



La détection d'un haplotype de loup d'Europe de l'Est perturbe le monomorphisme de l'ADN mitochondrial de la population Italienne de loups

Mammalian Biology 78 (2013) 374–378


Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Mammalian Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mambio

ELSEVIER  

Short Communication

Detection of an East European wolf haplotype puzzles mitochondrial DNA monomorphism of the Italian wolf population 

Francesca Boggiano^a, Claudio Ciofi^a, Luigi Boitani^b, Angela Formia^a, Lorenza Grottoli^b, Chiara Natali^a, Paolo Ciucci^{b,*}

^a Department of Biology, University of Florence, Via Madonna del Piano 6, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy
^b Department of Biology and Biotechnologies, University of Rome "La Sapienza", Viale dell'Università 32, 00185 Rome, Italy

Résumé

Les loups du sud de l'Europe ont souffert d'un déclin répété de leur population pendant les périodes glaciaires et, historiquement, à cause de la persécution humaine. Contrairement aux autres populations de loups Européennes, un seul **haplotype** de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (**W14**) a été décrit jusqu'à présent chez les loups Italiens, bien qu'aucun échantillonnage génétique intensif n'ait jamais été réalisé dans les populations sources historiques du centre et du sud de l'Italie. En utilisant des techniques génétiques non invasives, nous rapportons la présence d'un haplotype d'ADNmt inattendu (**W16**) dans la population de loups du parc national des Abruzzes, du Latium et du Molise (PNALM), dans le centre de l'Italie. Cet haplotype, détecté dans trois des 90 échantillons fécaux du PNALM, n'avait été signalé auparavant que chez des loups des Carpates du Nord, de Slovaquie et des Balkans. L'analyse des microsatellites et la détermination moléculaire du sexe ont confirmé que les échantillons W16 appartenaient à trois loups distincts. Bien que d'autres explications puissent être formulées pour l'origine de cet haplotype de l'ADNmt dans la population de loups Italiens, par ailleurs monomorphe, les procédures d'assignation ont indiqué que l'un des échantillons W16 était probablement issu d'un mélange avec des loups d'Europe de l'Est. L'introgression anthropogénique avec les chiens a été détectée dans la population de loups Italiens à l'aide de microsatellites de l'ADN nucléaire, mais aucune enquête génétique à l'échelle de la population n'avait auparavant signalé une variante de la région de contrôle de l'ADNmt chez les loups Italiens. Nos résultats suggèrent fortement qu'en plus de l'hybridation loup-chien, les loups relâchés en captivité ou les hybrides loup-chien peuvent se croiser avec succès avec les loups dans la nature, et que l'introgression par l'homme peut se produire même dans des zones protégées bien établies.

© 2013 Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde. Publié par Elsevier GmbH. Tous droits réservés

Les techniques moléculaires non invasives sont devenues des outils essentiels dans l'étude et la conservation des espèces sauvages menacées. Bien que plusieurs sources d'erreur puissent invalider les résultats obtenus à partir d'échantillons non invasifs (Taberlet et al. 1999 ; Paetkau 2003 ; Pompanon et al. 2005), la possibilité d'obtenir des données génétiques à partir de poils, d'excréments ou d'urine a considérablement amélioré notre capacité à étudier la

démographie, le comportement et l'état de conservation des populations, ainsi que l'occurrence et les niveaux d'hybridation (Allendorf et al. 2001 ; Schwartz et al. 2006).

Les loups Italiens (*Canis lupus*) ont connu une contraction prolongée de leur population et un isolement génétique subséquent, d'abord en raison des changements de paysage survenus au cours de la dernière glaciation du Pléistocène (Lucchini et al. 2004), et plus récemment en raison des fortes persécutions subies jusque dans les années 1970 (Boitani 1992). Depuis lors, la protection légale des populations restantes dans le centre-sud des Apennins (Zimen et Boitani 1975) et l'augmentation de l'abondance des proies ont conduit au rétablissement naturel des loups en Italie et à la recolonisation des Alpes occidentales (Fabbri et al. 2007). Des études génétiques basées sur des échantillons de tissus collectés dans l'aire de répartition du loup en Italie entre 1984 et 1999 ont identifié un haplotype unique de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Randi et al. 2000 ; Randi et Lucchini 2002 ; Lucchini et al. 2004), confirmant des études antérieures basées sur des échantillons de plus petite taille (Wayne et al. 1992 ; Vilà et al. 1997). Cet haplotype (W14 dans Randi et al. 2000 ; W4 dans Vilà et al. 1997), peut-être le résultat d'une dérive génétique aléatoire et de la persistance de faibles niveaux de tailles effectives de population, n'a été trouvé dans aucune autre population de loups dans le monde et représente donc un marqueur hautement diagnostique pour les loups Italiens (Randi et al. 2000 ; Wayne et Vilà 2003 ; Pilot et al. 2010). De plus, les analyses de l'ADNmt n'ont jusqu'à présent pas permis de détecter l'introgession d'haplotypes de chiens hérités de la mère chez les loups Italiens, et la séquence W14 n'a été décrite dans aucune des 30 races de chiens et des neuf chiens sauvages analysés dans les Apennins centraux (Randi et al. 2000 ; Lucchini et al. 2004). Le monomorphisme pour l'haplotype W14 a également été confirmé dans la population de loups recolonisée dans les Alpes (Lucchini et al. 2002 ; Valière et al. 2003). Cependant, des analyses génétiques plus approfondies n'ont pas impliqué d'haplotypes mitochondriaux (Verardi et al. 2006 ; Fabbri et al. 2007 ; Iacolina et al. 2010 ; Caniglia et al. 2011), et aucun échantillonnage intensif n'a jamais été réalisé dans les populations sources historiques du centre et du sud de l'Italie.

Dans cette étude, nous avons réalisé une étude génétique non invasive basée sur l'analyse de l'ADNmt et des microsatellites dans le cadre d'une étude écologique plus large des loups du Parc national des Abruzzes, du Latium et du Molise (PNALM) et des zones adjacentes, dans le centre de l'Italie. Nous avons analysé la région de contrôle de l'ADNmt d'échantillons fécaux collectés au cours de l'hiver 2006 le long de trajectoires de neige et évalué l'identité génétique d'échantillons individuels par analyse microsatellite multilocus et détermination moléculaire du sexe.

Cent sept échantillons fécaux frais de loups ($6 \leq h \leq 48$) ont été collectés et conservés dans de l'éthanol à 99% au cours d'études intensives de suivi de la neige de meutes de loups résidentes, dont le territoire a été identifié au moyen du suivi de la neige et de la radio-téléométrie. L'ADN a été extrait d'environ 200 mg de chaque échantillon à l'aide d'un kit QIAamp DNA Stool Mini (QIAGEN). Un échantillon de sang et trois échantillons de muscles ont également été prélevés sur des loups trouvés morts au cours de l'étude, et un échantillon de sang supplémentaire a été obtenu sur un loup capturé vivant. L'ADN a été purifié à partir des muscles et du sang en utilisant les protocoles standard phénol/chloroforme.

Un fragment de 630 pb de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial a été amplifié à l'aide de l'amorce L-Pro (Douzery et Randi 1997 et références), qui se lie à la position 15 432 du gène de l'ARNt Proline du loup d'Eurasie (Arnason et al. 2007), et de l'amorce interne de la région de contrôle H576 (Randi et al. 2000). Un fragment plus court de 405 pb se chevauchant a également été amplifié pour tous les tissus et un sous-ensemble d'échantillons fécaux à l'aide de L-Pro et de l'amorce interne de la région de contrôle H350 (Randi et al. 2000) afin de vérifier la précision du séquençage. L'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a été réalisée dans un volume total de 10 µl avec 100 ng d'ADN total, 1 × tampon PCR, 2,5 g d'albumine de sérum bovin, 1. 5 mM MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 0,5 M de chaque amorce et 0,5 unité de *Taq* ADN polymérase (Invitrogen). Les profils thermiques consistaient en une étape de dénaturation initiale de 5 min à 95°C, suivie de 35 cycles de 15 s à 95°C, 15 s à 52°C et 1 min à 72°C, avec une étape d'extension finale de 10 min à 72°C. Les produits PCR ont été séquencés par cycle à l'aide de BigDye Terminator v3.1 chemistry (Applied Biosystems). Les réactions de séquençage du cycle ont été purifiées par précipitation à l'isopropanol et résolues sur un séquenceur capillaire automatisé ABI 3100. Les chromatographies des séquences brutes des deux brins ont été éditées et alignées sur le génome de l'ADNmt de *Canis lupus lupus* de GenBank (numéro d'accès : NC009686.1) à l'aide de CodonCode Aligner 3.7.1 (CodonCode Corporation). L'alignement a été effectué en utilisant des séquences de 576 pb et 350 pb, obtenues à partir de PCR avec les amorces L-Pro/H576 et L-Pro/H350, respectivement.

Nous avons évalué la variation allélique à 12 loci microsatellites (CPH2, CPH3, CPH5, CPH6, CPH7, CPH8, CPH22, C09.250, FH2010, FH2088, FH2096, vWF.X) (Ostrander et al. 1993 ; Shibuya et al. 1994 ; Fredholm et Winterø 1995 ; Francisco et al. 1996 ; Dolf et al. 2000). Quatre PCR multiplex ont été réalisées pour chacun des trois loci à l'aide d'amorces directes marquées avec des colorants fluorescents FAM, HEX et NED (Applied Biosystems) dans un volume total de 10 µl contenant 10 ng d'ADN, 0,5X Multiple PCR Master Mix (QIAGEN) et 0,2 µM de chaque amorce. Les profils thermiques ont suivi le protocole du fabricant avec un recuit à 55°C. Chaque PCR multiplex a été chargée séparément sur un analyseur génétique Applied Biosystems 3100 et les allélismes ont été évalués par rapport à un étalon de taille GeneScan500 ROX à l'aide de GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). Les allèles ont été évalués en utilisant une approche de tubes multiples (Taberlet et al. 1996). Les hétérozygotes ont été définis si les allèles apparaissaient au moins deux fois après trois répétitions de la PCR. Les échantillons ont été notés comme homozygotes après huit amplifications positives et cohérentes du même allèle. Plusieurs échantillons ont nécessité jusqu'à 20 répétitions de PCR afin d'obtenir un nombre suffisant d'amplifications positives. Les erreurs de génotypage dues à de faux allèles, à l'abandon d'allèles ou à des erreurs spécifiques à un locus ont été évaluées à l'aide du test bimodal et du test de différence dans l'historique de capture (DCH) mis en œuvre dans DROPOUT (McKelvey et Schwartz 2005). Les erreurs dues à l'abandon allélique, aux allèles nuls et au bégaiement ont également été testées à l'aide de MICROCHECKER (Van Oosterhout et al. 2004). Nous avons utilisé GENALEX 6.4 (Peakall et Smouse 2006) et GENECLAP (Wilberg et Dreher 2004) pour dériver des génotypes consensuels à partir de différentes PCRs du même échantillon, pour estimer la probabilité d'identité, localiser les génotypes identiques et évaluer les niveaux d'hétérozygotie. Les génotypes multilocus différant par un seul allèle ont été attribués au même individu (Paetkau 2003).

Le sexage moléculaire a été réalisé par amplification PCR multiplex de deux fragments de l'intron 6 du loup DBX et de l'intron 7 du loup DBY de 249 pb et 118 pb, respectivement, à l'aide de quatre amorces PCR comme décrit dans Seddon (2005). Les produits PCR ont été contrôlés sur des gels d'agarose à 2%. Testée sur des échantillons de tissus de loups de sexe connu, l'amplification a systématiquement donné deux fragments chez les mâles et un fragment chez les femelles.

La parenté entre chaque paire de loups du PNALM a été évaluée par l'estimateur r_{xy} de Lynch et Ritland (1999) en utilisant IDENTIX (Belkhir et al. 2002). L'estimateur r_{xy} est la probabilité qu'un allèle aléatoire d'un individu x soit identique par descendance à un allèle aléatoire prélevé sur un individu y dans une population (par exemple, $r_{xy} = 0,5$ pour les membres à part entière, $r_{xy} = 0,25$ pour les membres à demi-part et $r_{xy} = 0$ pour les individus non apparentés). Nous avons utilisé l'approche bayésienne de regroupement avec mélange mise en œuvre dans STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) pour étudier les preuves d'hybridation entre les loups et les chiens. Un ensemble de référence de génotypes multilocus de chiens Italiens ($N = 95$) et de loups d'Italie ($N = 107$), de Croatie ($N = 27$), de Bulgarie ($N = 39$) et d'Europe du Nord-Est ($N = 47$) a été utilisé pour estimer le nombre de clusters ayant la probabilité a posteriori la plus élevée (Randi et Lucchini 2002 ; Lucchini et al. 2004). Nous avons effectué 100 000 étapes de Monte-Carlo en chaîne de Markov sans information préalable sur les populations pour un nombre de populations K allant d'un à sept (nombre de groupes putatifs plus deux) en utilisant une période de rodage de 30 000 itérations. Nous avons calculé la vraisemblance moyenne $L(K)$ sur 10 itérations pour chaque K . Nous avons évalué la différence moyenne entre les valeurs successives de la vraisemblance de K , $L(K)$, et la valeur absolue de la différence entre les valeurs successives de $L(K)$. Nous avons évalué la valeur la plus probable de K en suivant la méthode ΔK (Evanno et al. 2005) mise en œuvre dans STRUCTURE HARVESTER (Earl et vonHoldt 2012). L'appartenance moyenne estimée aux K groupes inférés a été calculée pour chaque individu dans les 10 passages en utilisant CLUMPP (Jakobsson et Rosenberg 2007). Les individus de référence ont ensuite été assignés à l'un des K groupes et cette information a été utilisée comme antécédent dans une nouvelle simulation (utilisant $K = 3$) visant à évaluer la proportion d'incorporation de chaque loup du PNALM. Les signaux d'introgression ont été vérifiés au cours des deux dernières générations à l'aide de l'option GENSBACK.

Nous avons réussi à amplifier les 5 échantillons de tissus et 90 des 107 échantillons de matières fécales pour les marqueurs d'ADN mitochondriaux et nucléaires. Tous les échantillons séquencés présentaient le même haplotype W14, à l'exception de trois échantillons fécaux collectés dans le même territoire de meute de loups à trois occasions d'échantillonnage différentes entre février et mars 2006. Une recherche nucléotidique BLAST utilisant l'algorithme blastn a confirmé une correspondance à 100% de l'haplotype W16 avec les séquences de la région de contrôle de l'ADNmt rapportées pour les loups de Bulgarie (Randi et al. 2000 ; W6 in Pilot et al. 2006), de Croatie (WCR03 in Gomer'ci 'c et al. 2010), de Slovaquie et des Carpates du Nord (W6 in Pilot et al. 2006) et de deux individus relâchés en captivité et capturés en France (W2 in Valière et al. 2003). Pour écarter la possibilité d'erreurs de séquençage, d'électrophorèse capillaire ou de notation, nous avons réextrait l'ADN de ces échantillons et confirmé la présence de l'haplotype W16 en effectuant

trois amplifications PCR et réactions de séquençage supplémentaires pour chaque échantillon.

L'analyse initiale des microsatellites a produit 84 génotypes uniques. Le nombre moyen d'allèles par locus était de $5,3 \pm 0,36$ SE (de 3 à 9 allèles). Les hétérozygosités observées et attendues étaient respectivement de 0,71 et 0,60. Le test DCH a révélé qu'aucun locus n'avait significativement plus d'erreurs que n'importe quel autre locus, et nous n'avons donc pas écarté de loci des analyses ultérieures. Le test de bimodalité a identifié un mode pour les échantillons différant à trois loci et une proportion relativement importante d'échantillons différant par seulement un ou deux loci. Nous avons réamplifié tous les échantillons dont les génotypes étaient dérivés d'un consensus de réplicats PCR positifs, mais qui présentaient une faible fréquence d'au moins un génotype alternatif. Nous avons également réamplifié les échantillons qui, au départ, ne s'amplifiaient pas à des loci particuliers et nous avons recalé l'ensemble des données. Nous avons effectué quatre itérations supplémentaires d'identification des erreurs et de réanalyse des données pour les échantillons différant ≤ 3 locus afin de vérifier qu'aucun nouvel individu n'avait été généré par des erreurs de génotypage. L'ensemble de données final a montré une distribution de séparation minimale avec un mode unimodal pour les échantillons différant à quatre locus et a identifié un total de 69 génotypes de loups distincts (25 mâles, 42 femelles, deux sexes). La probabilité que deux individus non apparentés, tirés au hasard d'une population, aient le même génotype multilocus était $P_{ID} = 5,07 \times 10^{-6}$, tandis que la même probabilité pour des frères et sœurs complets était $P_{SIB} = 2,08 \times 10^{-4}$. Nos résultats réitèrent que la notation des génotypes multilocus obtenus à l'aide d'approches conventionnelles à tubes multiples à partir d'échantillons génétiques non invasifs peut être sujette à des erreurs d'amplification de l'ADN, ce qui peut éventuellement affecter les estimations numériques des loups individuels. La probabilité d'erreurs de génotypage peut être réduite de façon significative en intégrant la détection de faux allèles, de pertes d'allèles et d'erreurs de base de données par des techniques informatiques et en réanalysant ensuite en laboratoire les échantillons problématiques pour les loci identifiés par les procédures de vérification des erreurs (McKelvey et Schwartz, 2005).

Les trois échantillons de loups présentant un haplotype W16 appartenaient respectivement à deux mâles et une femelle. Ils présentaient des génotypes multilocus différents à plus de trois loci. Le taux d'erreur moyen par locus pour ces trois échantillons variait de 0,10 (vWF.X) à 0,34 (CPH5) et le rendement moyen par locus était de 64,4%. La statistique basée sur le taux de changement de la probabilité logarithmique des données entre des valeurs K successives estimées à l'aide de l'analyse bayésienne de regroupement a donné une valeur modale de $\Delta K = 707,8$ pour $K = 3$. L'analyse d'assignation utilisant les informations sur la population et le modèle de mélange a montré que l'un des génotypes mâles et femelles avait une probabilité postérieure significativement élevée ($q^j = 0,993$ et $q^j = 0,992$, respectivement) d'appartenir au groupe contenant la majeure partie des génomes de loups Italiens. Un coefficient de parenté relativement faible a été enregistré entre ces deux échantillons ($r_{xy} = 0,140$; PNALM échantillons de loups : $-0,305 < r_{xy} < 0,485$). D'autre part, ce deuxième génotype multilocus mâle avait une probabilité postérieure relativement plus faible d'appartenir au groupe des loups Italiens ($q^j = 0,516$) et une probabilité postérieure de $q^j = 0,346$ et $q^j = 0,122$ de partager un parent et un grand-parent, respectivement, dans le groupe caractérisé par des génotypes de loups de Bulgarie, de Croatie et du nord-est de l'Europe (Tableau 1). Les coefficients de parenté avec les deux autres loups W16 étaient respectivement de 0,005 et 0,005, ce qui

indique des relations non parentales. Une proportion négligeable des génotypes des trois échantillons W16 ($q^j < 0,01$) a été attribuée au groupe des chiens.

La présence de l'haplotype W16 de la région de contrôle de l'ADNmt chez des loups du centre de l'Italie est **inattendue** si l'on se réfère aux études génétiques précédentes sur les loups Italiens et soulève des questions de conservation quant à leur **origine**. Un cas similaire a été rapporté en France, près de Montpellier, où deux loups, partageant un haplotype W2 (W16 dans Randi et al. 2000) et supposés être des individus relâchés en captivité en raison de leur confiance inhabituelle envers les humains, ont ensuite été capturés en 1999 (Valière et al. 2003). Cependant, aucun marqueur génétique supplémentaire n'a été utilisé par les auteurs pour approfondir l'identité des loups W2 de France. D'autre part, nous avons comparé les trois échantillons W16 du PNALM à des chiens et des loups d'autres populations Européennes afin de vérifier les preuves d'hybridation et d'introgession. **Le test d'assignation n'a pas permis de confirmer l'hypothèse d'une origine hybride avec les chiens des trois échantillons W16.** Nous envisageons donc **trois hypothèses alternatives** pour expliquer la présence de cet haplotype dans la population Italienne de loups. **Premièrement**, au cours de la dernière glaciation, les fréquences des haplotypes de l'ADNmt des loups dans les Apennins Italiens ont très probablement été affectées par une dérive aléatoire et une faible taille effective de la population, ce qui a vraisemblablement conduit à la fixation de l'haplotype le plus fréquent (Randi et al. 2000 ; Lucchini et al. 2004). **Selon ce scénario, l'haplotype W16 pourrait provenir d'une mutation spontanée dans la région de contrôle non codante de l'ADNmt du génome du loup au cours des quelque 10 000 ans qui ont suivi la fin de la dernière période glaciaire.** L'haplotype W16 pourrait donc ne pas avoir été décrit dans les études antérieures sur la génétique des populations, qui n'ont pas envisagé un échantillonnage complet dans le centre et le sud de l'Italie, où les populations de loups ont survécu à la contraction historique. En augmentant l'intensité de l'échantillonnage, un plus grand nombre d'haplotypes de loup de l'ADNmt a été détecté dans plusieurs pays d'Europe de l'Est que ce que l'on pensait auparavant, remettant en question l'idée que la majorité des populations de loups d'Eurasie ont des haplotypes uniques (Pilot et al. 2006). Les populations restantes de l'aire de répartition historique du loup pourraient donc encore héberger un haplotype W16 non détecté en raison de sa très faible fréquence et d'un échantillonnage génétique insuffisant (Koblmüller et al. 2009 ; Schwartz et McKelvey 2009). **Selon cette première hypothèse, le déclin de la population et le goulot d'étranglement qu'ont connu les loups Italiens pourraient avoir laissé plus de variation qu'on ne le pensait.** La diversité allélique et l'hétérozygotie dans la population de loups du PNALM étaient en fait comparables ou plus élevées que la diversité globale de la population de loups Italiens trouvée dans des études précédentes (Lucchini et al. 2004 ; Fabbri et al. 2007). **Une explication alternative** pourrait être l'immigration depuis les pays voisins où l'haplotype W16 a été détecté (i.e., Croatie ; Gomercic et al. 2010). Ceci est cependant peu probable en raison de la longue distance et des vastes zones cultivées dans la vallée du Pô, qui constituent des barrières efficaces à la dispersion des loups entre les Alpes orientales et les Apennins (Lucchini et al. 2004). De plus, aucun autre haplotype W16 n'a jamais été signalé pour les loups du nord des Apennins (Randi et al. 2000 ; Randi et Lucchini 2002 ; Lucchini et al. 2004). **Les résultats de notre test d'assignation suggèrent une troisième explication, plus probable, qui implique l'introgession anthropogénique des loups Italiens avec des loups relâchés en captivité ou des hybrides loups-chiens commercialisés** (par exemple des chiens-loups Tchécoslovaques), un problème de conservation d'actualité en Italie (Boitani et Ciucci 1993 ; Verardi et al. 2006 ;

Randi 2008). L'introgression avec les chiens a été confirmée par des analyses microsatellites (Randi 2008), et un haplotype d'ADNmt non Italien, différent de W16, a été précédemment détecté parmi les loups captifs détenus illégalement et confisqués par le Département Italien des forêts (Wu479 dans Randi et Lucchini 2002). Tous les allèles microsatellites caractérisés dans cette étude pour les trois individus W16 ont également été trouvés chez les loups du PNALM porteurs de l'haplotype W14. Cependant, alors qu'une forte proportion de deux des génotypes multilocus des échantillons W16 a été attribuée à un groupe de génomes de loups Italiens, le troisième échantillon W16 a montré une forte probabilité d'ascendance mélangée avec des loups d'Europe de l'Est. D'après les valeurs de q_i , ce dernier échantillon correspond très probablement à un hybride F1 avec des loups d'Europe de l'Est, tandis que les deux autres pourraient être des rétrocroisements de générations ultérieures diluées dans la population parentale de loups Italiens. De plus, les coefficients de parenté du mâle hybride F1 supposé avec les deux autres loups étaient proches de zéro, alors qu'une valeur de parenté supérieure à une relation de troisième ordre attendue (0,125) a été enregistrée entre la femelle et l'autre mâle. Selon notre **troisième** hypothèse, ces résultats suggèrent donc des événements d'hybridation récurrents, temporellement distincts mais localisés. Bien que l'introgression à partir d'hybrides commercialisés de loups et de chiens (par exemple les chiens-loups Tchécoslovaques) ne puisse pas être exclue, l'hybridation a probablement impliqué un ou quelques individus d'une lignée d'Europe de l'Est, provenant peut-être de loups captifs relâchés illégalement. Il est à noter qu'un zoo privé, hébergeant des loups non Italiens, est situé dans les environs immédiats de la zone du PNALM et que des loups se sont échappés à plusieurs reprises de cette installation (L. Sammarone, Département Italien des Forêts, comm. pers.).

Une étude génétique plus approfondie de la population de loups du PNALM, ainsi que d'autres populations du centre et du sud de l'Italie, pourrait être nécessaire pour mieux comprendre l'origine de cet haplotype et évaluer les implications de nos résultats en matière de conservation. Entre-temps, des efforts de gestion sont nécessaires pour appliquer la confiscation des loups captifs détenus illégalement et contrôler le nombre de chiens en liberté et de chiens vagabonds afin d'empêcher la propagation de l'introgression anthropogénique, en particulier dans les parcs nationaux et autres zones protégées. Nous demandons également aux administrations nationales et Européennes de réglementer strictement la commercialisation, la propriété et l'élevage d'hybrides loup-chien (par exemple, les chiens-loups Tchécoslovaques), en particulier dans les zones où ils pourraient se croiser avec les loups sauvages.