

Différenciation génétique de la population de loups gris (*Canis lupus* L.) des Balkans et des Carpates

Balkan Journal of Wildlife Research

2014, vol. 1, iss. 1, pp.87-93

Special issue

ISSN: 2335-0113

Original scientific paper

UDC: 599:575

DOI: <http://dx.doi.org/10.15679/bjwr.v1i1.17>

GENETIC DIFFERENTIATION OF GREY WOLF POPULATION (CANIS LUPUS L.) FROM BALKAN AND CARPATHIANS

Bakan, J.¹, Lavadinović, V.², Popović, Z.³, Paule, L.,¹

Résumé

La différenciation génétique des populations de loups gris (*Canis lupus*) des Balkans (Serbie et Bulgarie) et des Carpates occidentales a été étudiée à l'aide d'échantillons de tissus et d'os provenant de loups chassés légalement. Au total, 339 échantillons de tissus et d'os et un petit nombre d'échantillons d'aliments, de sang et d'urine ont été utilisés. Le génotypage était basé sur 15 microsatellites de l'ADN nucléaire. La différenciation génétique a été étudiée à l'aide d'une approche bayésienne (logiciel STRUCTURE). Les résultats obtenus ont montré la différenciation entre les populations des Balkans et des Carpates, ainsi qu'entre la population Bulgare et les deux populations de Serbie et de Slovaquie. **Il y a des indications de migration vers l'ouest.** Bien que ces résultats soient basés sur les marqueurs nucléaires, il serait conseillé de réanalyser les échantillons en utilisant les marqueurs de l'ADNmt.

INTRODUCTION

Bien que le loup gris (*Canis lupus*, L.) fascine les humains, sa concurrence avec les hommes a conduit à une chasse excessive et à un déclin de la population qui a même amené l'espèce au bord de l'extinction dans certaines parties de l'Europe. Cette tendance négative s'est traduite par plusieurs populations de loups isolées dans les péninsules Ibérique, Apennine et Balkanique ainsi que dans les régions orientales de l'Europe. Néanmoins, la sensibilisation récente des Européens à l'environnement a soutenu les efforts des gestionnaires de la faune et des scientifiques pour rétablir l'abondance des loups. Les loups ont pu se répandre à nouveau dans les zones appropriées du nord et du centre de la Slovaquie, tandis que leur nombre s'est stabilisé en Bulgarie et en Serbie.

Plusieurs auteurs (Rueness et al. 2003 ; Dalén et al. 2005) ont constaté que les carnivores à large distribution, comme les loups, ont des structures génétiques cryptiques qui ne peuvent être décrites par des facteurs géographiques ou historiques. La mobilité des loups n'est pas limitée par les types de paysages, les barrières naturelles et artificielles, mais plus probablement par certains facteurs écologiques qui pourraient restreindre les migrations et, dans certains cas, conduire à l'isolement. Ainsi, ces dernières années, la phylogéographie du loup en Europe est devenue un sujet de recherche courant. Selon Pilot et al. (2010), les haplotypes Européens du loup appartiennent à deux grands haplogroupes qui diffèrent entre le sud-ouest de l'Europe (péninsule Ibérique et péninsule des Apennins) et l'Europe de l'Est (Balkans, Europe de l'Est et du Sud-Est). Les mêmes auteurs ont trouvé des différences

phylogéographiques entre les populations des plaines du nord et les populations des montagnes du sud de l'Europe. Le défaut de ce travail est l'insuffisance de matériel expérimental provenant de l'ensemble de la chaîne des Carpates, à l'exception du sud de la Pologne et des Balkans.

L'objectif de cette étude est de comparer la diversité génétique de deux populations de loups - celle des Balkans, représentée par l'échantillon de loups de Serbie, et celle des Carpates, représentée par l'échantillon de loups de Slovaquie, le groupe le plus à l'ouest des Carpates. Ces deux populations seront comparées à l'échantillon de Bulgarie, qui pourrait être une source possible de flux génétique vers l'ouest des Balkans et/ou l'Europe centrale.

MATERIEL ET METHODE

Au total, 339 échantillons d'os, de peau, de tissus, de fèces, de sang et d'urine de loups gris (*Canis lupus*, L.) ont été prélevés en Slovaquie (194), en Serbie (120) et en Bulgarie (25). Les échantillons de tissus et de fèces ont été conservés dans de l'éthanol à 96% dans un réfrigérateur à une température de ± 4 °C. Les échantillons de neige, de sang et d'urine ont été conservés au congélateur à une température de -20 °C. Les échantillons d'os et de peaux ont été conservés au congélateur. Les échantillons d'os et de peau ont été conservés dans une enveloppe en papier ou dans des microtubes à la température ambiante.

...

RESULTATS

Pour l'analyse de la fragmentation, 15 loci microsatellites de l'ADN nucléaire ont été utilisés. Sur l'ensemble du matériel, nous avons trouvé 187 allèles, le nombre d'allèles par locus variant entre 8 et 19. Le nombre d'allèles privés est assez élevé pour les populations individuelles - Slovaquie 30, Serbie - 8 et Bulgarie - 6.

Les **Tableaux 1 et 2** donnent un aperçu des caractéristiques génétiques de l'ensemble de la population et des sous-populations individuelles. Comme le montrent les **deux Tableaux**, il existe une différence entre les hétérozygoties observées et les hétérozygoties attendues, ce qui a entraîné des valeurs significatives des indices de fixation, ce qui signifie un manque d'hétérozygotes. **Le manque général d'hétérozygotes pourrait s'expliquer par la structure des populations ainsi que par les populations fragmentées.**

En comparant la différenciation génétique des **trois populations étudiées**, nous avons trouvé des différences significatives entre la population Bulgare et les populations Slovaque et Serbe, alors que les différences entre les populations Serbe et Slovaque n'étaient pas aussi marquées. Il existe toujours un flux génétique le long de la péninsule Balkanique, de la Bulgarie vers l'ouest, mais principalement en direction de la population Serbe (**Figure 1**). En ce qui concerne les loci individuels, la plupart d'entre eux permettent d'estimer la différenciation entre les populations, mesurée par les caractéristiques F_{ST} (**Figure 2**).

Les résultats de l'analyse STRUCTURE montrent qu'à $k = 2$, les données sont divisées en deux groupes différents - celui des Balkans et celui des Carpates, bien qu'au sein des groupes des Carpates, plusieurs individus appartiendraient au groupe des Balkans et vice-versa. À $k = 3$, le groupe d'individus Bulgares diffère du groupe Serbe. Cependant, de nombreux individus

visibles pourraient être des migrants des Balkans orientaux, à la fois dans la population Serbe et dans celle des Carpates.

Tableau 1. Caractéristiques génétiques globales de la population dans les loci étudiés

Loci	H_o	H_e	F_{is}	F_{st}
CPH12	0.5290	0.6690	0.2067	0.0710
CPH5	0.5320	0.6152	0.1118	0.0670
CPH7	0.5410	0.7348	0.2615	0.0900
CPH8	0.5860	0.8373	0.2858	0.1330
CPH9	0.6400	0.8020	0.1666	0.0890
FH2010	0.5910	0.7931	0.2689	0.1120
FH2145	0.4280	0.8191	0.5022	0.2630
UCB250	0.6280	0.8072	0.1479	0.0940
UCB253	0.6860	0.8405	0.2286	0.0960
CPH2	0.6670	0.8261	0.1912	0.0320
CPH4	0.5490	0.7903	0.3900	0.1620
CPH6	0.6650	0.8456	0.2459	0.0560
FH2088	0.6280	0.8482	0.2490	0.1010
FH2096	0.4720	0.7193	0.3512	0.0740
FH2137	0.7810	0.9055	0.1299	0.0290
Mean	0.5949	0.7902	0.2492	0.0979

Tableau 2. Hétérozygoties observées et attendues et indices de fixation de trois populations de loups - Slovaquie (Carpates), Serbie et Bulgarie - réparties sur les loci étudiés

Loci	Observed heterozygosity – H_o			Expected heterozygosity – H_e			Fixation index – F_{IS}				
	Population			Loci	Population			Loci	Population		
	SVK	RS	BG		SVK	RS	BG		SVK	RS	BG
CPH12	0.594	0.435	0.474	CPH12	0.592	0.574	0.785	CPH12	0.000	0.249	0.419
CPH5	0.393	0.789	0.550	CPH5	0.487	0.609	0.771	CPH5	0.197	– 0.291	0.310
CPH7	0.519	0.409	0.250	CPH7	0.764	0.437	0.645	CPH7	0.323	0.069	0.628
CPH8	0.570	0.495	0.556	CPH8	0.758	0.655	0.835	CPH8	0.251	0.249	0.360
CPH9	0.635	0.583	0.412	CPH9	0.745	0.618	0.677	CPH9	0.151	0.065	0.417
FH2010	0.515	0.621	0.667	FH2010	0.634	0.803	0.756	FH2010	0.192	0.233	0.146
FH2145	0.495	0.143	0.353	FH2145	0.773	0.315	0.640	FH2145	0.364	0.550	0.473
UCB250	0.586	0.929	0.333	UCB250	0.745	0.620	0.807	UCB250	0.217	– 0.495	0.603
UCB253	0.738	0.443	0.667	UCB253	0.836	0.627	0.838	UCB253	0.120	0.297	0.228
CPH2	0.676	0.526	0.619	CPH2	0.775	0.825	0.837	CPH2	0.130	0.367	0.283
CPH4	0.336	0.413	0.500	CPH4	0.614	0.594	0.738	CPH4	0.456	0.310	0.348
CPH6	0.559	0.667	0.591	CPH6	0.782	0.793	0.817	CPH6	0.288	0.168	0.298
FH2088	0.641	0.640	0.800	FH2088	0.825	0.719	0.775	FH2088	0.227	0.114	0.020
FH2096	0.463	0.388	0.235	FH2096	0.616	0.675	0.656	FH2096	0.252	0.430	0.659
FH2137	0.775	0.825	0.733	FH2137	0.870	0.889	0.893	FH2137	0.113	0.081	0.212
MS34	0.141	0.108	0.385	MS34	0.498	0.441	0.707	MS34	0.720	0.759	0.487
Mean	0.539	0.526	0.508	Mean	0.707	0.637	0.761	Mean	0.250	0.197	0.368

DISCUSSION

Deux études précédentes concernant les populations de loups gris des Balkans étaient basées sur la variation de l'ADNmt. Gomerčić et al. (2010) et Djan et al. (2014) ont utilisé 280 pb de la région de contrôle mitochondriale Djan et al. (2014) ont trouvé deux haplogroupes (occidental et oriental) et ils ont révélé une variation génétique très élevée avec des différences significatives entre les deux haplogroupes. En revanche, dans l'article précédent, Gomerčić et al. (2010) ont trouvé dans la population Croate au total quatre haplotypes (dont un nouveau non décrit précédemment) et donc la population de loups Croate est considérée comme ayant la plus grande variation d'ADNmt.

Czarnomska et al. (2013) ont trouvé au total 6 haplotypes dans l'aire de répartition naturelle du loup en Pologne, dont quatre étaient plus fréquents et, sur la base de leur fréquence, quatre sous-populations ont pu être reconnues. Il y a une tendance nord-sud dans l'occurrence des haplotypes individuels et la sous-population des Carpates est clairement différenciée de celle des plaines. Ces résultats concordent également avec les résultats de l'analyse de fragmentation de 11 microsatellites nucléaires, qui ont montré une nette différenciation des sous-populations des Carpates et de Roztocze par rapport aux autres sous-populations des plaines.

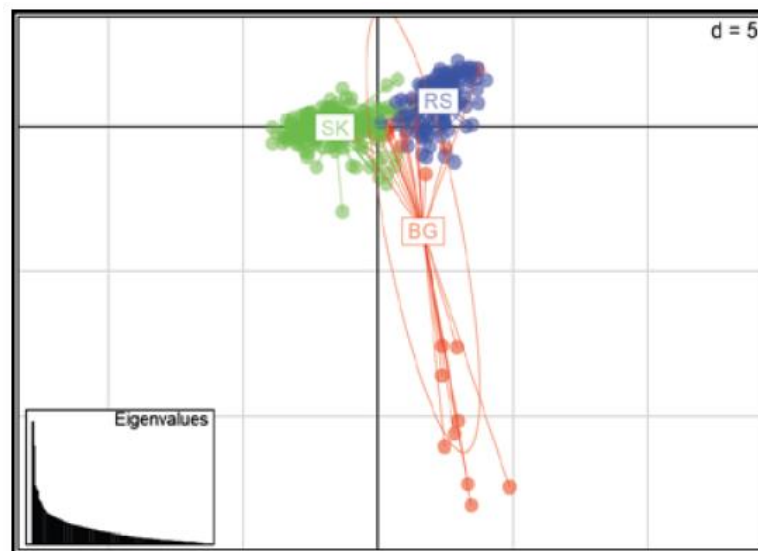


Figure 1. Analyse des coordonnées principales de la différenciation génétique des populations de loups des Balkans et des Carpates

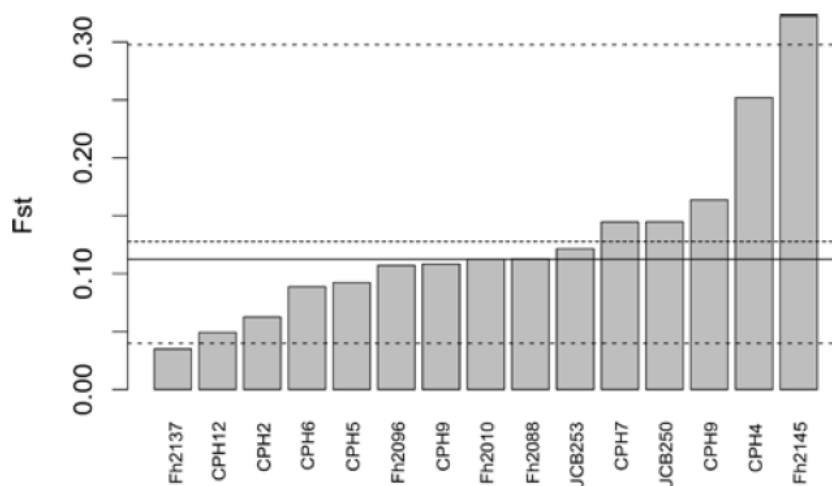


Figure 2. Distribution des valeurs de F_{ST} pour les différents loci

Les loups de Serbie font partie d'une plus grande population Dinarique, avec une distribution continue couvrant l'ensemble de la péninsule Balkanique, de la Slovénie à la Grèce. Cependant, le flux génétique effectif a été documenté entre plusieurs pays voisins, par exemple la Slovénie et la Croatie et/ou la Croatie et la Bosnie-Herzégovine, mais en fait il n'y a pas de barrières pour le flux génétique le long de la péninsule Balkanique. La population Dinarique est estimée à 5 000 individus (Linnell et al. 2007). Une diminution locale de la taille de la population Balkanique fragmentée au cours des deux dernières décennies du 20^{ème} siècle pourrait conduire à des changements dans la diversité génétique. En raison de son statut de

protection, la population semble se rétablir par migration à partir des territoires adjacents et/ou par recolonisation des habitats appropriés.

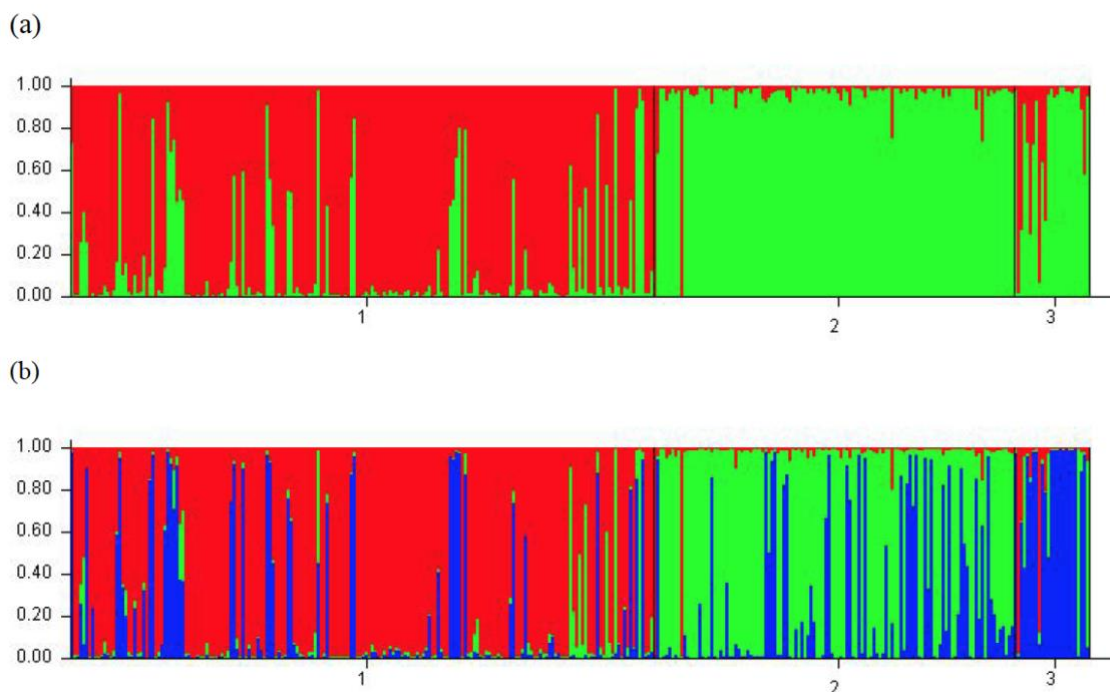


Figure 3. Résultats de l'analyse STRUCTURE attribuant les échantillons individuels aux grappes (a) cas de deux grappes $k = 2$, et (b) cas de trois grappes $k = 3$. Populations : 1 - Carpates, 2 - Serbie et 3 - Bulgarie

Une situation similaire semble exister le long des Carpates avec une population continue depuis la Slovaquie centrale, le sud de la Pologne jusqu'à la Roumanie en passant par les Carpates Ukrainiennes. En Ukraine, la population des Carpates est liée à la présence de loups dans les Pré-Carpates et les plaines adjacentes.

Les Carpates abritent une population de loups d'environ 3 000 à 4 000 individus, la plupart d'entre eux se trouvant en Roumanie et en Ukraine (Linnell et al. 2007).

Stronen et al. (2013), dans leur étude pionnière utilisant des SNP et couvrant l'ensemble de l'aire de répartition du sud et de l'est de l'Europe, ont bien présenté la différenciation de la population du centre-nord par rapport à celles de Croatie et des Carpates, ainsi que par rapport à celles de la steppe Ukrainienne, de la Bulgarie et de la Grèce. Le seul inconvénient de cette étude est le manque d'échantillons des Carpates et du centre des Balkans, ce qui aurait permis de mieux prouver leur position dans l'ensemble de l'Europe.

Il a été observé pour plusieurs taxons, y compris les loups Italiens (Lucchini et al. 2004), que la diversité nucléaire évaluée par les microsatellites était considérablement plus élevée que la diversité de l'ADNmt. C'est également la raison pour laquelle nous avons décidé de traiter la différenciation génétique basée sur les microsatellites nucléaires hérités par les deux parents. Conformément à Czarnomska et al. (2013), nous avons également constaté une assez bonne différenciation entre les trois groupes d'échantillons, avec des indications sur le schéma de migration entre les Balkans orientaux et centraux et les Carpates.

Les résultats de cette étude ont montré un regroupement clair des populations des Balkans et des Carpates avec une indication du processus de migration entre les populations Bulgares et Serbes. Bien que ces résultats soient basés sur les marqueurs nucléaires, il serait souhaitable de réanalyser les échantillons en utilisant également les marqueurs de l'ADNmt.

References

1. Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bnhomme, F. (2001): GENETIX 4.02, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier (France). Available from URL: <http://www.University-montp2.fr/~genetix/genetix/-genetix.htm>.
2. Coumuet, J.M., Luikart, G. (1996): Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144:2001–2014.
3. Czarnomska, S.D., Jędrzejewska, B., Borowik, T., Niedzialkowska, M., Stronen, A.V., Nowak, S., Mysłajek, R.W., Okarma, H., Konopiński, M., Pilot, M., Śmietana, W., Caniglia, R., Fabbri, E., Randi, E. (2013): Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics*, 14: 573–588.
4. Dalén, L., Fuglei, E., Hersteinsson, P., Kapel, C.M.O., Roth, J.D., Samelius, G., Tannerfeldt, M., Angerbjörn, A. (2005): Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox. *Biological Journal of Linnean Society*, 84: 79–89.
5. Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1994): Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 91: 3166–3170.
6. Djan, M., Maletić, V., Trbojević, I., Popović, D., Veličković, N., Burazerović, J., Čirović, D. (2014): Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mammalian Biology*, 79: 277–282.
7. Dolf, G., Schläpfer, J., Gaillard, C., Randi, E., Lucchini, V., Breitenmoser, U., Stahlberger–Saitbekova, N. (2000): Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis. *Genetics, Selection, Evolution*, 32(5): 533–541.
8. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
9. Ehrich, D., Gaudeul, M., Assefa, A. (2007): Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology*, 16: 2542–2559.
10. Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.

11. Excoffier, L., LAVA, G., Schneider, S. (2006): Arlequin ver 3.1. An integral software package for population genetics data analysis. University of Bern, Switzerland.
12. Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. (2003): Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567–1587.
13. Francisco, L.V., Langsten, A.A., Mellersh, C.S., Neal, C.L., Ostrander, E.A., 1996: A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7: 359–362.
14. Fredholm, M., Wintero, A.K., 1995: Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome*, 6: 11–18.
15. Gomerčić, T., Sindičić, M., Galov, A., Arbanasić, H., Kusak, J. (2010): High genetic variability of grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Studies*, 49: 816–823.
16. Goudet, J. (2001): FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
17. Gruber, B., Adamack, A. (2013): Introduction to PopGenReport. Available from <http://cran.r-project.org/web/packages/PopGenReport/index.html>
18. Linnell, J., Salvatori, V., Boitani, L. (2007): Guidelines for population level management plans for large carnivores. Large Carnivore Initiative for Europe report prepared for the European Commission. Rome, Italy.
19. Lucchini, V., Galov, A., Randi, E. (2004): Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Molecular Ecology*, 13: 523–536.
20. Muñoz-Fuentes, V., Darimont, C.T., Wayne, R.K., Paquet, P.C., Leonard, J.A. (2009): Ecological factors drive differentiation in wolves from British Columbia. *Journal of Biogeography*, 36: 1516–1531.
21. Oliveira, C.G., Martinez, R.A., Gaiotto, F.A. (2007): DNA extraction from bristles and quills of *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Erethizontidae) using a novel protocol. *Genetic and Molecular Research*, 6: 657–666.
22. Pilot, M., Branicki, W., Jędrzejewski, W., Goszczyński, J., Jędrzejewska, B., Dykyy, I., Shkvyrya, M., Tsingarska, E. (2010): Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 104.
23. Pilot, M., Jędrzejewski, W.J., Branicki, W., Sidorovich, V.E., Jędrzejewska, B., Stachura, K., Funk, S.M. (2006): Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, 15: 4533–4553.
24. Pritchard, J.K., Wen, W., and Falush, D. (2007): Documentation for STRUCTURE software: Version 2.2. University of Chicago, Chicago: 36 pp.
25. Randi, E. (2011): Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review*, 41: 99–111.
26. Rosenberg, N.A., Pritchard, J.K., Weber, J.L., Cann, H.M., Kidd, K.K., Zhivotovsky, L.A., Feldman, M.W. (2002): Genetic structure of human populations. *Science*, 298: 2381–2385.
27. Rueness, E.K., Stenseth, C., O'Donoghue, M., Boutin, S., Ellegren, H., Jacobsen, S. (2003): Ecological and genetic spatial structuring in the Canadian lynx. *Nature*, 425: 69–72.
28. Scandura, M., Iacolina, L., Capitani, C., Gazzola, A., Mattioli, L., Apollonio, M. (2011): Fine-scale genetic structure suggests low levels of short-range gene flow in a wolf population of the Italian Apennines. *European Journal of Wildlife Research* 57: 949–958.
29. Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1973): *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. ISBN 0-7167-0697-0, 573 pp.
30. Souto, L., Ferreira, E., Fonseca, C. (2004). Microsatellite analysis of wild boar populations in Portugal by multiplex PCR. *QIAGEN News*, 3: 63–64.
31. Stronen, A.V., Jędrzejewska, B., Pertoldi, C., Demontis, D., Randi, E. (2013): North-south differentiation and a region of high diversity in European wolves (*Canis lupus*). *PLoS ONE*, 8(10): e76454.
32. Sundqvist, A.K., Ellegren, H., Vilà, C. (2007): Wolf or dog? Genetic identification of the predator from saliva collected around bite wounds on prey. *Conservation Genetics*, 9: 1275–1279.
33. van Oosterhout, C., Hitchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. (2004): MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4: 535–538.
34. Vilà, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D., Castroviejo, J. (1999): Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8: 2089–2103.
35. Vilà, C., Sundqvist, A.K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Bjørnerfeldt, S., Koyola, I., Casulli, A., Sand, H., Wabakken, P., Ellegren, H. (2003): Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270: 91–97.
36. Walsh S.P., Metzger D.A., Higuchi R. (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506–513.
37. Weir, B.S., Cockerham, C.C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
38. Wright, S. (1969): *Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press.