



Rezumat raport monitorizare lup cu ajutorul probelor non-invazive de ADN

18.07.2023

Autori: Ruben Iosif¹, Tomaž Skrbinšek^{2,3}, Nándor Erős^{4,5}, Marjeta Konec^{2,3}, Barbara Boljte^{2,3}, Maja Jan², Liviu Ungureanu¹, Mădălin Mocanu¹, Laviniu Terciu¹, Călin Șerban¹, Bogdan Sulică¹, Daniel Bîrloiu¹, Barbara Promberger-Füerpass¹

Afilieri:

1 – Foundation Conservation Carpathia, 27 Calea Feldioarei, 500471 Brașov, Romania.

2 – University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dpt. of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia.

3 – DivjaLabs Ltd., Aljaževa 35a, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.

4 – Centre for Systems Biology, Biodiversity and Bioresources, Hungarian Dpt. of Biology and Ecology, Babeș-Bolyai University, 400006 Cluj-Napoca, Romania.

5 – Institute of Aquatic Ecology, Centre for Ecological Research, Bem Square 18/C, H-4026 Debrecen, Hungary.

Contact:

Ruben Iosif: r.iosif@carpathia.org

Nándor Erős: erosnandi@gmail.com

Tomaž Skrbinšek: tomaz.skrbinsek@gmail.com

Barbara Promberger-Füerpass: b.promberger@carpathia.org

Fotografie copertă: © Barbara & Christoph Promberger

Context

Deși la nivel European România pare să aibă o populație viabilă de lupi și este un bun exemplu de conviețuire istorică între comunitățile locale și această specie, Munții Carpați rămân în continuare printre cele mai puțin studiate ecosisteme montane din Europa. În Munții Carpați, metode științifice de măsurare a efectivelor populaționale, respectiv amenințările actuale ale acestei specii, au fost folosite abia în ultimul deceniu, multe aspecte fiind încă neclarificate. Este important să clarificăm aceste necunoscute în contextul schimbărilor climatice, al fragmentării habitatelor și al schimbărilor politicilor de mediu.

Munții Carpați reprezintă un bastion care a făcut posibilă, în mod tradițional, conviețuirea dintre comunitățile locale din jurul munților cu cele trei specii de carnivore mari ale continentului: lupul, râsul și ursul brun. Carpații Românești au o populație estimată fără finețe la aproximativ 3000 de exemplare de lup, populația de lupi din România având variabilitate genetică mare. Această variabilitate genetică este un indicator crucial pentru viabilitatea unei specii, o populație având variabilitate genetică mare atunci când îi sunt asigurate nevoile de spațiu și de habitat. Schimbările climatice, degradarea habitatelor dar și schimbările radicale de management al faunei, creează noi provocări complexe pentru strategia de coexistență pe termen lung (König *et al.*, 2020).

Schimbările în agricultura tradițională și în utilizarea terenurilor de-a lungul Carpaților au potențialul de a aduce oamenii și lupii mai aproape, intensificându-se astfel interacțiunile și conflictele (Mustăța & Pătru-Stupariu, 2021). Printre aceste schimbări, enumerăm abandonarea terenurilor agricole mai puțin atractive, schimbarea regimului sezonier de pășunare, respectiv expansiunea zonelor turistice în habitatele forestiere. Construcția autostrăzilor peste Carpați în următoarele decenii presupune riscuri majore de fragmentare a habitatelor cu consecințe potențiale asupra sănătății genetice a populației noastre de lupi (vedeți Fedorca *et al.*, 2019 pentru impactul prognozat al autostrăzilor asupra habitatelor și populațiilor de urs de la noi din țară).

Specia lup a fost în mod tradițional în grija vânătorilor și a gestionarilor fondurilor de vânătoare. Aceștia administrau populația de lup prin hrănire complementară (chiar dacă erau vizate alte specii, hrănirea cu resturi de animale domestice atrăgea inevitabil și lupii), și o controlau cu ajutorul cotelor de vânătoare anuale. Metodologia folosită pentru calcularea cotelor de vânătoare nu s-a sincronizat cu cele mai moderne metode științifice de monitorizare a populațiilor, uneori rezultând date nerealiste (Popescu *et al.*, 2016). În acest context, în 2016 Guvernul României a decis interzicerea vânătorii de trofee la specia lup. Această decizie nu a presupus și eforturi ulterioare de a implica acești actori în strategii coerente de conviețuire, de protejare și de monitorizare a lupilor, interesul lor de a proteja această specie probabil scăzând pe fondul competiției pentru cervide și mistreți (Riener, 2019).

În acest context dinamic ne lipsesc inițiative de monitorizare care să producă estimări bazate pe știință a parametrilor demografici precum numărul și compoziția haitelor de lupi. În Munții Carpați există până la acest moment o singură inițiativă care, folosind metode moderne precum genetica, a estimat mărimea populației de lupi într-o zonă pilot din Carpații Orientali și de Curbura (Gazzola, Sin & Corradini, 2017).

În studiul de față ne propunem să estimăm parametrii demografici precum abundența, densitatea populației, compoziția și dinamica haitelor într-o zonă pilot din Carpații Meridionali. Am colectat probe de ADN din

excremente, urină pe zăpadă și fire de păr pentru a urmări haitele de lupi pe parcursul a trei ani consecutivi. Cu ajutorul ADN-ului și a observațiilor din teren am clarificat structura familiilor de lupi. Cu ajutorul modelelor statistice de marcare-recapturare non-spațiale am estimat abundența iar cu ajutorul modelelor spațiale am estimat densitatea populației de lupi. Studiul prezintă riscurile întâlnite și face recomandări de îmbunătățire pentru viitoarele programe de monitorizare a acestei specii în România. Studiul a fost finanțat de [Fundația OAK](#), Comisia Europeană prin [Programul Operațional Infrastructură Mare – Axa Biodiversitate](#), și Fundația Arcadia prin [Endangered Landscape Programme](#).

Zona de studiu



📷 Călin Șerban

Zona de studiu este localizată în Carpații Meridionali, se suprapune cu partea estică a Munților Făgăraș, cu Piatra Craiului, lezer-Păpușa și Munții Leaota, și acoperă o suprafață relevantă pentru ecologia spațială a lupului de aproximativ 1400 km². Zona de studiu este împărțită în opt fonduri cinegetice, respectiv Parcul Național Piatra Craiului, cu gestionarii cărora am colaborat pentru colectarea probelor de ADN din teren.

Altitudinea zonei de studiu variază între 600 și 2400 m. Foioasele, coniferele și pădurile mixte, în proporții egale, acoperă 62% din zona de studiu. Pădurile mixte sunt localizate la altitudini medii (1400-1500 m) și au în compoziție fag și brad sau fag, brad și molid (*Fagus sylvatica*, *Abies alba* și *Picea abies*). Fagul este dominant la altitudini mai joase (900 – 1300 m) iar coniferele la altitudini mai mari (1500 – 1800 m). La peste 1800 m întâlnim zona subalpină cu arbuști (*Pinus mugo*, *Vaccinium subsp.*) și pășunile alpine. La baza muntelui, zonele joase prezintă un peisaj mozaicat cu agricultură tradițională cu pășuni, fânețe și petice de pădure. Turismul este o activitate economică în creștere în zonele accesibile de pe văi. Păștoritul este încă practicat deși a scăzut în importanță în această zonă, mai ales în etajul alpin. În ultimele decenii, după retrocedarea pădurilor, zona a fost afectată de defrisări massive (Kuemmerle *et al.*, 2009), exploatarea lemnului fiind și astăzi o importantă activitate economică a zonei.

Zona de studiu adăpostește o comunitate intactă de carnivore și erbivore precum ursul brun (*Ursus arctos*), lupul (*Canis lupus*), râsul (*Lynx lynx*), pisica sălbatică (*Felis silvestris*); vulpea (*Vulpes vulpes*), bursucul (*Meles meles*), căpriorul (*Capreolus capreolus*), cerbul (*Cervus elaphus*), capra neagră (*Rupicapra rupicapra*) și porcul mistreț (*Sus scrofa*). Zimbrul (*Bison bonasus*) și castorul (*Castor fiber*) au fost de curând reintroduși în zona de studiu (https://www.carpathia.org/wp-content/uploads/2022/11/FCC_Raport-anual_EN_2021_FINAL-compressed.pdf).

Metode



© Iosif Ruben

De-a lungul a trei ani consecutivi am colectat și analizat 505 probe non-invasive de ADN de lup din excremente, urină pe zăpadă și fire de păr.

Aceste probe ne-au ajutat să identificăm lupii, să stabilim relațiile parentale dintre indivizi și să reconstruim haitele, respectiv să evaluăm magnitudinea hibridizării lup-câine. Pe baza frecvenței cu care am observat aceiași indivizi în diferite momente de timp, am estimat parametrii demografici precum abundența și densitatea populației.

Colectarea probelor a avut loc în trei sesiuni consecutive: 1 iulie 2017 – 31 iunie 2018 (Sesiunea 1), 1 iulie 2018 – 31 iunie 2019 (Sesiunea 2) și 1 iulie 2019 – 31 iunie 2020 (Sesiunea 3). Deși colectarea a fost deschisă tot timpul anului în fiecare sesiune, colectarea sistematică și intensivă a avut loc în perioada noiembrie – mai, folosindu-ne de zăpadă pentru a urmări activitatea haitelor, în timp ce în sezonul cald am colectat doar oportunist. Toate probele colectate au fost analizate genetic pentru identificarea indivizilor și reconstrucția pedigree-ului / familiilor, în timp ce probele colectate sistematic în perioada rece a anului au fost folosite și pentru estimarea parametrilor demografici asumându-ne că populația este închisă din punct de vedere demografic în acest interval.

De cele mai multe ori am colectat ADN din excremente, urină pe zăpadă sau fire de păr lăsate în urmă de lupi. Mai rar am reușit să colectăm sânge de lup pe zăpadă, saliva de pe carcasele de erbivore prădate de lup sau țesut de la lupii găsiți morți. Am evitat colectarea din probe mai vechi de 5 zile știind că asta poate afecta sever succesul analizelor de laborator. Deși subiectivă, estimarea vechimii unei probe în teren se îmbunătățește cu timpul și s-a dovedit a fi deosebit de importantă pentru succesul studiului.

Analizele de laborator au fost realizate la Universitatea Ljubljana din Slovenia și s-au bazat pe 16 markeri genetici specifici canidelor în cadrul unei analize complexe PCR. Am folosit un marker genetic suplimentar pentru identificarea sexului. În ceea ce privește procedura de extragere și analiză a materialului genetic, am implementat un protocol strict prin care am evitat riscurile de contaminare. Printre măsurile luate amintim: utilizarea a două laboratoare separate pentru manipularea probelor pre-PCR și PCR cu regim strict de transfer al probelor dintr-un laborator în celălalt; utilizarea roboților de pipetare pentru a elimina erorile umane.

Pentru a evalua hibridizarea dintre lupi și câini am colectat probe de salivă de la 21 de câini din zona de proiect în aceeași perioadă cu colectarea probelor de lup. Probele de la câini au fost folosite ca probe de referință pentru evaluarea purității genetice a canidelor eșantionate în sălbăticie.

Pentru a evalua structura și dinamica haitelor în spațiu și timp am utilizat analize parentale. Analizele parentale au folosit datele genetice ale fiecărui individ pentru a reconstrui familiile de lupi care trăiesc în zona de studiu. În acest fel am putut identifica familiile de lupi și gradul de rudenie între indivizi. Am făcut aceste analize parentale în programul Colony (Jones & Wang, 2010).

Lupii sunt animale sociale, trăiesc în familii (haite) sau perechi, sunt de obicei animale monogame care au o singură pereche reproducătoare în cadrul grupului (Mech & Boitani, 2003). De cele mai multe ori o haită include și puii perechii reproducătoare, pui care până la urmă vor părăsi haita, dar există numeroase situații în care lupii accepta în cadrul grupului, cel puțin temporar, și lupi cu care nu sunt înrudiți. Acest context complicat face ca analizele parentale să fie expuse erorilor în special în cazul seturilor de date de dimensiuni reduse. Pentru a minimiza aceste erori am folosit observații din teren și am corectat acolo unde a fost cazul analizele parentale. În timpul sesiunilor de colectare de probe am înregistrat într-o aplicație dedicată și observații cu privire la numărul de urme unice vizibile pe zăpadă. Mai mult, informații cu privire la mărimea haitelor am obținut și cu ajutorul camerelor de monitorizare a faunei în cadrul unui studiu de monitorizare sistematică a

râșilor în aceeași zonă și în același interval de timp (https://www.carpathia.org/wp-content/uploads/2020/10/FCC-Report-on-monitoring-Eurasian-lynx-using-camera-trapping-in-the-Romanian-Carpathians_20201013.pdf).

Pentru a estima parametrii demografici precum abundența și densitatea populației de lupi, am folosit modele statistice de marcarea-recapturare. Am estimat abundența cu ajutorul modelelor non-spațiale iar densitatea cu ajutorul modelelor spațiale de marcarea-recapturare măsurând efortul de eșantionare în kilometri parcurși pe teren.



Cum evaluăm hibridizarea între lupi și câini?



În timp ce am colectat probele de lup, am colectat și probe de referință de la câinii din sate. Stăpânii câinilor ne-au ajutat cu recoltarea probelor de salivă. Pe baza acestor probe am comparat puritatea genetică a canidelor sălbatice în raport cu cele domestice. Am putut identifica astfel indivizii din populația de canide sălbatice care au structură genetică de hibrid și sunt acceptate ca parte a unei haite de lupi.

Hibridizarea între lupi și câini este o amenințare reală asupra populației de lupi la nivelul Europei, în special în țările cu peisaje puternic modificate antropic și cu populații de lupi izolate. Hibridizarea poate degrada variabilitatea genetică a lupilor până la extincția locală a populațiilor afectate. Astfel de declinuri s-au întâmplat spre exemplu în sudul Spaniei unde o populație de lupi a fost atât de izolată și afectată de hibridizare în ultimele decenii încât a dispărut. Puține date concrete există cu privire la magnitudinea hibridizării lup-câine în România deși personalul de teren a semnalat observații directe ale unor animale cu caracteristici morfologice atât de lup cât și de câine. Este necesară studierea acestei probleme în România fiindcă știm că există multe zone unde câinii hoinari apar în habitatul lupului, mai ales acolo unde spațiul montan al lupului întâlnește spațiul comunităților locale de unde provin câinii hoinari



Începând cu decembrie 2018 am realizat o monitorizare a faunei cu ajutorul camerelor cu senzor de mișcare în aceeași zonă de studiu în care am colectat probele de lup. În partea sudică a zonei de proiect, pe fondul cinegetic Stoenești, am instalat anual 10-15 astfel de camere. În această zonă am înregistrat în jur de 100 de detecții foto ale lupilor. Tot aici am înregistrat 27 de detecții foto ale câinilor hoinari în habitatul forestier. Pe 21 decembrie 2019, una din camere a confirmat rezultatele genetice detectând o haită formată din doi

lupi, un posibil hibrid (cu caracteristici morfologice de câine și lup) și un câine. De la acest moment am detectat pe camere această haită de 9 ori. Mai târziu câinele a dispărut din componența haitei.

Rezultate



Foundation Conservation Carpathia

Din totalul probelor, 53% au conținut ADN suficient. Probele cu ADN insuficient au reprezentat 34%. În 5.6% din probe am găsit ADN de la doi sau mai mulți indivizi (probe mixte de la doi lupi sau lup și vulpe), lucru care face imposibilă identificarea exactă a indivizilor. Totodată, 7.5% din probe au fost probe de la altă specie (în special de la câini hoinari).

De-a lungul celor trei sesiuni de monitorizare am identificat 48 indivizi unici, 27 masculi, 20 femele și un hibrid lup-câine. Rata medie de recapturare cu probe de ADN este de 6.3 per individ pentru masculi (SE = 1.2) și 4.75 pentru femele (SE = 0.92).

După analizele parentale și corecturile bazate pe observațiile din teren, am grupat 40 de lupi și hibridul în șase haite (Figura 1). Ceilalți 7 lupi nu au putut fi atribuiți unei haite și sunt considerați animale care se dispersează sau animale care aparțin unor haite vecine și care au fost detectate doar întâmplător pe teritoriile sau la limitele de teritorii ale haitelor noastre. Cu excepția unei singure haite în zona Piatra Craiului, toate celelalte haite au avut indivizi care nu sunt înrudiți genetic cu haita, indivizi care fie se deplasau împreună cu haita, fie au fost detectați pe teritoriul aproximativ al haitei respective. De-a lungul celor trei ani am detectat modificări ale perechilor reproducătoare la 2 din 6 haite. Numărul de indivizi per haită a variat de la 4 la 7 în Sesiunea 1, de la 2 la 6 în Sesiunea 2 și de la 3 la 6 în Sesiunea 3.

Pentru estimarea mărimii populației (abundența) am selectat modelul matematic Chao Mh. Acest model a estimat mărimea populației locale la 31 de lupi (95%CI = 25-38) în Sesiunea 3 (sesiunea cu cel mai mare efort

de colectare a probelor). Raportul pe sexe estimat este echilibrat, numărul de masculi fiind estimat la 16 (10-22) iar cel al femelelor la 17 (12-22). Modelul spațial de marcare-recapturare a estimat densitatea populației de lupi la 2.35 indivizi/100 km² (BCI=1.68–3.03).

i Lupii și haitele identificate cu ajutorul probelor de ADN		
<i>În acest tabel sunt prezentate toate animalele detectate de-a lungul a 3 ani de monitorizare.</i>		
47 lupi	27 masculi	20 femele
1 hibrid lup-câine		
6 haite	Șercăița	3-5 lupi de-a lungul a celor trei ani
	Bârsa-Izvoarele Dâmboviței	4-6 lupi --
	Piatra Craiului	5-7 lupi --
	Dâmbovița-Râul Târgului	2-6 lupi –
	Stoenești	3-5 lupi --
	Stoenești hibrizi	2-4 lupi –

i Parametrii demografici estimați pe baza probelor de ADN	
<i>În acest tabel sunt prezentate estimările pentru un singur an / o singură sesiune de monitorizare (noiembrie 2019 – mai 2020), sesiune în cadrul căreia populația monitorizată este considerată închisă din punct de vedere demografic.</i>	
Mărimea estimată a populației de lupi în iarna 2019-2020:	
31 lupi	
Densitatea populației de lupi în 2019-2020:	
2,35 lupi / 100 km²	
Raportul între sexe – femele / masculi în 2019-2020:	
17 femele / 16 masculi	

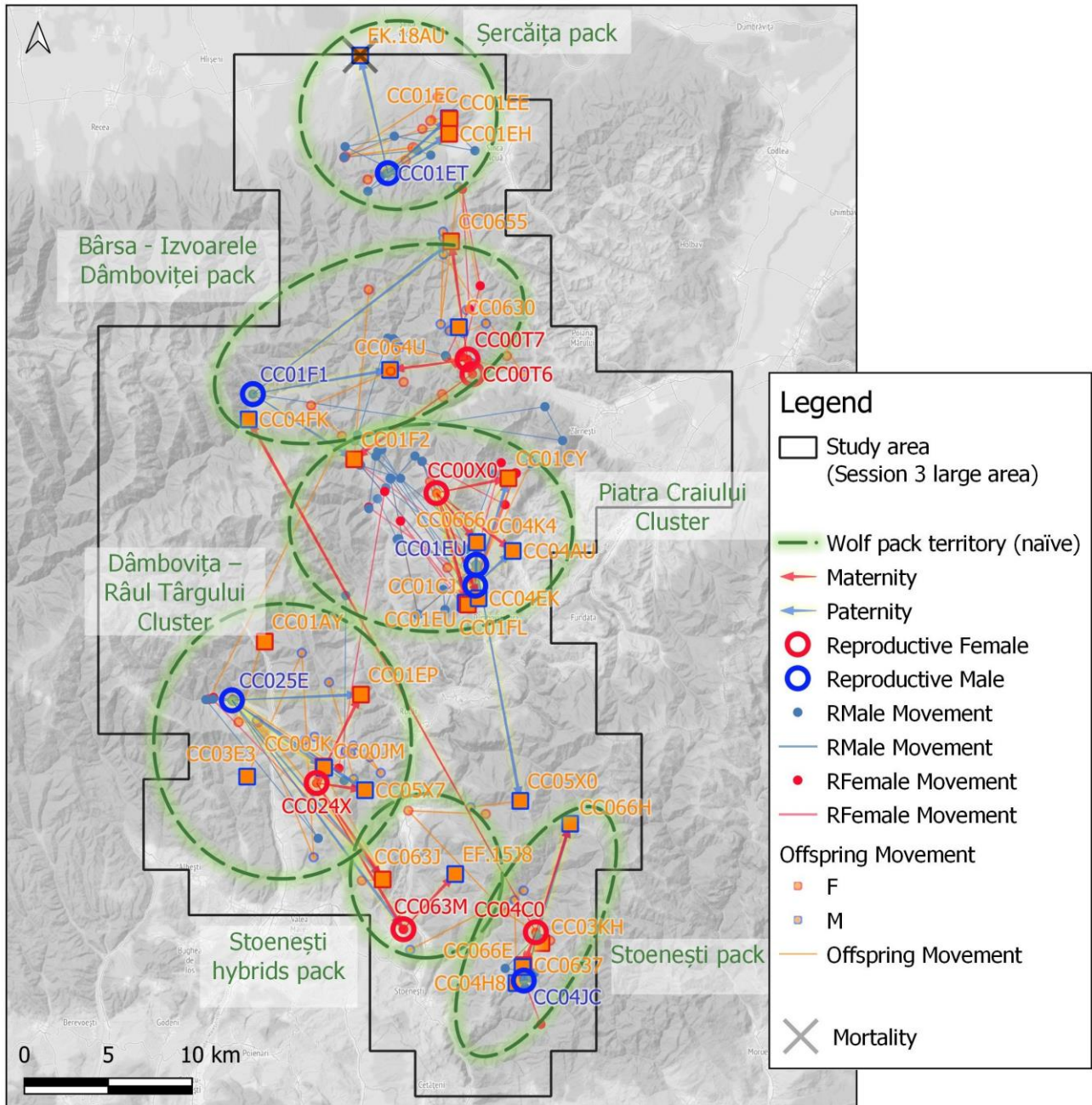


Figura 1 Distribuția haitelor de lupi așa cum reiese din monitorizarea cu probe non-invasive de ADN de-a lungul a trei ani. Cele șase haite identificate însumează 40 de lupi și un hibrid lup-câine.

Concluzii

Studiul nostru estimează parametrii demografici precum abundența, raportul pe sexe și densitatea populației de lupi și urmărește dinamica haitelor de-a lungul a trei ani într-o zonă pilot din Carpații Meridionali. Monitorizarea bazată pe probe de ADN poate să clarifice tendințele demografice ale speciei în funcție de amenințările acesteia, schimbând astfel procesul de luare a deciziilor către un management transparent bazat pe date concrete.

Densitatea estimată de noi la 2.35 lupi/100 km² (BCI=1.68 - 3.03) este mai mică decât densitatea din Parcul Național Yellowstone din SUA (5 - 9.8 lupi/100 km²; Mech & Barber-Meyer, 2015), mai mică decât densitatea din nordul Munților Apenini din Italia unde habitatele sunt mai fragmentate (4.7 lupi/100 km²; Apollonio et al., 2004). În Peninsula Scandinavă, o zonă cu condiții climatice diferite unde populația de lupi încearcă să își revină după un declin genetic de amploare, densitatea lupilor este semnificativ mai mică decât în cazul nostru (0.18 lupi/100 km²; Milleret et al., 2021).

Structura haitelor noastre este dinamică de la an la an. Am detectat atât schimbări de indivizi între haite cât și schimbări ale perechilor reproducătoare. La 3 din 6 haite am detectat cel puțin un individ care nu este înrudit cu ceilalți membri ai haitei și care fie se deplasau cu haita, fie au fost detectați din întâmplare pe teritoriul haitei. Schimbul de indivizi între haite este un bun indicator al conectivității habitatelor însă modificările la nivelul perechii reproducătoare și ale dimensiunii haitelor într-un timp scurt pot indica o presiune antropică asupra acestei populații. Mortalitatea determinată de către oameni poate avea multe forme: animale prinse în laș sau otrăvite, braconaj (inclusive în timpul vânătorii la cervide / mistreț), mortalitate rutieră, însă aceste amenințări nu sunt încă studiate cantitativ în România. Studii în alte părți de pe glob au arătat spre exemplu că mortalitatea antropică are efecte asupra capacității de creștere a puilor la canide, moartea indivizilor reproducători scăzând șansele de supraviețuire ale întregii familii (Courchamp & Macdonald, 2001).

Am confirmat prezența unui hibrid lup-câine, din cunoștințele noastre, prima confirmare genetică a unui hibrid lup-câine în Carpații României. Deși hibridizarea pare o amenințare nesemnificativă la acest moment, problema câinilor hoinari în habitatul lupilor este acută și creează premisele unui declin în sănătatea genetică a populației noastre de lupi pentru următoarele decenii.

Rezultatele studiului nostru sugerează faptul că monitorizarea genetică a populației de lupi, a structurii haitelor, dinamica acestora, precum și hibridizarea lup-câine pot fi implementate la scară regională în Munții Carpați iar repetarea anuală a acestor studii poate clarifica tendințele demografice ale populației. Am arătat că pot fi obținute estimări precise ai parametrilor populaționali precum densitatea într-un singur sezon de iarna cu ajutorul unui efort de eșantionare de 15-20 probe / 100 km² și pe o suprafață totală de 1200-1400 km². O astfel de schemă de monitorizare aplicată în mai multe zone pilot din țară poate să ofere informații despre viabilitatea populației de lupi în fața provocărilor actuale de mediu, de management și de conviețuire între oameni și carnivore mari.

Bibliografie

- Fedorca, A., Russo, I.R.M., Ionescu, O., Ionescu, G., Popa, M., Fedorca, M., Curtu, A.L., Sofletea, N., Tabor, G.M. & Bruford, M.W. (2019). Inferring fine-scale spatial structure of the brown bear (*Ursus arctos*) population in the Carpathians prior to infrastructure development. *Sci. Rep.* **9**, 1–12.
- Gazzola, A., Sin, T. & Corradini, A. (2017). LIFE13NAT/RO/000205 WOLFLIFE - Final report. 37 pg (in Romanian).
- Jones, O.R. & Wang, J. (2010). COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 551–555.
- König, H.J., Kiffner, C., Kramer-Schadt, S., Fürst, C., Keuling, O. & Ford, A.T. (2020). Human–wildlife coexistence in a changing world. *Conserv. Biol.* **34**, 786–794.
- Kuemmerle, T., Müller, D., Griffiths, P. & Rusu, M. (2009). Land use change in Southern Romania after the collapse of socialism. *Reg. Environ. Chang.* **9**, 1–12.
- Mech, D.L. & Boitani, L. (2003). *Wolves: behavior, ecology, and conservation*. Chicago and London: The University of Chicago Press. 472 pg.
- Mustățea, M. & Pătru-Stupariu, I. (2021). Using landscape change analysis and stakeholder perspective to identify driving forces of human–wildlife interactions. *Land* **10**, 1–22.
- Popescu, V. D., Artelle, K., Pop, M. I., Manolache, S., Rozyłowicz, L. (2016). Assessing biological realism of wildlife populations in data-poor systems. *J. Appl. Ecol.* **53**, 1248–1259.
- Riener, J. (2019). Understanding romanian hunters' cognitive components toward large carnivores in the Făgăraș Mountains, Romania. Master's thesis, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada. <https://research.library.mun.ca/14304/1/thesis.pdf>



FOUNDATION CONSERVATION CARPATHIA

27 Calea Feldioarei
Brasov – Romania 500471
Tel./Fax: +40 368 45 24 11
info@carpathia.org

www.carpathia.org