

Suivi génétique d'une population de loups gris récemment établie dans une aire protégée périurbaine, avec un premier aperçu de l'hybridation entre loups et chiens en Grèce



Article

Genetic Monitoring of a Newly Established Grey Wolf Population in a Peri-Urban Protected Area with First Insights into Wolf–Dog Hybridization in Greece

Aimilia Ioakeimidou ^{1,2,3}, Yorgos Iliopoulos ², Aristotelis Moulitanos ³, Kerasia Galani ³, Athanasia Fyta ³, Eirini Antoniadou ², Georgios Bartzokas ², Theodoros Kampouris ⁴, Caroline Sophie Birkenhain ^{5,6}, Gregor Rolshausen ⁵, Carsten Nowak ⁵, Triantafyllos Akriotis ¹, Maria Papandreou ⁷ and Nikoleta Karaiskou ^{3,8,*}

Résumé

Contexte/Objectifs : Après des siècles d'éradication systématique, les populations de loups gris (*Canis lupus*) à travers l'Europe ont connu un rétablissement significatif au cours des dernières décennies, ce qui suscite des inquiétudes concernant, entre autres, l'hybridation d'origine anthropique. En Grèce, le statut génétique de la population de loups reste largement inconnu à ce jour. Nous surveillons et testons ici génétiquement les événements d'hybridation loup-chien au sein d'une population de loups récemment établie dans la zone protégée de Parnitha, à proximité immédiate de la capitale Grecque. **Méthodes :** Cent vingt-quatre échantillons d'excréments de loup ont été génotypés au niveau de 20 loci microsatellites autosomiques spécifiques aux canidés et comparés à des échantillons de tissus de référence disponibles provenant de loups et de chiens en liberté. **Résultats :** Au moins 31 individus loups distincts ont été identifiés, organisés en au moins trois meutes. **Aucun hybride loup-chien n'a été détecté dans la zone d'étude.** Afin de valider la précision de l'analyse microsatellite, un panel de 93 SNP informatifs sur l'ascendance a été appliqué à des échantillons d'ADN de loups prélevés de manière non invasive dans la zone d'étude, confirmant l'absence d'hybrides parmi eux. Cependant, un hybride loup-chien potentiel a été détecté parmi les échantillons de référence de loups collectés dans le nord de la Grèce, où des individus présentant des traits morphologiques atypiques ont été observés. La taille estimée de la population recensée correspondait aux données obtenues simultanément par piégeage photographique, tandis que les valeurs d'hétérozygotie étaient faibles. **Conclusions :** Cette recherche représente le premier effort systématique en Grèce visant à surveiller génétiquement les loups récemment établis dans une zone protégée. Elle souligne la nécessité de stratégies de gestion ciblées basées sur des données génétiques afin d'assurer une conservation équilibrée à long terme des loups dans les zones périurbaines.

Mots-clés : grands carnivores ; hybridation anthropogénique ; microsatellites ; échantillonnage non invasif ; diversité génétique

1. INTRODUCTION

Le rétablissement naturel des grands prédateurs en Europe au cours du dernier demi-siècle est principalement attribué à la protection juridique de leurs habitats et de leurs populations contre la dégradation et le braconnage [1]. Cette expansion ne se limite pas aux zones protégées, mais s'étend bien au-delà, jusqu'aux paysages culturels. Inévitablement, les loups et autres grands carnivores colonisent de nouveaux habitats dominés par l'utilisation des terres par l'homme à mesure que leurs individus se dispersent. Cette expansion est associée à une augmentation des conflits entre loups et bétail [2] et peut également être liée à des attaques contre des chiens de chasse et des chiens en liberté [3].

Compte tenu de l'intérêt public massif et des exigences strictes de la législation Européenne et nationale en matière de conservation au cours des derniers siècles, de multiples approches ont été développées pour fournir des estimations de la taille des populations [4]. Les estimations de l'abondance des loups combinant des méthodes de terrain standard telles que les pièges photographiques, la détection des hurlements ou les questionnaires de piégeage manquent de crédibilité et de précision en raison de la difficulté à identifier les individus [15]. Ainsi, des méthodes d'étude non invasives basées sur l'ADN extrait d'échantillons collectés sur le terrain (par exemple, excréments, poils, urine) sont de plus en plus utilisées en association avec des modèles de capture-recapture (CR) pour évaluer avec précision les paramètres démographiques des populations de loups [6,7].

Les méthodes génétiques non invasives se sont également révélées efficaces pour identifier les événements d'hybridation anthropogénique entre le loup gris et le chien domestique (*C. familiaris*). L'identification génétique des hybrides présumés est essentielle, car leurs traits morphologiques atypiques ne sont pas considérés à eux seuls comme des preuves fiables d'hybridation [8]. Le loup et le chien domestique partagent une histoire évolutive récente, leurs ancêtres ayant divergé il y a environ 40 000 à 14 000 ans [9]. Bien que ces deux taxons soient étroitement apparentés, ils diffèrent considérablement en termes de comportement et de morphologie [10,11]. L'hybridation loup-chien (WDH) peut affecter à long terme l'intégrité écologique et génétique du loup, y compris sa capacité d'adaptation [12]. Bien qu'il n'existe à ce jour aucune évaluation précise de la WDH à l'échelle Européenne, les données disponibles suggèrent que les populations de loups d'Europe du Sud et de l'Est sont plus vulnérables à l'introggression génétique provenant des chiens en raison du grand nombre de chiens en liberté dans ces régions [13].

La Grèce, qui représente l'une des limites sud de l'aire de répartition du loup en Europe, abrite actuellement une population relativement importante, estimée à au moins 2 075 loups et composée d'au moins 255 meutes [14]. Alors que les loups sont principalement répartis dans le nord et le centre de la Grèce continentale, des observations récentes d'une meute de neuf individus ont également confirmé l'expansion de l'espèce vers le sud, notamment dans le Péloponnèse.

Bien que les loups en Grèce aient connu un déclin important jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, comme ailleurs en Europe, ils sont restés abondants localement et ont fait partie de la biodiversité grecque au fil des siècles. Jusqu'aux années 1980, la répartition des loups était limitée au nord de la Grèce continentale, ne couvrant que la moitié de son aire de répartition

actuelle. Le rétablissement ultérieur de la population de loups en Grèce a été largement facilité par l'intégration de conventions internationales clés dans la législation nationale, ce qui a conduit à une réduction de l'utilisation d'appâts empoisonnés et à l'interdiction de la chasse au loup [15].

Depuis les années 1990, la population de loups a commencé à s'étendre vers la Grèce centrale, pour finalement recoloniser la région du mont Parnitha. Le Parnitha est une zone montagneuse boisée (altitude maximale : 1 413 m), dont le sommet se trouve à seulement 30 km du centre d'Athènes et dont les flancs sud chevauchent la périphérie de la ville [16]. Elle constitue un point chaud de biodiversité en Europe du Sud, avec une flore et une faune remarquablement riche et un endémisme élevé (par exemple, 1 093 espèces végétales, 42 espèces de mammifères et 93 espèces végétales endémiques de Grèce) [16].

Parmi sa faune, le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) se distingue comme le vestige le plus important de la population sauvage grecque, qui a été gravement affectée par les incendies de forêt au cours des dernières décennies [17] et par le retour du loup sur le mont Parnitha depuis 2014 [18]. Selon les estimations les plus récentes (2017), la taille minimale de la population était de 21 individus vivant en deux meutes [19].

L'objectif de la présente étude était de mettre en lumière la structure de la population de loups dans une zone récemment recolonisée de Grèce centrale, après une absence d'au moins 60 ans [18], c'est-à-dire de vérifier **(a)** si les loups ont déjà formé des meutes reproductrices ou s'ils sont principalement des individus en dispersion et **(b)** si la proximité immédiate des établissements humains pourrait accroître les événements d'hybridation. De plus, nous avons cherché à évaluer les niveaux de diversité génétique et de densité de population dans la région.

2. MATERIEL et METHODES

2.1. Prélèvement d'échantillons

Un prélèvement génétique non invasif a été réalisé de juillet 2022 à juin 2023, couvrant une zone de recensement d'environ 200 km² au sein de la zone protégée de Parnitha (Figure 1). Cette zone comprend une zone spéciale de conservation (ZSC) et une zone de protection spéciale (ZPS) au titre des directives « Habitats » (92/43/CEE) et « Oiseaux » (2009/147/CE), respectivement, répertoriées sous le code GR3000001 dans le réseau Natura 2000 [20].

Des échantillons de tissu épithélial provenant d'excréments frais ont été prélevés principalement aux intersections le long de chemins de terre, grâce à la présence de loups enregistrée par télémétrie GPS par satellite, des pièges photographiques et des enquêtes de terrain sur les bio-indices des loups. L'identification des excréments de loups a été effectuée en examinant leur taille, leur forme, leur odeur et leur contenu [21]. **De plus**, des échantillons de tissus ont été prélevés sur l'appareil génital de chiens errants dans le cadre de stérilisations officielles menées par les municipalités locales à proximité de la région de Parnitha. Outre l'échantillonnage systématique dans la région de Parnitha, un prélèvement opportuniste à l'échelle nationale d'échantillons de tissus musculaires et de sang provenant de loups morts, identifiés morphologiquement comme des loups de race pure, a été entrepris sur l'ensemble de l'aire de répartition du loup entre 2010 et 2024 par la Callisto Wildlife and Nature

Conservation Society. Tous les échantillons ont été immergés dans de l'éthanol dénaturé à 99% et conservés à -20°C.

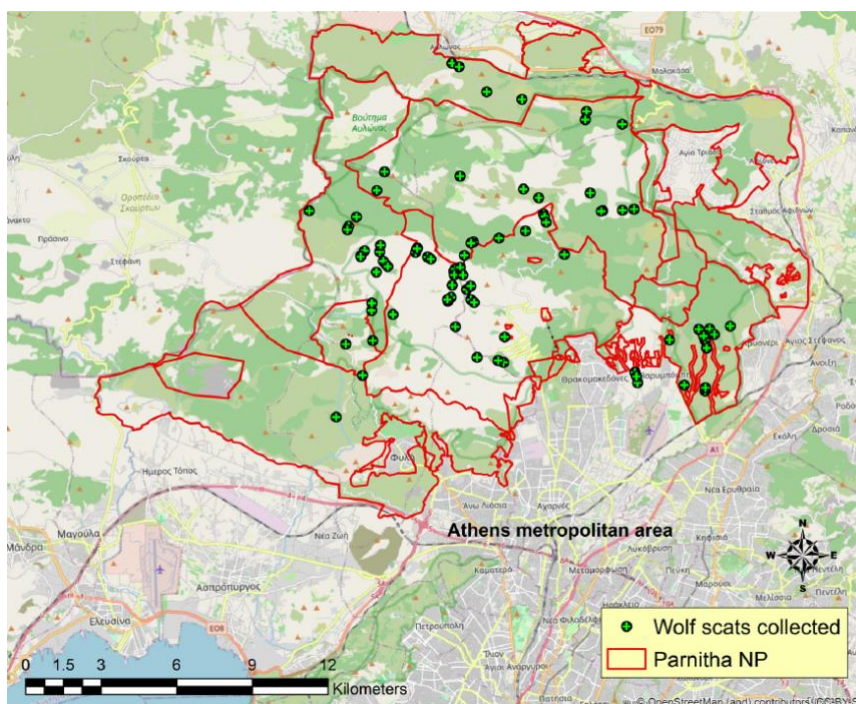


Figure 1. Répartition des échantillons d'excréments de loup (cercles verts) prélevés dans la zone protégée de Parnitha

2.2. Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait de 124 excréments de loup, 50 échantillons de tissus de loup et 50 échantillons de tissus de chien à l'aide du QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) pour les excréments, du QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) pour les tissus de loup et de la méthode au bromure de cétyltriméthylammonium [22] pour les tissus de chien. L'efficacité de l'extraction de l'ADN à partir des échantillons de crottes a été évaluée par amplification par PCR d'un seul locus, en utilisant plusieurs réplicats de PCR indépendants par échantillon, car la faible concentration de l'ADN obtenu ne permet pas de réaliser un test direct sur gel d'agarose. Afin de vérifier l'amplification de ce locus, tous les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%.

2.3. Amplification par PCR

Les échantillons non invasifs ont été amplifiés par PCR multiplex sur 20 microsatellites autosomiques spécifiques au chien : FH2079, FH2140 [23], C250, C253, C466 [24], CPH3, CPH4, CPH5, PH6, CPH7, CPH8, CPH12 [25], vWF [26], FH3210, FH3241, FH2004, FH2658, FH4012, REN214L11 et FH2361 [27]. Des échantillons de tissus de loups et de chiens ont également été génotypés au niveau de 20 loci microsatellites (FH3210, FH3241, FH2004, FH2658, FH4012, REN214L11, FH2361), avec une amplification multiplexe mise en œuvre de manière similaire. Ces génotypes ont fourni des profils génétiques de référence permettant de comparer les fréquences alléliques à chaque locus afin de déterminer si chaque échantillon de crottes appartenait à un loup, à un chien ou à un hybride. Le volume total de chaque réaction était de 10 μ L, contenant 0,1 μ L de chaque amorce et 1 μ L d'ADN matrice correspondant à 50-1 000 ng provenant d'échantillons de tissus et de sang, ou 4 μ L d'ADN de crottes correspondant à 20-40 ng.

Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un mélange maître PCR multiplex 2×, de Q-Solution 5× (Qiagen, Allemagne), et le cycle thermique « touchdown » a été lancé par une dénaturation à 94°C pendant 3 min, suivie de 10 cycles à 94°C pendant 30 s, 65°C pendant 1 min (diminution de 0,5°C par cycle) et 72°C pendant 30 s, puis s'est poursuivie par 30 cycles supplémentaires à 94°C pendant 30 s, 60°C pendant 1 min et 72°C pendant 30 s, avec une extension finale à 72°C pendant 5 min.

Tous les échantillons ayant présenté une amplification PCR positive lors de l'évaluation de la qualité de l'ADN ont ensuite été génotypés à l'aide d'une approche multi-tubes au niveau des 20 loci microsatellites susmentionnés [28]. Deux PCR indépendantes par locus ont été initialement réalisées pour chaque échantillon selon le protocole d'Adams et Waits [29]. Un allèle n'était accepté que s'il était amplifié au moins deux fois ; dans le cas contraire, une troisième PCR était effectuée. Si l'amplification échouait même après la troisième PCR, des réplicats supplémentaires ont été effectués. Si l'allèle n'était pas amplifié au moins deux fois après un total de cinq réplicats de PCR, le génotype à ce locus était écarté. Un contrôle négatif (sans ADN) et un contrôle positif (avec des génotypes connus) ont été inclus dans chaque PCR afin de détecter une contamination et de confirmer que la réaction fonctionnait, respectivement.

Les échantillons de crottes uniques ont été amplifiés en trois réplicats à l'aide du Taq PCR Core Kit (Qiagen) pour l'identification du sexe de deux fragments d'ADN : un fragment de 106 pb situé dans la région codante du gène de la région déterminant le sexe Y (SRY) et un fragment de 185 pb situé dans le gène du récepteur des androgènes (AR) sur le chromosome X de *Canis l.* [30]. Chaque réaction de 10 µL comprenait 0,1 µL de chaque amorce conçue par van Asch et al. [30], 4 µL d'ADN génomique (correspondant à environ 20-40 ng), 0,75 unité/µL de Taq polymérase Qiagen, 0,25 mM de dNTP et 1 µL de tampon PCR 10× Qiagen. Le programme de PCR comprenait une dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min ; 35 cycles à 94°C pendant 30 s, 60°C pendant 90 s et 72°C pendant 1 min ; et une extension finale à 72 °C pendant 30 min. Après amplification, 2 µl de chaque produit de PCR ont été soumis à une électrophorèse avec une échelle de 100 pb sur un gel d'agarose à 2%. Lorsque l'amplification a été testée avec des échantillons de tissus de loups de sexe connu, elle a produit les deux fragments chez un mâle et un fragment de 185 pb chez une femelle.

2.4. Analyse des données

...

2.5. Test basé sur les SNP des hybrides loup-chien

Harmoinen et al. [46] ont développé un panel réduit de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) comprenant 93 marqueurs informatifs sur l'ascendance des loups et des chiens, dérivés de la puce Illumina CanineHD Whole-Genome BeadChip (174 K). **Ce panel a été spécialement conçu pour les échantillons non invasifs et a été sélectionné pour son fort pouvoir discriminant entre les loups et les chiens ainsi que leurs hybrides jusqu'à la troisième génération de rétrocroisement.**

Afin d'évaluer la précision de l'analyse microsatellite pour l'identification des hybrides, 30 échantillons d'ADN non invasifs de haute qualité provenant de loups de la région de Parnitha ont été génotypés à l'aide de ce panel de 93 SNP avec la technologie de puces microfluidiques

Standard BioTool v.9.3 (anciennement Fluidigm Corp., San Francisco, CA, États-Unis), testée sur des puces microfluidiques 96.96 Dynamic Arrays^{TMM} (Standard BioTools Inc., South San Francisco, CA, États-Unis) [47]. Une étape de préamplification multiplexée, connue sous le nom d'amplification ciblée spécifique (STA), avec un volume d'ADN accru et des cycles de STA-PCR, a été employée pour améliorer le taux d'amplification conformément au protocole amélioré pour le génotypage SNP, comme démontré dans von Thaden et al. [147].

Le logiciel NewHybrids 1.1 Beta 3 [48] a été appliqué à l'ensemble de données SNP afin d'attribuer les échantillons aux catégories d'hybrides récents (loup, chien, F1 et F2) et aux deux générations de rétrocroisement récentes (loup ou chien, respectivement), avec un burn-in de 250 000 pas, suivi de 250 000 balayages.

Pour une attribution correcte, 20 échantillons, provenant chacun de populations de loups Européens différentes – d'Europe centrale (CEP), de la Baltique (BALT), des Balkans dinariques (DIN) et des Carpates (CARP) – et 20 chiens de référence issus de diverses races courantes, à l'exclusion des races de chiens-loups, ont été utilisés. L'utilisation de références de loups identifiées génétiquement provenant de différentes populations Européennes a été recommandée afin de tenir compte de l'impact potentiel de la structure des populations au sein des loups Européens, susceptible de biaiser les probabilités d'attribution [8].

3. RESULTATS

3.1. Résultats du génotypage

Sur les 124 échantillons d'excréments prélevés dans la zone, seuls 57 échantillons (46%) ont satisfait au contrôle de qualité initial (amplification au moins sur un locus) et ont fait l'objet d'une amplification supplémentaire sur les autres loci. Quarante-six échantillons (37%) ont été génotypés presque intégralement et ont fait l'objet d'une analyse plus approfondie. Le taux moyen de perte d'allèles était de 2,3%, tandis que le taux moyen de faux allèles était de 0,3%. Le contenu moyen en information de polymorphisme (PIC) était de 0,55. La probabilité cumulative d'identité ($PID = 6,7 \times 10^{-15}$ et $PID\text{-sibs} = 7,3 \times 10^{-7}$) était considérablement faible, garantissant que les génotypes identiques correspondaient à des recaptures du même individu plutôt qu'à des individus distincts partageant le même génotype par hasard.

3.2. Estimations de la taille de la population et du rapport des sexes

À partir de 46 échantillons génotypés, 31 individus distincts ont été identifiés, fournissant un dénombrement minimal de la population de loups. Vingt-deux loups (71%) ont été capturés une fois, tandis que neuf loups (29%) ont été capturés entre deux et quatre fois, avec une moyenne de 1,42 capture par individu. Le N_e estimé à l'aide de l'ECM était de 57 loups (IC à 95% : 40-67), tandis que le TIRM a donné une estimation plus élevée de 76 individus (IC à 95% : 56-100). Les performances des deux modèles ont été comparées à l'aide du LRI, l'ECM offrant un meilleur ajustement ($LR = 8,79$, valeur $p = 0,18 > 0,1$). La valeur estimée de N_e selon la méthode du déséquilibre de liaison était de 12,5 (IC à 95% : 10,7-14,6), tandis que celle obtenue par la méthode de la fratrie était de 9 (IC à 95% : 6-10,2). Le sexe a été déterminé avec succès pour 65% des individus uniques, dont neuf ont été identifiés comme étant de sexe masculin et 13 comme étant de sexe féminin, ce qui a donné un rapport des sexes de 0,69.

3.3. Diversité génétique

Tous les loci analysés étaient polymorphiques, avec une moyenne de 4,35 allèles par locus (Tableau S1). L'hétérozygotie moyenne observée était de 0,55, tandis que l'hétérozygotie moyenne attendue était de 0,62. L'ensemble des données a montré un écart significatif par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (test multilocus), avec une valeur moyenne de F_{is} positive (0,11), ce qui reflétait un déficit en hétérozygotes. Les tests sur un seul locus ont détecté des écarts par rapport à l'HWE sur la moitié des loci microsatellites, tandis que seuls CPH4 et C466 présentaient un écart significatif dû à un excès d'hétérozygotes. Micro-Checker a détecté des allèles nuls potentiels sur deux loci, qui étaient les seuls à présenter des valeurs Full gonflées (VWF : 0,23, FH2361 : 0,25).

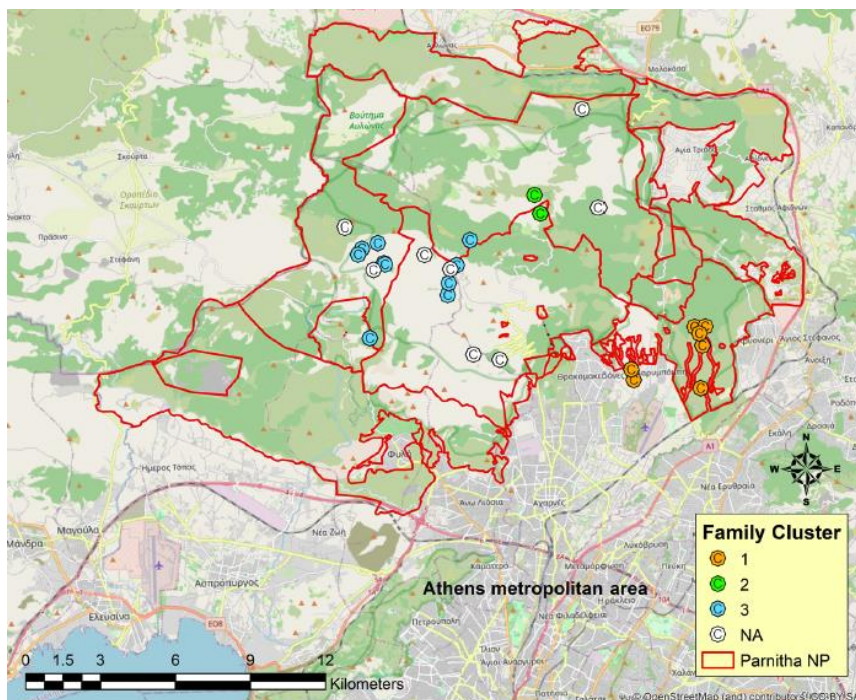


Figure 2. Répartition des meutes de loups dans la zone protégée de Parnitha. Chaque point représente un individu distinct. Les individus n'appartenant à aucun groupe sont indiqués en blanc (NA)

3.4. Fraternité et attribution de la filiation

L'analyse généalogique à l'aide de COLONY a révélé la présence de trois groupes familiaux distincts dans la zone d'étude (Figure 2). La principale unité familiale a été détectée dans la partie sud-est et se composait d'un couple reproducteur dominant, 05 (mâle) et 06 (femelle), ainsi que de leur progéniture : 01, 013, 015, 016 et 023. Le **deuxième groupe familial** a été identifié dans la partie centrale de la zone d'étude et se composait d'un couple parent-descendant, 010 étant désigné comme le père de 022. Les **relations parent-descendant** et entre frères et sœurs germains au sein de ces deux groupes ont également été confirmées par des estimations de parenté ($r = 0,4-0,6$). Un autre groupe familial a également été trouvé dans la zone d'étude principale, comprenant onze individus (03, 04, 07, 08, 018, 019, 024, 025, 026, 027 et 028). Parmi ceux-ci, un seul couple parent-descendant (08 en tant que mère de 019) a été détecté. Les individus de cette unité familiale élargie ont été considérés comme des parents au premier au troisième degré (c'est-à-dire parents-progéniture, frères et sœurs germains, demi-frères et demi-sœurs, grands-parents-petits-enfants, oncles et tantes, et cousins germains) sur la base des valeurs de parenté par paires ($r = 0,1-0,6$) obtenues à partir

de sept estimateurs utilisant COANCESTRY. Huit individus n'ont été affectés à aucun groupe, car aucune relation parentale ou de fratrie complète n'a été trouvée avec un membre des groupes définis. Trois individus ont été exclus avant l'analyse car ils avaient été génotypés sur 13 des 20 loci, ce qui pouvait masquer l'affectation correcte au pedigree.

3.5. Hybridation loup-chien

Quarante-cinq des 50 échantillons de tissus de loups de référence collectés de manière opportuniste au cours des 15 dernières années à travers la Grèce et les 50 échantillons de tissus de chiens de référence collectés sur le mont Parnitha ont été génotypés avec succès pour effectuer une analyse bayésienne STRUCTURE.

Selon la méthode d'Evanno ΔK , l'ensemble des données était le mieux représenté par deux groupes génétiques déduits ($K = 2$; Figure 3). Tous les chiens de référence ont été affectés à un seul groupe (d), avec une proportion d'appartenance moyenne de $Q_d = 0,98$ (intervalle de confiance = 0,921-0,995). Parmi les individus uniques identifiés dans la zone protégée du Parnitha, 31 ont été affectés au groupe w ($Q_w = 0,92$, intervalle de $q_w = 0,884-0,995$), tandis que deux ont révélé une ascendance canine avec une proportion d'appartenance presque égale à un ($q_d = 0,991$ et $0,995$), indiquant que ces deux échantillons appartenaient à des chiens, mais qu'ils avaient initialement été identifiés à tort comme des échantillons de loups. Le même résultat a été obtenu parmi les 45 loups de référence, où deux individus se sont également avérés être des chiens. La présence d'un individu dans l'ensemble de données de référence sur les loups, partiellement attribué aux deux groupes sur la base des microsatellites, avec une proportion individuelle de métissage de $q_w = 0,451$ et $q_d = 0,549$, revêtait une importance particulière, fournissant une preuve solide de l'existence d'un hybride loup-chien en Grèce appartenant probablement à la génération F1 [46].

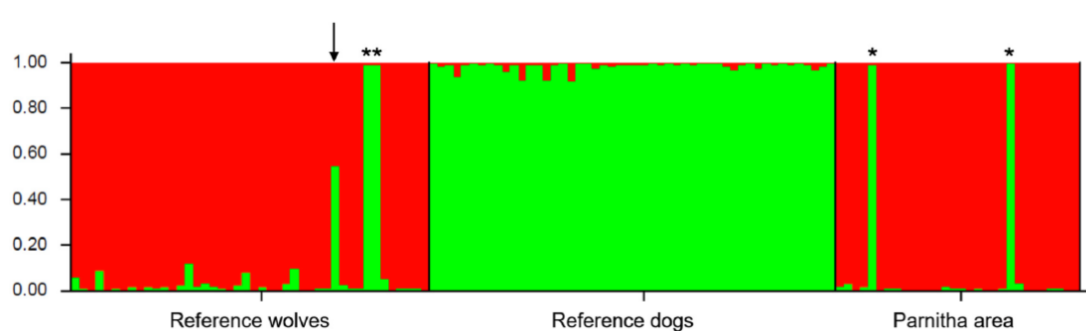


Figure 3. Diagramme à barres issu d'une analyse de clusters bayésienne réalisée dans STRUCTURE, montrant l'affectation génétique des individus à deux clusters déduits ($K = 2$). Chaque couleur correspond à un cluster, et chaque barre verticale correspond à un individu, les proportions de couleur indiquant la probabilité d'affectation (0-1) à chaque cluster. Les individus présentant des scores de métissage $q \geq 0,8$ ont été classés comme parentaux (loup ou chien), tandis que ceux présentant $q < 0,8$ ont été considérés comme métissés. Deux individus de la région de Parnitha et deux individus parmi les loups de référence, signalés par des **astérisques**, ont été identifiés comme des chiens, tandis qu'un individu issu des échantillons de loups de référence, signalé par une **flèche**, s'est avéré être un hybride F1 potentiel.

Afin de tester l'efficacité des loci microsatellites utilisés dans la présente étude pour détecter les hybrides loup-chien, le panel SNP réduit conçu par Harmoinen et al. [46] pour les échantillons non invasifs a été appliqué uniquement aux échantillons de Parnitha. **Ainsi**, sur la base du panel de 93 SNP, deux des 30 échantillons non invasifs de Parnitha n'ont pas pu être génotypés avec succès et ont donc été exclus de l'analyse ultérieure. Sur les 28 échantillons génotypés avec succès, 27 ont été regroupés en tant que loups purs, tandis qu'un

semblait être un rétrocroisement de deuxième génération avec un chien, bien qu'il ne puisse être exclu qu'il s'agisse d'un chien de race pure (Figure S3).

4. DISCUSSION

Dans le cadre de cette étude, un génotypage par microsatellites a été réalisé afin d'évaluer la situation des loups ayant recolonisé le mont Parnitha, en Grèce centrale, **en déterminant l'organisation familiale potentielle**, en identifiant les hybrides loup-chien potentiels **en raison de la proximité d'une zone à forte densité de population humaine et en estimant les principaux paramètres démographiques**. Nos résultats permettent de mieux comprendre l'état de conservation des loups présents dans la partie la plus méridionale de l'Europe.

4.1. Relations de parenté

L'analyse généalogique est un outil précieux pour la conservation des loups, car elle permet de retracer les lignées génétiques, d'identifier la consanguinité et d'évaluer l'efficacité des stratégies de gestion. Les généalogies ont montré que les loups étaient organisés en au moins trois unités familiales distinctes au sein de la zone d'étude. La présence permanente de trois meutes – une à la limite sud-est et deux dans la zone centrale d'étude – a déjà été confirmée par la détection de louveteaux dans ces deux zones à l'aide de pièges photographiques [49]. **En revanche**, les relations au sein du groupe familial élargi semblaient floues, reflétant une structure plus fragmentée. Les observations sur le terrain suggèrent que cette région pourrait servir de zone de chevauchement et de marquage territorial entre deux territoires de loups distincts, comme l'indique la forte densité d'excréments de loups. Les données télémétriques récentes sur les loups datant de 2025 viennent également étayer cette hypothèse. **De plus**, cette partie de Parnitha abrite la plus forte densité de cerfs élaphe, qui représentent près de 67% de la biomasse consommée par les loups dans la région de Parnitha [49]. Cela pourrait expliquer la présence accrue de loups dans le secteur central, même si de nombreux individus n'étaient pas étroitement apparentés. Il semble qu'en peu de temps, les loups aient réussi à former des unités de reproduction dans la région de Parnitha, et qu'ils ne puissent pas être considérés simplement comme un puits de population composé principalement de solitaires en dispersion.

4.2. Identification des hybrides

La présence de loups à proximité de la zone métropolitaine d'Athènes soulève des préoccupations supplémentaires concernant une hybridation potentielle avec des chiens domestiques. Le risque d'hybridation loup-chien est probablement plus prononcé dans les habitats où une petite population de loups ou quelques loups disperseurs en phase de recolonisation coexistent avec une importante population de chiens errants, en particulier sous une pression humaine intense telle que le braconnage qui détruit la structure de la meute [50].

Dans le cas de la région de Parnitha, l'analyse de cluster bayésienne n'a révélé aucun loup métissé parmi les 31 individus distincts détectés dans la zone. Étant donné qu'un ensemble nettement plus important de marqueurs microsatellites est nécessaire pour détecter de manière fiable les individus issus de rétrocroisement, un seuil de score de métissage prudent a été appliqué dans l'analyse de cluster bayésienne afin de minimiser le risque de classer à tort des individus parentaux purs comme hybrides [45]. Les individus présentant des scores de

métissage de $q \geq 0,8$ ont été classés comme parentaux (loup ou chien), tandis que ceux présentant des scores inférieurs ont été considérés comme métissés.

De plus, afin de valider l'absence d'hybrides dans la population de loups de Parnitha, un panel de 93 SNP a été utilisé, ce qui a permis de détecter un individu issu d'un rétrocroisement, classé comme un rétrocroisement de deuxième génération avec un chien (Figure S3). **Cependant**, étant donné que diverses races de chiens présentent un contenu intrinsèque de loup [51], cet individu était très probablement un chien domestique, un résultat également fortement corroboré par l'analyse microsatellite. Aucun autre hybride n'a été trouvé dans la population étudiée de la zone protégée de Parnitha sur la base de l'analyse SNP, confirmant ainsi les résultats de l'analyse microsatellite et étayant l'absence d'événements d'hybridation récents dans la région. L'absence d'hybrides pourrait être liée à la protection stricte de la zone, qui limite la présence de chiens en liberté et les perturbations humaines. **En conséquence**, les loups conservent une structure sociale stable et se nourrissent principalement d'ongulés sauvages, le cerf élaphe et le sanglier représentant respectivement 67% et 14% de la biomasse consommée [49]. De telles conditions minimisent les rencontres et les opportunités de reproduction avec des chiens errants, malgré leur présence dans les zones environnantes, réduisant ainsi la probabilité d'hybridation [46].

Bien qu'aucun hybride n'ait été détecté dans la région de Parnitha, un hybride loup-chien potentiel a été détecté au sein de la population de référence de loups Grecs, composée d'individus répartis dans toute la Grèce. Cet individu se trouvait dans le nord de la Grèce, dans une zone présentant localement des densités plus élevées de chiens en liberté et un statut de protection moins strict, ce qui pourrait être associé à des événements d'hybridation plus fréquents. Cette observation est corroborée par les enregistrements des pièges photographiques, qui montrent que quatre des onze meutes de loups détectées comprenaient des individus présentant des traits morphologiques atypiques [52]. Il convient toutefois de noter ici qu'il existe un risque d'identification erronée d'hybride si un immigrant issu d'une population voisine n'est pas représenté dans les populations de référence de loups [53]. L'inclusion future d'échantillons de référence provenant d'autres populations de loups des Dinarides et des Balkans pourrait aider à éviter d'identifier à tort les immigrants comme ayant des ancêtres canins.

4.3. Taille de la population de loups dans la région de Parnitha

L'estimation de la taille de la population de loups est cruciale car elle aide à comprendre les relations prédateur-proie. En particulier dans le cas de la région de Parnitha, où le cerf élaphe est considéré comme en danger critique d'extinction et où la taille de la population de loups influe sur la dynamique de la population de cerfs élaphe, la compréhension de cette relation est vitale pour la gestion des deux espèces. La taille de la population de loups a été estimée à 57 individus (IC à 95% : 40-67) à l'aide de l'ECM ou à 76 individus (IC à 95% : 56-100) à l'aide du TIRM. Quel que soit le modèle utilisé, la taille et la densité de la population de loups sont considérées comme extrêmement élevées. Les raisons sont liées aux conditions dans lesquelles les loups ont recolonisé le mont Parnitha. La réapparition de l'espèce après 60 ans d'absence a coïncidé avec une période (2011-2014) où la population de cerfs élaphe a explosé à la suite des incendies de forêt de 2007, qui ont créé un habitat de pâturage plus propice pour les cerfs élaphe. La population minimale de cerfs élaphe a été estimée à 1 000 individus [17] ; il existe donc une très forte densité d'individus naïfs face à la prédation. **Parallèlement**,

la zone est bien protégée et le braconnage des loups est rare. La combinaison de sources de nourriture abondantes (cerfs élaphe, sangliers et animaux domestiques) et de l'absence de braconnage systématique a rapidement conduit à la formation de grandes meutes, dont la taille était adaptée à la chasse de proies de grande taille. D'autre part, l'absence de mortalité due à l'homme a permis de maintenir cette structure et cette densité de population. Même si la zone protégée de Parnitha est très proche de la capitale Grecque, elle forme essentiellement un système naturel où la taille de la population de loups est régulée en fonction de la biomasse alimentaire disponible.

Il convient de mentionner ici qu'il existe des aspects techniques susceptibles d'améliorer la précision de l'estimation de la taille de la population. **Premièrement**, le taux moyen de recapture était inférieur au seuil minimum recommandé, qui garantit des estimations fiables et précises de la taille de la population [41]. Un facteur susceptible d'influencer le taux de recapture est la saison d'échantillonnage. Afin d'atteindre une moyenne de plus de deux captures par individu, les relevés sur le terrain devraient être intensifiés en automne, en hiver et au début du printemps, lorsque les températures sont plus basses qu'en été [54]. D'autre part, la méthode de conservation est cruciale pour améliorer le taux de réussite de l'amplification par PCR et la précision du génotypage, ce qui peut en fin de compte contribuer à augmenter les taux de recapture [55]. À l'exception de l'éthanol à haute concentration, couramment utilisé pour conserver les échantillons de crottes de loup [29,56-58], un milieu de stockage alternatif tel que le tampon DET, qui minimise la dégradation enzymatique de l'ADN nucléaire [59], pourrait permettre d'obtenir un meilleur taux de réussite de l'amplification par PCR. De plus, la précision des estimations génétiques de la taille de la population pourrait également être améliorée en augmentant l'effort d'échantillonnage [54], par exemple en collectant 2,5 à 3 fois plus d'échantillons que le nombre supposé d'individus dans la population examinée [60]. Dans ce cas, il est recommandé de procéder à une estimation préliminaire de la taille de la population avant de mettre en œuvre des méthodes de CR génétique, en utilisant des méthodes alternatives non invasives et moins coûteuses, telles que le piégeage photographique pour le comptage de la taille minimale de la population ou en combinaison avec des modèles de rencontre aléatoire (REM) [61].

4.4. Niveaux de diversité génétique

La diversité génétique, mesurée par l'hétérozygotie observée et attendue, est un indicateur clé — au même titre que la taille de la population — du potentiel évolutif d'une population, lui permettant de s'adapter aux défis environnementaux. Une faible hétérozygotie est souvent associée à des **goulots d'étranglement** ou à des **effets de fondateur** dans les populations petites ou isolées, ce qui peut augmenter le risque de consanguinité et réduire la valeur sélective de la population [62]. Les valeurs d'hétérozygotie relativement faibles, ainsi que les valeurs de population effective observées dans la population de loups de Parnitha, s'expliquent par le petit nombre d'individus installés dans la région de Parnitha et s'organisant par la suite en quelques meutes [18,19]. De faibles niveaux de diversité génétique ont également été signalés dans d'autres populations de loups recolonisées subissant l'effet fondateur [57,63]. Ces paramètres ne seront utiles pour comprendre les processus démographiques à long terme que lorsque des données de suivi supplémentaires seront systématiquement disponibles.

La structure familiale peut influencer à la fois les valeurs d'hétérozygotie et l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE), ce qui a également été le cas dans la présente étude. Dans la plupart des études sur les loups rapportées, on observe une tendance générale à s'écarter de l'équilibre de Hardy-Weinberg [57,58,64]. Cette tendance est généralement attribuée à l'effet Wahlund, qui se produit lorsque des sous-structures cachées existent au sein d'une population, telles que les unités familiales dans le cas des loups [64]. L'effet Wahlund peut entraîner un excès d'homozygotes et un F_{is} positif, ce qui peut être interprété à tort comme un signe de reproduction assortative si aucune analyse complémentaire n'est effectuée [65]. Afin de déterminer si l'écart manifeste par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg résultait de la structure de la meute, une analyse bayésienne STRUCTURE (Figure S1) et une PCoA (Figure S2) ont été réalisées, indiquant toutes deux l'existence de deux sous-populations génétiquement distinctes. La sous-population A, située à l'extrémité sud-est de la zone d'étude, était entièrement composée de sept individus, tous apparentés au premier degré, tandis que la sous-population B comprenait 21 individus apparentés du premier au troisième degré. Lorsque l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé au sein de chaque sous-population, aucun écart significatif n'a été constaté dans la sous-population A, et seuls 30% des loci microsatellites présentaient un écart dans la sous-population B. De plus, les valeurs moyennes de H_o et H_e ne différaient pas de manière significative dans l'une ou l'autre sous-population (A : $H_o = 0,52$, $H_e = 0,46$, valeur $p = 0,084$; B : $H_o = H_e = 0,57$, valeur $p = 0,9$; test t bilatéral, $\alpha = 0,05$). La valeur F_{ST} par paires de 0,17 indiquait une forte différenciation génétique entre les deux sous-populations, ce qui corrobore davantage l'hypothèse selon laquelle le déficit en hétérozygotes au niveau de la population était probablement dû à l'effet Wahlund.

5. Conclusions

Cette étude fournit les premiers aperçus génétiques sur la population de loups récemment établie dans la zone protégée de Parnitha. Une taille minimale de population de 31 loups, organisés en au moins trois meutes, a été identifiée. Un échantillonnage génétique plus rigoureux est nécessaire pour comprendre la structure sociale d'une zone présentant une densité de loups aussi élevée. L'absence d'hybrides pourrait indiquer que l'hybridation entre loups et chiens ne se produit pas nécessairement dans les environnements périurbains récemment recolonisés du sud de l'Europe, ce qui constitue un résultat encourageant et souligne l'importance des zones protégées bien gérées en tant que bastions génétiques de la population de loups. Les recherches futures devront vérifier cette hypothèse en incluant davantage de zones d'échantillonnage dans les zones protégées par rapport aux zones dominées par l'homme. D'autre part, l'identification d'un possible hybride F1 loup-chien dans le nord de la Grèce souligne la nécessité d'étudier plus en profondeur les événements de métissage, en particulier dans les zones présentant un nombre élevé d'individus aux traits morphologiques atypiques, comme l'indique une étude récente menée dans la péninsule Italienne où les événements d'hybridation atteignent près de 50% [66]. Une surveillance génétique non invasive continue, combinée à des méthodes de terrain standard, est essentielle pour détecter les changements démographiques et les premiers signes potentiels d'hybridation. Ces efforts contribuent à l'élaboration de stratégies efficaces pour répondre aux défis croissants de la coexistence entre l'homme et le loup dans les zones périurbaines.

References

1. Chapron, G.; Kaczensky, P.; Linnell, J.D.C.; Von Arx, M.; Huber, D.; Andr n, H.; L pez-Bao, J.V.; Adamec, M.;  lvares, F.; Anders, O.; et al. Recovery of Large Carnivores in Europe’s Modern Human-Dominated Landscapes. *Science* 2014, 346, 1517–1519. [[CrossRef](#)]
2. Khorozyan, I.; Heurich, M. Large-Scale Sheep Losses to Wolves (*Canis lupus*) in Germany Are Related to the Expansion of the Wolf Population but Not to Increasing Wolf Numbers. *Front. Ecol. Evol.* 2022, 10, 778917. [[CrossRef](#)]
3. Ruid, D.B.; Paul, W.J.; Roell, B.J.; Wydeven, A.P.; Willging, R.C.; Jurewicz, R.L.; Lonsway, D.H. Wolf–Human Conflicts and Management in Minnesota, Wisconsin, and Michigan. In *Recovery of Gray Wolves in the Great Lakes Region of the United States*; Wydeven, A.P., Van Deelen, T.R., Heske, E.J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 279–295.
4. Chapron, G.; Wikenros, C.; Liberg, O.; Wabakken, P.; Flagstad,  .; Milleret, C.; M nsson, J.; Svensson, L.; Zimmermann, B.;  kesson, M.; et al. Estimating Wolf (*Canis lupus*) Population Size from Number of Packs and an Individual Based Model. *Ecol. Model.* 2016, 339, 33–44. [[CrossRef](#)]
5. Galaverni, M.; Caniglia, R.; Fabbri, E.; Milanese, P.; Randi, E. One, No One, or One Hundred Thousand: How Many Wolves Are There Currently in Italy? *Mammal Res.* 2016, 61, 13–24. [[CrossRef](#)]
6. Hausknecht, R.; Gula, R.; Pirga, B.; Kuehn, R. Urine—A Source for Noninvasive Genetic Monitoring in Wildlife. *Mol. Ecol. Notes* 2007, 7, 208–212. [[CrossRef](#)]
7. Marucco, F.; Boiani, M.V.; Dupont, P.; Milleret, C.; Avanzinelli, E.; Pilgrim, K.; Schwartz, M.K.; Von Hardenberg, A.; Perrone, D.S.; Friard, O.P.; et al. A Multidisciplinary Approach to Estimating Wolf Population Size for Long-term Conservation. *Conserv. Biol.* 2023, 37, e14132. [[CrossRef](#)]
8. Stronen, A.V.; Aspi, J.; Caniglia, R.; Fabbri, E.; Galaverni, M.; Godinho, R.; Kvist, L.; Mattucci, F.; Nowak, C.; Von Thaden, A.; et al. Wolf-Dog Admixture Highlights the Need for Methodological Standards and Multidisciplinary Cooperation for Effective Governance of Wild x Domestic Hybrids. *Biol. Conserv.* 2022, 266, 109467. [[CrossRef](#)]
9. Bergstr m, A.; Stanton, D.W.G.; Taron, U.H.; Frantz, L.; Sinding, M.-H.S.; Ersmark, E.; Pfrengle, S.; Cassatt-Johnstone, M.; Lebrasseur, O.; Girdland-Flink, L.; et al. Grey Wolf Genomic History Reveals a Dual Ancestry of Dogs. *Nature* 2022, 607, 313–320. [[CrossRef](#)]
10. Hare, B.; Brown, M.; Williamson, C.; Tomasello, M. The Domestication of Social Cognition in Dogs. *Science* 2002, 298, 1634–1636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Wayne, R.K.; Ostrander, E.A. Lessons Learned from the Dog Genome. *Trends Genet.* 2007, 23, 557–567. [[CrossRef](#)]
12. Randi, E. Detecting Hybridization between Wild Species and Their Domesticated Relatives. *Mol. Ecol.* 2008, 17, 285–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Smith, L.M.; Goold, C.; Quinnell, R.J.; Munteanu, A.M.; Hartmann, S.; Dalla Villa, P.; Collins, L.M. Population Dynamics of Free-Roaming Dogs in Two European Regions and Implications for Population Control. *PLoS ONE* 2022, 17, e0266636. [[CrossRef](#)]
14. Kaczensky, P.; Ranc, N.; Hatlauf, J.; Payne, J.C.; Acosta-Pankov, L.;  lvares, F.; Andr n, H.; Andri, P.; Aragno, P.; Avanzinelli, E.; et al. Large Carnivore Distribution Maps and Population Updates 2017–2022/23. In *Report to the European Commission Under Contract N  09.0201/2023/907799/SER/ENV.D.3 “Support for Coexistence with Large Carnivores”, “B.4 Update of the Distribution Maps”*; IUCN/SSC Large Carnivore Initiative for Europe (LCIE) and Istituto Di Ecologia Applicata (IEA): Rome, Italy, 2024.
15. Iliopoulos, Y. *Wolf Distribution, Population Estimation, and Population Trends in Greece*; LIFE NAT97 “WOLF” project. ARCTUROS; unpublished work; General Directorate of Forests and Forest Environment: Thessaloniki, Greece, 1999.
16. Aplada, E.; Tiniakou, A.; Theocharopoulos, M. Phytogeography and Ecological Evaluation of the Flora and Vegetation of Mt Parnitha (Attica, Greece). *Edinb. J. Bot.* 2007, 64, 185–207. [[CrossRef](#)]
17. Karaiskou, N.; Tsakogiannis, A.; Gkagkavouzis, K.; Operator of Parnitha National Park; Papika, S.; Latsoudis, P.; Kavakiotis, I.; Pantis, J.; Abatzopoulos, T.J.; Triantaphyllidis, C.; et al. Greece: A Balkan Subrefuge for a Remnant Red Deer (*Cervus elaphus*) Population. *J. Hered.* 2014, 105, 334–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Iliopoulos, Y. *Progress Report on Wolf Recolonization in Parnitha Protected Area for EU 92/43 Habitats Directive Species Monitoring Under Article 17*; Unpublished Work; Callisto NGO: Thessaloniki, Greece, 2014.

19. Giannatos, G.; Bogdanowicz, W.; Linardaki, I.; Panagiotopoulou, H.; Patrzyk, M.; Siekiera, A.; Ioannidis, I.; Reppa, C.; Alivizatos, C.; Gourlas, K.; et al. *Monitoring of Wolf Presence, Activity Patterns and Predation on Autochthonous Red Deer (Cervus elaphus) in Parnitha National Park, Greece; Unpublished Work*; Biosfaira NGO: Athens, Greece, 2019.
20. Christopoulou, A.; Kazanis, D.; Fyllas, N.; Arianoutsou, M. Post-Fire Recovery of Abies Cephalonica Forest Communities: The Case of Mt Parnitha National Park, Attica, Greece. *IForest-Biogeosci. For.* **2018**, *11*, 757–764. [[CrossRef](#)]
21. Ciucci, P.; Boitani, L.; Pelliccioni, E.R.; Rocco, M.; Guy, I. A Comparison of Scat-analysis Methods to Assess the Diet of the Wolf *Canis lupus*. *Wildl. Biol.* **1996**, *2*, 37–48. [[CrossRef](#)]
22. Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B.K. *Molecular Systematics*, 2nd ed.; Sinauer: Sunderland, UK, 1996.
23. Francisco, L.V.; Langsten, A.A.; Mellersh, C.S.; Neal, C.L.; Ostrander, E.A. A Class of Highly Polymorphic Tetranucleotide Repeats for Canine Genetic Mapping. *Mamm. Genome* **1996**, *7*, 359–362. [[CrossRef](#)]
24. Ostrander, E.A.; Sprague, G.F.; Rine, J. Identification and Characterization of Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog. *Genomics* **1993**, *16*, 207–213. [[CrossRef](#)]
25. Fredholm, M.; Winterø, A.K. Variation of Short Tandem Repeats within and between Species Belonging to the Canidae Family. *Mamm. Genome* **1995**, *6*, 11–18. [[CrossRef](#)]
26. Shibuya, H.; Collins, B.K.; Huang, T.H.; Johnson, G.S. A Polymorphic (AGGAAT)_n Tandem Repeat in an Intron of the Canine von Willebrand Factor Gene. *Anim. Genet.* **1994**, *25*, 122. [[CrossRef](#)]
27. Van Asch, B.; Alves, C.; Gusmão, L.; Pereira, V.; Pereira, F.; Amorim, A. A New Autosomal STR Nineplex for Canine Identification and Parentage Testing. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 417–423. [[CrossRef](#)]
28. Taberlet, P. Reliable Genotyping of Samples with Very Low DNA Quantities Using PCR. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3189–3194. [[CrossRef](#)]
29. Adams, J.R.; Waits, L.P. An Efficient Method for Screening Faecal DNA Genotypes and Detecting New Individuals and Hybrids in the Red Wolf (*Canis rufus*) Experimental Population Area. *Conserv. Genet.* **2006**, *8*, 123–131. [[CrossRef](#)]
30. Van Asch, B.; Alves, C.; Santos, L.; Pinheiro, R.; Pereira, F.; Gusmão, L.; Amorim, A. Genetic Profiles and Sex Identification of Found-Dead Wolves Determined by the Use of an 11-Loci PCR Multiplex. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2010**, *4*, 68–72. [[CrossRef](#)]
31. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647–1649. [[CrossRef](#)]
32. McKelvey, K.S.; Schwartz, M.K. DROPOUT: A Program to Identify Problem Loci and Samples for Noninvasive Genetic Samples in a Capture-mark-recapture Framework. *Mol. Ecol. Notes* **2005**, *5*, 716–718. [[CrossRef](#)]
33. Waits, L.P.; Luikart, G.; Taberlet, P. Estimating the Probability of Identity among Genotypes in Natural Populations: Cautions and Guidelines. *Mol. Ecol.* **2001**, *10*, 249–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kalinowski, S.T.; Taper, M.L.; Marshall, T.C. Revising How the Computer Program CERVUS Accommodates Genotyping Error Increases Success in Paternity Assignment. *Mol. Ecol.* **2007**, *16*, 1099–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Park, S.D.E. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Ph.D. Thesis, Trinity College, Dublin, Ireland, 2001.
36. Raymond, M.; Rousset, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* **1995**, *86*, 248–249. [[CrossRef](#)]
37. Goudet, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J. Hered.* **1995**, *86*, 485–486. [[CrossRef](#)]
38. Do, C.; Waples, R.S.; Peel, D.; Macbeth, G.M.; Tillett, B.J.; Ovenden, J.R. NeEstimator v2: Re-implementation of Software for the Estimation of Contemporary Effective Population Size (Ne) from Genetic Data. *Mol. Ecol. Resour.* **2014**, *14*, 209–214. [[CrossRef](#)]
39. Jones, O.R.; Wang, J. COLONY: A Program for Parentage and Sibship Inference from Multilocus Genotype Data. *Mol. Ecol. Resour.* **2010**, *10*, 551–555. [[CrossRef](#)]
40. Peakall, R.; Smouse, P.E. GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research—An Update. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2537–2539. [[CrossRef](#)]
41. Miller, C.R.; Joyce, P.; Waits, L.P. A New Method for Estimating the Size of Small Populations from Genetic Mark-Recapture Data. *Mol. Ecol.* **2005**, *14*, 1991–2005. [[CrossRef](#)]
42. Wang, J. COANCESTRY: A Program for Simulating, Estimating and Analysing Relatedness and Inbreeding Coefficients. *Mol. Ecol. Resour.* **2011**, *11*, 141–145. [[CrossRef](#)]
43. Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **2000**, *155*, 945–959. [[CrossRef](#)]
44. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software STRUCTURE: A Simulation Study. *Mol. Ecol.* **2005**, *14*, 2611–2620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. McFarlane, S.E.; Pemberton, J.M. Detecting the True Extent of Introgression during Anthropogenic Hybridization. *Trends Ecol. Evol.* **2019**, *34*, 315–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Harmoinen, J.; Von Thaden, A.; Aspi, J.; Kvist, L.; Cocchiara, B.; Jarausch, A.; Gazzola, A.; Sin, T.; Lohi, H.; Hytönen, M.K.; et al. Reliable Wolf-Dog Hybrid Detection in Europe Using a Reduced SNP Panel Developed for Non-Invasively Collected Samples. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Von Thaden, A.; Cocchiara, B.; Jarausch, A.; Jüngling, H.; Karamanlidis, A.A.; Tiesmeyer, A.; Nowak, C.; Muñoz-Fuentes, V. Assessing SNP Genotyping of Noninvasively Collected Wildlife Samples Using Microfluidic Arrays. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10768. [[CrossRef](#)]
48. Anderson, E.C.; Thompson, E.A. A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data. *Genetics* **2002**, *160*, 1217–1229. [[CrossRef](#)]
49. Iliopoulos, Y.; Antoniadis, E.; Bartzokas, G.; Theodosiadis, E.; Ioakeimidou, A.; Borboudakis, D.; Nestoridis, G.; Petridou, M.; Goudeli, G.; Karaiskou, N. Wolf and Red Deer Population Size Estimations (2022–2023), Red Deer Habitat Use and Wolf Predatory Behavior in Parnitha Protected Area. In *Summary of the Current Situation and Proposals for Management Measures to Enhance the Viability of the Red Deer Population*; unpublished work; Callisto NGO: Thessaloniki, Greece, 2025.
50. Hindrikson, M.; Männil, P.; Ozolins, J.; Krzywinski, A.; Saarma, U. Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46465. [[CrossRef](#)]
51. Fan, Z.; Silva, P.; Gronau, I.; Wang, S.; Armero, A.S.; Schweizer, R.M.; Ramirez, O.; Pollinger, J.; Galaverni, M.; Ortega Del-Vecchio, D.; et al. Worldwide Patterns of Genomic Variation and Admixture in Gray Wolves. *Genome Res.* **2016**, *26*, 163–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Iliopoulos, Y.; Antoniadis, E.; Ioakeimidou, A.; Psaralexi, M.; Pasios, F. Preliminary Research on the Management of Emergency Incidents: Wolf-Human Conflicts in Areas under the Responsibility of the Thermaikos Gulf Management Authority. In *Research Findings and Proposed Mitigation Measures; Operational Programme “Transport Infrastructure, Environment and Sustainable Development”*; unpublished work; Callisto NGO: Thessaloniki, Greece, 2022.
53. Stronen, A.V.; Mattucci, F.; Fabbri, E.; Galaverni, M.; Cocchiara, B.; Nowak, C.; Godinho, R.; Ruiz-González, A.; Kusak, J.; Skrbinšek, T.; et al. A Reduced SNP Panel to Trace Gene Flow across Southern European Wolf Populations and Detect Hybridization with Other Canis Taxa. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 4195. [[CrossRef](#)]
54. Marucco, F.; Boitani, L.; Pletscher, D.H.; Schwartz, M.K. Bridging the Gaps between Non-Invasive Genetic Sampling and Population Parameter Estimation. *Eur. J. Wildl. Res.* **2011**, *57*, 1–13. [[CrossRef](#)]
55. Panasci, M.; Ballard, W.B.; Breck, S.; Rodriguez, D.; Densmore, L.D.; Wester, D.B.; Baker, R.J. Evaluation of Fecal DNA Preservation Techniques and Effects of Sample Age and Diet on Genotyping Success. *J. Wildl. Manag.* **2011**, *75*, 1616–1624. [[CrossRef](#)]
56. Moura, A.E.; Tsingarska, E.; Dąbrowski, M.J.; Czarnomska, S.D.; Jędrzejewska, B.; Pilot, M. Unregulated Hunting and Genetic Recovery from a Severe Population Decline: The Cautionary Case of Bulgarian Wolves. *Conserv. Genet.* **2014**, *15*, 405–417. [[CrossRef](#)]
57. Fabbri, E.; Miquel, C.; Lucchini, V.; Santini, A.; Caniglia, R.; Duchamp, C.; Weber, J.; Lequette, B.; Marucco, F.; Boitani, L.; et al. From the Apennines to the Alps: Colonization Genetics of the Naturally Expanding Italian Wolf (*Canis lupus*) Population. *Mol. Ecol.* **2007**, *16*, 1661–1671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Lucchini, V.; Galov, A.; Randi, E. Evidence of Genetic Distinction and Long-term Population Decline in Wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol. Ecol.* **2004**, *13*, 523–536. [[CrossRef](#)]
59. Wulsch, C.; Waits, L.P.; Hallerman, E.M.; Kelly, M.J. Optimizing Collection Methods for Noninvasive Genetic Sampling of Neotropical Felids. *Wildl. Soc. Bull.* **2015**, *39*, 403–412. [[CrossRef](#)]
60. Solberg, K.H.; Bellemain, E.; Drageset, O.-M.; Taberlet, P.; Swenson, J.E. An Evaluation of Field and Non-Invasive Genetic Methods to Estimate Brown Bear (*Ursus arctos*) Population Size. *Biol. Conserv.* **2006**, *128*, 158–168. [[CrossRef](#)]
61. Kavčić, K.; Palencia, P.; Apollonio, M.; Vicente, J.; Šprem, N. Random Encounter Model to Estimate Density of Mountain-Dwelling Ungulate. *Eur. J. Wildl. Res.* **2021**, *67*, 87. [[CrossRef](#)]
62. Reed, D.H.; Frankham, R. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conserv. Biol.* **2003**, *17*, 230–237. [[CrossRef](#)]
63. Jarausch, A.; Harms, V.; Kluth, G.; Reinhardt, I.; Nowak, C. How the West Was Won: Genetic Reconstruction of Rapid Wolf Recolonization into Germany’s Anthropogenic Landscapes. *Heredity* **2021**, *127*, 92–106. [[CrossRef](#)]
64. Pilot, M.; Jędrzejewski, W.; Branicki, W.; Sidorovich, V.E.; Jędrzejewska, B.; Stachura, K.; Funk, S.M. Ecological Factors Influence Population Genetic Structure of European Grey Wolves. *Mol. Ecol.* **2006**, *15*, 4533–4553. [[CrossRef](#)]
65. Hindrikson, M.; Remm, J.; Pilot, M.; Godinho, R.; Stronen, A.V.; Baltrūnaitė, L.; Czarnomska, S.D.; Leonard, J.A.; Randi, E.; Nowak, C.; et al. Wolf Population Genetics in Europe: A Systematic Review, Meta-analysis and Suggestions for Conservation and Management. *Biol. Rev.* **2017**, *92*, 1601–1629. [[CrossRef](#)]
66. Lorenzini, R.; Pizzarelli, A.; Attili, L.; Biagetti, M.; Sebastiani, C.; Ciucci, P. Genetic Evidence Reveals Extensive Wolf-Dog Hybridisation in Peninsular Italy: Warnings against Ineffective Management. *Biol. Conserv.* **2026**, *313*, 111615. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.