *et al.*, 2009b). In particolare, il DNA *metabarcoding* è un approccio innovativo che consiste nell'identificare contemporaneamente specie multiple usando il DNA estratto da campioni ambientali (es. suolo, acqua, feci) (Pompanon *et al.*, 2012; Taberlet *et al.*, 2012). Esso nasce in associazione alle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (High Throughput sequencing, HTS) (Shendure & Ji 2008; Glenn, 2011), ed a seguito di opportune analisi bioinformatiche permette di identificare simultaneamente il taxon di appartenenza di diversi tipi di DNA presenti nel campione. Questo risultato è ottenuto sequenziando, direttamente e in parallelo, migliaia di molecole di DNA corrispondenti allo stesso DNA *barcode* ma di specie diverse, amplificato utilizzando *primer* universali (Valentini *et al.*, 2009b; Taberlet *et al.*, 2012). Questo approccio è stato utilizzato con successo per definire le preferenze alimentari di diversi erbivori, come il bisonte europeo (Kowalczyk *et al.*, 2011), le gazzelle (Baamrane *et al.*, 2012), piccoli roditori (Soininen *et al.*, 2009, 2015) e la marmotta dal ventre giallo (Valentini *et al.*, 2009b), senza alcuna conoscenza *a priori* dei possibili fonti alimentari a disposizione dell'animale.

Nel presente studio, per la caratterizzazione delle abitudini alimentari della lepre italiana è stato utilizzato, per la prima volta su questa specie, un approccio molecolare di DNA *metabarcoding* su pellet fecali.

### ***2.6.1. Estrazione del DNA da pellet***

Il DNA è stato estratto dalla porzione più interna del campione fecale, contenente prevalentemente il materiale del pasto. È stato usato il metodo del CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) (Doyle & Doyle 1987) al fine di aggredire specificamente la parete cellulare e aumentare la probabilità di estrarre il DNA delle componenti ingerite dall'animale. Doyle e Doyle (1987), indicano come questo metodo permetta di estrarre il DNA da differenti gruppi di angiosperme (es. *Cyperaceae, Fabaceae, Fagaceae, Orchidaceae, Palmae, Portulacaceae, Rosaceae, Saxifragaceae, Solanaceae, Juglandaceae*).

Il protocollo consiste nel tritare finemente il campione (con l'utilizzo di utensili sterili), aggiungere una opportuna quantità (10 ml per ogni 3 grammi di campione) di *Buffer* CTAB (2% CTAB, 100 mM TrisHCl pH=8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol) e incubare a 70°C per 30 min. Seguono due estrazioni in cloroformio/alcool isoamilico (24:1) e la precipitazione degli acidi nucleici con il 70% di isopropanolo assoluto. Gli acidi nucleici sono poi sottoposti a lavaggi con Etanolo 70%. Infine, il campione è liofilizzato e diluito in TE *buffer*. L'integrità del campione è stata valutata attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% in *Buffer* TBE e per confronto con un marcatore molecolare di peso noto. La concentrazione e il grado di purezza da fenoli e proteine sono stati valutati spettrofotometricamente attraverso il Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

### ***2.6.2. Amplificazione del DNA con primer universali per vegetali***

Per l'analisi della dieta, è stato scelto come marcatore molecolare di riferimento un tratto di 350 bp della regione ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), compresa tra le sequenze 18 S e il 5.8 S del DNA nucleare ribosomiale di diverse specie di vegetali, proposta come DNA *barcode standard* per funghi e piante (Alvarez & Wendel 2003; Kress *et al.*, 2005; Schoch *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Per l'amplificazione, sono stati utilizzati *primer* universali per vegetali, JK11 e JK14 (Tab. 2) (Yokota *et al.*, 1989; Aceto *et al.*, 1999; Frediani & Caputo 2005), modificati con l'aggiunta di specifici adattatori Illumina alla loro estremità 5', che agiscono come identificatori per il recupero delle *read* nelle tappe successive al sequenziamento (Binladen *et al.*, 2007;

Valentini *et al.*,2009; Coissac *et al.*. 2012). Prima del loro utilizzo, ne è stata valutata la capacità di amplificare, con la stessa efficienza, diverse specie vegetali, in modo da essere sicuri che fosse rispettata la diretta proporzionalità tra la quantità di biomassa vegetale ingerita dall'animale e la quantità di molecole di DNA amplificate e poi sequenziate. A tale scopo, *in vitro*, è stata allestita una Real Time PCR su 5 diversi DNA vegetali, a concentrazione nota [50 ng/μL], appartenenti alle 5 famiglie tra le più abbondanti ritrovate nell'area di studio: *Asteraceae* (*Centaurea parlatoris*), *Fabaceae* (*Genista tinctoria*), *Orchideaceae* (*Orchis pauciflora*), *Poaceae* (*Zea mays*) e *Rosaceae* (*Ruta angustifolia*), e su una miscela di tutti i DNA citati (50 ng di ogni DNA). Le amplificazioni sono state eseguite usando il Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA), in un volume totale di 25 μl, includendo, per ogni reazione, la Rotor-Gene 2X SYBR Green mix (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA), 0.075 μg di DNA e [0.4 μM] di ciascun *primer*. Per tutti i campioni sono state allestite due repliche. Sono stati inclusi nell'analisi due controlli negativi, *no reverse transcriptase* e acqua pura, per escludere eventuali contaminazioni. Il programma utilizzato consiste di un'attivazione iniziale della polimerasi a 95°C for 30 sec, seguita da 45 cicli di 95°C per 15 sec e 56°C per 30 sec. La fase finale è stata condotta a 72°C per 30 sec. Le curve di amplificazione, di *melting*, e il valore Ct (*Cycle threshold*) sono stati analizzati utilizzando il *software* Rotor-Gene Q Series v. 2.3 (QIAGEN GmbH Valencia, CA, USA). I risultati sono stati confermati attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% in *Buffer* TBE e per confronto con un marcatore molecolare di peso noto.

Per l'analisi della dieta, le amplificazioni con i *primer* universali per vegetali sono state condotte usando 50 ng di DNA in un volume totale di 25 μl, con 2.5 μl di *Buffer* B 10X (0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% w/v Tween-20), 2.5 μl di MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 4 μl di dNTP [2.5 mM], 0.25 μl di ciascun *primer* [25 μM], 1 U Taq polimerasi (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). La reazione è stata condotta usando una temperatura iniziale di 94°C per 3 min, 94°C per 30 sec (denaturazione), 53°C per 45 sec (*annealing*), 72°C per 45 sec (allungamento) e, infine, 72°C per 7 min. Le tappe di denaturazione, *annealing* ed allungamento sono state ripetute per 35 volte. Per ogni campione, sono state prodotte due repliche. Sono stati inclusi nell'analisi anche controlli positivi e negativi (acqua pura) per testare l'attendibilità dei risultati ed escludere eventuali contaminazioni, rispettivamente. In particolare, il controllo positivo consiste di una miscela dei 5 diversi DNA di vegetali precedentemente citati.

Il risultato è stato valutato attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1.5% in *Buffer* TBE e per confronto con un marcatore molecolare di peso noto.

Prima del sequenziamento, i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La concentrazione del DNA è stata valutata spettrofotometricamente, usando il Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

**Tabella 2.** *Primer* utilizzati per le analisi genetiche. \* in associazione al *primer* LepDloopF.

<i>Primer</i>	Sequenza (5'-3')	Taxon target	regione target	bp
<b>LepDloopF</b>	TAGTCTTRTTCTCCCCTGATCTTCTCGG	<i>Lepus</i>	Dloop	237
<b>LepDloopR</b>	AGGAAGGGGATAATTGCTAGGATRAGRATT	<i>Lepus</i>	Dloop	
<b>ReverseLc</b>	CGTCAATAGTGACAAGGTACTTGGA	<i>Lepus</i>	Dloop	84*
<b>ReverseLe</b>	TGGGGAAGAGCTTTAATGCACGAT	<i>Lepus</i>	Dloop	212*
<b>JK11</b>	ATCCTGGAATTCACAACCAAGTATCG	<i>Planta</i>	ITS1	>350
<b>JK14</b>	GGAGAAGTCGTAACAAGTTTCCG	<i>Planta</i>	ITS1	

### 2.6.3. Sequenziamento di nuova generazione e analisi bioinformatica dei dati

Il sequenziamento degli ampliconi è effettuato utilizzando il sistema Illumina MiSeq con una corsa 2x300 bp *paired-end* seguendo il protocollo Nextera DNA Sample Preparation, presso la Genomix4Life dell'Università di Salerno (<http://www.genomix4life.com/it/>).

La tecnologia Illumina consiste in un protocollo strutturato in tre tappe: la preparazione della libreria genomica, la *clusterizzazione* ed il sequenziamento.

Nella prima tappa, il campione di DNA è frammentato in una libreria di piccoli segmenti, per sonicazione. Ogni molecola di DNA è usata come stampo in un'amplificazione con *primer* specifici per il tratto di interesse. I *primer* sono dotati di adattatori ed *index* necessari nelle tappe successive. In particolare, durante la *clusterizzazione*, essi permettono alla molecola di DNA di ancorarsi alla *flow cell* (substrato di vetro a singola corsia su cui vengono generati i *cluster* e viene eseguita la reazione di sequenziamento) per complementarità con oligonucleotidi di ancoraggio ivi presenti. La polimerasi, usando come innesco l'oligonucleotide di ancoraggio, sintetizza

un nuovo filamento nucleotidico. A questo punto, il vecchio filamento è allontanato mentre le molecole neosintetizzate sono amplificate attraverso *bridge amplification* (amplificazione a ponte). Ogni molecola di DNA si ripiega ibridando con l'oligonucleotide di ancoraggio adiacente e la polimerasi forma un amplicone a ponte. Nello *step* successivo, la doppia elica è denaturata, e ogni filamento è usato in successivi cicli di amplificazione clonale per generare milioni di *cluster* contenenti circa 1000 copie della stessa molecola di DNA. Al termine della *clusterizzazione* il filamento *reverse* è allontanato e ogni singolo filamento *forward* è usato per la tappa successiva.

La reazione di sequenziamento Illumina avviene attraverso la tecnologia *Sequencing-by-Synthesis* (SBD). Sulla cella di flusso vengono aggiunti il *primer* di sequenza e contemporaneamente i 4 precursori nucleotidici. Essi sono dotati di terminatori di catena reversibili e fluorescenti. Ogni base è marcata con un gruppo fluorescente di colore diverso. Ad ogni ciclo la polimerasi incorpora un nucleotide marcato che, quando viene eccitato, emette fluorescenza. In questo modo, è possibile monitorare in tempo reale l'aggiunta di tutti i nucleotidi su ogni frammento, fotografando le fluorescenze emesse. I terminatori reversibili possono essere riattivati grazie all'azione di un enzima che taglia la parte di molecola che blocca l'attività della DNA polimerasi. In questo modo la reazione di sequenziamento riprende e la polimerasi incorpora il nucleotide successivo. Questa procedura viene ripetuta fino al completamento della sequenza del DNA stampo, sia per il filamento *forward* che per il *reverse* (*paired-end sequencing*).

I risultati del sequenziamento (*read*) sono in formato FastQ. Esso permette di memorizzare le sequenze genetiche e i relativi *quality scores* (punteggi assegnati da un algoritmo alla stringa di caratteri) che vengono utilizzati per scegliere il *match* migliore contro il genoma di riferimento.

L'analisi bioinformatica consiste di diversi *step*: valutazione della qualità delle *read* e pulizia delle stesse, analisi qualitativa (*assembly* e confronto con le banca dati) e analisi quantitativa.

La qualità delle *read* è valutata con il software FastQC v0.11.4 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) che, attraverso una interfaccia grafica, fornisce una serie di informazioni relative alle caratteristiche delle *raw read*. Per la rimozione (*filtering*) delle *raw read* di bassa qualità ( $Q < 28$ ), dei *primer* e degli adattatori Illumina è stato utilizzato il software Trimmomatic v0.35 (Bolger *et al.*, 2014), in *paired end*

*mode*. Per valutare l'efficienza del *filtering* è stata nuovamente visualizzata la qualità delle *filtered read* utilizzando FastQC.

L'*assembly* permette di ridurre la quantità di dati da analizzare, riducendo la ridondanza delle *read* ed, allo stesso tempo, ottenendo sequenze di lunghezza maggiori che possono facilitare l'identificazione delle specie. Per ogni campione, le *filtered read* (*forward* e *reverse*) sono state sovrapposte e utilizzate per creare sequenze contigue (*contig*) attraverso il programma SOAPdenovo2\_127-mer (Luo *et al.*, 2012). Nell'ultimo *step*, le sequenze dei *contig* sono confrontate (*blast*) con le sequenze nucleotidiche presenti in NCBI attraverso il *software* BLAST 2.3.0 + (Camacho *et al.*, 2009) per l'assegnazione di ciascuna sequenza al corrispondente livello tassonomico tra le specie attese nell'area di studio in base a liste floristiche sito-specifiche (Strumia *et al.*, 2007) e liste regionali estrapolate dal sito [www.actaplantarum.org](http://www.actaplantarum.org). Tale conoscenza *a priori* non ha reso necessario la produzione di OTU (Operational Taxonomic Unit) e tutte le sequenze non riconducibili alle specie vegetali attese sono state considerate artefatti.

Dopo il confronto con la banca dati, sono stati selezionati solo gli allineamenti con un *Evalue* < 0.1 e un rapporto tra la lunghezza della sequenza e quella dell'allineamento (*alignment score*) > 30%. Per semplificare le analisi e selezionare solo i dati di interesse, sono state selezionati solo *i contig* ascrivibili al sottoregno *Viridiplantae* e al regno *Fungi*.

Durante il *blast*, potrebbe capitare che uno stesso *contig* venga assegnato ad unità tassonomiche diverse (Freitas *et al.*, 2015). In questi casi, la sequenza è stata ascritta al livello tassonomico più alto che includeva i diversi *taxa*. Per questo motivo, l'assegnazione è stata fatta con un diverso grado di risoluzione (famiglia, genere, specie): per le sequenze corrispondenti ad una sola specie è stata riportata solo questa categoria; per le sequenze corrispondenti a due o più specie diverse, appartenenti allo stesso genere, è stato riportato solo quest'ultimo; per le sequenze appartenenti a due o più specie diverse, di generi diversi ma della stessa famiglia è stata riportata solo la categoria tassonomica superiore. Tutte le sequenze per le quali non è stato possibile effettuare una classificazione almeno al livello di famiglia sono state etichettate come *unclassified*.

Per la quantificazione, le *read* sono state allineate contro i *contig* di riferimento (*mapping*), precedentemente assegnati ai rispettivi *taxa*, attraverso la combinazione dei

*software* bwa-0.7.12 (Li & Durbin 2009), samtools 1.3 (Li *et al.*, 2009) e samstat 1.5.1 (Lassmann *et al.*, 2010). Per ogni assegnazione tassonomica è stato calcolato il numero delle *read* corrispondenti. Le sequenze uniche sono state rimosse e l'identificazione tramite *barcoding* è stata fatta usando le sequenze che si ripetevano un numero di volte superiore a due (Mollot *et al.*, 2014).

#### **2.6.4. Analisi di rarefazione**

Il numero minimo di campioni fecali utili a definire significativamente la dieta di lepre è stato stimato mediante analisi di rarefazione attraverso il programma Vegan (Oksanen *et al.*, 2010), implementato in R (Dixon, 2003; R Development Core Team, 2010), relazionando il numero di campioni fecali con il numero dei taxa vegetali identificanti nell'analisi della dieta.

### **2.7. Caratterizzazione floristico-vegetazionale della Sotto-area 2b**

Al fine di valutare i livelli di sovrapposizione trofica tra lepre italiana e lepre europea è stato analizzato lo sfruttamento delle risorse alimentari confrontando i dati della dieta con la disponibilità di piante nell'area di simpatria/sintopia tra le due specie.

E' stata effettuata la caratterizzazione floristico-vegetazionale, durante la stagione estiva (giu-ago), in un'area di 2 kmq inclusa nella Sotto-area 2b.

Prima di tutto è stata realizzata una mappa della vegetazione su base fisionomica, in scala 1:5000 mediante foto-interpretazione e rilievi diretti. All'interno delle differenti fisionomie individuate, sono stati effettuati rilievi della vegetazione per descrivere le caratteristiche delle differenti comunità vegetali presenti. In di ogni *stand* sono stati rilevati i principali aspetti ambientali (pendenza, esposizione, rocciosità) e la struttura verticale ed orizzontale degli strati (erbaceo, arbustivo ed arboreo) della vegetazione. Infine, è stata definita la composizione floristica della fitocenosi, assegnando un valore di copertura secondo il metodo fitosociologico (Kent & Cooker 1992), utilizzando la scala di Braun-Blanquet, modificata da Van der Maarel (1979). Quest'ultima permette la trasformazione della originale scala ordinale in una scala numerica che ne consente l'elaborazione secondo tecniche di analisi multivariata.

Le piante non riconoscibili direttamente sono state raccolte e successivamente

determinate in laboratorio con l'ausilio di uno stereomicroscopio Leica EZ-4D, utilizzando la chiave dicotomica presente in Pignatti (1982) e quella riportata in Tutin *et al.*, (1993).

I dati relativi alla forma biologica per ogni singola specie sono stati desunti da Pignatti (1982) e sono stati utilizzati per l'interpretazione dei risultati dell'analisi multivariata.

I dati raccolti hanno generato una prima matrice grezza che è stata sottoposta ad una preliminare elaborazione finalizzata a diminuire le ridondanze dovute ad un eccesso di specie con frequenze molto basse ( $< 5$ ). In seguito, la matrice è stata analizzata secondo tecniche di analisi multivariata utilizzando il *software* SYN-TAX 2000 (Podani, 2001). In particolare, per definire le caratteristiche dei diversi tipi di vegetazione indagati, è stata effettuata una classificazione gerarchica, sia dei rilievi che delle specie, utilizzando l'indice di Jaccard su base qualitativa, come indice di dissimilarità, ed il legame medio (UPGMA), come criterio agglomerativo. La stessa matrice è stata poi sottoposta ad ordinamento utilizzando la Principal Component Analysis (PCA) per evidenziare la presenza di pattern relazionali nascosti e di gradienti tra rilievi, variabili e caratteristiche ambientali (Podani, 2007), in accordo ai principi dell'analisi indiretta dei gradienti.

L'abbondanza delle singole specie vegetali è stata stimata moltiplicando l'importanza percentuale della specie nell'associazione vegetazionale con l'unità di spazio in cui tale associazione era presente.

## **2.8. Plasticità ecologica**

Al fine di valutare la plasticità ecologica di lepre italica, intesa come capacità di adattare le sue preferenze in condizioni limitanti, attraverso il *software* IndSpec1 (Bolnick, 2002), è stato misurato il livello di specializzazione trofica individuale sotto differenti condizioni ambientali (descritte nel paragrafo 2.1), evidenziando gli scostamenti dalla condizione di controllo (lepre italica in assenza di pressioni=Sotto-area 2a). La matrice per elaborare le variazioni della dieta nelle diverse condizioni ambientali si compone di colonne (taxa vegetali ritrovati nei pellet) e righe (condizioni ambientali). I taxa vegetali sono espressi come numero di *read* ( $n_{ij}$ ) corrispondenti ad un

taxon vegetale ( $j$ ) consumato dall'individuo nella condizione  $i$ . Questa matrice di dati ( $X$ ) con elementi  $n_{ij}$  è convertita in una matrice di proporzioni ( $P$ ) con elementi  $p_{ij}$ :

$$p_{ij} = n_{ij} / \sum n_{ij}$$

È stata calcolata l'Ampiezza Totale di Nicchia ( $TNWS$ ) usando l'indice di Roughgarden (1979), basato sull'equazione di Shannon-Weaver:

$$TNWS = - \sum q_j \ln q_j$$

dove  $q_j$  è la proporzione di risorsa trofica  $j$  utilizzata. Tale indice è 0, quando la dieta include un'unica componente, e cresce all'aumentare del numero di elementi pascolati con la stessa proporzionalità.

## 2.9. Analisi di sovrapposizione di nicchia

Il principio di esclusione competitiva (Gause, 1934; Hardin, 1960) afferma che affinché due specie possano coesistere nello stesso ambiente è necessario che esse si differenzino nell'utilizzare le risorse a disposizione. Generalmente, quando questa convivenza è in equilibrio, si dovrebbe riscontrare una sovrapposizione di nicchia relativamente bassa (McArthur & Levis 1967; Sale 1974; Connell, 1980); al contrario, quando è in corso una concorrenza per le risorse limitate, la sovrapposizione delle nicchie delle due specie dovrebbe essere elevata.

Per valutare eventuali interazioni competitive (trofiche/spaziali) tra lepre italiana e lepre europea è stato misurato il grado di sovrapposizione delle loro nicchie ecologiche tramite l'indice di sovrapposizione di nicchia calcolato utilizzando la formula di Pianka (1973), riadattata da Mac Arthur e Levis:

$$O_{j,k} = \sum P_{ij} * P_{kj} / \sum P_{ij}^2 * \sum P_{kj}^2$$

dove  $O$  è il coefficiente di sovrapposizione,  $j$  e  $k$  si riferiscono alle due specie esaminate,  $P_{ij}$  è la proporzione dell'attività o della dieta della specie  $j$  rispetto la risorsa  $i$ . Questo valore può variare tra 0 (nessun elemento condiviso) ed 1 (utilizzo della stessa risorsa).

Tale elaborazione è stata sviluppata con EcoSim Professional v. 1.2d (Gotelli & Entsminger 2001) ed, in particolare, la partizione *Niche Overlap*. A tal fine, sono stati integrati i dati derivanti dall'analisi della nicchia spaziale e quelli derivanti della

caratterizzazione delle abitudini alimentari delle due specie. I dati immessi nel sistema consistono di una matrice in cui ogni riga rappresenta una specie diversa e ogni colonna indica una diversa risorsa ecologica. Ogni valore rappresenta l'utilizzo di quella particolare risorsa da parte della specie. Il "non utilizzo" è stato indicato con zero.

EcoSim sfrutta una randomizzazione Monte Carlo per creare pseudo-comunità (Pianka, 1986), confrontando statisticamente i modelli ottenuti per queste comunità randomizzate con quello ottenuto usando i dati della matrice reale. Questo sistema permette di valutare l'ampiezza della nicchia della singola specie in condizioni in cui non ci sia aspetta nessun grado di condivisione delle risorse (analisi del modello nullo *sensus* Gotelli & Graves 1996).

L' algoritmo randomizzato è RA3: l'ampiezza della nicchia osservata si ottiene attraverso la randomizzazione dei valori usati all'interno di ogni riga della matrice; in questo modo, è mantenuto il grado di specializzazione della specie (*retained*). Lo zero, inteso come "non utilizzo della risorsa", è rimescolato (*reshuffled*), in modo che il sistema possa ammettere che la risorsa non usata da una specie in natura possa essere, invece, usata dalla *null-community*.

# Capitolo 3

## Risultati

---



### 3.1. Assegnazione della specie

Sono stati collezionati 323 campioni ascrivibili al genere *Lepus*, di cui 25 tessuti, 5 peli e 293 pellet.

Le analisi genetiche confermano la specificità dei *primer* LepDloopF, LepDloopR, ReverseLe e ReverseLc per la discriminazione tra *L. corsicanus* e *L. europaeus*.

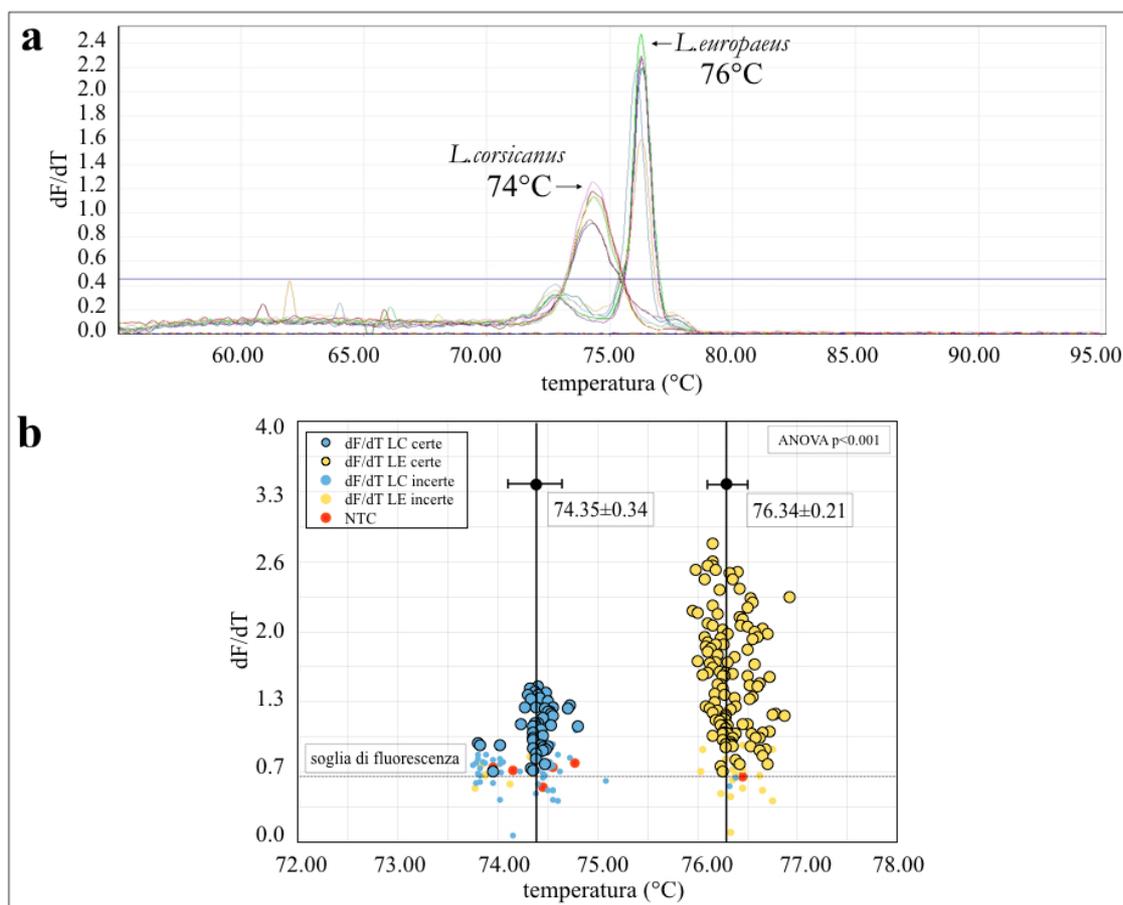
Per 98 campioni di lepre ( $L_c = 48$ ;  $L_e = 50$ ) è stata effettuata caratterizzazione di specie sia tramite sequenziamento Sanger che tramite HRM. I risultati ottenuti sono congruenti nel 100% dei casi, indicando la possibilità di utilizzare con successo l'HRM per distinguere *L. corsicanus* da *L. europaeus*.

Attraverso sequenziamento Sanger la coppia di *primer* LepDloopF/R ha permesso l'assegnazione di specie nel 100% dei casi, per i DNA estratti da tessuto e peli, e nell'80.82% dei casi, per DNA estratti da pellet. Di questi, 157 sono risultati essere di *L. europaeus* e 90 di *L. corsicanus*. Per 46 pellet non è stato possibile effettuare la caratterizzazione, probabilmente a causa della cattiva conservazione del materiale genetico.

Attraverso HRM, la combinazione dei *primer* LepDloopF, ReverseLe e ReverseLc, ha permesso di assegnare alla specie di appartenenza il DNA estratto da pellet nell'84.24%, mentre per DNA estratti da altre fonti la percentuale si mantiene pari a 100%.

In HRM, i DNA corrispondenti a *L. corsicanus* producono un profilo di *melting* caratterizzato da un picco unico a  $74^{\circ}\text{C} \pm 0.34$ , che, nel caso di DNA ascrivibili a *L. europaeus*, si sposta a  $76^{\circ}\text{C} \pm 0.21$  (Fig. 14a), con una differenza statisticamente significativa (ANOVA,  $p < 0.001$ ).

L'assegnazione di un reperto ad una delle due specie è stata valutata anche mediante il livello di fluorescenza (rapporto  $dF/dT$ ) che ha creato i limiti di accettabilità dei profili di *melting* riferibili a *L. corsicanus* e *L. europaeus* (Fig. 14b).



**Figura 14.** Analisi High Resolution Melting (HRM) su pellet di lepre. **a)** Profili di *melting* di *L. corsicanus* (picco a 74°C) e *L. europaeus* (picco a 76°C). Ogni colore rappresenta un campione analizzato. Per esigenze grafiche è stata riportata una sola replica per ciascun campione. **dF/dT:** rapporto tra la derivata della fluorescenza e la temperatura di *melting*. **b)** Valore soglia di fluorescenza (0.67). **LC certe** = DNA estratto da pellet assegnato a *L. corsicanus* di origine nota; **LE certe** = DNA estratto da pellet assegnato a *L. europaeus* di origine nota; **LC incerte** = DNA estratto da pellet assegnato a *L. corsicanus*; **LE incerte** = DNA estratto da pellet assegnato a *L. europaeus*; **NTC** = controllo negativo.

## 3.2. Analisi dell'ecologia spaziale

### 3.2.1. Distribuzione del genere *Lepus* nel Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni (Sotto-area 1)

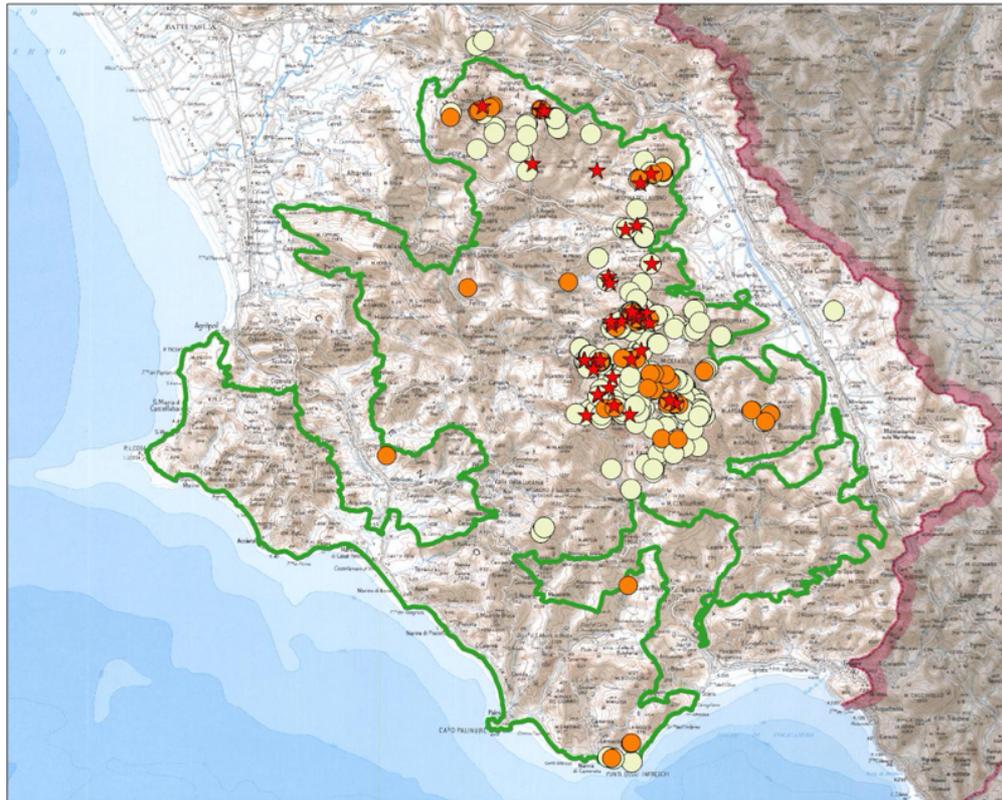
L'ecologia spaziale di lepre italiana è stata indagata nella Sotto-area 1 (PNCVDA).

La spazializzazione dei segni di presenza di *Lepus*, in associazione alla caratterizzazione genetica dei campioni biologici, è stata utilizzata per l'elaborazione di una mappa di distribuzione specie-specifica (Fig. 15). Essa evidenzia una chiara simpatria tra lepre italiana e lepre europea, che per alcune località diviene sintopia. Il

rapporto quantitativo di lepre italica/lepre europea nelle aree di simpatria/sintopia è pari a 2.15.

Monte Serra Nuda rientra tra le aree ad esclusiva presenza di lepre italica.

Monte Vivo rientra nelle area di sintopia tra le due specie.



**Figura 15.** Mappa di distribuzione del genere *Lepus* nella Sotto-area 1. Spot gialli, posizione dei campioni biologici e delle osservazioni assegnati al genere *Lepus*. Spot arancione: siti di presenza di lepre europea. Spot rossi: siti di presenza di lepre italica. Il perimetro verde è il confine del Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni (PNCVDA).

### 3.2.2. ENFA

La distribuzione di lepre italica e lepre europea nella Sotto-area 1 è stata utilizzata come base per l'elaborazione di mappe di idoneità di habitat utilizzando il metodo ENFA. Dall'analisi fattoriale di nicchia ecologica sembrerebbe che lepre italica sfrutti meglio le risorse offerte dall'ambiente (marginalità=1.98) rispetto alla congenerica lepre europea

(marginalità=2.42), sebbene la prima risulti più specializzata (specializzazione  $L_c=1.63$  vs specializzazione  $L_e=1.46$ ).

Per entrambe, i fattori ambientali più correlati alla presenza sul territorio sono l'altitudine e la presenza di seminativi, seguiti dalla presenza della macchia mediterranea e la lontananza dalle strutture antropiche (Tab. 3).

La distribuzione della lepre italiana risulta anche particolarmente influenzata dalla pendenza e dall'esposizione del territorio, preferendo forti pendenze e versanti rivolti a sud.

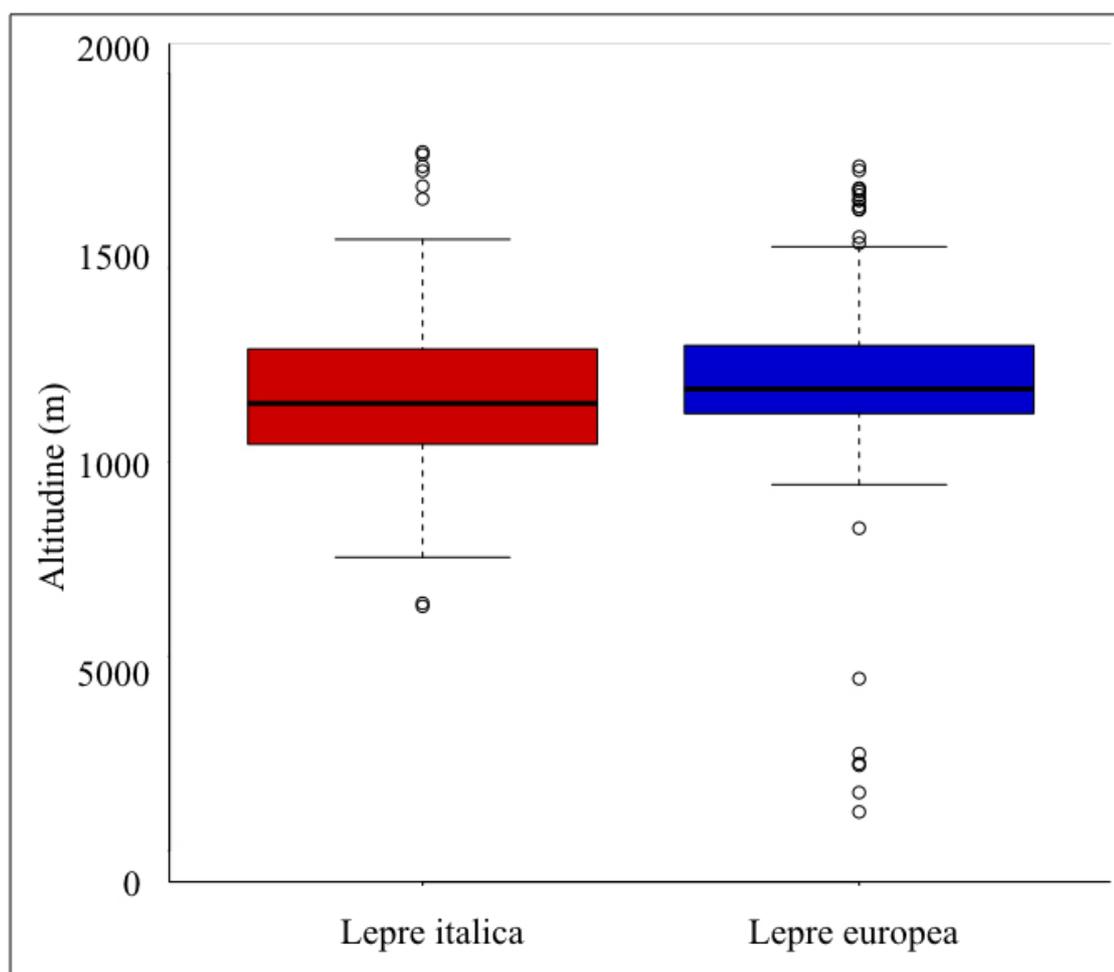
**Tabella 3.** Varianza spiegata dai primi 8 fattori ecologici e coefficienti delle variabili per lepre italiana e lepre europea.

<b>Lepre italiana</b>								
<b>Matrice dei punteggi</b>	<b>Marginalità (27.6%)</b>	<b>Spec.1 (39.9%)</b>	<b>Spec.2 (18.7%)</b>	<b>Spec.3 (5.4%)</b>	<b>Spec.4 (3.2%)</b>	<b>Spec.5 (2.3%)</b>	<b>Spec.6 (1.8%)</b>	<b>Spec.7 (1.1%)</b>
Esposizione	0.226	-0.041	0.233	-0.287	0.118	0.817	-0.098	0.002
Barriere antropiche	0.296	0.008	0.152	-0.349	-0.679	-0.005	-0.014	0.082
Boschi di latifoglie	-0.003	0.737	-0.749	-0.024	-0.026	-0.069	-0.012	-0.019
Macchia	0.298	-0.065	-0.048	-0.525	0.447	-0.441	-0.541	0.047
Pascolo	-0.058	0.661	0.576	0.394	-0.024	-0.154	-0.186	0.026
Quote	0.591	0.036	-0.078	0.487	-0.388	-0.003	0.058	-0.757
Seminativi	0.583	0.028	-0.070	0.233	0.383	0.055	-0.140	0.626
Pendenza	0.280	0.106	0.126	-0.271	0.163	-0.327	0.800	0.161

<b>Lepre europea</b>								
<b>Matrice dei punteggi</b>	<b>Marginalità (33.6%)</b>	<b>Spec.1 (35.8%)</b>	<b>Spec.2 (13.8%)</b>	<b>Spec.3 (6.1%)</b>	<b>Spec.4 (4.3%)</b>	<b>Spec.5 (3.1%)</b>	<b>Spec.6 (2.2%)</b>	<b>Spec.7 (1.1%)</b>
Esposizione	0.187	-0.018	-0.161	0.292	-0.328	-0.615	-0.103	0.099
Barriere antropiche	0.412	-0.008	0.026	0.068	-0.467	0.532	0.297	0.324
Boschi di latifoglie	-0.003	-0.959	0.546	-0.071	0.067	0.044	0.051	-37
Macchia	0.312	0.023	0.004	0.612	0.540	-0.086	0.318	0.134
Pascolo	-0.046	-259	-816	-317	0.124	0.044	0.117	0.071
Quote	0.495	-64	32	-0.569	-0.411	56	0.440	-0.852
Seminativi	0.635	0.053	-0.025	-0.115	0.424	-0.323	-0.436	0.367
Pendenza	0.218	-0.080	-0.082	0.305	0.120	0.469	-0.632	-0.005

Tra le due specie non c'è una segregazione altitudinale statisticamente significativa (Fig. 16). Entrambe sono osservate a quote elevate (oltre i 1700 metri s.l.m.) e solo lepre europea si spinge a quote significativamente inferiori alla media (<100 m s.l.m.).



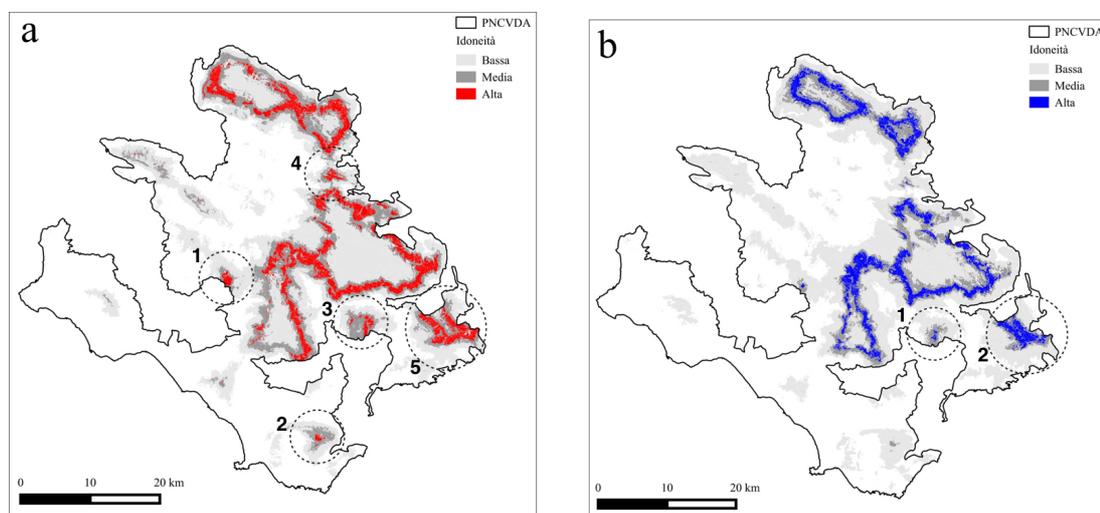
**Figura 16.** Presenza di lepre italiana (in rosso) e lepre europea (in blu) secondo la variazione altitudinale.

Dall'analisi ENFA per il territorio indagato, emerge che l'area totale di idoneità dell'habitat è maggiore per lepre italiana (855.6 kmq) che per lepre europea (816.7 kmq), e lo stesso risultato si ottiene considerando le aree ad elevata idoneità (alta idoneità  $L_c=133.00$  kmq; alta idoneità  $L_e=101.00$  kmq) (Tab. 4, Fig. 17a, b).

**Tabella 4.** Valori di idoneità di habitat elaborati tramite ENFA per lepre italiana e lepre europea, relativamente alla Sotto-area 1 (Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni). Tutte le misure sono espresse in kmq.

	<b>Area totale di idoneità</b>	<b>Bassa idoneità 5-25</b>	<b>Media idoneità 35-65</b>	<b>Alta idoneità 75-100</b>
<b>L. italiana</b>	855.6	383.9	339.0	133.0
<b>L. europea</b>	816.7	428.2	287.1	101.0

Tuttavia, per la specie endemica si individuano almeno 5 isole ad elevata idoneità disconnesse tra loro (Fig. 17a), che nel caso della lepre europea si riducono a 2 (Fig. 17b).



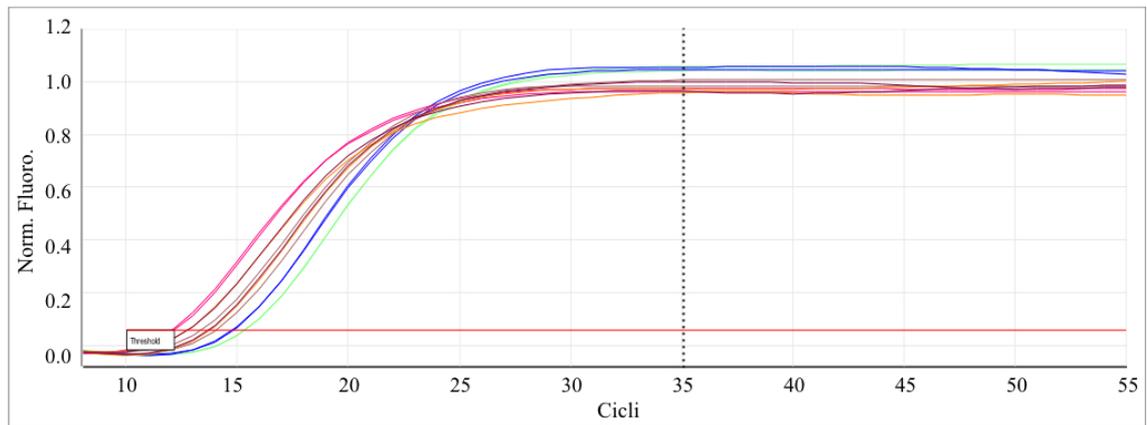
**Figura 17.** Mappa di idoneità di habitat elaborata tramite ENFA per **a)** lepre italiana e **b)** lepre europea nella la Sotto-area 1 (Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni, PNCVDA). In rosso e blu le aree a maggiore idoneità per lepre italiana e lepre europea, rispettivamente. In grigio scuro le aree di media idoneità. In grigio chiaro le aree a minore idoneità. Le aree circoscritte indicano isole ad paesaggistiche.

### 3.3. Analisi della dieta

Le indagini finalizzate ad approfondire aspetti relativi all'ecologia trofica di lepre italiana sono state svolte nell'ambito della Sotto-area 2 (2a e 2b).

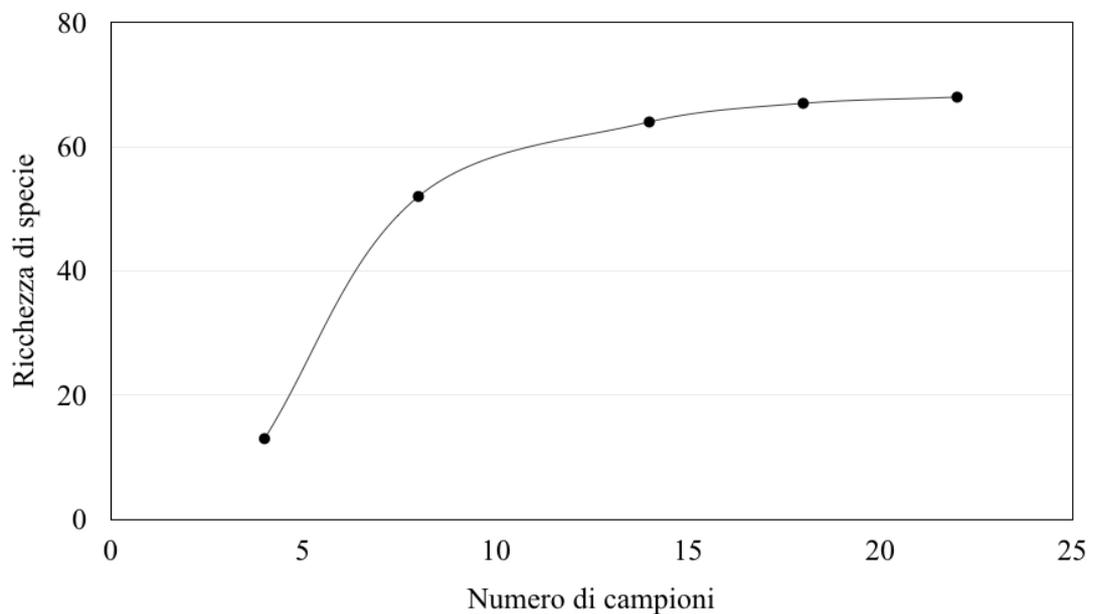
Per la caratterizzazione molecolare della dieta sono stati processati 75 pellet ( $L_c=47$ ;  $L_e=28$ ), organizzati in 15 pool ( $L_c=9$ ;  $L_e=6$ ).

L'efficacia dei *primer* JK 11 e JK14, utilizzati per analizzare la dieta, è stata testata mediante Real time PCR, evidenziando la eguale efficacia di amplificazione nei confronti di 5 rappresentanti delle principali famiglie di vegetali presenti nell'area di studio. Infatti, per tutti i campioni analizzati, il livello di saturazione è raggiunto entro il 35° ciclo (Fig. 18).



**Figura 18.** Real time PCR condotta con i *primer* universali per vegetali JK11 e JK14 su 5 specie di DNA vegetale: *Centaurea parlatoris* (in rosa), *Genista tinctoria* (in blu), *Orchis pauciflora* (in verde), *Zea mays* (in arancio) e *Ruta angustifolia* (in viola), e su una miscela di tutti i DNA citati (in marrone). Tutti campioni raggiungono la saturazione entro il 35° ciclo di reazione (linea verticale tratteggiata).

L'analisi di rarefazione indica che 22 pellet sono sufficienti per ottenere una stima reale della composizione della dieta di lepre (Fig. 19).



**Figura 19.** Curva di saturazione basata sul numero di piante identificate nei pellet fecali di lepre italiana.

### 3.3.1. Caratterizzazione delle preferenze alimentari di lepre italiana

Dal sequenziamento *pairedend* derivano *short read* (301 bp) a partire da entrambe le estremità dei frammenti, per un totale di 11'634'372 *read* grezze, delle quali sono state utili per assegnazione delle specie vegetali 927'835. Di queste, il 54.91% sono state caratterizzate a livello di famiglia, 35.33% a livello di genere e 10.24% a livello di specie. I 215 taxa identificati sono stati assegnati a 19 famiglie, 67 generi e 129 specie (Tab. 5).

La maggiore diversità in taxa si osserva per la famiglia delle *Poaceae*, che ne include 47, alla quale seguono le *Fabaceae* (27 taxa), le *Asteraceae* (19 taxa) e le *Rosaceae* (18 taxa) (Tab. 5).

**Tabella 5.** Lista dei taxa vegetali identificati nei pellet di lepre italiana e il numero di *read* ad essi corrispondenti.

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di <i>read</i></b>
<i>Aceraceae</i>	<i>Acer</i>	446
	<i>Acer campestre</i>	10262
	<i>Acer platanoides</i>	544
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Beta</i>	1450
	<i>Beta vulgaris</i>	2
<i>Amaryllidaceae</i>	<i>Allium</i>	2560
	<i>Allium cepa</i>	2
	<i>Allium vineale</i>	2
<i>Apiaceae</i>	<i>Apiaceae</i>	117
	<i>Bupleurum</i>	12
	<i>Chaerophyllum</i>	12
	<i>Daucus</i>	2
	<i>Peucedanum officinale</i>	72
<i>Apocinaceae</i>	<i>Nerium oleander</i>	8
<i>Araliaceae</i>	<i>Hedera helix</i>	32
<i>Asteraceae</i>	<i>Asteraceae</i>	2418
	<i>Artemisia</i>	6

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
	<i>Bellis</i>	138
	<i>Bellis perennis</i>	18
	<i>Bellis sylvestris</i>	26
	<i>Bidens frondosa</i>	1024
	<i>Cichorium intybus</i>	2
	<i>Crepis</i>	2991
	<i>Delairea odorata</i>	2
	<i>Hieracium racemosum</i>	20
	<i>Hypochaeris cretensis</i>	10
	<i>Jacobaea aquatica</i>	6
	<i>Picris hieracioides</i>	6
	<i>Pilosella</i>	6
	<i>Scorzonera</i>	6
	<i>Scorzoneroides</i>	8
	<i>Scorzoneroides cichoriacea</i>	105
	<i>Taraxacum</i>	20
	<i>Tragopogon porrifolius</i>	43
<b><i>Betulaceae</i></b>	<i>Alnus cordata</i>	2
<b><i>Boraginaceae</i></b>	<i>Pulmonaria obscura</i>	26
	<i>Echium candicans</i>	2
<b><i>Brassicaceae</i></b>	<i>Aethionema saxatile</i>	2
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	46
	<i>Brassica</i>	23
	<i>Brassica rapa</i>	2
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	4
	<i>Erophila verna</i>	2
<b><i>Caryophyllaceae</i></b>	<i>Caryophyllaceae</i>	104
	<i>Dianthus</i>	16
	<i>Silene</i>	2
	<i>Silene italica</i>	14
<b><i>Chenopodiaceae</i></b>	<i>Salicornia patula</i>	2

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
<i>Cistaceae</i>	<i>Cistaceae</i>	418
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulaceae</i>	2
<i>Crassulaceae</i>	<i>Crassulaceae</i>	24
	<i>Sedum</i>	140
	<i>Sedum rupestre</i>	2
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucurbitaceae</i>	10
	<i>Bryonia dioica</i>	72
	<i>Cucumis</i>	70
	<i>Cucumis melo</i>	3190
	<i>Cucurbita pepo</i>	18
	<i>Lagenaria siceraria</i>	282
<i>Cyperaceae</i>	<i>Cyperaceae</i>	4233
	<i>Carex</i>	42
	<i>Carex brachystachys</i>	6
<i>Ericaceae</i>	<i>Ericaceae</i>	2
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia</i>	56
	<i>Euphorbia esula</i>	2
	<i>Euphorbia marginata</i>	44
	<i>Euphorbia nicaeensis</i>	2
<i>Fabaceae</i>	<i>Fabaceae</i>	18862
	<i>Anthyllis</i>	3531
	<i>Anthyllis vulneraria</i>	2
	<i>Astragalus glycyphyllos</i>	37
	<i>Cicer arietinum</i>	8
	<i>Galega officinalis</i>	10
	<i>Lathyrus</i>	14
	<i>Lathyrus nissolia</i>	2
	<i>Lotus</i>	78
	<i>Lupinus angustifolius</i>	4
	<i>Medicago sativa</i>	2
	<i>Medicago truncatula</i>	178

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
	<i>Onobrychis</i>	230019
	<i>Onobrychis arenaria</i>	2
	<i>Onobrychis caput-galli</i>	878
	<i>Onobrychis montana</i>	2
	<i>Onobrychis viciifolia</i>	36
	<i>Ononis spinosa</i>	3
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1990
	<i>Spartium junceum</i>	168
	<i>Trifolium</i>	19281
	<i>Trifolium montanum</i>	2
	<i>Trifolium repens</i>	84
	<i>Trifolium tomentosum</i>	2
	<i>Trifolium striatum</i>	8
	<i>Trifolium suffocatum</i>	2
	<i>Vicia</i>	145
<b><i>Fagaceae</i></b>	<i>Fagaceae</i>	429486
	<i>Fagus sylvatica</i>	58539
	<i>Quercus</i>	8
	<i>Quercus cerris</i>	6
<b><i>Geraniaceae</i></b>	<i>Geranium</i>	26
	<i>Geranium tuberosum</i>	2
<b><i>Iridaceae</i></b>	<i>Iridaceae</i>	1206
	<i>Crocus</i>	6
	<i>Crocus imperati</i>	2
	<i>Romulea bulbocodium</i>	38
<b><i>Juncaceae</i></b>	<i>Luzula</i>	1133
	<i>Luzula campestris</i>	2
<b><i>Lamiaceae</i></b>	<i>Lamiaceae</i>	11113
	<i>Clinopodium vulgare</i>	2
	<i>Prunella</i>	13
	<i>Thymus pulegioides</i>	12

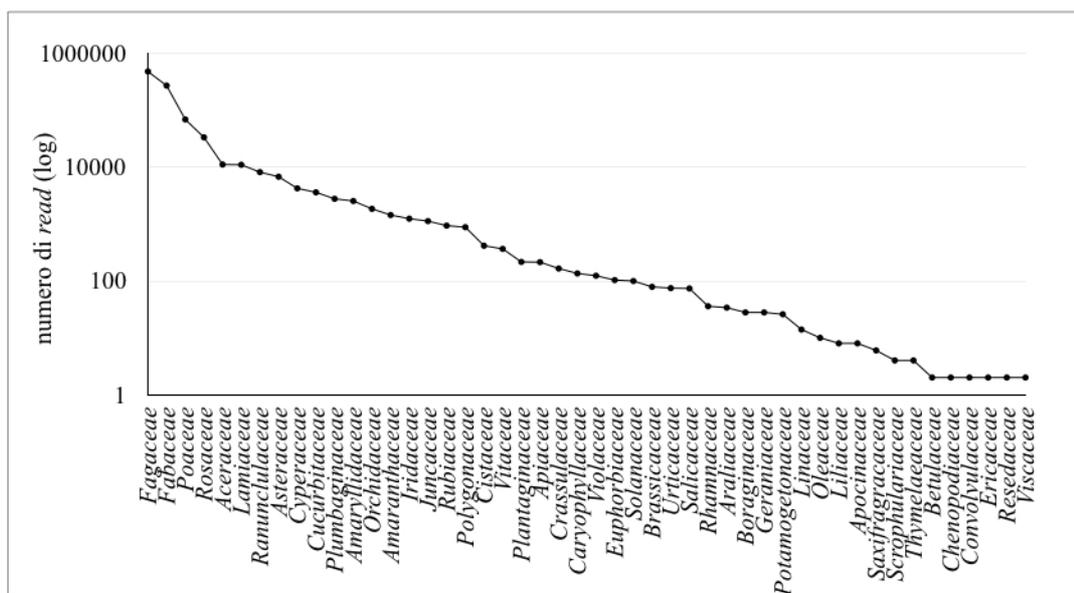
<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
<b><i>Liliaceae</i></b>	<i>Gagea bohemica</i>	4
	<i>Gagea lutea</i>	4
<b><i>Linaceae</i></b>	<i>Linum</i>	14
<b><i>Oleaceae</i></b>	<i>Fraxinus ornus</i>	10
<b><i>Orchidaceae</i></b>	<i>Orchidaceae</i>	1752
	<i>Epipactis atrorubens</i>	20
	<i>Orchis</i>	90
	<i>Orchis mascula</i>	2
<b><i>Plantaginaceae</i></b>	<i>Digitalis</i>	10
	<i>Plantago</i>	207
<b><i>Plumbaginaceae</i></b>	<i>Armeria canescens</i>	618
	<i>Armeria majellensis</i>	2181
<b><i>Poaceae</i></b>	<i>Poaceae</i>	34710
	<i>Achnatherum calamagrostis</i>	40
	<i>Agrostis</i>	330
	<i>Agrostis capillaris</i>	20
	<i>Agrostis stolonifera</i>	42
	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	3
	<i>Arrhenatherum</i>	71
	<i>Avena</i>	2
	<i>Brachypodium</i>	10851
	<i>Brachypodium retusum</i>	87
	<i>Bromus</i>	6946
	<i>Bromus diandrum</i>	122
	<i>Bromus erectus</i>	136
	<i>Bromus hordeaceus</i>	2
	<i>Bromus tectorum</i>	8
	<i>Briza maxima</i>	2
	<i>Catapodium</i>	4
<i>Cynosurus cristatus</i>	420	
<i>Cynosurus echinatus</i>	34	

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
	<i>Dactylis</i>	499
	<i>Dactylis glomerata</i>	4
	<i>Dasypyrum villosum</i>	93
	<i>Deschampsia cespitosa</i>	6
	<i>Elymus caninus</i>	2
	<i>Festuca</i>	562
	<i>Festuca arundinacea</i>	2
	<i>Festuca circummediterranea</i>	47
	<i>Festuca laevigata</i>	940
	<i>Festuca pratensis</i>	6
	<i>Festuca rubra</i>	62
	<i>Helictochloa</i>	4
	<i>Hordeum secalinum</i>	12
	<i>Hordelymus europaeus</i>	30
	<i>Koeleria</i>	2348
	<i>Koeleria macrantha</i>	12
	<i>Lolium</i>	4283
	<i>Milium vernale</i>	2
	<i>Panicum miliaceum</i>	20
	<i>Phleum</i>	277
	<i>Phleum alpinum</i>	4
	<i>Phleum pratense</i>	801
	<i>Poa</i>	5952
	<i>Poa bulbosa</i>	2
	<i>Poa pratensis</i>	62
	<i>Secale</i>	76
	<i>Triticum aestivum</i>	14
	<i>Zea mays</i>	12
<b><i>Polygonaceae</i></b>	<i>Polygonaceae</i>	2
	<i>Bistorta</i>	68
	<i>Polygonum</i>	689

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
	<i>Polygonum aviculare</i>	4
	<i>Rumex</i>	6
	<i>Rumex acetosa</i>	118
<b><i>Potamogetonaceae</i></b>	<i>Potamogeton</i>	2
	<i>Potamogeton nodosus</i>	24
<b><i>Ranunculaceae</i></b>	<i>Ranunculaceae</i>	16
	<i>Adonis vernalis</i>	20
	<i>Clematis vitalba</i>	8185
	<i>Ficaria verna</i>	2
	<i>Ranunculus</i>	28
<b><i>Resedaceae</i></b>	<i>Reseda</i>	2
<b><i>Rhamnaceae</i></b>	<i>Ziziphus jujuba</i>	36
<b><i>Rosaceae</i></b>	<i>Rosaceae</i>	220
	<i>Crataegus</i>	28
	<i>Fragaria vesca</i>	962
	<i>Geum urbanum</i>	1166
	<i>Malus domestica</i>	4
	<i>Malus pumila</i>	4
	<i>Malus sylvestris</i>	16
	<i>Potentilla</i>	1115
	<i>Potentilla argentea</i>	42
	<i>Prunus</i>	16
	<i>Pyrus</i>	68
	<i>Pyrus amygdaliformis</i>	18
	<i>Rosa</i>	338
	<i>Rosa canina</i>	44
	<i>Rosa dumalis</i>	10
	<i>Rosa gallica</i>	8
	<i>Rubus</i>	29779
	<i>Sorbus</i>	32
<b><i>Rubiaceae</i></b>	<i>Rubiaceae</i>	226

<b>Famiglie</b>	<b>Taxa</b>	<b>Numero di read</b>
	<i>Asperula</i>	718
<b><i>Salicaceae</i></b>	<i>Populus alba</i>	38
	<i>Salix</i>	36
<b><i>Saxifragraceae</i></b>	<i>Saxifraga</i>	6
<b><i>Scrophulariaceae</i></b>	<i>Veronica</i>	4
<b><i>Solanaceae</i></b>	<i>Capsicum annuum</i>	2
	<i>Solanum lycopersicum</i>	98
<b><i>Thymelaeaceae</i></b>	<i>Thymelaea passerina</i>	4
<b><i>Urticaceae</i></b>	<i>Ustica dioica</i>	75
<b><i>Violaceae</i></b>	<i>Viola</i>	124
<b><i>Viscaceae</i></b>	<i>Viscum album</i>	2
<b><i>Vitaceae</i></b>	<i>Vitis vinifera</i>	368
<b>totale</b>	<b>48</b>	<b>215</b>
		<b>927833</b>

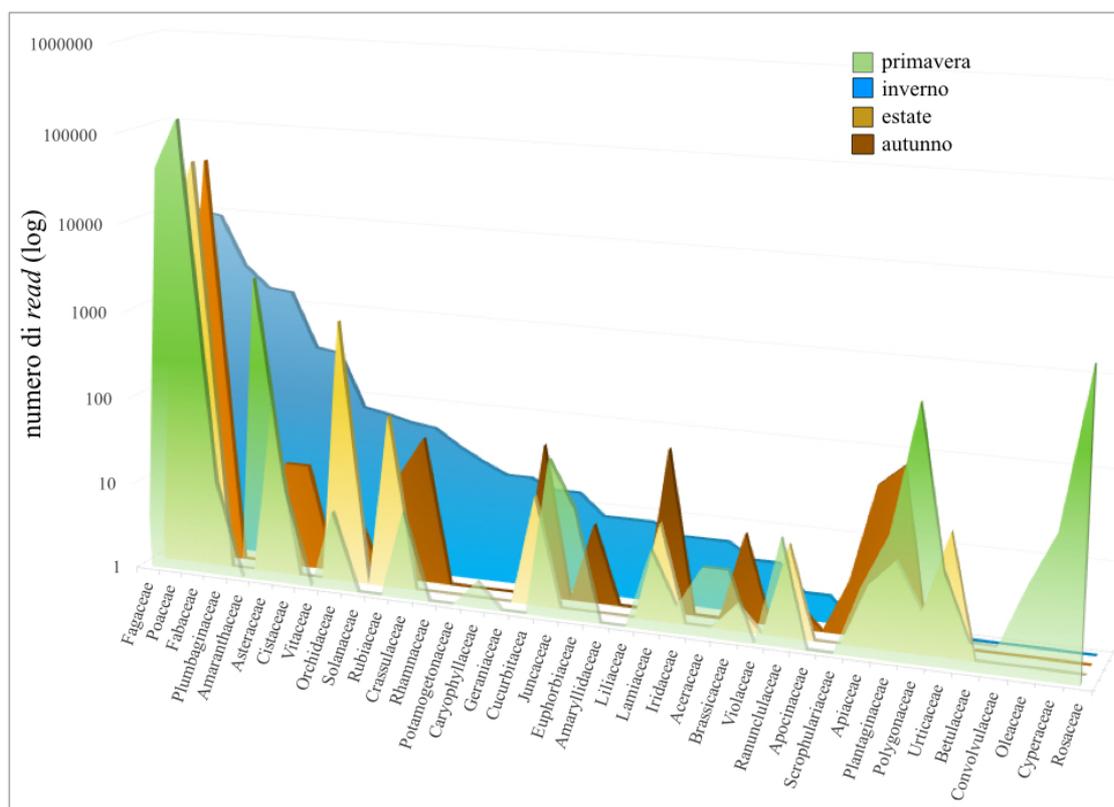
L'analisi quantitativa ha dimensionato le famiglie dalle più frequenti alle rare. Le *Fagaceae*, le *Fabaceae*, le *Poaceae*, e le *Rosaceae* (numero di *read* > 10'000) emergono come le più rappresentative mentre le *Betulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Convolvulaceae*, *Ericaceae*, *Resedaceae* e le *Viscaceae* sono presenti in percentuale inferiore allo 0.10% (Fig. 20).



**Figura 20.** Numero di *read* (in scala logaritmica) assegnate ad ognuna delle 48 famiglie individuate nei pellet fecali di lepore italiana.

### 3.3.2. *Variazione stagionale della dieta di lepore italiana*

La variazione stagionale della dieta di lepore italiana, ordinata secondo la lista decrescente delle piante riscontrate durante l'inverno (area in blu), evidenzia un *pattern* di distribuzione simile tra estate ed autunno, mentre la primavera e l'inverno sembrano evidenziare profili molto diversi (Fig. 21). Le *Fabaceae* rappresentano l'elemento trofico principale sia in primavera (75.65%) sia in estate (84.42%) che in autunno (98.43%). In particolare, in queste stagioni, il genere *Onobrychis* rappresenta 84.92% della dieta, il 43.74% e il 98.40%, rispettivamente. In inverno, invece, sono le *Fagaceae* ad essere le più consumate, sebbene costituiscano solo per il 32.02%. Infatti, a differenza delle altre stagioni, dove si registra una esclusiva dominanza delle *Fabaceae*, in inverno le *Fagaceae*, le *Poaceae* (26.92%) e le *Fabaceae* (23.99%) contribuiscono per l'82.94% alla dieta.



**Figura 21.** Variazione stagionale della dieta di lepre italiana espressa come numero di *read* (in scala logaritmica) assegnate a ciascuna famiglia vegetale. Inverno (in blu); in primavera (in verde); in estate (in giallo); in autunno (in marrone).

Le preferenze alimentari della stagione invernale si caratterizzano anche per un incremento nel numero di taxa consumati, di cui 10 famiglie sono esclusive di in questa stagione: *Amaranthaceae*, *Amaryllidaceae*, *Apocinaceae*, *Geraniaceae*, *Liliaceae*, *Potamogetonaceae*, *Rhamnaceae*, *Solanaceae*, *Violaceae* e *Vitaceae*.

La diversità nella dieta invernale è evidente dall'indice di Roughgarden (*TNWs*) che raggiunge 2.24 rispetto alle altre stagioni in cui è mediamente 0.87 (Tab. 6).

Semberebbe che tra le 28 famiglie incluse nella dieta in inverno, alcune di esse, verosimilmente *Fagaceae*, *Poaceae* e *Fabaceae*, siano consumate con una proporzionalità simile, rispetto a quanto accade nelle altre stagioni. In queste, la ricchezza in famiglie diminuisce (primavera=25; estate=14; autunno=15), insieme al valore dell'indice di diversità (*TNWs* primavera=0.85; *TNWs* estate=1.02; *TNWs* autunno=0.75) (Tab. 6).

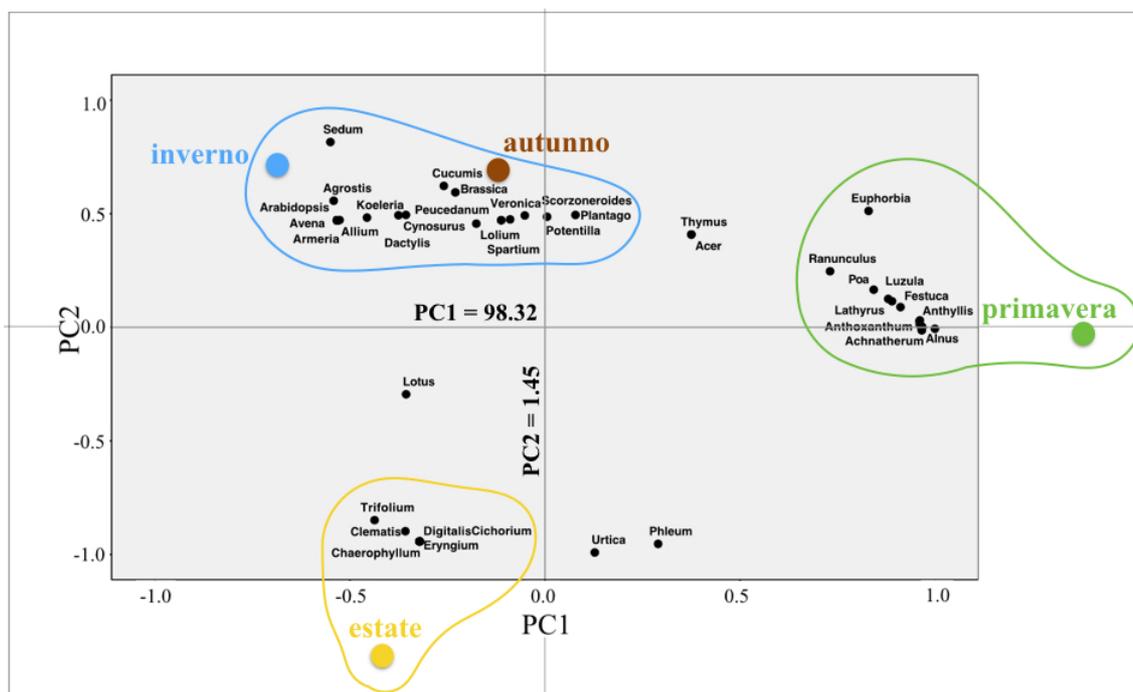
**Tabella 6.** Diversità nella dieta (*TNWs*) calcolata a livello di famiglie e ricchezza in famiglie di lepre italica, in inverno, primavera, estate ed autunno. Dei due indicatori è stato calcolato anche il livello di sovrapposizione.

stagione	Indice di diversità	sovrapposizione	Ricchezza in famiglie	sovrapposizione
<b>inverno</b>	2.24		28	
<b>primavera</b>	0.85	0.58	25	7
<b>estate</b>	1.02		14	
<b>autunno</b>	0.75		15	

L'analisi delle componenti principali utilizzando i generi delle piante come variabili e le stagioni come oggetti, ha prodotto due corrispondenti ordinamenti.

L'ordinamento delle variabili evidenzia tre principali gruppi alimentari che possono essere identificati da *Sedum*, *Euphorbia* e *Trifolium*, rispettivamente. Alcuni generi sono interspersi nello spazio di ordinamento.

La tecnica del Biplot consente di identificare il contributo delle variabili (generi delle piante) nell'ordinamento degli oggetti (diete stagionali). Come si evince dal diagramma Biplot (Fig. 21), la dieta invernale e autunnale (che occupano lo spazio negativo di PC1 e positivo di PC2) mostrano molte similitudini e sono caratterizzate dai generi come *Agrostis*, *Brassica*, *Cucumis* e *Sedum* (Fig. 21). La dieta primaverile si colloca nella porzione positiva di PC1 ed annovera generi come *Anthyllis*, *Festuca* e *Luzula* (Fig. 21). La dieta che si differenzia maggiormente dalle altre è quella della stagione estiva caratterizzata ad esempio da generi come *Eryngium* e *Trifolium* (Fig. 21).



**Figura 21.** Diagramma Biplot utilizzato per identificare il contributo delle variabili (generi delle piante ingerite) nell'ordinamento degli oggetti (diete stagionali): inverno (in blu), primavera (in verde), estate (in giallo), autunno (in marrone). Contributo delle componenti principali: PC1 (98.32%), PC2 (1.45%).

### 3.3.3. Caratterizzazione delle preferenze alimentari di lepre europea

Al fine di valutare i livelli di sovrapposizione nelle scelte alimentari da parte di lepre italiana e lepre europea, in particolare nelle aree di simpatria/sintopia (Sotto-area 2b), è stato costruito anche il profilo alimentare di lepre europea (Tab. 7). Dall'analisi della dieta sono state ottenute 1'748'748 *read* in totale. Di queste, il 41.93% sono state caratterizzate a livello di famiglia, il 56.54% a livello di genere e il 1.52% a livello di specie (Tab. 7).

**Tabella 7.** Lista dei taxa vegetali identificati nei pellet di lepre europea e il numero di *read* ad essi corrispondenti.

Famiglia	taxa	numero di <i>read</i>
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	2
<i>Amaryllidaceae</i>	<i>Allium</i>	318
<i>Apiaceae</i>	<i>Apiaceae</i>	118

<b>Famiglia</b>	<b>taxa</b>	<b>numero di read</b>
	<i>Eryngium</i>	32
	<i>Peucedanum officinale</i>	32
	<i>Pimpinella</i>	4
<b><i>Asteraceae</i></b>	<b><i>Asteraceae</i></b>	1687
	<i>Bellis</i>	124
	<i>Bellis perennis</i>	2
	<i>Centaurea</i>	2
	<i>Cichorium</i>	354
	<i>Cirsium</i>	18
	<i>Crepis</i>	18
	<i>Cynosurus echinatus</i>	6
	<i>Jacobaea aquatica</i>	48
	<i>Jacobaea vulgaris</i>	4001
	<i>Lactuca</i>	24
	<i>Picris</i>	88
	<i>Taraxacum</i>	10
	<i>Tragopogon porrifolius</i>	8
<b><i>Betulaceae</i></b>	<b><i>Betulaceae</i></b>	102
	<i>Alnus</i>	8
<b><i>Boraginaceae</i></b>	<b><i>Boraginaceae</i></b>	22
<b><i>Brassicaceae</i></b>	<b><i>Brassicaceae</i></b>	4
	<i>Brassica</i>	8
	<i>Brassica oleracea</i>	2
	<i>Brassica rapa</i>	2
	<i>Capsella</i>	142
	<i>Sinapis pubescens</i>	14
<b><i>Cannabaceae</i></b>	<b><i>Cannabaceae</i></b>	77
<b><i>Caprifoliaceae</i></b>	<b><i>Caprifoliaceae</i></b>	22
	<i>Knautia calycina</i>	14
<b><i>Caryophyllacea</i></b>	<b><i>Caryophyllacea</i></b>	409
	<i>Astragalus glycyphyllos</i>	4

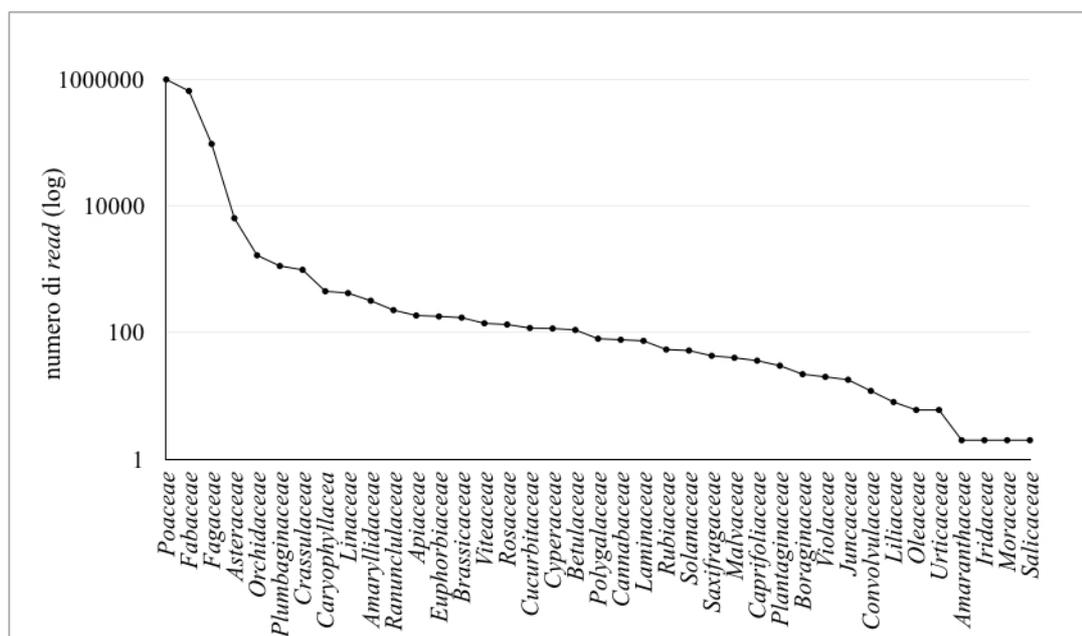
<b>Famiglia</b>	<b>taxa</b>	<b>numero di read</b>
	<i>Dianthus</i>	30
	<i>Dianthus barbatus</i>	6
<b><i>Convolvulaceae</i></b>	<i>Convolvulaceae</i>	2
	<i>Cuscuta</i>	10
<b><i>Crassulaceae</i></b>	<i>Crassulaceae</i>	304
	<i>Sedum</i>	668
	<i>Sedum album</i>	8
<b><i>Cucurbitaceae</i></b>	<i>Bryonia dioica</i>	2
	<i>Cucumis melo</i>	108
	<i>Cucurbita pepo</i>	4
	<i>Lagenaria siceraria</i>	4
<b><i>Cyperaceae</i></b>	<i>Carex</i>	116
<b><i>Euphorbiaceae</i></b>	<i>Euphorbia</i>	124
	<i>Euphorbia marginata</i>	2
	<i>Ricinus communis</i>	54
<b><i>Fabaceae</i></b>	<i>Fabaceae</i>	100834
	<i>Anthyllis</i>	34
	<i>Astragalus</i>	454
	<i>Astragalus depressus</i>	14
	<i>Cytisus</i>	94
	<i>Dorycnium</i>	44
	<i>Lathyrus</i>	132
	<i>Lotus</i>	136
	<i>Lupinus angustifolius</i>	162
	<i>Medicago sativa</i>	2
	<i>Medicago truncatula</i>	24
	<i>Onobrychis</i>	521716
	<i>Onobrychis arenaria</i>	4
	<i>Onobrychis viciifolia</i>	140
	<i>Spartium junceum</i>	10
	<i>Trifolium</i>	27556

<b>Famiglia</b>	<b>taxa</b>	<b>numero di read</b>
	<i>Trifolium pratense</i>	2
	<i>Trifolium repens</i>	2
	<i>Vicia</i>	58
<b>Fagaceae</b>	<i>Fagaceae</i>	92866
	<i>Fagus sylvatica</i>	2164
	<i>Quercus robur</i>	42
<b>Iridaceae</b>	<i>Iridaceae</i>	2
<b>Juncaceae</b>	<i>Luzula</i>	18
<b>Laminaceae</b>	<i>Lamiaceae</i>	74
<b>Liliaceae</b>	<i>Gagea</i>	6
	<i>Gagea liotardii</i>	2
<b>Linaceae</b>	<i>Linum</i>	420
<b>Malvaceae</b>	<i>Malvaceae</i>	40
<b>Moraceae</b>	<i>Ficus carica</i>	2
<b>Oleaceae</b>	<i>Fraxinus</i>	6
<b>Orchidaceae</b>	<i>Orchidaceae</i>	200
	<i>Epipactis atrorubens</i>	202
	<i>Orchis</i>	1226
	<i>Orchis provincialis</i>	30
<b>Plantaginaceae</b>	<i>Globularia</i>	6
	<i>Plantago</i>	24
<b>Plumbaginaceae</b>	<i>Armeria</i>	808
	<i>Armeria canescens</i>	318
<b>Poaceae</b>	<i>Poaceae</i>	536505
	<i>Aegilops</i>	2
	<i>Achnatherum calamagrostis</i>	146
	<i>Agrostis</i>	222
	<i>Agrostis stolonifera</i>	116
	<i>Avena fatua</i>	16260
	<i>Avena sativa</i>	6

<b>Famiglia</b>	<b>taxa</b>	<b>numero di read</b>
	<i>Brachypodium</i>	1948
	<i>Bromus</i>	17456
	<i>Bromus diandrus</i>	4
	<i>Bromus erectus</i>	2
	<i>Cynosurus cristatus</i>	62
	<i>Dactylis</i>	236
	<i>Dactylis glomerata</i>	102
	<i>Elymus caninus</i>	54
	<i>Festuca</i>	3160
	<i>Festuca laevigata</i>	184
	<i>Festuca pratensis</i>	8
	<i>Festuca rubra</i>	190
	<i>Festuca arundinacea</i>	4
	<i>Festuca gigantea</i>	6
	<i>Helictochloa</i>	2
	<i>Hordeum</i>	1754
	<i>Hordeum secalinum</i>	66
	<i>Hordeum vulgare</i>	4
	<i>Hordeum bulbosum</i>	2
	<i>Koeleria</i>	4558
	<i>Koeleria macrantha</i>	8
	<i>Lagurus ovatus</i>	2
	<i>Lolium</i>	388008
	<i>Lolium multiflorum</i>	6
	<i>Lolium rigidum</i>	4
	<i>Melica</i>	1416
	<i>Milium</i>	2
	<i>Phleum</i>	5340
	<i>Phleum pratense</i>	290
	<i>Phleum alpinum</i>	6
	<i>Phleum subulatum</i>	28

<b>Famiglia</b>	<b>taxa</b>	<b>numero di read</b>
	<i>Poa</i>	9440
	<i>Poa bulbosa</i>	1020
	<i>Poa compressa</i>	126
	<i>Setaria italica</i>	2
	<i>Triticum</i>	2
	<i>Triticum aestivum</i>	190
<b><i>Polygalaceae</i></b>	<b><i>Polygonaceae</i></b>	4
	<i>Polygala</i>	22
	<i>Rumex</i>	54
<b><i>Ranunculaceae</i></b>	<b><i>Clematis vitalba</i></b>	44
	<i>Ranunculus</i>	182
<b><i>Rosaceae</i></b>	<b><i>Rosaceae</i></b>	6
	<i>Potentilla</i>	2
	<i>Potentilla argentea</i>	42
	<i>Prunus</i>	14
	<i>Rosa</i>	28
	<i>Rosa caesia</i>	40
	<i>Rosa spinosissima</i>	2
<b><i>Rubiaceae</i></b>	<b><i>Rubiaceae</i></b>	52
	<i>Asperula</i>	2
<b><i>Salicaceae</i></b>	<b><i>Populus tremula</i></b>	2
<b><i>Saxifragaceae</i></b>	<b><i>Saxifraga</i></b>	2
	<i>Saxifraga bulbifera</i>	41
<b><i>Solanaceae</i></b>	<b><i>Solanum</i></b>	10
	<i>Solanum lycopersicum</i>	42
<b><i>Urticaceae</i></b>	<b><i>Urtica membranacea</i></b>	2
	<i>Urtica pilulifera</i>	2
	<i>Urtica urens</i>	2
<b><i>Violaceae</i></b>	<b><i>Viola</i></b>	20
<b><i>Viteaceae</i></b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	140
<b>totale</b>	<b>39</b>	<b>156</b>
		<b>1748748</b>

Le famiglie più rappresentative, con un numero di *read* superiore a 10'000, sono le *Poaceae*, *Fabaceae* e *Fagaceae*. Tutte le altre sono presenti in percentuali inferiori ad 1% (Fig. 23). Come per la dieta di lepre italiana, anche in questo caso la maggiore diversità in taxa si osserva per la famiglia delle *Poaceae*, che ne include 43, alla quale seguono le *Fabaceae* con 18 taxa, e le *Asteraceae* con 13 taxa (Tab. 7).



**Figura 23.** Numero di *read* (in scala logaritmica) assegnate ad ognuna delle 39 famiglie vegetali individuate nell'analisi della dieta di lepre europea.

### 3.3.4. Sovrapposizione trofica tra lepre italica e lepre europea

Lo sfruttamento delle risorse spaziali da parte di lepre italica e lepre europea è sovrapposto, se si considera l'informazione derivante dalla distribuzione e dall'analisi dell'idoneità dell'habitat. Tale sovrapposizione spaziale potrebbe rappresentare anche una competizione, se si traducesse in una sovrapposizione funzionale (le due specie scelgono le stesse risorse trofiche e in percentuale simili). Per verificare questa ipotesi, è stato comparato il numero di taxa vegetali consumati dalle due specie con l'abbondanza relativa delle risorse trofiche disponibili. Il confronto è stato fatto nella Sotto-area 2b (MonteVivo, dove è stata accertata la sintopia tra lepre italica e lepre europea), durante la stagione estiva. E' bene ricordare che durante l'estate il pascolo dovuto ad animali domestici è molto ridotto per alcune disposizioni normative regionali.

Per meglio comprendere il grado di interazione tra le due specie è stato anche caratterizzato il pascolo da un punto di vista floristico-vegetazionale e quantitativo (disponibilità trofica).

Tale caratterizzazione ha permesso di individuare 360 specie vegetali (Tab. 8).

**Tabella 8.** Lista di specie vegetali individuate tramite caratterizzazione floristico-vegetazionale della Sotto-area 2b, durante la stagione estiva (giugno-agosto) e loro abbondanza relativa.

<b>Famiglia</b>	<b>Specie</b>	<b>abbondanza relativa</b>
<i>Aceraceae</i>	<i>Acer opalus</i> Mill. subsp. <i>obtusatum</i> (Waldst. & Kit. ex Willd.) Gams	0.0007
	<i>Acer cappadocicum</i> Gled. subsp. <i>lobelii</i> (Ten.) Murray	0.0000
<i>Adoxaceae</i>	<i>Adoxa moschatellina</i> L. s.l.	0.0016
<i>Amaryllidaceae</i>	<i>Allium sphaerocephalon</i> L.	0.0022
	<i>Allium pendulinum</i> Ten.	0.0020
	<i>Allium vineale</i> L.	0.0016
	<i>Allium ursinum</i> L. subsp. <i>ucrainicum</i> Oksner & Kleopow	0.0004
<i>Apiaceae</i>	<i>Narcissus poëticus</i> L.	0.0004
	<i>Galanthus nivalis</i> L.	0.0001
	<i>Eryngium campestre</i> L.	0.0237
	<i>Eryngium amethystinum</i> L.	0.0110
	<i>Pimpinella tragium</i> Vill.	0.0057

	<i>Sanicula europaea</i> L.	0.0029
	<i>Bunium petraeum</i> Ten.	0.0019
	<i>Anthriscus nemorosa</i> (M. Bieb.) Spreng.	0.0016
	<i>Bupleurum baldense</i> Turra	0.0016
	<i>Oenanthe pimpinelloides</i> L.	0.0011
	<i>Orlaya daucoides</i> (L.) Greuter	0.0005
	<i>Torilis nodosa</i> (L.) Gaertn.	0.0005
	<i>Trinia dalechampii</i> (Ten.) Janch.	0.0005
	<i>Chaerophyllum temulum</i> L.	0.0004
	<i>Huetia cynapioides</i> (Guss.) P.W. Ball subsp. <i>cynapioides</i>	0.0001
	<i>Seseli tommasinii</i> Rchb. f.	0.0001
<b>Apocynaceae</b>	<i>Vinca minor</i> L.	0.0124
<b>Aquifoliaceae</b>	<i>Ilex aquifolium</i> L.	0.0004
<b>Araceae</b>	<i>Arisarum proboscideum</i> (L.) Savi	0.0012
	<i>Arum maculatum</i> L.	0.0012
	<i>Arum italicum</i> Mill. subsp. <i>italicum</i>	0.0008
<b>Araliaceae</b>	<i>Hedera helix</i> L. s.l.	0.0069
<b>Aristolochiaceae</b>	<i>Aristolochia lutea</i> Desf.	0.0011
<b>Asparagaceae</b>	<i>Polygonatum multiflorum</i> (L.) All.	0.0044
	<i>Scilla bifolia</i> L.	0.0025
	<i>Loncomelos pyrenaicus</i> (L.) Hrouda ex J. <i>Holub</i> s.l.	0.0015
	<i>Muscari botryoides</i> (L.) Mill. s.l.	0.0007
	<i>Ruscus aculeatus</i> L.	0.0004
<b>Asphodelaceae</b>	<i>Asphodeline lutea</i> (L.) Rchb.	0.0195
	<i>Asphodelus albus</i> Mill. subsp. <i>delphinensis</i> (Gren. & Godr.) Z. Díaz & Valdés	0.0000
<b>Aspleniaceae</b>	<i>Ceterach officinarum</i> Willd. s.l.	0.0027
	<i>Asplenium trichomanes</i> L. s.l.	0.0015
	<i>Asplenium ruta-muraria</i> L. s.l.	0.0011
	<i>Asplenium onopteris</i> L.	0.0003
	<i>Asplenium ruta-muraria</i> L. subsp. <i>ruta-</i> <i>muraria</i>	0.0000
<b>Asteraceae</b>	<i>Leucanthemum pallens</i> (Perreym.) DC.	0.0087
	<i>Bellis perennis</i> L.	0.0080
	<i>Onopordum acanthium</i> L. subsp. <i>acanthium</i>	0.0056
	<i>Taraxacum officinale</i>	0.0048
	<i>Picris hieracioides</i> L. s.l.	0.0042
	<i>Doronicum columnae</i> Ten.	0.0037
	<i>Crepis neglecta</i> L.	0.0030
	<i>Cichorium intybus</i> L.	0.0029
	<i>Crepis leontodontoides</i> All.	0.0028
	<i>Centaurea deusta</i> Ten.	0.0027

	<i>Lactuca muralis</i> (L.) Gaertn.	0.0026
	<i>Hieracium murorum</i> L.	0.0024
	<i>Leucanthemum vulgare</i> (Vaill.) Lam. subsp. <i>vulgare</i>	0.0023
	<i>Lapsana communis</i> L. subsp. <i>communis</i>	0.0020
	<i>Leontodon rosanii</i> (Ten.) DC.	0.0019
	<i>Arctium nemorosum</i> Lej.	0.0016
	<i>Carduus nutans</i> L. s.l.	0.0016
	<i>Crepis vesicaria</i> L. s.l.	0.0016
	<i>Hypochaeris radicata</i> L.	0.0016
	<i>Leontodon tuberosus</i> L.	0.0015
	<i>Hieracium pilosella</i> L.	0.0011
	<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.	0.0010
	<i>Filago germanica</i> (L.) Huds.	0.0010
	<i>Solidago virgaurea</i> L. subsp. <i>virgaurea</i>	0.0010
	<i>Crepis rubra</i> L.	0.0005
	<i>Crupina vulgaris</i> Cass.	0.0005
	<i>Xeranthemum cylindraceum</i> Sm.	0.0005
	<i>Hieracium piloselloides</i> Vill.	0.0003
	<i>Senecio vulgaris</i> L.	0.0003
	<i>Bellis sylvestris</i> Cirillo	0.0003
	<i>Cyanus triumfettii</i> (All.) Dostál ex Á. & D. Löve	0.0001
<b>Betulaceae</b>	<i>Corylus avellana</i> L.	0.0003
	<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.	0.0001
	<i>Alnus cordata</i> (Loisel.) Loisel.	0.0001
<b>Boraginaceae</b>	<i>Symphytum tuberosum</i> L. subsp. <i>angustifolium</i> (A. Kern.) Nyman	0.0056
	<i>Pulmonaria apennina</i> Cristof. & Puppi	0.0022
	<i>Cerintho minor</i> L. subsp. <i>auriculata</i> (Ten.) Domac	0.0010
	<i>Myosotis sylvatica</i> Hoffm. s.l.	0.0008
	<i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill subsp. <i>arvensis</i>	0.0007
	<i>Buglossoides arvensis</i> (L.) I.M. Johnst. subsp. <i>arvensis</i>	0.0004
<b>Brassicaceae</b>	<i>Cardamine bulbifera</i> (L.) Crantz	0.0071
	<i>Arabis hirsuta</i> (L.) Scop.	0.0036
	<i>Cardamine graeca</i> L.	0.0034
	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik. subsp. <i>bursa-pastoris</i>	0.0016
	<i>Cardamine kitaibelii</i> Bech.	0.0009
	<i>Cardamine hirsuta</i> L.	0.0009
	<i>Arabis alpina</i> L. subsp. <i>caucasica</i> (Willd.) Briq.	0.0008

	<i>Cardamine chelidonia</i> L.	0.0006
	<i>Arabis turrita</i> L.	0.0004
	<i>Erophila verna</i> (L.) DC. subsp. <i>verna</i>	0.0003
<b>Campanulaceae</b>	<i>Campanula trachelium</i> L. subsp. <i>trachelium</i>	0.0017
	<i>Campanula persicifolia</i> L. subsp. <i>persicifolia</i>	0.0003
<b>Caprifoliaceae</b>	<i>Scabiosa columbaria</i> L. s.l.	0.0110
	<i>Knautia arvensis</i> (L.) Coult.	0.0033
	<i>Lonicera caprifolium</i> L.	0.0027
	<i>Knautia calycina</i> (C. Presl) Guss.	0.0011
	<i>Knautia purpurea</i> (Vill.) Borbás	0.0003
	<i>Sambucus ebulus</i> L.	0.0003
	<i>Sambucus nigra</i> L.	0.0001
<b>Caryophyllaceae</b>	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill. subsp. <i>media</i>	0.0046
	<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link s.l.	0.0042
	<i>Cerastium tomentosum</i> L.	0.0028
	<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.	0.0027
	<i>Scleranthus polycarpus</i> L.	0.0027
	<i>Minuartia verna</i> (L.) Hiern s.l.	0.0025
	<i>Petrorhagia prolifera</i> (L.) P.W. Ball & Heywood	0.0022
	<i>Dianthus sylvestris</i> Wulfen subsp. <i>sylvestris</i>	0.0021
	<i>Silene italica</i> (L.) Pers. subsp. <i>italica</i>	0.0020
	<i>Minuartia verna</i> (L.) Hiern subsp. <i>verna</i>	0.0016
	<i>Moehringia trinervia</i> (L.) Clairv.	0.0007
	<i>Cerastium glutinosum</i> Fr.	0.0005
	<i>Stellaria neglecta</i> Weihe	0.0005
	<i>Cerastium brachypetalum</i> Desp. ex Pers. subsp. <i>roeseri</i> (Boiss. & Heldr.) Nyman	0.0003
	<i>Silene latifolia</i> Poir. subsp. <i>latifolia</i>	0.0003
	<i>Moehringia muscosa</i> L.	0.0003
<b>Cistaceae</b>	<i>Helianthemum oelandicum</i> (L.) Dum. Cours. subsp. <i>incanum</i> (Willk.) G. López	0.0059
	<i>Helianthemum nummularium</i> (L.) Mill. s.l.	0.0018
	<i>Helianthemum nummularium</i> (L.) Mill. subsp. <i>grandiflorum</i> (Scop.) Schinz & Thell.	0.0016
	<i>Helianthemum apenninum</i> (L.) Mill. subsp. <i>apenninum</i>	0.0005
<b>Colchicaceae</b>	<i>Colchicum multiflorum</i> Brot.	0.0004
<b>Convolvulaceae</b>	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	0.0015
<b>Crassulaceae</b>	<i>Sedum ochroleucum</i> Chaix	0.0136
	<i>Sedum rupestre</i> L. s.l.	0.0022
	<i>Sedum hispanicum</i> L.	0.0007

	<i>Sedum amplexicaule</i> DC. subsp. <i>tenuifolium</i> (Sm. in Sibth. & Sm.) Greuter	0.0005
	<i>Sedum dasyphyllum</i> L.	0.0005
<b>Cucurbitaceae</b>	<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	0.0010
	<i>Carex flacca</i> Schreb. subsp. <i>serrulata</i> (Biv.) Greuter	0.0122
<b>Cyperaceae</b>	<i>Scirpoides holoschoenus</i> (L.) Soják	0.0050
	<i>Carex caryophyllea</i> Latourr.	0.0030
<b>Cystopteridaceae</b>	<i>Cystopteris fragilis</i> (L.) Bernh.	0.0017
	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn subsp. <i>aquilinum</i>	0.0143
<b>Dioscoreaceae</b>	<i>Tamus communis</i> L.	0.0005
<b>Dryopteridaceae</b>	<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	0.0004
	<i>Polystichum setiferum</i> (Forssk.) T. Moore ex Woyt.	0.0001
<b>Ericaceae</b>	<i>Monotropa hypopitys</i> L.	0.0001
<b>Euphorbiaceae</b>	<i>Euphorbia myrsinites</i> L. subsp. <i>myrsinites</i>	0.0101
	<i>Mercurialis perennis</i> L.	0.0075
	<i>Euphorbia amygdaloides</i> L. subsp. <i>amygdaloides</i>	0.0023
	<i>Euphorbia helioscopia</i> L. subsp. <i>helioscopia</i>	0.0009
	<i>Euphorbia corallioides</i> L.	0.0003
	<i>Euphorbia dulcis</i> L.	0.0003
<b>Fabaceae</b>	<i>Ononis spinosa</i> L. s.l.	0.0283
	<i>Trifolium pratense</i> L. subsp. <i>semipurpureum</i> (Strobl) Pignatti	0.0205
	<i>Medicago lupulina</i> L.	0.0128
	<i>Trifolium angustifolium</i> L. subsp. <i>angustifolium</i>	0.0127
	<i>Lotus corniculatus</i> L. s.l.	0.0122
	<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	0.0117
	<i>Anthyllis vulneraria</i> L. s.l.	0.0114
	<i>Onobrychis alba</i> (Waldst. & Kit.) Desv. subsp. <i>alba</i>	0.0081
	<i>Trifolium ochroleucum</i> Huds.	0.0080
	<i>Lathyrus venetus</i> (Mill.) Wohlf.	0.0064
	<i>Spartium junceum</i> L.	0.0039
	<i>Medicago minima</i> (L.) L.	0.0038
	<i>Melilotus neapolitanus</i> Ten.	0.0032
	<i>Trifolium pratense</i> L. s.l.	0.0032
	<i>Lathyrus incospicuus</i> L.	0.0030
	<i>Trifolium repens</i> L. subsp. <i>prostratum</i> Nyman	0.0017
	<i>Lotus corniculatus</i> L. subsp. <i>corniculatus</i>	0.0016

	<i>Trifolium repens</i> L. s.l.	0.0016
	<i>Cytisophyllum sessilifolium</i> (L.) O. Lang	0.0011
	<i>Vicia grandiflora</i> Scop.	0.0007
	<i>Coronilla scorpioides</i> (L.) W.D.J. Koch	0.0005
	<i>Hippocrepis comosa</i> L. subsp. <i>comosa</i>	0.0005
	<i>Hippocrepis glauca</i> Ten.	0.0005
	<i>Trifolium campestre</i> Schreb.	0.0005
	<i>Trifolium cherleri</i> L.	0.0005
	<i>Trifolium striatum</i> L. subsp. <i>tenuiflorum</i> (Ten.) Arcang.	0.0005
	<i>Trifolium subterraneum</i> L. s.l.	0.0005
	<i>Trifolium vesiculosum</i> Savi	0.0005
	<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	0.0005
	<i>Lathyrus pratensis</i> L. subsp. <i>pratensis</i>	0.0004
	<i>Vicia sativa</i> L. s.l.	0.0003
	<i>Emerus major</i> Mill. subsp. <i>major</i>	0.0003
	<i>Vicia disperma</i> DC.	0.0003
	<i>Vicia sepium</i> L.	0.0001
	<i>Robinia pseudacacia</i> L.	0.0001
<b>Fagaceae</b>	<i>Fagus sylvatica</i> L. subsp. <i>sylvatica</i>	0.0041
	<i>Castanea sativa</i> Mill.	0.0006
<b>Gentianaceae</b>	<i>Blackstonia perfoliata</i> (L.) Huds. s.l.	0.0080
	<i>Centaurium erythraea</i> Rafn s.l.	0.0027
<b>Geraniaceae</b>	<i>Geranium versicolor</i> L.	0.0019
	<i>Geranium robertianum</i> L.	0.0018
	<i>Geranium molle</i> L.	0.0015
	<i>Geranium lucidum</i> L.	0.0013
	<i>Erodium acaule</i> (L.) Bech. & Thell.	0.0003
<b>Hypericaceae</b>	<i>Hypericum perforatum</i> L.	0.0036
	<i>Hypericum montanum</i> L.	0.0001
<b>Iridaceae</b>	<i>Romulea bulbocodium</i> (L.) Sebast. & Mauri	0.0010
	<i>Crocus vernus</i> (L.) Hill subsp. <i>vernus</i>	0.0006
<b>Juncaceae</b>	<i>Luzula campestris</i> (L.) DC.	0.0017
	<i>Luzula forsteri</i> (Sm.) DC.	0.0014
<b>Lamiaceae</b>	<i>Teucrium chamaedrys</i> L. s.l.	0.0116
	<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	0.0106
	<i>Thymus striatus</i> Vahl	0.0081
	<i>Acinos alpinus</i> (L.) Moench s.l.	0.0058
	<i>Micromeria juliana</i> (L.) Benth. ex Rchb.	0.0043
	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	0.0040
	<i>Teucrium montanum</i> L.	0.0016
	<i>Stachys sylvatica</i> L.	0.0013
	<i>Origanum vulgare</i> L. s.l.	0.0013

	<i>Clinopodium vulgare</i> L. s.l.	0.0011
	<i>Stachys heraclea</i> All.	0.0010
	<i>Calamintha grandiflora</i> (L.) Moench	0.0010
	<i>Prunella vulgaris</i> L. subsp. <i>vulgaris</i>	0.0010
	<i>Lamium flexuosum</i> Ten.	0.0008
	<i>Lamium garganicum</i> L. subsp. <i>laevigatum</i> Arcang.	0.0006
	<i>Thymus praecox</i> Opiz subsp. <i>polytrichus</i> (Borbás) Jalas	0.0003
	<i>Ajuga reptans</i> L.	0.0003
	<i>Melittis melissophyllum</i> L. subsp. <i>albida</i> (Guss.) P.W. Ball	0.0003
	<i>Calamintha ascendens</i> Jord.	0.0001
	<i>Scutellaria columnae</i> All. subsp. <i>columnae</i>	0.0001
	<i>Lilium bulbiferum</i> L. subsp. <i>croceum</i> (Chaix) Jan	0.0024
<b>Liliaceae</b>		
<b>Linaceae</b>	<i>Linum tenuifolium</i> L.	0.0046
	<i>Linum bienne</i> Mill.	0.0026
	<i>Linum catharticum</i> L. s.l.	0.0025
	<i>Linum strictum</i> L. s.l.	0.0016
	<i>Linum alpinum</i> Jacq.	0.0005
<b>Melanthiaceae</b>	<i>Veratrum nigrum</i> L.	0.0021
<b>Oleaceae</b>	<i>Fraxinus ornus</i> L. subsp. <i>ornus</i>	0.0000
<b>Onagraceae</b>	<i>Epilobium montanum</i> L.	0.0006
	<i>Circaea lutetiana</i> L. subsp. <i>lutetiana</i>	0.0003
	<i>Epilobium lanceolatum</i> Sebast. & Mauri	0.0001
<b>Orchidaceae</b>	<i>Neottia nidus-avis</i> (L.) Rich.	0.0038
	<i>Dactylorhiza sambucina</i> (L.) Soó	0.0011
	<i>Orchis mascula</i> (L.) L. s.l.	0.0011
	<i>Cephalanthera rubra</i> (L.) Rich.	0.0009
	<i>Epipactis helleborine</i> (L.) Crantz s.l.	0.0006
	<i>Anacamptis pyramidalis</i> (L.) Rich.	0.0005
	<i>Orchis pauciflora</i> Ten.	0.0005
	<i>Orchis provincialis</i> Balb. ex Lam. & DC.	0.0005
	<i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó subsp. <i>saccifera</i> (Brongn.) Diklic	0.0004
	<i>Platanthera bifolia</i> (L.) Rich.	0.0003
	<i>Epipactis persica</i> (Soó) Nannf. subsp. <i>gracilis</i> (B. Baumann & H. Baumann) W. Rossi	0.0003
	<i>Epipactis placentina</i> Bongiorno & Grünanger (incl. <i>E. robatschiana</i> Bartolo, D'Emerico, Pulv., Terrasi & Stuto)	0.0001
<b>Papaveraceae</b>	<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. & Körte subsp. <i>cava</i>	0.0034

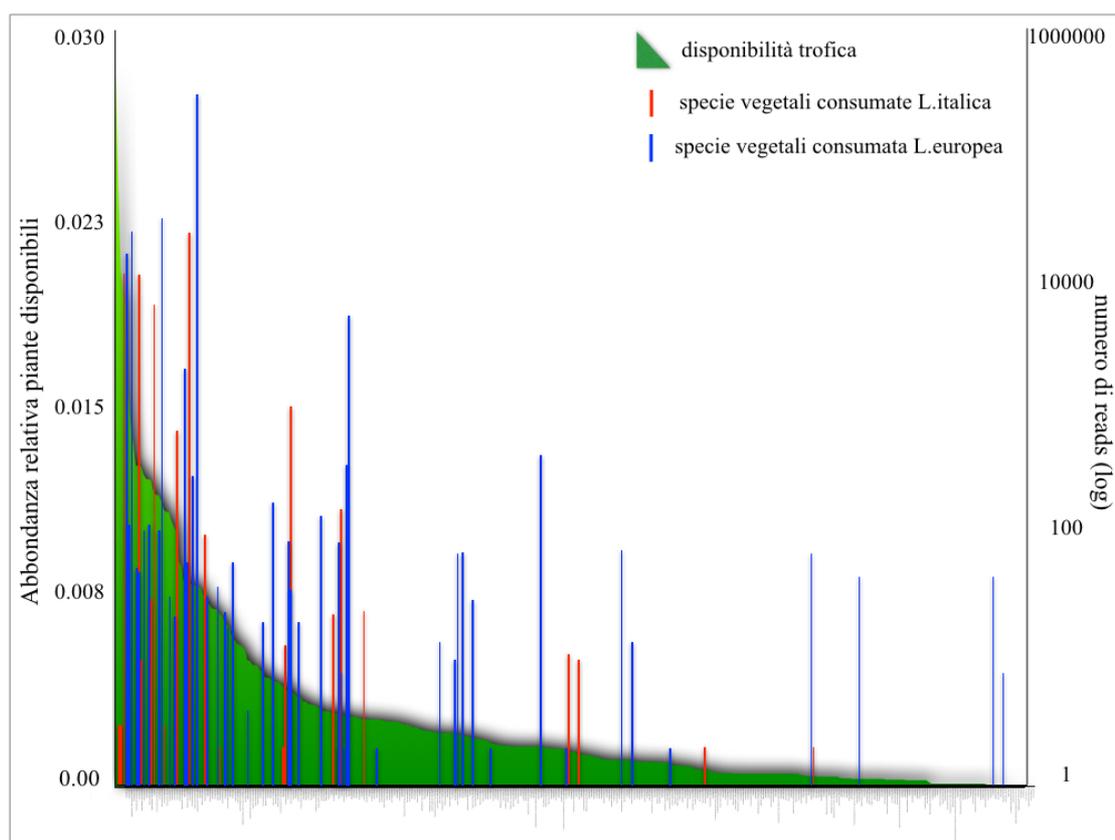
<b><i>Pinaceae</i></b>	<i>Abies alba</i> Mill.	0.0005
<b><i>Plantaginaceae</i></b>	<i>Globularia meridionalis</i> (Podp.) O. Schwarz	0.0081
	<i>Plantago lanceolata</i> L.	0.0071
	<i>Veronica chamaedrys</i> L. subsp. <i>chamaedrys</i>	0.0022
	<i>Digitalis lutea</i> L. subsp. <i>australis</i> (Ten.) Arcang. (6)	0.0013
	<i>Veronica hederifolia</i> L. subsp. <i>hederifolia</i>	0.0007
	<i>Linaria purpurea</i> (L.) Mill.	0.0006
	<i>Veronica arvensis</i> L.	0.0005
	<i>Veronica officinalis</i> L.	0.0004
	<i>Cymbalaria muralis</i> G. Gaertn., B. Mey., & <i>Scherb. s.l.</i>	0.0001
	<i>Veronica montana</i> L.	0.0001
	<i>Veronica chamaedrys</i> L. <i>s.l.</i>	0.0000
	<i>Veronica orsiniana</i> Ten. subsp. <i>orsiniana</i>	0.0000
	<i>Veronica serpyllifolia</i> L. <i>s.l.</i>	0.0000
	<i>Armeria majellensis</i> Boiss. subsp. <i>ausonia</i>	
<b><i>Plumbaginaceae</i></b>	<i>Bianchini</i>	0.0011
	<i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & <i>Schult.</i>	0.0192
<b><i>Poaceae</i></b>	<i>Dactylis glomerata</i> L. <i>s.l.</i>	0.0156
	<i>Bromus erectus</i> Huds. subsp. <i>erectus</i>	0.0128
	<i>Sesleria autumnalis</i> (Scop.) F.W. Schultz	0.0122
	<i>Bromus erectus</i> Huds. <i>s.l.</i>	0.0109
	<i>Phleum pratense</i> L.	0.0103
	<i>Festuca heterophylla</i> Lam.	0.0090
	<i>Bromus hordeaceus</i> L. <i>s.l.</i>	0.0072
	<i>Koeleria lobata</i> (M. Bieb.) Roem. & Schult.	0.0071
	<i>Cynosurus cristatus</i> L.	0.0068
	<i>Poa bulbosa</i> L.	0.0031
	<i>Briza media</i> L.	0.0030
	<i>Triticum ovatum</i> (L.) Raspail	0.0030
	<i>Lolium perenne</i> L.	0.0029
	<i>Melica uniflora</i> Retz.	0.0028
	<i>Poa sylvicola</i> Guss.	0.0028
	<i>Poa alpina</i> L. subsp. <i>alpina</i>	0.0027
	<i>Poa pratensis</i> L.	0.0026
	<i>Cynosurus effusus</i> Link	0.0025
	<i>Brachypodium sylvaticum</i> (Huds.) P. Beauv. subsp. <i>sylvaticum</i>	0.0022
	<i>Aira caryophylla</i> L. <i>s.l.</i>	0.0022
	<i>Festuca circummediterranea</i> Patzke	0.0022
	<i>Brachypodium sylvaticum</i> (Huds.) P. Beauv. <i>s.l.</i>	0.0021

	<i>Cynosurus echinatus</i> L.	0.0019
	<i>Avena barbata</i> Pott ex Link	0.0016
	<i>Drymochloa drymeja</i> (Mert. & Koch) Holub subsp. <i>exaltata</i> (C. Presl) Foggi & Signorini	0.0015
	<i>Dactylis glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> (Roth) Nyman	0.0010
	<i>Hordelymus europaeus</i> (L.) Harz	0.0010
	<i>Milium effusum</i> L.	0.0004
	<i>Bromus ramosus</i> Huds.	0.0003
	<i>Catapodium rigidum</i> (L.) C.E. Hubb. s.l.	0.0003
	<i>Anthoxanthum odoratum</i> L. s.l.	0.0003
	<i>Briza maxima</i> L.	0.0003
	<i>Poa molinerii</i> Balb.	0.0001
	<i>Poa nemoralis</i> L. subsp. <i>nemoralis</i>	0.0001
	<i>Poa nemoralis</i> L. s.l.	0.0000
	<i>Polygala nicaeensis</i> W.D.J. Koch subsp. <i>mediterranea</i> Chodat	0.0026
<b>Polygalaceae</b>	<i>Polygala nicaeensis</i> W.D.J. Koch s.l.	0.0016
	<i>Polygala vulgaris</i> L. s.l.	0.0013
<b>Polygonaceae</b>	<i>Fallopia convolvulus</i> (L.) Á. Löve	0.0016
	<i>Rumex alpestris</i> Jacq.	0.0013
	<i>Rumex crispus</i> L.	0.0005
	<i>Rumex sanguineus</i> L.	0.0004
<b>Polypodiaceae</b>	<i>Polypodium vulgare</i> L.	0.0013
	<i>Cyclamen hederifolium</i> Aiton subsp. <i>hederifolium</i>	0.0063
<b>Primulaceae</b>	<i>Primula vulgaris</i> Huds. subsp. <i>vulgaris</i>	0.0055
	<i>Cyclamen repandum</i> Sm. subsp. <i>repandum</i>	0.0033
<b>Ranunculaceae</b>	<i>Anemone apennina</i> L. subsp. <i>apennina</i>	0.0116
	<i>Ranunculus lanuginosus</i> L.	0.0033
	<i>Ranunculus millefoliatus</i> Vahl	0.0028
	<i>Ranunculus neapolitanus</i> Ten.	0.0026
	<i>Ranunculus brutius</i> Ten.	0.0019
	<i>Clematis vitalba</i> L.	0.0014
	<i>Aquilegia vulgaris</i> auct. fl. ital.	0.0010
	<i>Ranunculus ficaria</i> L. s.l.	0.0009
	<i>Thalictrum aquilegiifolium</i> L. subsp. <i>aquilegiifolium</i>	0.0003
	<i>Aconitum lycoctonum</i> L. emend. Koelle	0.0001
	<i>Anemonoides nemorosa</i> (L.) Holub	0.0001
<b>Rosaceae</b>	<i>Sanguisorba minor</i> Scop. s.l.	0.0080
	<i>Aremonia agrimonoides</i> (L.) DC. subsp. <i>agrimonoides</i>	0.0043
	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	0.0029

	<i>Geum urbanum</i> L.	0.0027
	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	0.0026
	<i>Prunus spinosa</i> L. subsp. <i>spinosa</i>	0.0022
	<i>Potentilla micrantha</i> Ramond ex DC.	0.0022
	<i>Aphanes arvensis</i> L.	0.0022
	<i>Potentilla recta</i> L. s.l.	0.0022
	<i>Rosa canina</i> L.	0.0021
	<i>Fragaria vesca</i> L. subsp. <i>vesca</i>	0.0020
	<i>Rubus hirtus</i> (group)	0.0015
	<i>Potentilla reptans</i> L.	0.0014
	<i>Potentilla calabra</i> Ten.	0.0011
	<i>Potentilla rigoana</i> Th. Wolf	0.0003
	<i>Pyrus communis</i> L.	0.0001
	<i>Rubus idaeus</i> L. subsp. <i>idaeus</i>	0.0001
	<i>Rosa arvensis</i> Huds.	0.0000
<b>Rubiaceae</b>	<i>Galium lucidum</i> All. s.l.	0.0078
	<i>Galium corrudifolium</i> Vill.	0.0074
	<i>Galium odoratum</i> (L.) Scop.	0.0066
	<i>Sherardia arvensis</i> L.	0.0050
	<i>Galium aparine</i> L.	0.0024
	<i>Cruciata laevipes</i> Opiz	0.0011
	<i>Galium verum</i> L. s.l.	0.0010
	<i>Galium rotundifolium</i> L. subsp. <i>rotundifolium</i>	0.0006
	<i>Asperula aristata</i> L. f. s.l.	0.0005
	<i>Cruciata glabra</i> (L.) Ehrend. s.l.	0.0003
	<i>Asperula taurina</i> L. subsp. <i>taurina</i>	0.0003
<b>Salicaceae</b>	<i>Salix caprea</i> L.	0.0002
	<i>Populus tremula</i> L.	0.0001
<b>Saxifragaceae</b>	<i>Saxifraga rotundifolia</i> L. subsp. <i>rotundifolia</i>	0.0038
	<i>Saxifraga bulbifera</i> L.	0.0026
	<i>Saxifraga tridactylites</i> L.	0.0011
	<i>Saxifraga paniculata</i> Mill.	0.0001
<b>Scrophulariaceae</b>	<i>Rhinanthus wettsteinii</i> (Sterneck) Soó	0.0050
	<i>Euphrasia salisburgensis</i> Funck ex Hoppe	0.0027
	<i>Bartsia trixago</i> L.	0.0011
	<i>Parentucellia viscosa</i> (L.) Caruel	0.0010
	<i>Pedicularis elegans</i> Ten.	0.0001
	<i>Scrophularia vernalis</i> L.	0.0001
<b>Solanaceae</b>	<i>Atropa bella-donna</i> L.	0.0000
<b>Thymelaeaceae</b>	<i>Daphne laureola</i> L.	0.0042
<b>Urticaceae</b>	<i>Urtica dioica</i> L. subsp. <i>dioica</i>	0.0027
<b>Violaceae</b>	<i>Viola reichenbachiana</i> Jord. ex Boreau	0.0049

		<i>Viola pseudogracilis</i> Strobl subsp. <i>pseudogracilis</i>	0.0014
		<i>Viola alba</i> Besser subsp. <i>dehnhardtii</i> (Ten.) <i>W. Becker</i>	0.0007
		<i>Viola aethnensis</i> (DC.) Strobl s.l.	0.0003
		<i>Viola odorata</i> L.	0.0003
<b>totale</b>	<b>62</b>	<b>360</b>	<b>1.0000</b>

Delle 360 piante presenti, lepre italiana ne seleziona 24, con una preferenza spostata verso quelle più comuni. lepre europea, invece, ne consuma 48, includendo anche specie meno rappresentate (Fig. 24).



**Figura 24.** Sovrapposizione tra l'abbondanza relativa delle risorse trofiche disponibili nella sotto-area 2b, Monte Vivo (n= 360, area verde) e il numero di taxa vegetali (in scala logaritmica) consumati da lepre italiana (n=24, in rosso) e lepre europea (n=48, in blu).

La diversità della dieta è più elevata per la lepre italiana,  $TNWs = 1.93$ , che per la lepre

europea,  $TNW_s = 0.95$  (Tab. 9). Benché entrambe sfruttino maggiormente le risorse trofiche più abbondanti, sembrerebbe che lepre italiana abbia delle esigenze trofiche più ristrette e più diversificate. Assumendo l'indice di Roughgarden come rappresentativo dell'ampiezza di nicchia, è possibile calcolare il livello di sovrapposizione tra le nicchie trofiche delle due specie che raggiunge il 60% (Tab. 9).

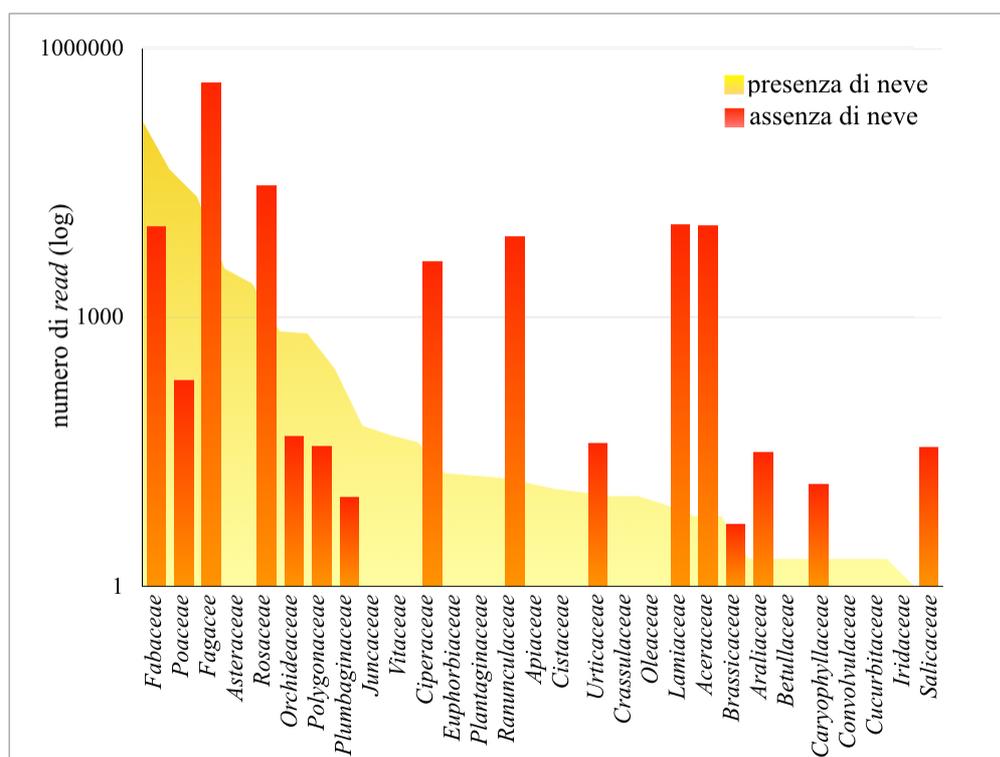
**Tabella 9.** Diversità nella dieta ( $TNW_s$ ) calcolata a livello di specie e ricchezza in specie di lepre italiana e lepre europea. Dei due indicatori è stato calcolato anche il livello di sovrapposizione.

specie	Indice di diversità	sovrapposizione	Ricchezza in specie	sovrapposizione
lepre italiana	1.93	0.60	24	15
lepre europea	0.95		48	

### 3.3.5. Plasticità di lepre italiana in presenza di neve

La dieta di lepre italiana è stata valutata anche in presenza di neve. La neve copre la cuticola erbosa, rendendo disponibile all'animale brucatore gli apici delle specie vegetali affioranti oppure la corteccia degli alberi. Casi di lepre italiana in attività di scavo per raggiungere la cuticola erbosa coperta da neve non sono mai stati segnalati.

I risultati evidenziano che la presenza della coltre nevosa condiziona le scelte alimentari della lepre italiana inducendo una variazione sia nella dominanza delle famiglie di piante selezionate che della diversità di taxa vegetali in esse inclusi. In assenza di neve, delle 28 famiglie incluse nella dieta, le *Fabaceae*, le *Poaceae* e le *Fagaceae* risultano quelle più consumate (numero di *read* > 10'000) (Fig. 25). In presenza di neve, il numero di famiglie si riduce a 16 e le dominanze si spostano verso le *Fagaceae*, le *Rosaceae*, le *Lamiaceae*, le *Aceraceae* e le *Fabaceae* (numero di *read* > 10'000) (Fig. 25). Si assiste anche ad una riduzione a livello di genere entro le famiglie. In particolare, è molto evidente per la famiglia delle *Poaceae*, infatti, c'è un decremento da 16 a 4, passando da una condizione di assenza a quella di presenza della neve, rispettivamente; per le *Asteraceae*, invece, si passa addirittura da 6 generi a 0.



**Figura 25.** Famiglie consumate dalla lepre italiana in presenza di neve (giallo) e in assenza di neve (rosso). Il numero delle *read* associate a ciascuna famiglia è in scala logaritmica.

In presenza di neve, la diversità di generi vegetali consumati decresce da 1.54 (senza neve) a 1.25 (con neve) (Tab. 10). Nonostante questo leggero decremento, il numero di generi passa da 56 a 23 (Tab. 10). Questa drastica riduzione in ricchezza, non accompagnata da un indice di diversità con decremento proporzionale, suggerisce che la lepre italiana sia capace di ridurre a poche essenze vegetali la sua dieta senza alterare i rapporti proporzionali tra essi. Infatti, la dieta cambia totalmente se si considera l'indice di sovrapposizione 0.04 (Tab. 10) e, in particolare, i 12 generi vegetali comuni alle due condizioni sono consumati con proporzionalità sensibilmente differenti (Tab. 10).

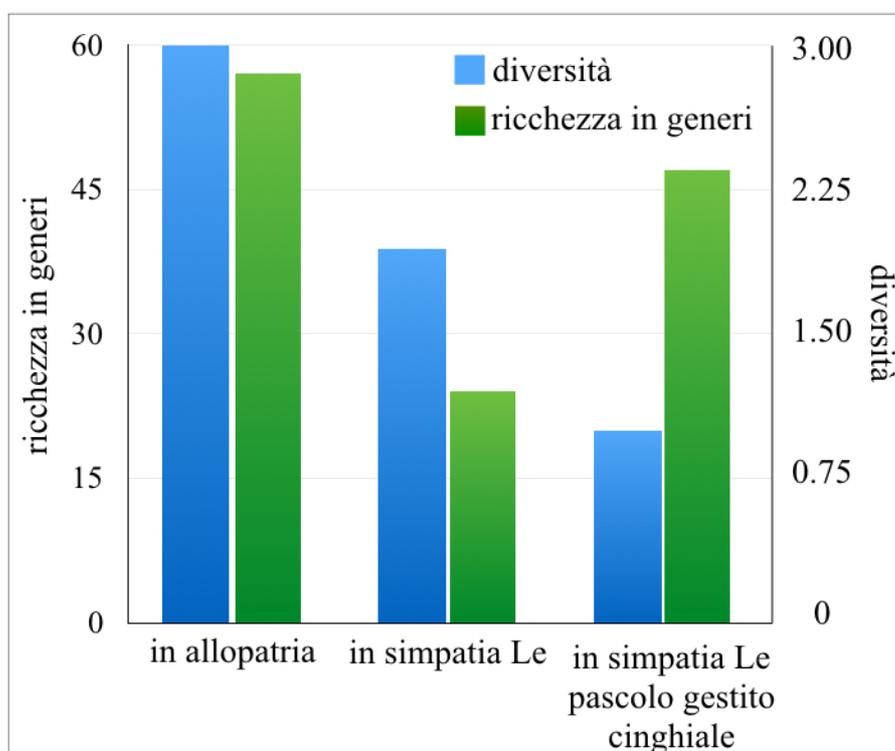
**Tabella 10.** Diversità nella dieta (*TNWs*) calcolata a livello di generi e ricchezza in generi di lepre italiana, in presenza ed assenza di neve. Dei due indicatori è stato calcolato anche il livello di sovrapposizione.

condizione	Indice di diversità	sovrapposizione	Ricchezza in generi	sovrapposizione
presenza_neve	1.54	0.04	23	12
assenza_neve	1.25		56	

### 3.3.6. Plasticità di *lepre italica* in presenza di altri disturbi

La plasticità della lepre italica è stata valutata anche considerando “disturbi” tali che fossero capaci di imporre un cambiamento di regime alimentare come gli animali al pascolo, sia domestici che selvatici.

La diversità della dieta di lepre italica in assenza di disturbi e/o competitori (in simpatia con lepre europea) evidenzia un valore molto elevato,  $TNWs = 3.02$ . Tale valore si riduce drasticamente in presenza di tutte le variabili condizionanti, infatti,  $TNWs$  è 1.00 in presenza della lepre europea, del pascolo gestito e del cinghiale. Invece, la presenza della sola congenerica è responsabile dell’abbassamento dell’indice diversità a 1.94 (Fig. 26).

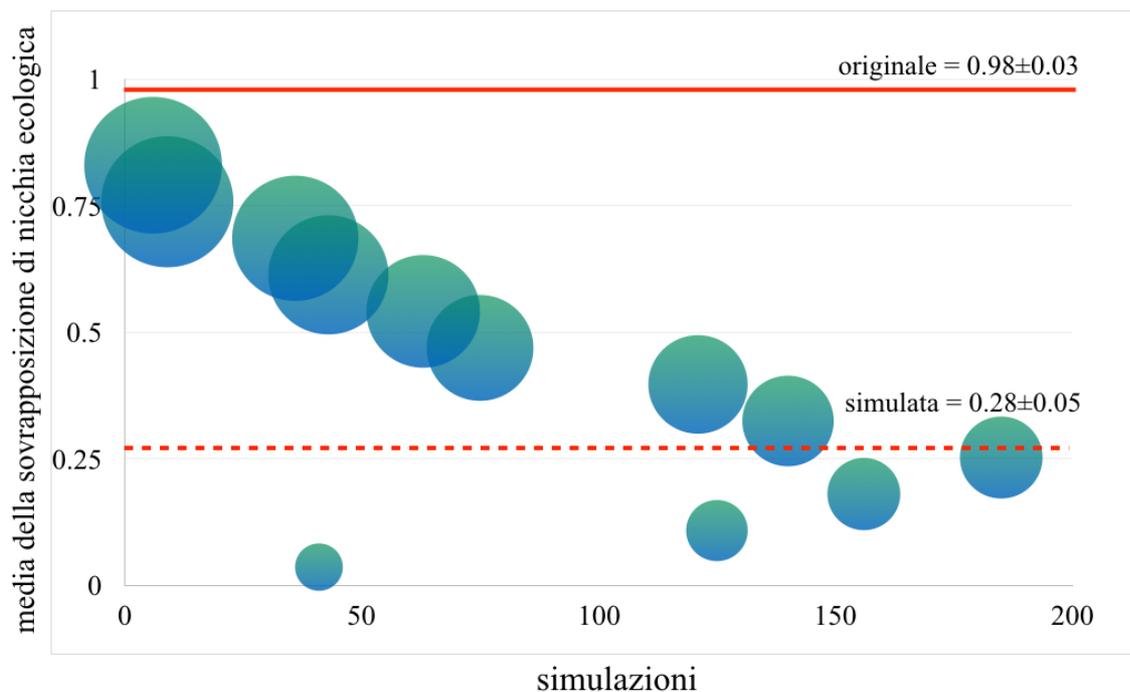


**Figura 26.** Diversità nella dieta ( $TNWs$ ) (in blu) calcolata a livello di generi e ricchezza in generi (in verde) di lepre italica in allopatria, in simpatia con lepre europea e in presenza di pascolo gestito.

### 3.4. Sovrapposizione di nicchia ecologica tra lepre italica e lepre europea

La sovrapposizione di nicchia ecologica tra lepre italica e lepre europea è stata valutata attraverso il calcolo randomizzato delle variabili (spaziali e trofiche) della nicchia: specializzazione, marginalità, *range* altitudinale di occupazione, uso del suolo ed *items* vegetali ingeriti. Per la stima della sovrapposizione mediante randomizzazione, il *reshuffled* ha previsto 1000 iterazioni in 12 *bins*. Il numero maggiore di simulazioni

( $n=185$ ) ricade nell'intervallo 0.25-0.32 (Fig. 26). Questo valore si discosta fortemente da quello ottenuto considerando la distanza reciproca media di Pianka calcolata sulla matrice originale dei dati, che indica una sovrapposizione tra le nicchie ecologiche delle due specie pari a 0.98 (Fig. 27).



**Figura 27** Sovrapposizione di nicchia ecologica generata attraverso la randomizzazione della matrice originale. La linea rossa tratteggiata indica il valore di sovrapposizione di nicchia ottenuto utilizzando le matrici simulate ( $0.25 < x < 0.32$ ). La linea rossa continua indica il valore di sovrapposizione di nicchia ottenuto utilizzando la matrice originale dei dati ( $x=0.98$ ).

# Capitolo 4

## Discussione

---



Lo studio integrato delle caratteristiche spaziali e trofiche della lepre italiana ha permesso di ottenere una prima definizione della sua nicchia ecologica, dipanando molte incertezze relative alla sua collocazione nell'ambiente e alle sue scelte alimentari. Tali acquisizioni individuano le traiettorie da seguire per futuri approfondimenti e costituiscono un importante punto di partenza per avviare efficaci strategie di intervento volte a preservare questo endemismo dell'Italia centro-meridionale.

L'immagine che emerge della lepre italiana, è di una specie perfettamente calata nel suo ambiente, adattabile e capace di sfruttare un ampio spettro di risorse ecologiche. Questa caratteristica spiegherebbe, ad esempio, la sua presenza in contesti ambientali molto diversificati: dal piano montano alla macchia mediterranea, le dune costiere o le pendici dell'Etna (Blondel & Aronson 1999; Trocchi & Riga 2001; 2005; Riga *et al.*, 2003; Fusco *et al.*, 2007; Ricci *et al.*, 2007), e soprattutto, in simpatria con popolazioni stabili di lepre europea (Fulgione *et al.*, 2009). I rapporti con quest'ultima sembrano suggerire che le due specie vivono una fase di risoluzione di un rapporto competitivo. Infatti, l'indicatore di sovrapposizione di nicchia ecologica restituisce un valore di 98.7%, se calcolato come valore medio tra le variabili considerate, e di 35%, se calcolato attraverso una procedura di randomizzazione delle 15 variabili considerate. Questa discordanza potrebbe essere il segnale di una simile richiesta ecologica che ha trovato una recente segregazione risolvendo la fase competitiva (Gotelli & Graves 1996; Sale 1974; Connell 1980).

Lepre italiana evidenzia tutta la sua plasticità ecologica proprio in contesti in cui è presente la lepre europea, come suggerisce la sua minore marginalità e la maggiore specializzazione.

Per quanto riguarda le abitudini alimentari, infatti, lepre italiana consuma un numero di taxa vegetali maggiore rispetto a lepre europea. In particolare, delle 360 specie vegetali identificate nell'area di studio, 156 taxa sono stati identificati dal DNA estratto dai pellet di lepre europea e 215 da quelli di lepre italiana. Tale numero dipende dalla variazione stagionale che lepre italiana attua nella sua strategia di pascolamento ma potrebbe essere anche il frutto (se pure limitato) di altri DNA vegetali "contaminanti" presenti sui reperti fecali.

In accordo con i risultati di Fulgione *et al.* (2009), lepre italiana sembrerebbe meglio adattata al contesto territoriale in cui si è evoluta, rispetto alla lepre europea, la cui

popolazioni sono composte di individui alloctoni (Fulgione *et al.*, pers. comm) e individui autoctoni naturalmente dispersi (es. Galende & Raffaele 2008; Bertolino *et al.*, 2007).

Sarebbe interessante approfondire il tema della bassa marginalità trofica in pascoli che sono il frutto di un impianto secondario. Probabilmente, la distribuzione di sfruttamento disconnessa, che incide sulle specie più abbondanti e poi su quelle rare, è la traccia di questa condizione.

La lepre è un animale territoriale e con una bassa capacità dispersiva sul territorio (Broekhuinzen & Maaskamp 1982; Ricci, 1983; Fiechter, 1986; Tapper & Barnes 1986; Parkes, 1984; Kovacs & Buza 1992; Reitz & Leonard 1994; Gemma, 1997); quando i disturbi incidono nei siti indagati, può essere escluso che l'animale si sposti, e, quindi, assunto che effettivamente subisca la pressione.

In presenza di condizioni stringenti, come la neve, la specie è capace di ridurre a poche essenze vegetali la sua dieta, modificando quasi completamente le sue scelte alimentari rispetto a quelle che la caratterizzano in assenza della coltre nevosa. Molti studi riportano che, durante la stagione invernale, probabilmente a causa delle prolungate e severe condizioni climatiche, la lepre pascola soprattutto specie arbustive, nutrendosi della loro parte legnosa come la corteccia e i ramoscelli, in particolare quando l'accesso alla cotica erbosa è limitato dalla presenza della neve (Homolka, 1982; Pulliainen & Tunkkari 1987; Hulbert *et al.*, 2001). In accordo con ciò, i nostri risultati evidenziano un aumento di circa 84% nel consumo di *Fagaceae*, passando da una condizione di assenza di neve ad una in cui il pascolo è ricoperto dalla coltre nevosa.

Confrontando la dieta di lepre italiana in diverse condizioni di pressione ambientale (disturbi) si rileva come essa, al pari di altri lagomorfi (Flux, 1981), sia capace di adottare strategie di foraggiamento flessibili per rispondere ai cambiamenti.

In condizioni di allopatria, sia l'indice di diversità di Roughgarden ( $TNW_s=3.02$ ) che la ricchezza in generi ( $n=56$ ), presentano i valori maggiori, indicando un'ampia nicchia trofica e un comportamento generalista.

Passando da una condizione in cui lepre italiana è in sola simpatria con lepre europea ( $TNW_s=1.94$ ;  $n=24$ ) alla presenza di pascolatori (disturbi) ( $TNW_s=1.00$ ;  $n=57$ ), l'indice di diversità della dieta diminuisce mentre la ricchezza in generi aumenta. Questo suggerisce che, in sola presenza della competitorice, la lepre italiana espande la sua nicchia trofica, generalizzando il suo comportamento alimentare (Van Valen's, 1965;

Lister, 1976; Bolnick *et al.*, 2002), considerando anche la minore diversità specifica e fitocenotica del pascolo. Infatti, l'assenza di grandi animali al pascolo favorisce, nelle praterie di origine secondaria, la colonizzazione da parte delle specie arbustive e la ripresa del dinamismo della vegetazione, determinando, di conseguenza, trasformazioni del paesaggio vegetale e perdita di biodiversità (Gusmeroli, 2004; Hickman *et al.*, 2004; Hanke *et al.*, 2014; Komac *et al.*, 2014).

Viceversa, la presenza di bovini ed equini, che adottano strategie di pascolamento e calpestio diversificate, influenza le comunità di piante nelle aree pascolive, contribuendo ad aumentare la diversità vegetale (Gusmeroli, 2004; Hickman *et al.*, 2004; Hanke *et al.*, 2014; Komac *et al.*, 2014). In questa condizione, sebbene sia incluso nella dieta un numero maggiore di generi vegetali, aumenta il grado di specializzazione di lepre italica, che va incontro ad una parziale segregazione trofica. Questa strategia di pascolamento è comune tra gli erbivori, che si specializzano quando le risorse sono molte e si generalizzano quando sono poche (Westoby, 1974, Belovsky, 1978).

L'adattabilità e la plasticità, sia spaziale che trofica, di lepre italica sembrano suggerire che la vulnerabilità di questa specie non sia connessa alla mancanza di idonee nicchie ecologiche o alla sua incapacità di sostenere la competizione con la lepre europea. Dall'analisi ENFA per il territorio indagato, emerge che l'area totale di idoneità è addirittura maggiore per lepre italica (855.6 kmq) che per lepre europea (816.7 kmq). I dati qui elaborati sembrano suggerire che sia la frammentazione del paesaggio a rappresentare la reale minaccia alle popolazioni di lepre italica.

Nell'area indagata sono state identificate almeno 5 isole ad alta idoneità disconnesse tra loro. Una delle conseguenze della frammentazione dell'ambiente è la riduzione della connettività (Burel & Baudry 1999), intesa come la capacità del paesaggio di facilitare o impedire lo spostamento degli individui tra gli areali (Taylor *et al.*, 1993). La distanza tra le aree di idoneità per lepre italica è maggiore delle capacità di spostamento della specie sul territorio (Arnold *et al.*, 1993; Diffendorfer *et al.*, 1995).

Quali possano essere le cause che hanno portato le popolazioni in questa condizione di elevata frammentazione è difficile da determinare anche se, come per altre specie, possono aver avuto un ruolo rilevante fattori come l'abbandono del piano montano da parte dell'uomo, la persecuzione e il bracconaggio o eventi epidemici dovuti al contatto

con le popolazioni immesse di lepre europea (Angelici & Luiselli 2001; Trocchi & Riga 2005; Rippa *et al.*, 2001).

La condizione attuale deve essere affrontata e risolta, prima che variabili come la riduzione del flusso genico, *inbreeding* ed erosione della diversità genetica (Frankham *et al.*, 2006) possano estinguere localmente questa specie.

I risultati ottenuti con l'analisi delle caratteristiche ecologiche di lepre italiana introducono importanti spunti gestionali. In particolare, sarebbe interessante indagare la composizione genetica delle popolazioni isolate, valutandone il tasso di consanguineità e il grado di flusso genico, cercando di definire il loro reale stato di minaccia. Successivamente, potrebbero essere concepiti corridoi ecologici mirati alla connessione dei nuclei isolati. Inoltre, partendo dai territori con caratteristiche ecologiche idonee alla presenza della specie, potrebbero essere avviate pratiche di reintroduzione di nuovi individui (Fig. 28) (nel rispetto dell'identità genetica dei diversi aplo-gruppi italiani) per incrementare le densità delle popolazioni. Unitamente questi interventi potrebbero rappresentare un valido contributo per il recupero e la salvaguardia di questo importante tassello della biodiversità.



**Fig. 28.** Giovane di lepre italiana allevato in cattività presso la foresta demaniale di Cerreta Cognole (Padula, Salerno).

# Ringraziamenti

---

Ringrazio il Prof. Domenico Fulgione per avermi dato la possibilità di intraprendere l'esperienza del Dottorato di Ricerca.

Ringrazio la Dottoressa Valeria Maselli per il sostegno nelle attività di campo e di laboratorio.

Ringrazio l'Istituto di Gestione della Fauna per il supporto economico, ed, in particolare, il Dott. Gabriele de Filippo ed il Dott. Sabatino R Troisi per aver collaborato nelle attività di campionamento.

Ringrazio il Parco Nazionale del Cilento Vallo di Diano e Alburni per il supporto logistico, il Dott. Marco Carafa e il Dott. Luciano Di Martino del Parco Nazionale della Majella per aver fornito campioni utili alle attività di ricerca.

Ringrazio la Sequentia Biotech SL (Barcelona, Spagna) per l'aiuto nell'elaborazione bioinformatica dei dati.

Ringrazio tutte le mie colleghe di laboratorio per il loro supporto durante questi tre anni di dottorato.

# Bibliografia

---

- Aceto S, Caputo S, Cozzolino S, Gaudio L and Moretti A. 1999. Phylogeny and Evolution of Orchis and Allied Genera Based on ITS DNA Variation: Morphological Gaps and Molecular Continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13: 67–76.
- Alvarez I and Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 417-434.
- Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F and Harris DJ. 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27: 70-80.
- Angelici FM and Luiselli L. 2001. Distribution and status of the critically endangered Apennine hare *Lepus corsicanus* De Winton, 1898 in continental Italy and Sicily. *Oryx* 3:245-249.
- Angelici FM and Spagnesi M. 2008. lepre appenninica *Lepus corsicanus*. In: Amori G, Contoli L, Santini L and Spagnesi M. (a cura di), Fauna d'Italia, Mammalia, Insectivora, Lagomorpha, Rodentia (II edizione). Calderini, Bologna.
- Arnold GW, Steven DE, Weeldenburg JR and Smith EA. 1993. Influences of remnant size, spacing pattern and connectivity on population boundaries and demography in euros *Macropus robustus* living in a fragmented landscape. *Biological Conservation* 64:219-230.
- Belovsky G.E. 1978. Diet optimization in a generalist herbivore: the moose. *Theoretical Population Biology* 14: 105-134.
- Bertolino S, Perrone A, Gola L and Cordero di Montezemolo N. 2007. Population densities and habitat selection of brown hare (*Lepus europaeus*) and introduced eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) in Northern Italy. *Hystrix* 2: 360.

- Binladen J, Gilbert M, Thomas P, Bollback JP, Panitz F, Bendixen C, Nielsen R and Willerslev. 2007. The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS One* 2: e197.
- Blondel J and Aronson J. 1999. *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford University pp. 328.
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30: 176-180.
- Bolnick DI, Yang LH, Fordyce JA, Davis JM. and Svanbäck R. 2002. Measuring individual-level resource specialization. *Ecology* 83: 2936-2941.
- Bolnick DI, Yang LH, Fordyce JF, Davis JM and Svanbeck R. 2002. Measuring individual-level resource specialization. *Ecology* 83: 2936-2941.
- Boyce MS, Vernier PR, Nielsen SE and Schmiegelow FKA. 2002. Evaluating resource selection functions. *Ecological Modelling* 157: 281-300.
- Brinkman BM, Hildebrand F, Kubica M, Gooens D, Del Favero J, Declercq W, Raes J and Vandenabeele P. 2011. Caspase deficiency alters the murine gut microbiome. *Cell Death and Disease* 2: e220.
- Brinkman T, Schwartz M, Person D, Pilgrim K and Hundertmark K. 2002. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. *Conservation Genetics* 11: 1547-1552.
- Broekhuizen S and Maaskamp F. 1982. Movement, home range and clustering in the European hare (*Lepus europaeus* Pallas) in the Netherlands. *Z. Mammalian Biology* 47: 22-32.
- Burel F and Baudry J. 1999. *Écologie du paysage. Concepts méthodes et applications*. TEC and DOC, Paris (France).
- Butet A. 1985. Méthode d'étude du régime alimentaire d'un rongeur polyphage (*Apodemus sylvaticus* L., 1758) par l'analyse microscopique des fèces. *Mammalia* 4: 455-483.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K and Madden TL. 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421.

- Cervantes FA, Lorenzo C, Álvarez-Castaneda ST, Rojas-Viloria A and Vargas J. 1996. Chromosomal study of the insular San Jose brush rabbit (*Sylvilagus mansuetus*) from Mexico. *Southwestern Naturalist* 41: 455-457.
- Chapuis JL. 1980. Méthodes d'étude du régime alimentaire du Lapin de garenne, *Oryctolagus cuniculus* (L.) par l'analyse microscopique des fèces. *Annual Review of Ecology and Systematics (Terre Vie)* 34: 159-195.
- Connell JH. 1980. Diversity and the coevolution of competitors, or the ghost of competition past. *Oikos* 35: 131-138.
- De Barba M, Miquel C, Boyer F, Mercier C, Rioux D, Coissac E and Taberlet P. 2014. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources* 14: 306–323.
- de Battisti R, Migliore S, Masutti L and Trocchi V. 2004. The diet of the Italian hare *Lepus corsicanus* on Etna Mountain, Sicily. *Research Center in Biodiversity and Genetic Resources, Vairao, Portugal*.
- de Filippo G, Caliendo MF, Fulgione D, Fusco L and Troisi SR. 2007. Status delle popolazioni di *Lepus corsicanus* nel territorio del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. In: de Filippo G, De Riso L, Riga F, Trocchi V and Troisi SR (a cura di), 2007. *Conservazione di Lepus corsicanus De Winton, 1898 e stato delle conoscenze*. IGF Publ., Napoli, Italia.
- Deagle B, Eveson J and Jarman S. 2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples, a case study on DNA in faeces. *Frontier Zoology* 3: 11.
- Diffendorfer JE, Gaines MS and Holt RD. 1995. Habitat fragmentation and movements of three small mammals (*Sigmodon*, *Microtus*, and *Peromyscus*). *Ecology* 76:827-839.
- Dixon P. 2003. Vegan, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14: 927-930.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Eastman JR. 2002. IDRISI 32.2. Clark Laboratories. The Idrisi Project, Worcester MA.

- Ellerman JR and Morrison-Scott TCS. 1951. Checklist of Palearctic and Indian Mammals. British Museum, Londra.
- Fiechter A. 1986. Le radiopistage du lièvre (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). Mesogee 2: 127-133.
- Flux JEC.1981. Reproductive strategies in the genus *Lepus*. In: Myers K, MacInnes CD (eds) Proceedings of the World Lagomorph Conference. University of Guelph, Guelph.
- Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA. 2006. Fondamenti di genetica della conservazione. Zanichelli, Bologna (Italy).
- Frediani M and Caputo P. 2005. Phylogenetic relationships among annual and perennial species of the genus *Cicer* as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Biologia Plantarum* 49: 45-52.
- Freitas TAK, Li PE, Scholz MB and Chain PS. 2015. Accurate read-based metagenome characterization using a hierarchical suite of unique signatures. *Nucleic Acids Resources* 43: e69.
- Fulgione D, Maselli V, Pavarese G, Rippa D and Rastogi RK. 2009. Landscape fragmentation and habitat suitability in endangered Italian hare (*Lepus corsicanus*) and European hare (*Lepus europaeus*) populations. *European Journal of Wildlife Research* 55: 385-396.
- Fusco L, Trosi SR, Accardo Y, Vaccaro L, Caliendo MF and de Filippo G. 2007. Interspecific habitat selection between Italic and European Hares sympatric populations. V European Congress of Mammalogy, Siena, 21-26 settembre 2007. *Hystrix*. 88.
- Galende GI and Raffaele E. 2008. Space use of a non-native species, the European hare (*Lepus europaeus*), in habitats of the southern Vizcacha (*Lagidium viscacia*) in Northwestern Patagonia, Argentina. *European Journal Wildlife Research* 54:299-304.
- Gause GF. 1934. *Struggle for Existence*. Williams & Wilkins Co.: Baltimore, MD, USA. IBGE (1986). Projeto RadamBrasil: Levantamento dos recursos naturais, Vol 3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE: Rio de Janeiro, Brazil.

- Gemma F. 1997. Uso e selezione dell'habitat in lepri (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) di ripopolamento rilasciate in ambiente preappenninico. Tesi di laurea, A.A. 1996-97, Università degli Studi di Roma La Sapienza.
- Gissi C, Gullberg A and Arnason U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Genomics* 50:161–169.
- Glenn TC. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources* 11: 759-769.
- Gotelli N and Entsminger G. 2001. EcoSim: Null Models Software for Ecology, Version 7.0. Computer software. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear.
- Gusmeroli F. 2004. Il piano di pascolamento: strumento fondamentale per una corretta gestione del pascolo. *Quaderni SOZOOALP*, 1, Il sistema delle malghe alpine, pp. 27-41.
- Hanke W, Böhner J, Dreber N, Jürgens N, Schmiedel U, Wesuls D and Dengler J. 2014. The impact of livestock grazing on plant diversity: an analysis across dryland ecosystems and scales in southern Africa. *Ecological Applications* 24: 1188-1203.
- Hardin G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science* 131: 1292-1297.
- Hebert PDN and Gregory TR. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852-859.
- Hickman KR, Hartnett DC, Cochran RC and Owensby CE. 2004. Grazing management effects on plant species diversity in tallgrass prairie. *Rangeland Ecology & Management* 57: 58-65.
- Hirzel AH, Hausser J and Perrin N. 2007. Biomapper 4.0. Laboratory for Conservation Biology, Department of Ecology and Evolution, University of Lausanne, Switzerland. URL: <http://www2.unil.ch/biomapper>.
- Hirzel AH, Hausser J, Chessel D and Perrin N. 2002. Ecological-niche factor analysis: how to compute habitat-suitability maps without absence data? *Ecology* 83: 2027-2036.
- Hirzel AH, Le Lay G, Helfer V, Randin C and Guisan A. 2006. Evaluating the ability of habitat suitability models to predict species presences. *Ecological Modelling* 142-152.

- Hirzel AH, Posse B, Oggier PA, Glenz YC and Arlettaz R. 2004. Ecological requirements of a reintroduced species, with implications for release policy: the bearded vulture recolonizing the Alps. *Journal of Applied Ecology* 41: 1103-1116.
- Holechek JL, Vavra M and Pieper RD. 1982. Botanical composition determination of range herbivore diets: a review. *Journal of Range Management* 35: 309-315.
- Homolka M. 1982. The food of *Lepus europaeus* in a meadow and woodland complex. *Folia Zoologica* 31: 243-253.
- Hulbert IAR, Iason GR and Mayes RW. 2001. The flexibility of an intermediate feeder: dietary selection by mountain hares measured using faecal n-alkanes. *Oecologia* 129:197-205.
- Hutchinson GE. 1957. "Concluding remarks" (PDF). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 22: 415-427.
- Ingerson-Mahar JM. 2014. Relating diet and morphology of the head, mandibles and proventriculus in adult carabid beetles. In: Holland JM (eds). *The Agroecology of Carabid Beetles*. Intercept, Andover.
- Jarman SN, Gales NJ, Tierney M, Gill PC and Elliott NG. 2002. A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Molecular Ecology* 10: 2679-2690.
- Kaneko H and Lawler IR. 2006. Can Near Infrared Spectroscopy Be Used To Improve Assessment Of Marine Mammal Diets Via Fecal Analysis? *Marine Mammal Science* 22: 261-275.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P and Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649. Geneious v 5.5. <http://www.geneious.com>.
- Kent M and Coker P. 1992. *Vegetation description and analysis. A practical approach*. SRP Ltd, Exeter.
- King RA, Read DS, Traugott M and Symondson WOC. 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology* 17: 947-963.

- Komaca B, Domènecha M, and Fanlob R. 2014. Effects of grazing on plant species diversity and pasture quality in subalpine grasslands in the eastern Pyrenees (Andorra): Implications for conservation. *Journal for Nature Conservation* 22: 247-255
- Kovacks G and Buzza C. 1992. Home range size of the brown hare in Hungary. In: *Global trends in wildlife management, Proc. 18th Cong. Int. Union of Game Biology, Krakov-Warszawa*: 267-271.
- Kowalczyk R, Taberlet P, Coissac E, Valentini A, Miquel C, Kamiński T and Wójcika LM. 2011. Influence of management practices on large herbivore diet case of European bison in Białowieża a primeval forest (Poland). *Forest Ecology Management* 261: 821-828.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA and Janzen DH. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS USA* 102: 8369-8374.
- Lassmann T, Hayashizaki Y and Daub CO. 2011. SAMStat: monitoring biases in next generation sequencing data. *Bioinformatics* 27: 130-131.
- Li H and Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 25: 1754-60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G and Durbin R. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
- Lister, BC. 1976. The nature of niche expansion in West Indian *Anolis* lizards II: evolutionary components. *Evolution* 30:677-692.
- Lo Valvo M, Barera A and Seminara S. 1997. Biometria e status della lepore appenninica (*Lepus corsicanus*, de Winton 1898) in Sicilia. *Naturalista Siciliano* IV: 67-74.
- Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu SM, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam TW and Wang J. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience* 1: 18.
- MacArthur RH and Levins R. 1967. The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species. *American Naturalist* 101: 377-385.

- Macchia M, Riga F and Trocchi V. 2005. Preliminary data on distribution and comparative ecology of Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898) and European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in the Grosseto Province (Tuscany, Italy). Pohlmeier K. (eds) Extended abstract of the XXVIIth Congress of the International Union of Game biologists: 402-404. Hannover 2005. DSV. Verlag Hamburg.
- Mattioli L, Apollonio M, Mazzarone V and Centofanti E. 1995. Wolf food habits and wild ungulate availability in the Foreste Casentinesi. National Park, Italy. *Acta Therologica* 4: 387-402.
- Mengoni C, Mucci N and Randi E. 2015. Genetic diversity and no evidences of recent hybridization in the endemic Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Conservation Genetics* 16: 477.
- Miller GS. 1912. Catalogue of the mammals of western Europe. British Museum, London.
- Mollot G, Duyck PF, Lefeuvre P, Lescourret F, Martin JF, Piry S, Canard E and Tixier P. 2014. Cover Cropping Alters the Diet of Arthropods in a Banana Plantation: A Metabarcoding Approach. *PLoS ONE* 9: e93740.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E and Wagnere H. 2011. *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.0-0. <<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.
- Palacios 1996. Systematic of the indigenous hares of Italy traditionally identified as *Lepus europaeus* Pallas 1778 (Mammalia: Leporidae). *Bonn zoological Bulletin* 46: 59-91.
- Parkers J. 2001. Methods to monitor the density and impact of hares (*Lepus europaeus*) in grasslands in New Zealand. Doc. Science Internal Series 8. Dept. Conservation, Wellington, New Zealand.
- Pianka E.R. 1986. Ecology and natural history of desert lizards. Princeton University Press, Princeton.
- Pianka ER. 1973. The Structure of Lizard Communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 53-74.

- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V and Randi E. 1999. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* 11: 1805-17.
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V and Randi E. 2003. Hare populations in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation. *C. R. Biologies* 326: S80-S84.
- Piggott MP. 2005. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Resources* 31: 485-493.
- Pignatti S. 1982. *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Pignatti S. 1994a. *Ecologia del paesaggio*. UTET, Torino.
- Pignatti S. 1994b. The climax vegetation above timberline in the northern and central Apennines. *Fitosociologia* n° 26.
- Pignatti S. 1995. Biodiversità della vegetazione mediterranea. *Atti dei Covegni Lincei* 115 (La vegetazione italiana, Roma 5 giugno 1993).
- Pignatti S. 1998. *I boschi d'Italia, sinecologia e biodiversità*. UTET, Torino.
- Podani J. 2001. *SYN-TAX 2000. Computer Programs for Data Analysis in Ecology and Systematics – User's Manual*. Scientia Publishing, Budapest, Hungary.
- Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN and Taberlet P. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21: 1931-1950.
- Pulliaainen E and Tunkkari P. 1987. Winter diet, habitat selection and fluctuation of a mountain hare population *Lepus timidus*, in Finnish Forest Lapland. *Holarctic Ecology* 10:261-267.
- Ramón-Laca A, Gleeson D, Yockney I, Perry M, Nugent G and Forsyth DM. 2014. Reliable Discrimination of 10 Ungulate Species Using High Resolution Melting Analysis of Faecal DNA. *PLoS ONE* 9: e92043.
- Randi E, Mengoni C and Mucci N. 2007. Genetic distinction and assessment of interspecific Hybridisation among three species of hares (*Lepus*) in Italy. V European Congress of Mammalogy, Siena, 21-26 settembre 2007. *Hystrix* (N.S.) II, Supp.: 362.
- Reitz F and Leonard Y. 1994. Characteristics of European Hare (*Lepus europaeus*) use of space in a French agricultural region of intensive farming. *Acta theriologica* 39: 143-147.

- Ricci F, Riga F, Trocchi V, Pierpaoli M, Barone V and Di Giambattista P. 2007. Ecologia e *status* di *Lepus corsicanus* e *L. europaeus* nella Riserva Naturale Regionale Gole del Sagittario. In de Filippo G, De Riso L, Riga F, Trocchi V and Troisi SR (a cura di) 2007. Conservazione di *Lepus corsicanus* De Winton, 1898 e stato delle conoscenze. IGF Publ., Napoli, Italia.
- Ricci JC. 1983. Suivi d'un lâcher de lièvres d'importation (*Lepus europaeus* Pallas) au moyen de la radiotélémétrie: mortalité, dispersion et utilisations de l'espace. *Acta Oecologica* 1: 31-46.
- Riga F, Trocchi V and Toso S. 2001. Morphometric differentiation between the Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898) and European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *Journal of Zoology* 253: 241-252.
- Riga F, Trocchi V, Scalabrini M, Carpaneto GM and Toso S. 2003. Italian hare (*Lepus corsicanus*) distribution and habitat suitability. Abstracts and contributing authors, XXVIth International IUGB Congress, Xth International Perdix Symposium, 1-6 settembre, Braga (Portogallo).
- Rippa D, Maselli V, Soppelsa O and Fulgione D. 2011. The impact of agro-pastoral abandonment on the Rock Partridge *Alectoris graeca* in the Apennines. *Ibis* 153: 721-734.
- Robinson TJ and Dippenaar, NJ. 1983. Morphometrics of the South African *Leporidae*. I. Genus *Pronolagus* Lyon, 1904. *Annals du Musée Royal d'Afrique Centrale. Sciences Zoologiques* 237: 43-61.
- Robinson TJ and Dippenaar, NJ. 1987. Morphometrics of the South African *Leporidae*. II: *Lepus* Linnaeus, 1758 and *Bunolagus* Thomas, 1929. *Annals of the Transvaal Museum* 34: 379-404.
- Roughgarden J. 1979. *Theory of population genetics and evolutionary ecology: an introduction*. Macmillan, New York, New York, USA.
- Sale P, Guy AJ, and Steel WJ. 1994. Ecological Structure of Assemblages of Coral Reef Fishes on Isolated Patch Reefs. *Oecologia*, 98: 83-99.
- 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.

- Sanz-Martín MJ, Pérez-Suárez G, Estomba A and Palacios F. 2007. A phylogenetic study of Iberian hare species by mtDNA analysis: *Lepus castroviejoi*, *L. europaeus* and *L. granatensis*. V European Congress of Mammology, Siena, 21 - 26 settembre 2007. *Hystrix* (N.S.) II, Supp.: 164.
- Scandurra A, Magliozzi L, Fulgione D, Aria M and D'Aniello B. 2016. *Lepidoptera Papilionoidea* communities as a sentinel of biodiversity threat: the case of wild boar rooting in a Mediterranean habitat. *Journal of Insect Conservation* 20: 353-362.
- Schoch LC, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109: 6241-6246.
- Soininen EM, Gauthier G, Bilodeau F, Berteaux D, Gielly L, Taberlet P, Gussarova G, Bellemain E, Hassel K, Stenøien HK, Epp L, Schröder-Nielsen A, Brochmann C and Yoccoz NG. 2015. Highly Overlapping Winter Diet in Two Sympatric Lemming Species Revealed by DNA Metabarcoding. *PLoS ONE* 10: e0115335.
- Soininen EM, Valentini A, Coissac E, Miquel C, Gielly L, Brochmann C, Brysting AK, Sønstebo JH, Ims RA, Yoccoz NG and Taberlet P. 2009. Analyzing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Frontiers Zoology* 6: 16.
- Strumia S, Catalanotti AE, Santangelo A and de Filippo G. 2007.. Caratterizzazione floristico-vegetazionale dei siti alimentari di *Lepus corsicanus* nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. In: de Filippo G, De Riso L, Riga F (eds). Conservazione di *Lepus corsicanus* De Winton, 1898 e stato delle conoscenze. IGF Publishing pp149-157.
- Symondson WOC. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology* 11: 627-641.
- Taberlet P, Coissac E and Pompanon F. 2014. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 42: e14.

- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M and Rieseberg LH. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789-1793.
- Tapper SC and Barnes RFW. 1986. Influence of farming practice on the ecology of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Journal of Applied Ecology* 23: 39-52.
- Taylor PD, Fahrig L, Henein K and Merriam G. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68: 571-573.
- Toschi A. 1965. Fauna d'Italia. Mammalia: Lagomorpha, Rodentia, Carnivora, Ungulata, Cetacea. Calderini, Bologna, VII: 1-47.
- Trocchi V and Riga F. 2001. Piano d'azione nazionale per la lepre italiana (*Lepus corsicanus*). Quaderni di Conservazione della Natura, 9 INFS e Ministero dell'Ambiente.
- Trocchi V and Riga F. 2005. I Lagomorfi in Italia. Linee guida per la conservazione e la gestione. Min. Politiche Agricole e Forestali. Istituto Nazionale Fauna Selvatica, Documenti tecnici, 25: 1-28.
- Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, Heywood VH, Moore TM, Valentine DH, Walters SM and Webb DA. 1993. *Flora Europea*, 1, 2a. Cambridge University Press.
- Valentini A, Miquel C, Nawaz M, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson JE and Taberlet P. 2009a. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources* 9: 51-60.
- Valentini A, Pompanon F and Taberlet P. 2009b. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110-117.
- Valiere N and Taberlet P. 2000. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology* 9: 2150-2152.
- Van Valen L. 1965. Morphological variation and the width of ecological niche. *American Naturalist* 99: 377-389.
- Vigne JD. 1988. Les mammifères post-glaciaires de Corse. Etude archéozoologique XXVIe supplément a Gallia Préhistoire. Editions du CNRS, Parigi: 337 pp. Wagner (1841).
- Vigne JD. 1992. Zooarchaeology and the biogeographical history of the mammals of Corsica and Sardinia since the last ice age. *Mammal Review* 2: 87-89.

- Vynne C, Baker M, Breuer Z and Wasser S. 2012. Factors influencing degradation of DNA and hormones in maned wolf scat. *Animal Conservation* 15: 184-194.
- Wang XC, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang JH, Cai D and Li JQ. 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources* 15: 573-586.
- Wasser S, Houston C, Koehler GM, Cadd G and Fain S. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* 6: 1091-1097.
- Westoby M. 1974. An analysis of diet selection by large generalist herbivores. *The American Naturalist* 108: 290-304.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG and Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49: 853-860.
- Yokota Y, Kawata T, Iida Y, Kato A and Tanifuji S. 1989. Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. *Journal of Molecular Evolution* 29: 294-301.