

Mélange génétique entre les populations de loups d'Europe centrale et des Alpes

Check for updates

WILDLIFE BIOLOGY

Short communication

Genetic admixture between Central European and Alpine wolf populations

Pavel Hulva^{1,2}, Sebastian Collet³, Lucie Baránková¹, Kamila Valentová¹, Jana Šrutová¹, Harald Bauer⁴, Martin Gahbauer⁵, Jan Mokry⁶, Dušan Romportl⁷, Adam Francis Smith^{4,8,9,10}, Aleš Vorel¹¹, Vladimír Zýka¹², Carsten Nowak³, Barbora Černá Bolíková¹² and Marco Heurich^{4,8,9,10}*

¹Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic
²Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic
³Senckenberg Research Institute and Natural History Museum Frankfurt, Centre for Wildlife Genetics, Gelnhausen, Germany
⁴Department of Conservation and Research, Bavarian Forest National Park, Grafenau, Germany
⁵Department of National Park Monitoring, Bavarian Forest National Park, Grafenau, Germany
⁶Department of Zoology, Šumava National Park Administration, Vimperk, Czech Republic
⁷Department of Physical Geography and Geocology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic
⁸Frankfurt Zoological Society, Frankfurt, Germany
⁹Wildlife Ecology and Management department, University of Freiburg, Freiburg, Germany
¹⁰Institute of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Science, Koppang, Norway
¹¹Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic
¹²Department of Animal Science and Food Processing, Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

Correspondence: Hulva Pavel (hulva@natur.cuni.cz)

Wildlife Biology 2024: e0128, doi: 10.1002/wlb3.01281

Résumé

La reconstitution et l'expansion de populations de loups autrefois isolées en Europe soulèvent des questions sur la nature de leurs interactions et sur les conséquences futures pour la viabilité et la conservation des populations. Les populations fragmentées fusionneront-elles ou maintiendront-elles un certain niveau d'isolement grâce à la migration ? L'Europe centrale se prête bien à l'obtention de données empiriques dans ce domaine, car elle représente un « carrefour » avec un potentiel de contact entre plusieurs lignées phylogéographiques. Dans cette étude, des échantillons génétiques non invasifs obtenus lors de la surveillance des populations dans les chaînes de montagnes de la forêt de Bohême et de Bavière (BBF) en République Tchèque et en Allemagne (massif de Bohême) ont été analysés à l'aide de différents marqueurs neutres, notamment la séquence mitochondriale, les microsatellites nucléaires autosomiques et les marqueurs sexosomiques gonosomiques. Les profils génétiques obtenus ont été comparés aux données de référence afin d'étudier l'ascendance de la population. Les analyses en grappes des génotypes microsatellites et la présence syntopique des haplotypes HW01 et HW22 ont montré un **mélange** génétique entre les populations d'Europe centrale et les populations Alpines. Il s'agit d'un contact secondaire et d'un **mélange** entre des populations autrefois allopatriques ayant des histoires phylogéographiques différentes et des centres d'expansion éloignés dans des biomes différents dans la région de la Baltique par rapport à la péninsule des Apennins et aux Alpes. En outre, l'étude décrit l'événement fondateur et la généalogie de ce dème mélangé, qui vit dans des conditions environnementales intermédiaires par rapport aux formes parentales, et souligne le rôle des zones protégées en tant que tremplins dans le processus de recolonisation de l'aire de répartition des grands mammifères menacés d'extinction.

INTRODUCTION

L'histoire de l'aire de répartition de nombreuses espèces de mégafaune implique fréquemment **1)** de grandes aires de répartition continues avant les impacts humains substantiels ; **2)** une réduction et une fragmentation anthropiques de l'aire de répartition ; **3)** dans certains cas, comme chez le loup gris *Canis lupus*, un processus de réexpansion à l'ère post-industrielle. Diverses études soulignent que les populations de mammifères Européens étaient plus interconnectées avant les interventions humaines (Tucker et al. 2018). La **fragmentation** de l'aire de répartition résultant de la perte d'habitat et de l'exploitation/persécution a souvent des conséquences profondes sur la variation et la structure génétiques d'espèces particulières (Haag et al. 2010). Les mesures de protection, l'abandon des paysages et d'autres facteurs conduisent à la reconstitution de certaines populations (Horn et al. 2014, Lucena-Perez et al. 2022). Cependant, il est difficile de décrire les conséquences et de prédire l'avenir du processus de recolonisation et d'expansion des populations animales autrefois isolées. Un scénario possible implique la fusion des populations, effaçant les différences génétiques (Kearns et al. 2018, Jan et al. 2023). D'autre part, un certain niveau d'isolement avec une migration maintenue par la différenciation écologique pourrait se produire chez les espèces dont les aires de répartition s'étendent sur différents biomes, y compris les prédateurs cosmopolites (Pilot et al. 2006, Ratkiewicz et al. 2014, Foote et al. 2016).

Le **mélange** génétique intraspécifique de lignées divergentes autrefois isolées est un facteur proximal crucial impliqué dans les scénarios d'expansion. Le **mélange** peut avoir des conséquences négatives, telles que la dépression de reproduction (Sagvik et al. 2005, Huff et al. 2011). **Des conditions spécifiques doivent être remplies pour que le processus ait des effets bénéfiques liés à l'hétérosis et joue un rôle adaptatif.** Au cours des expansions de l'aire de répartition, le mélange intraspécifique peut générer des changements dans les compositions génomiques qui peuvent éventuellement augmenter l'aptitude et offrir des possibilités d'adaptation locale et de survie (Krehenwinkel et Tautz 2013, Rius et Darling 2014, Fontsero et al. 2019). Par exemple, Hendricks et al. (2019) ont rapporté un mélange entre les écotypes de loups de la forêt tropicale côtière et de la forêt des Rocheuses du Nord. Les meutes mélangées ont colonisé de nouvelles zones intermédiaires sur le plan environnemental dans l'État de Washington, aux États-Unis. Notamment, une meute métissée a même créé un territoire dans une zone où l'environnement était moins approprié pour les deux populations parentales (Hendricks et al. 2019). Des événements récents de métissage bénéfique entre plusieurs lignées phylogéographiques divergentes, formées lors de raréfactions locales dramatiques causées par la chasse et la destruction de l'habitat, ont été signalés chez plusieurs espèces de mammifères Européens. Par exemple, la loutre Eurasienne *Lutra lutra* (Pigneur et al. 2019), le castor Européen *Castor fiber* (Munclinger et al. 2022), le chat sauvage Européen *Felis silvestris* (Mueller et al. 2020) ou l'ours brun *Ursus arctos* (Kopatz et al. 2014).

L'Europe centrale représente un important « **carrefour** » phylogéographique où plusieurs populations précédemment isolées interagissent (Eliášová et al. 2022). Les populations de loups fournissent un exemple convaincant des interactions et de la divergence génétique qui façonnent la biodiversité de la région (Pilot et al. 2010). Actuellement, des populations d'Europe centrale, des Carpates, des Alpes et de la région Dinaric-Balkan sont présentes dans la région (Hulva et al. 2018).

La population d'Europe centrale a divergé de la population Baltique (Szewczyk et al. 2019, 2021). Suite à la protection nationale des loups en Pologne en 1998, les fondateurs de cette population se sont étendus du nord-est de la Pologne vers l'ouest (Nowak et Mysłajek 2016) et en Allemagne (Jarausch et al. 2021), où ils ont établi la première meute reproductrice en 2000 (Ansorge et al. 2010). L'aire de répartition actuelle de la population d'Europe centrale est située dans certaines parties de la plaine Européenne, avec les plus grands effectifs en Pologne et en Allemagne et des ramifications dans d'autres régions telles que la République Tchèque (Fig. 1, Informations complémentaires, Boitani 2018) et des enclaves isolées en Slovaquie (Hulva et al. 2018). Par conséquent, un certain degré de métissage entre les populations d'Europe centrale et des Carpates a également été mentionné (Hulva et al. 2018). La population Alpine est originaire d'une population Italienne isolée dans la péninsule des Apennins et a colonisé les Alpes au cours des années 1990 (Lucchini et al. 2002, Valière et al. 2003). **La colonisation des Alpes s'est accompagnée d'un fort effet fondateur, ce qui explique que les individus formant la population actuelle des Alpes présentent une plus faible variabilité génétique que les loups des Apennins** (Fabbri et al. 2007). La différenciation génétique est maintenue par un flux génétique réduit entre la population source en Italie et la population des Alpes (Fabbri et al. 2007, 2014). Cependant, un certain mélange de la population alpine avec la population Dinarique-Balkanique a été détecté (Ražen et al. 2016) et pourrait être lié à la colonisation de nouvelles régions (Fabbri et al. 2014). Actuellement, la majorité de la population habite les parties occidentales des Alpes, entre la France et l'Italie, et une plus petite proportion de la population habite la partie orientale des Alpes (Marucco et al. 2023). Plusieurs territoires sont également établis dans le Massif central, les Pyrénées, la Suisse et l'Autriche (Boitani 2018). Des animaux vagabonds ont également été occasionnellement documentés en Allemagne et en République Tchèque (données propres). Les populations étudiées présentent des histoires phylogéographiques contrastées (Pilot et al. 2010, Hindrikson et al. 2017, Montana et al. 2017, Salari et al. 2017). **Les loups des populations Italiennes et Alpines sont caractérisés par un haplotype unique appartenant à l'haplogroupe 2 et sont liés à une ancienne lignée éteinte qui était répandue en Eurasie et en Amérique du Nord à la fin du Pléistocène** (Pilot et al. 2010), y compris un morphotype distinct de loups Béringiens (Meachen et al. 2016). **Les loups de la population d'Europe centrale, en revanche, appartiennent à l'haplogroupe 1, dont la fréquence a augmenté après le dernier maximum glaciaire (LGM) et qui a dépassé l'haplogroupe 2 au cours des derniers milliers d'années** (Pilot et al. 2010, Hindrikson et al. 2017). Les changements dans la fréquence des haplotypes ont très probablement été associés à des changements environnementaux et écologiques survenus après le LGM (Pilot et al. 2010). Les voies microévolutives divergentes se reflètent également dans la diversification phénotypique. **Suivant la règle de Bergmann, les loups des populations Italiennes et Alpines ont des tailles plus petites que les loups d'Europe centrale** (Nowak et Federoff 2002, O'Keefe et al. 2013). Ces populations diffèrent également par leurs traits phénotypiques et leur comportement, liés à des variations dans les stratégies de chasse et les préférences des proies (Palmegiani et al. 2013, Zlatanova et al. 2014), et les dynamiques de reproduction, en particulier le moment de la reproduction (Mech 2002, Schmidt et al. 2007). Le comportement de mise bas varie également ; les femelles de plaine creusent des tanières sous des arbres déracinés, etc., tandis que les femelles de montagne utilisent des cachettes naturelles (grottes et crevasses rocheuses) comme tanières (Mech et Boitani 2003, Schmidt et al. 2007, Volokh 2011).

Cette étude se concentre sur la recolonisation de l'écosystème de la forêt de Bohême et de Bavière (BBF) par les loups gris en utilisant la génétique non invasive. Tout d'abord, elle examine son ascendance au sein des populations d'Europe centrale et Alpine et le degré de mélange au sein du **dème** de la FBB à l'aide de méthodes de regroupement. Ensuite, sur la base de méthodes généalogiques, il décrit ses relations avec les populations parentales originaires des Alpes et de la plaine nord-Européenne, sa composition génétique et l'histoire de la meute.

MATERIEL ET METHODE

Zone d'étude

La forêt de Bohême et de Bavière (BBF) est située dans une unité géologique qui forme la transition entre la grande plaine Européenne au nord et la ceinture orogénique hercynienne au sud (Fig. 1), typique des hautes altitudes. Le BBF comprend l'une des plus grandes forêts contiguës protégées d'Europe centrale (Heurich et al. 2015). Elle est dominée par des basses montagnes boisées, avec des tourbières dans certaines zones, et une végétation qui ressemble beaucoup à la flore Alpine de haute montagne (Metzger et al. 2005). La population locale de loups s'est éteinte au 18^{ème} siècle (Hůrka 1981, Bufka et al. 2005).

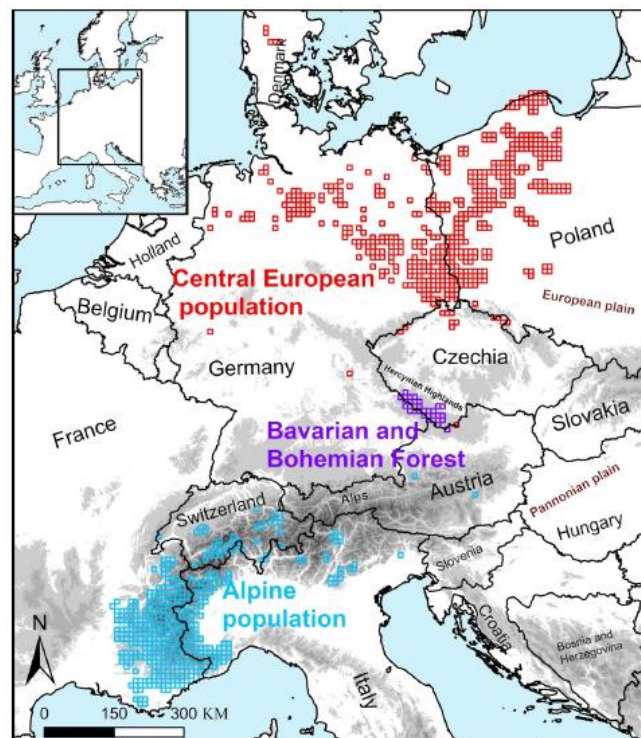


Figure 1. Présence permanente de loups gris dans les noyaux des populations Alpines (bleu) et d'Europe centrale (rouge), ainsi que toutes les données de présence dans les forêts de Bohême et de Bavière (violet foncé). Les données d'occurrence pour les populations d'Europe centrale et Alpine contiennent des données de la liste rouge de l'UICN (données jusqu'en 2016) mises à jour avec des publications plus récentes et des rapports disponibles (pour certains pays, jusqu'à l'année du loup 2019-2020). Les données relatives aux forêts de Bohême et de Bavière contiennent toutes les données de présence des années 2014 à 2021 dans la zone cartographiée. Une liste des sources de données se trouve dans les informations complémentaires. Les données d'occurrence sont présentées dans la grille de référence de l'AEE (10 × 10 km). L'altitude est affichée en tons gris avec une échelle de 500 m et une plage d'altitude de 0 à 4800 m

En 1963, les efforts de protection de la nature ont conduit à la création du paysage protégé de la Šumava, qui couvre environ 996 km². Le parc national de la forêt Bavaroise (Bayerische Wald) a été fondé en 1970 sur une superficie de 250 km², et le parc national de la Šumava (parc national de la forêt de Bohême) a été créé en 1991, avec une superficie d'environ 690 km² (Křenová et Vrba 2014). La présence de loups était **sporadique** jusqu'à la première preuve de l'installation permanente de loups dans cette zone en 2015 (Kutal 2017).

Suivi sur le terrain et collecte d'échantillons

Des données génétiques et d'occurrence ont été collectées dans le BBF pendant les années-loups (WY) (début mai à fin avril de l'année suivante) de WY 2013/2014 à WY 2020/2021 (Informations complémentaires). Bien que l'ensemble des données contienne des données jusqu'au 7 mars 2021, l'ensemble de la WY 2021/2022 n'a pas pu être pris en compte et évalué dans le cadre de cette étude. Avant 2017, les loups ont été suivis de manière opportuniste dans la zone d'étude ; par la suite, un suivi systématique a été appliqué. Pour l'analyse génétique, des échantillons non invasifs d'excréments, de poils, d'urine, d'écouvillons d'urine, de sang d'œstrus femelle, d'écouvillons de kills sites et de tissus provenant d'animaux tués sur la route ont été inclus (Informations complémentaires). Les échantillons ont été collectés par les organisations responsables (cf. Remerciements). Tous les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 96% à -20°C. Les données d'occurrence consistaient en des données de piégeage photographique et de suivi, suivant l'approche de Kaczensky et al. (2009). Chaque enregistrement a été positionné par un GPS portable et daté. Les pièges photographiques ont été placés sur des sites où des signes de présence de loups avaient été mis en évidence précédemment.

Tous les enregistrements ont été validés selon les critères du « statut et de la conservation de la population de lynx Alpin » (SCALP) (Molinari-Jobin et al. 2012). Pour l'évaluation de la valeur SCALP pour les loups, les lignes directrices publiées par Kaczensky et al. (2009) ont été utilisées. Pour la visualisation spatiale, seuls les enregistrements qui ont approuvé la **validation C1** (preuve claire : par exemple, données télémétriques, preuve génétique, animal trouvé mort, images de pièges photographiques) ou **C2** (preuve confirmée par une personne expérimentée : par exemple, piste ou proie) ont été pris en compte ; tous ces enregistrements ont été convertis en couche de points dans le système d'information géographique (SIG) (ArcGIS 10.8 d'ESRI). Ainsi, chaque point donné représente une marque de loup confirmée pour la date d'origine. Le contexte spatial des données d'occurrence a été étudié dans ArcGIS 10.8 d'ESRI. Les enregistrements ont été regroupés en années-loups (WY). L'estimation de la densité du noyau a été déployée pour montrer les points chauds de l'activité des loups dans la dernière année-loup complète disponible pour notre étude - l'année-loup 2020/2021. La fonction de noyau a utilisé la fonction de noyau quartique (Silverman 1998) ; la largeur de bande a été calibrée à l'aide des données de l'année-loup en question. Les zones couvertes par les échantillons génotypés avec succès de deux meutes de loups ont été visualisées sous la forme d'un polygone convexe minimal à 100% (MCP) basé sur les échantillons génétiques de l'année scolaire 2020/2021, vraisemblablement après la stabilisation du territoire des loups. La surface des polygones a été mesurée dans ArcGIS 10.8 par ESRI.

Les informations sur l'occurrence permanente des populations alpines et d'Europe centrale (Fig. 1), ainsi que les données sur l'occurrence d'autres populations situées à une distance du BBF pouvant être atteinte par la dispersion des loups, ont été tirées de la littérature disponible jusqu'en 2020 (Informations complémentaires) et fusionnées dans la couche d'occurrence dans ArcGIS 10.8 par ESRI. Les données génétiques de référence utilisées pour les analyses comparatives des groupes comprenaient des échantillons de populations alpines et d'Europe centrale (informations complémentaires). Des génotypes provenant des enclos des forêts de Bohême et de Bavière ont été ajoutés pour détecter la contribution potentielle des animaux en captivité dans la population sauvage (informations complémentaires).

Extraction et amplification de l'ADN

...

Une combinaison de microsatellites autosomiques hérités des parents, de loci gonosomiques déterminant le sexe et d'ADN mitochondrial matrilinéaire a été utilisée pour le génotypage individuel et la détermination des haplotypes. Au total, **21 loci microsatellites** ont été utilisés, dont 13 loci partagés par les parties Tchèque et Allemande.

...

Analyses de génétique des populations

La notation et la classification des allèles ont été effectuées dans le logiciel geneious à l'aide du plugin geneious Microsatellite (Kearse et al. 2012). Les allèles à un locus particulier ont été acceptés selon la méthode de consensus « n/2 », dans laquelle les allèles apparaissent dans la moitié des réplicats (Benschop et al. 2013). Dans cette étude, les allèles apparaissant dans au moins deux amplifications sur trois ont été admis dans le génotype de consensus. Sur la base de l'hypothèse d'une valeur $P_{\text{Isib}} < 0,001$ pour garantir une puissance statistique suffisante de l'ensemble de données dans les analyses d'identité et de parenté (McKelvey et Schwartz 2004), les échantillons avec au moins 67% d'amplification de loci (minimum 14 sur 21 loci) et 77% d'amplification de loci (10 sur 13 loci) ont été considérés comme des génotypes consensus multilocus de qualité suffisante en République Tchèque et en Allemagne, respectivement (Szewczyk et al. 2019, Jarausch et al. 2021). Les séquences obtenues ont été éditées, alignées et assignées aux haplotypes connus sensu Pilot et al. (2010) à l'aide du logiciel geneious (Kearse et al. 2012). L'équilibre de Hardy-Weinberg, la présence d'allèles nuls et l'abandon d'allèles ont été estimés à l'aide d'un micro-contrôleur (Van Oosterhout et al. 2004).

L'analyse d'identité a été réalisée à l'aide du programme cervus (Kalinowski et al. 2007). Pour le filtrage initial, le nombre minimum de loci correspondants et la correspondance floue (nombre de non-concordances entre les génotypes) dans les échantillons Tchèques ont été fixés à 14 et cinq loci, respectivement. La comparaison des échantillons Tchèques et Allemands a été basée sur 13 loci ($P_{(\text{ID})\text{sib}} = 0,0002$), le nombre minimum de loci correspondants étant respectivement de neuf et de cinq correspondances floues. Avant d'éliminer les génotypes identiques de l'ensemble de données, les données primaires et les métadonnées ont été à nouveau examinées. Les origines des individus fondateurs et la dispersion de la progéniture en dehors de la zone étudiée ont été déterminées par comparaison avec les bases de données de profils génétiques issues du suivi génétique national des loups en Allemagne et en République Tchèque. Le logiciel ml-relate (Kalinowski et al. 2006) a été utilisé pour estimer la structure généalogique. Après l'estimation de la relation la plus probable (FS = frère et sœur ; PO = parent/enfants), le test d'hypothèse spécifique, avec 100 000 génotypes simulés, a été exécuté pour déterminer si la relation choisie était statistiquement significative (Kalinowski et al. 2006). Les données temporelles et spatiales des échantillons collectés ont été prises en compte pour affiner les relations suggérées. Les résultats des analyses précédentes ont été confirmés à l'aide d'une approche de maximum de vraisemblance dans COLONY ver. 2.0.6.6. (Jones et Wang 2010). L'analyse a été traitée avec l'hypothèse d'une polygamie femelle/mâle et tous les individus ont été considérés comme des parents candidats. La probabilité d'inclure les pères et les mères

comme candidats à la paire parentale a été fixée à 0,5, avec un taux d'erreur supposé de 0,01 (Palomares et al. 2017).

Des analyses de regroupement bayésiennes ont été utilisées pour déduire la structure génétique de la population. Dans le logiciel de structure (Pritchard et al. 2000), le rodage initial a été fixé à 2×10^5 étapes suivies de 106 itérations de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Le modèle de mélange avec des fréquences d'allèles corrélées et aucune information préalable sur la population a été utilisé. Le nombre de grappes examinées a été fixé entre $K = 1$ et $K = 10$. Chaque K a été répété cinq fois. Les résultats ont été téléchargés dans une application web structureelector (Li et Liu 2018) pour sélectionner et visualiser le nombre optimal de grappes à l'aide de plusieurs méthodes. Dans cette étude, deux méthodes ont été sélectionnées : la méthode Puechmaille (Puechmaille 2016) et la méthode Evanno (Evanno et al. 2005). Trois analyses différentes de la structure ont été réalisées. La première comprenait tous les individus BBF issus de la nature ($n = 22$) et les individus captifs issus des enclos de la forêt de Bohême ($n = 15$) et de Bavière ($n = 8$). La deuxième analyse n'a porté que sur les individus sauvages ($n = 22$). La troisième analyse a été réalisée en utilisant seulement trois individus (descendants) par meute du dème BBF sauvage ($n = 6$), afin de contrôler l'impact de la parenté sur le regroupement bayésien. Dans les trois analyses, des échantillons de référence de la population Alpine ($n = 25$) et de la population d'Europe centrale ($n = 20$) ont été inclus. Une analyse factorielle des correspondances (FCA) mise en œuvre dans genetix 4.05 (Belkhir et al. 2000) a été utilisée pour visualiser les distances génétiques entre les individus et les populations étudiés ($n = 67$). Tous les génotypes uniques du dème BBF ($n = 22$) et les génotypes de comparaison des populations Alpines ($n = 25$) et d'Europe centrale ($n = 20$) ont été utilisés.

RESULTATS

Généalogie du dème BBF

Au total, 233 échantillons génétiques ont été traités dans la zone d'étude au cours de la période considérée. Au total, 96 génotypes de loups du BBF ont été obtenus et le taux de réussite de l'amplification était d'environ 41% (informations complémentaires). Le $PI_{(ID)_{sib}}$ de l'ensemble des données comprenant les échantillons Tchèques et Allemands (0,0002) était suffisamment faible pour permettre une discrimination fiable des individus (McKelvey et Schwartz 2004). Le dème BBF est probablement en équilibre HW, aucune preuve d'une chute importante d'allèles n'a été trouvée et la présence d'allèles nuls n'a pas été détectée. L'analyse d'identité a révélé 22 génotypes uniques, ce qui donne un taux de recapture de 4,32. Huit femelles et 14 mâles ont été détectés, ce qui donne un sex-ratio de 1,75. Au total, 18 séquences mitochondriales ont été identifiées à partir de 22 échantillons présentant des génotypes microsatellites uniques (avec un taux de réussite de 82% ; Fig. 2a). 17 individus portant l'haplotype HW01 et un individu portant l'haplotype HW22 ont été identifiés dans la zone d'étude. Les individus captifs des enclos portent des haplotypes différents de ceux des loups du dème BBF, les loups captifs de la forêt de Bohême portent l'haplotype HW04 et les loups captifs de la forêt de Bavière portent l'haplotype HW13 (Informations complémentaires).

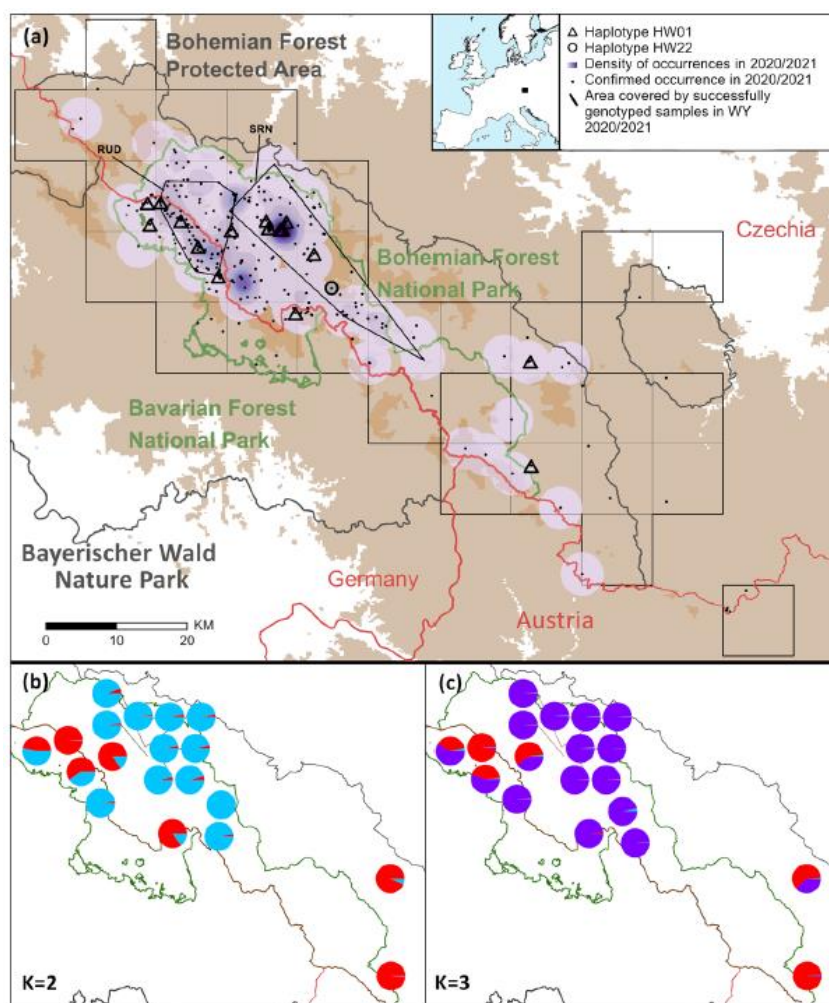


Figure 2. Localités des échantillons et affinités génétiques des loups gris **mélangés** dans la forêt de Bohême et de Bavière au cours des années-loups (WY) de WY 2013/2014 à WY 2020/2021. Les échantillons génétiques sont affichés en fonction de la première occurrence détectée d'un individu particulier. **(a)** Montre les haplotypes de la séquence mitochondriale. Les polygones convexes minimaux (ligne noire) construits à partir de tous les enregistrements génétiques de membres particuliers de la meute en 2020/2021 visualisent les zones couvertes par des échantillons génotypés avec succès. La carte de densité (échelle de couleur violette) est construite à partir de tous les enregistrements d'occurrence (génétiques et pièges photographiques) au cours de l'année scolaire 2020/2021. L'altitude est représentée dans les tons bruns, avec une échelle de 500 m et une fourchette d'altitude de 0 à 1330 m. La grille de référence de l'AEE (10 × 10 km) est utilisée. **(b)-(c)** Représentation du regroupement des microsatellites nucléaires 13, tel que détecté par les analyses de structure lorsque $K = 2$ **(b)** et $K = 3$ **(c)**. Les codes de couleur en **(b)** et **(c)** sont les suivants : population alpine (bleu), pop. d'Europe centrale (rouge) et BBF dôme (rouge), (rouge) et BBF dôme (violet). Les frontières des zones protégées sont marquées par des lignes vertes (parcs nationaux) et grises (autres zones protégées). Les frontières des pays sont marquées par des lignes rouges

Structure de la population et analyse des mélanges

La première analyse de la structure, qui incluait les loups BBF captifs, a donné $K = 4$ (Puechmaille 2016) et $K = 3$ (Evanno et al. 2005) comme étant le nombre de clusters le mieux supporté (Informations complémentaires). Aucun mélange entre les groupes de loups sauvages et les loups captifs de l'enclos n'a été observé. La seconde analyse, qui n'incluait que les loups sauvages du BBF, suggérait $K = 3$ (Puechmaille 2016) et $K = 2$ (Evanno et al. 2005) comme le nombre de groupes le plus probable (Fig. 2b-c ; Informations complémentaires). **Dans les deux meutes de BBF sauvages, un mélange de populations Alpines et d'Europe centrale a été détecté.** Les résultats de la troisième analyse, qui n'incluait que trois individus (descendants) de chaque meute du BBF, ont également suggéré $K = 3$ (Puechmaille 2016) et $K = 2$ (Evanno et al. 2005) comme le nombre le plus probable de grappes (Fig. 3a, informations complémentaires). Dans $K = 2$, les échantillons de la meute RUD ont montré un **mélange** plus important avec la population d'Europe centrale par rapport aux

échantillons de celle de SRN. Les résultats de l'analyse FCA montrent une division claire en trois groupes (Fig. 3b-c). Le **mélange** a également été confirmé par l'analyse de l'ADN mitochondrial. L'haplotype HW01 se retrouve principalement dans la population d'Europe centrale, tandis que l'haplotype HW22 est caractéristique de la population Alpine (Fig. 2a).

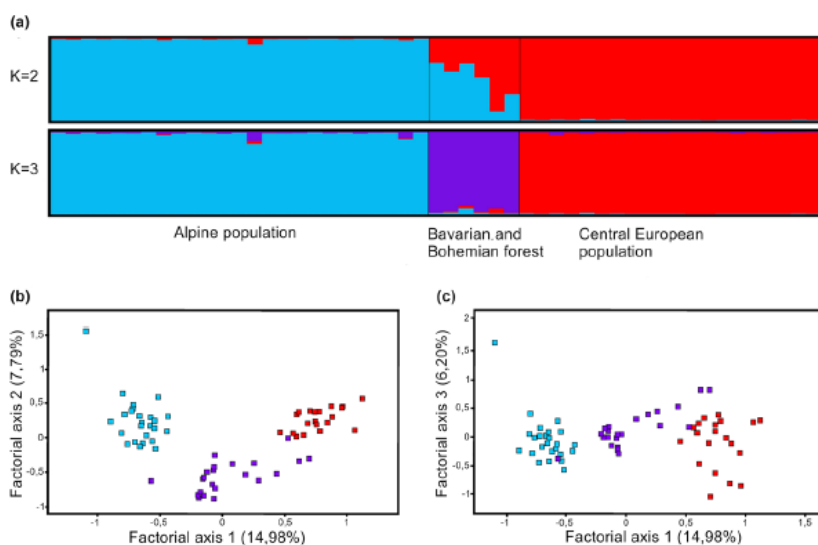


Figure 3. (a) Analyse bayésienne de regroupement du dème de loup sauvage BBF (trois descendants par meute ; six génotypes uniques) et des populations alpines ($n = 25$) et d'Europe centrale ($n = 20$) comparées à l'aide de 13 loci microsatellites. Les résultats sont présentés pour deux ($K = 2$) et trois ($K = 3$) groupes. Les lignes verticales représentent les génotypes individuels, les segments de couleur représentent les coefficients d'appartenance aux groupes (Q_i) et les codes de couleur correspondent à la figure 1. Les résultats complets de l'analyse (Delta K et $L(K)$ moyen (\pm SD) selon Evanno et al. (2005), ainsi que les statistiques MedMedK, MedMeanK, MaxMedK et MaxMeanK (Puechmaile 2016), sont affichés dans les informations complémentaires. (b)-(c) Analyse factorielle des correspondances (AFC) du dème de loup sauvage BBF ($n = 22$) et des populations alpines ($n = 25$) et d'Europe centrale ($n = 20$) comparées à l'aide de 13 loci microsatellites

Relations familiales

L'analyse des généalogies a indiqué la présence de deux meutes, Ruda (RUD) (à l'ouest) et Srni (SRN) (à l'est) (Fig. 2a, Informations complémentaires). La carte de densité de l'année 2020/2021 est présentée dans la Fig. 2a. Les polygones représentant les zones couvertes par des échantillons génotypés avec succès au cours de l'année scolaire 2020/2021 avaient une superficie de 97 km² pour la meute RUD et de 185 km² pour la meute SRN (Figure 2a). La meute SRN a été la première à s'établir. La femelle reproductrice (GW665f) porte l'haplotype HW01 et le mâle reproducteur (GW676m) porte l'haplotype HW22. La première capture d'un échantillon génétique du mâle reproducteur (GW676m) a été constatée dans les Alpes Bavaoises, à environ 180 km de la région BBF, distance mesurée en ligne droite (Informations complémentaires). Cependant, nous n'avons pas été en mesure de détecter la meute de naissance originale et il y a un écart de 3 ans jusqu'à la recapture génétique dans la région BBF (Informations complémentaires). La femelle reproductrice (GW665f) provenait de la population d'Europe centrale, avec une présence éparse dans les hautes terres hercyniennes (Szewczyk et al. 2021). Une présence antérieure de cet individu n'a pas été détectée, et donc la localisation de la meute de naissance de cette femelle n'a pas pu être déterminée, ni la distance qu'elle a parcourue.

Jusqu'à présent, 14 descendants de la meute fondatrice ont été identifiés. Une nouvelle meute proche de Zelezná Ruda (meute RUD), avec un mâle (GW1488m) et une femelle (GW1112f), a été découverte. D'après les analyses parentales, la femelle fondatrice de la meute RUD

(GW1112f) a probablement été remplacée par sa sœur (GW871f) au cours de la période d'échantillonnage. Les deux femelles reproductrices de la meute RUD étaient à l'origine des descendants de la meute SRN (Informations complémentaires). Les trois individus portaient également l'haplotype HW01. Dans les deux groupes de reproduction de deuxième génération, deux descendants ont été identifiés jusqu'à présent. Une dispersion sur de longues distances de quatre mâles issus de la meute SRN a été détectée : deux individus (GW942m et GW938m) se sont dispersés vers le centre et le nord de l'Allemagne (à environ 270 km et 520 km de distance, mesurée en ligne droite), tandis qu'un individu (CW20_228m) a été détecté en Moravie (à environ 290 km de distance) et qu'un autre (GW1556m) s'est dispersé en Autriche (à environ 140 km de distance) (Informations de soutien).

DISCUSSION

Dème génétiquement mélangé

En raison de la grande mobilité, de l'insaisissabilité et de l'absence de motifs de pelage distinctifs, les méthodes génétiques se sont avérées être l'outil le plus efficace pour évaluer les origines des populations de loups (Hulva et al. 2018). La présente étude a détecté un **mélange** génétique entre les populations de loups des Alpes et d'Europe centrale (Fig. 2-3, Informations complémentaires). Le dème BBF présente des génotypes mélangés à $K = 2$ et forme un troisième groupe dans le cas de $K = 3$. Nous supposons que ce schéma indique la nature **mélangée** du dème dans la région BBF. Les résultats du regroupement bayésien et la présence d'haplotypes qui n'ont pas été détectés chez les animaux sauvages ont démontré que les loups détenus en captivité n'ont pas joué un rôle dans la formation de la composition génétique du dème BBF. Cependant, étant donné la taille limitée de l'échantillon, les résultats des analyses bayésiennes doivent être interprétés avec prudence (Porras-Hurtado et al. 2013). Pour valider et compléter ces conclusions, il sera nécessaire de mettre en œuvre des données génomiques supplémentaires.

Les loups sont caractérisés par leur capacité à se disperser sur de courtes et de longues distances, formant des dèmes dans des zones plus éloignées (Valière et al. 2003, Kojola et al. 2006, Jimenez et al. 2017, Jarausch et al. 2021). En ce qui concerne les mécanismes proches à l'origine de l'établissement de la meute BBF, nous émettons l'hypothèse que le **mélange** pourrait se produire en relation avec l'effet Allee, c'est-à-dire que le **mélange** entre différentes formes pourrait être facilité par la faible densité de population d'au moins une forme parentale dans des environnements nouveaux. Ce phénomène se produit fréquemment dans la biogéographie insulaire, y compris les îles d'habitat et les ramifications de l'aire de répartition (Courchamp et al. 2008).

Alors que les deux meutes BBF montrent des preuves évidentes de **mélange** dans l'analyse microsatellite de l'ADN nucléaire, la majorité des individus étudiés portent l'haplotype HW01, appartenant à la population d'Europe centrale. Cela peut s'expliquer par l'héritage maternel de l'ADN mitochondrial : seul le premier mâle reproducteur portait l'haplotype HW22, propre aux loups Alpains et Italiens. Tous les descendants, y compris ceux de la deuxième meute, ont hérité de l'haplotype HW01 des femelles reproductrices, qui provenaient de la population d'Europe centrale.

Les loups de la population d'Europe centrale connaissent actuellement une expansion rapide en Europe centrale (Hulva et al. 2018, Szewczyk et al. 2019, 2021, Jarausch et al. 2021). Des

loux des Alpes sont occasionnellement détectés au nord des Alpes (Jarausch et al. 2021, données propres). Il est donc probable que les croisements entre les deux populations se poursuivent. Bien que cela reste spéculatif, nous supposons que la progéniture des meutes BBF **mélangées** pourrait contribuer à ce processus en formant un dème de population dans une région géographiquement et écologiquement intermédiaire par rapport aux populations mères (Hendricks et al. 2019). La détection de plusieurs loups originaires de ces meutes BBF, certains même dans des régions assez éloignées, soutient cette hypothèse.

Structure des meutes dans les forêts de Bohême et de Bavière

La première meute de la région BBF (SRN) a été fondée par des disperseurs longue distance, car le mâle reproducteur s'est dispersé sur au moins 180 km, mesurés en ligne droite. Cependant, la localisation inconnue de la meute d'origine, l'écart de 3 ans dans la recapture génétique dans le BBF, et la résistance à la dispersion dans le paysage (Huck et al. 2011, Ražen et al. 2016) suggèrent que cet individu aurait pu parcourir une distance beaucoup plus longue avant de s'installer. Des études antérieures ont fait état d'événements de dispersion allant jusqu'à environ 1 200 km (Kojola et al. 2006, Andersen et al. 2015, Ražen et al. 2016, Byrne et al. 2018). Une dispersion sur de longues distances a été détectée chez quatre mâles descendants de la meute SRN. **Ces individus ont parcouru environ 140-520 km depuis la meute d'origine, mesurés en ligne droite. La région du BBF pourrait donc représenter une source importante de loups en expansion à l'avenir.**

Le sex-ratio des loups identifiés dans la région BBF est fortement orienté vers les mâles. Néanmoins, le sex-ratio présente des incohérences significatives à travers les meutes étudiées en Europe (Kojola et al. 2006, Sidorovich et al. 2007, Stansbury et al. 2016, Jarausch et al. 2021).

Dans la meute RUD, la femelle reproductrice (GW1112f) a très probablement été remplacée par un autre individu. Cette femelle n'a été identifiée que deux fois par le passé, et plus depuis l'année du loup 2019/2020. Elle est probablement partie ou est morte ; il est possible qu'elle reste dans la région sans être identifiée génétiquement.

Dans le scénario où la première femelle est morte, elle a été remplacée par sa sœur (GW871f) l'année suivante. Ce scénario est étayé par les résultats des analyses parentales ; en 2020/2021, deux descendants d'une femelle remplaçante et du mâle fondateur ont été génétiquement détectés. Ce cas n'est pas unique, des cas similaires ont été rapportés. Brainerd et al. (2007) ont constaté que les loups territoriaux se reproduisaient la saison suivante dans 47% des cas, avec une plus grande proportion de reproduction lorsqu'un reproducteur a dû être remplacé (56%) par rapport aux cas où les deux reproducteurs ont dû être remplacés (9%).

Bien qu'il n'y ait pas de preuves génétiques à l'appui, la possibilité d'une reproduction multiple et d'une polygamie potentielle ne peut être écartée. Diverses études fournissent des preuves de la présence de femelles reproductrices multiples dans les grandes meutes (Mech et Boitani 2003, Ausband 2018, Sidorovich et Rotenko 2019, Ausband et Mitchell 2021), et plusieurs cas ont été identifiés dans le cadre du suivi génétique légal des loups en Allemagne (Carsten Nowak comm. pers.). La raison principale de la reproduction multiple était l'accouplement du mâle dominant (fondateur) non seulement avec la femelle fondatrice (mère) mais aussi avec des filles ou d'autres femelles sous-dominantes. De plus, des preuves empiriques

indiquent un seuil de polygamie, avec des femelles à reproduction multiple observées principalement dans des groupes de plus de huit individus (Ausband 2018). Cependant, la taille de la meute du RUD est estimée à moins de huit individus. Le processus potentiel à l'origine des schémas susmentionnés implique la polygamie dans la deuxième meute (SRN) avec environ 10 individus estimés, mais aucune femelle à reproduction multiple n'a été observée dans cette meute jusqu'à présent. Pour cette raison, et en raison de l'absence de preuve génétique d'une femelle fondatrice de la meute RUD après l'année du loup 2019/2020, nous supposons que la possibilité de la mort ou du départ de la première femelle reproductrice (GW1112f) est une explication plus probable.

Les zones centrales des deux meutes BBF correspondent à celles d'autres meutes étudiées d'Europe, où la taille du territoire varie entre 100-400 km² (Fuller et al. 2003, Jędrzejewski et al. 2007, Duchamp et al. 2012). Dans l'ensemble, les loups présentent une grande variabilité dans leur domaine vital et la taille de leur territoire, qui dépend fortement de la disponibilité des proies, de la latitude et du stade de colonisation (Mattisson et al. 2013)

Les zones protégées comme tremplin pour les îles sauvages

Compte tenu du statut de parc national du BBF, l'étude illustre l'importance des zones protégées en tant qu'outils de conservation de la biodiversité. Elles peuvent préserver la faune et la flore et fournir des habitats à l'abri des influences humaines perturbatrices, en particulier du braconnage (Bassi et al. 2015, Rosenblatt et al. 2016, Henschel et al. 2020). En Allemagne, par exemple, la recolonisation initiale des loups a été facilitée par l'installation de meutes dans des zones interdites au public, telles que des zones d'entraînement militaire et des zones minières (Reinhardt et al. 2019). Alors que les zones protégées sont souvent trop petites en Europe centrale pour servir de refuges aux grands carnivores, la forêt Bavaroise et les parcs nationaux de Sumava s'étendent sur une zone capable d'accueillir plusieurs territoires de meutes de loups, et le nombre de meutes dérivées de la paire fondatrice décrite ci-dessus augmente au cours des dernières années du loup. Par conséquent, ils peuvent présenter une région d'une importance particulière pour la conservation des grands carnivores. La préservation à long terme d'une population stable de lynx Européens dans la région du BBF (Müller et al. 2014) en est un autre exemple et souligne l'importance des grandes régions naturelles protégées en tant qu'îlots de nature relativement sauvage au sein des paysages anthropiques densément peuplés d'Europe centrale. **Ces régions peuvent servir de tremplin au cours du processus de recolonisation.** La présence de prédateurs au sommet de la chaîne, tels que les loups, peut à son tour augmenter la valeur des zones protégées (Runte 2002) en raison de leur rôle de clé de voûte et de leurs effets descendants sur l'écosystème (Ripple et Beschta, 2012, Ripple et al. 2014).

References

- Andersen, L. W., Harms, V., Caniglia, R., Czarnomska, S. D., Fabri, E., Jędrzejewska, B., Kluth, G., Madsen, A. B., Nowak, C., Pertoldi, C., Randi, E., Reinhardt, I. and Stronen, A. V. 2015. Long-distance dispersal of a wolf, *Canis lupus*, in northwestern Europe. – *Mamm. Res.* 60: 163–168.
- Ansorge, H., Holzapfel, M., Kluth, G., Reinhardt, I. and Wagner, C. 2010. Die Rückkehr der Wölfe. Das erste Jahrzehnt. – *Biol. Unserer Zeit* 40: 244–253.
- Ausband, D. E. 2018. Multiple breeding individuals within groups in a social carnivore. – *J. Mammal.* 99: 836–844.

- Ausband, D. E. and Mitchell, M. S. 2021. The effect of group size on reproduction in cooperatively breeding gray wolves depends on density. – *Anim. Conserv.* 24: 994–1000.
- Bassi, E., Willis, S. G., Passilongo, D., Mattioli, L. and Apollonio, M. 2015. Predicting the spatial distribution of wolf (*Canis lupus*) breeding areas in a mountainous region of central Italy. – *PLoS One* 10: e0124698.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. and Bonhomme, F. 2000. GENETIX, A Windows™ based software for population genetic analyses. laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5171. – Univ. de Montpellier, <http://www.univmontp2.fr/genetix/genetix.htm>.
- Benschop, C., Haned, H. and Sijen, T. 2013. Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. – *Int. J. Leg. Med.* 127: 11–23.
- Boitani, L. 2018. *Canis lupus* (errata version published in 2019), vol. 2018. – The IUCN Red List of Threatened Species, p. e.T3746A144226239.
- Brainerd, S., Andrén, H., Bangs, E., Bradley, L., Fontaine, J., Hall, W., Iliopoulos, Y., Jimenez, M., Jozwiak, E., Liberg, O., Mack, C., Meier, T., Niemeyer, C., Pedersen, H., Sand, H., Schultz, R., Smith, D., Wabakken, P. and Wydeven, A. 2007. The effects of breeder loss on wolves. – *J. Wildl. Manage.* 72: 89–98.
- Breen, M. et al. 2001. Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. – *Genome Res.* 11: 1784–1795.
- Buřka, L., Heurich, M., Engleder, T., Wölfl, M., Červený, J. and Scherzinger, W. 2005. Wolf occurrence in the Czech-Bavarian-Austrian border region – review of the history and current status. – *Silva Gabreta* 11: 27–42.
- Byrne, M. E., Webster, S. C., Lance, S. L., Love, C. N., Hinton, T. G., Shamovich, D. and Beasley, J. C. 2018. Evidence of long-distance dispersal of a gray wolf from the Chernobyl Exclusion Zone. – *Eur. J. Wildl. Res.* 64: 1–5.
- Courchamp, F., Berec, L. and Gascoigne, J. 2008. Allee effects in ecology and conservation. – Oxford Univ. Press.
- Creel, S., Spong, G., Sands, J. L., Rotella, J., Zeigle, J., Joe, L., Murphy, K. M. and Smith, D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. – *Mol. Ecol.* 12: 2003–2009.
- Duchamp, C., Boyer, J., Briaudet, P.-E., Leonard, Y., Moris, P., Bataille, A., Dahier, T., Delacour, G., Millischer, G., Miquel, C., Poillot, C. and Marboutin, E. 2012. A dual frame survey to assess time- and space-related changes of the colonizing wolf population in France. – *Hystrix* 23: 1–12.
- Elišová, K., Lucas Lledó, J. I., Grau, J. H., Loudová, M., Bannikova, A. A., Zolotareva, K. I., Beneš, V., Hulva, P. and Černá Bolfíková, B. 2022. Contrasting levels of hybridization across the two contact zones between two hedgehog species revealed by genome-wide SNP data. – *Heredity* 129: 305–315.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. – *Mol. Ecol.* 14: 2611–2620.
- Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J. M., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P. and Randi, E. 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. – *Mol. Ecol.* 16: 1661–1671.
- Fabbri, E., Caniglia, R., Kusak, J., Galov, A., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Huber, D. and Randi, E. 2014. Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. – *Mamm. Biol.* 79: 138–148.
- Fontserè, C., de Manuel, M., Marques-Bonet, T. and Kuhlwillm, M. 2019. Admixture in mammals and how to understand its functional implications on the abundance of gene flow in mammalian species, its impact on the genome, and roads into a functional understanding. – *BioEssays* 41: e1900123.
- Footo, A. D. et al. 2016. Genome-culture coevolution promotes rapid divergence of killer whale ecotypes. – *Nat. Commun.* 7: 11693.
- Francisco, L. V., Langston, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L. and Ostrander, E. A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. – *Mamm. Genome* 7: 359–362.
- Fredholm, M. and Winterø, A. K. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. – *Mamm. Genome* 6: 11–18.
- Fuller, T. K., Mech, L. D. and Cochrane, J. F. 2003. Wolf population dynamics. Wolves: behaviour, ecology, and conservation, vol. 481. – Univ. Chicago Press Pacific Climatic Effects Ungulate Recruitment, pp. 161–191.
- Guyon, R., Lorentzen, T. D., Hitte, C., Kim, L., Cadieu, E., Parker, H. G., Quignon, P., Lowe, J. K., Renier, C., Gelfenbeyn, B., Vignaux, F., DeFrance, H. B., Gloux, S., Mahairas, G. G., André, C., Galibert, F. and Ostrander, E. A. 2003. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. – *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 5296–5301.
- Haag, T., Santos, A. S., Sana, D. A., Morato, R. G., Cullen, L., Crawshaw, P. G., De Angelo, C., Di Bitetti, M. S., Salzano, F. M. and Eizirik, E. 2010. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). – *Mol. Ecol.* 19: 4906–4921.
- Hausknecht, R., Gula, R., Pirga, B. and Kuehn, R. 2007. Urine – a source for non-invasive genetic monitoring in wildlife. – *Mol. Ecol. Notes* 7: 208–212.
- Hendricks, S. A., Schweizer, R. M., Harrigan, R. J., Pollinger, J. P., Paquet, P. C., Darimont, C. T., Adams, J. R., Waits, L. P., vonHoldt, B. M., Hohenlohe, P. A. and Wayne, R. K. 2019. Natural re-colonization and admixture of wolves (*Canis lupus*) in the US Pacific Northwest: challenges for the protection and management of rare and endangered taxa. – *Heredity* 122: 133–149.
- Henschel, P., Petracca, L. S., Ferreira, S. M., Ekwanga, S., Ryan, S. D. and Frank, L. G. 2020. Census and distribution of large carnivores in the Tsavo national parks, a critical east African wildlife corridor. – *Afr. J. Ecol.* 58: 383–398.
- Heurich, M., Brand, T. T., Kaandorp, M. Y., Šustr, P., Müller, J. and Reineking, B. 2015. Country, cover or protection: what shapes the distribution of red deer and roe deer in the Bohemian Forest ecosystem? – *PLoS One* 10: e0120960.
- Hindrikson, M. et al. 2017. Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. – *Biol. Rev.* 92: 1601–1629.
- Horn, S., Prost, S., Stiller, M., Makowiecki, D., Kuznetsova, T., Benecke, N., Pucher, E., Hufthammer, A. K., Schouwenburg, C., Shapiro, B. and Hofreiter, M. 2014. Ancient mitochondrial DNA and the genetic history of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Europe. – *Mol. Ecol.* 23: 1717–1729.
- Huck, M., Jędrzejewski, W., Borowik, T., Jędrzejewska, B., Nowak, S. and Mysłajek, R. W. 2011. Analyses of least cost paths for

- determining effects of habitat types on landscape permeability: wolves in Poland. – *Acta Theriol.* 56: 91–101.
- Huff, D. D., Miller, L. M., Chizinski, C. J. and Vondracek, B. 2011. Mixed-source reintroductions lead to outbreeding depression in second-generation descendants of a native North American fish. – *Mol. Ecol.* 20: 4246–4258.
- Hulva, P., Černá Bolfíková, B. Č., Woznicová, V., Jindřichová, M., Benešová, M., Myslejsek, R. W., Nowak, S., Szewczyk, M., Niedźwiecka, N., Figura, M., Hájková, A., Sándor, A. D., Zyka, V., Romportl, D., Kutal, M., Findo, S. and Antal, V. 2018. Wolves at the crossroad: fission–fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. – *Divers. Distrib.* 24: 179–192.
- Hulva, P., Collet, S., Baránková, L., Valentová, K., Šrutová, J., Bauer, H., Gahbauer, M., Mokřý, J., Romportl, D., Smith, A. F., Vorel, A., Zýka, V., Nowak, C., Černá Bolfíková, B. and Heurich, M. 2024. Data from: Genetic admixture between Central European and Alpine wolf populations. – Dryad Digital Repository, <https://doi.org/10.5061/dryad.zgmsbccdt>.
- Hůrka, L. 1981. Historie výskytu velkých šelem v západních a jihozápadních Čechách [The history of the occurrence of the big carnivores in the western and the south-western Bohemia]. – *Zprávy Muzei Západočeského Kraje Příroda* 24: 95–103, in Czech.
- Jan, M., Stronen, A. V., Boljite, B., Černe, R., Huber, Đ., Iosif, R., Kljun, F., Konec, M., Kos, I., Krofel, M., Kusak, J., Luštrik, R., Majič Skrbinšek, A., Promberger-Fürerpass, B., Potočnik, H., Rigg, R., Trontelj, P. and Skrbinšek, T. 2023. Wolf genetic diversity compared across Europe using the yardstick method. – *Sci. Rep.* 13: 13727.
- Jarausch, A., Harms, V., Kluth, G., Reinhardt, I. and Nowak, C. 2021. How the west was won: genetic reconstruction of rapid wolf recolonization into Germany's anthropogenic landscapes. – *Heredity* 127: 92–106.
- Jędrzejewski, W., Schmidt, K., Theuerkauf, J., Jędrzejewska, B. and Kowalczyk, R. 2007. Territory size of wolves *Canis lupus*: linking local (Białowieża Primeval Forest, Poland) and Holarctic-scale patterns. – *Ecography* 30: 66–76.
- Jimenez, M. D., Bangs, E. E., Boyd, D. K., Smith, D. W., Becker, S. A., Ausband, D. E., Woodruff, S. P., Bradley, E. H., Holyan, J. and Laudon, K. 2017. Wolf dispersal in the Rocky Mountains, Western United States: 1993–2008. – *J. Wildl. Manage.* 81: 581–592.
- Jones, O. R. and Wang, J. 2010. colony: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. – *Mol. Ecol. Resour.* 10: 551–555.
- Kaczynsky, P., Kluth, G., Knauer, F., Rauer, G., Reinhardt, I. and Wotschikowsky, U. 2009. Monitoring of large carnivores in Germany. – *BfN Script* 251: 1–99.
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P. and Taper, M. L. 2006. ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. – *Mol. Ecol. Notes* 6: 576–579.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. – *Mol. Ecol.* 16: 1099–1106.
- Kearns, A. M., Restani, M., Szabo, I., Schröder-Nielsen, A., Kim, J. A., Richardson, H. M., Marzluff, J. M., Fleischer, R. C., Johnsen, A. and Omland, K. E. 2018. Genomic evidence of speciation reversal in ravens. – *Nat. Commun.* 9: 906.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. and Drummond, A. 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. – *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Kojola, I., Aspi, J., Hakala, A., Heikkinen, S., Ilmoni, C. and Ronkainen, S. 2006. Dispersal in an expanding wolf population in Finland. – *J. Mammal.* 87: 281–286.
- Kopatz, A., Eiken, H. G., Aspi, J., Kojola, I., Tobiassen, C., Tironen, K. F., Danilov, P. I. and Hagen, S. B. 2014. Admixture and gene flow from Russia in the recovering northern European brown bear (*Ursus arctos*). – *PLoS One* 9: e97558.
- Krehenwinkel, H. and Tautz, D. 2013. Northern range expansion of European populations of the wasp spider *Argiope bruennichi* is associated with global warming–correlated genetic admixture and population-specific temperature adaptations. – *Mol. Ecol.* 22: 2232–2248.
- Křenová, Z. and Vrba, J. 2014. Just how many obstacles are there to creating a National Park? A case study from the Šumava National Park. – *Eur. J. Environ. Sci.* 4: article 1.
- Kutal, M. et al. 2017. Výskyt velkých šelem – rysa ostrovida (*Lynx lynx*), vlka obecného (*Canis lupus*) a medvěda hnědého (*Ursus arctos*) – a kočky divoké (*Felis silvestris*) v České republice a na západním Slovensku v letech 2012–2016 (Carnivora) [Occurrence of large carnivores – *Lynx lynx*, *Canis lupus*, and *Ursus arctos* – and of *Felis silvestris* in the Czech Republic and western Slovakia in 2012–2016 (Carnivora)]. – *Lynx* 48: 93–107.
- Li, Y. L. and Liu, J. X. 2018. structure selector: a web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. – *Mol. Ecol. Resour.* 18: 176–177.
- Lingaas, E., Sorensen, A., Juneja, R. K., Johansson, S., Fredholm, M., Wintero, A. K., Sampson, J., Mellersh, C., Curzon, A., Holmes, N. G., Binns, M. M., Dickens, H. F., Ryder, E. J., Gerlach, J., Bäumle, E. and Dolf, G. 1997. Towards construction of a canine linkage map: establishment of 16 linkage groups. – *Mamm. Genome* 8: 218–221.
- Lucena-Perez, M., Bazzicalupo, E., Paijmans, J., Kleinman-Ruiz, D., Dalén, L., Hofreiter, M., Delibes, M., Clavero, M. and Godoy, J. A. 2022. Ancient genome provides insights into the history of Eurasian lynx in Iberia and Western Europe. – *Quat. Sci. Rev.* 285: 107518.
- Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L. and Randi, E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. – *Mol. Ecol.* 11: 857–868.
- Mariat, D., Kessler, J. L., Vaiman, D. and Panthier, J. J. 1996. Polymorphism characterization of five canine microsatellites. – *Anim. Genet.* 27: 434–435.
- Marucco, F. et al. 2023. A multidisciplinary approach to estimating wolf population size for long-term conservation. – *Conserv. Biol.* 37: e14132.
- Mattisson, J., Sand, H., Wabakken, P., Gervasi, V., Liberg, O., Linnell, J. D., Rauset, G. R. and Pedersen, H. C. 2013. Home range size variation in a recovering wolf population: evaluating the effect of environmental, demographic, and social factors. – *Oecologia* 173: 813–825.
- McKelvey, K. S. and Schwartz, M. K. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. – *J. Wildl. Manage.* 68: 439–448.
- Meachen, J. A., Brannick, A. L. and Fry, T. J. 2016. Extinct Beringian wolf morphotype found in the continental U.S. has

- implications for wolf migration and evolution. – *Ecol. Evol.* 6: 3430–3438.
- Mech, L. and Boitani, L. 2003. Wolves: behavior, ecology, and conservation. – Univ. Chicago Press.
- Mech, L. D. 2002. Breeding season of wolves, *Canis lupus*, in relation to latitude. – *Can. Field Nat.* 116: 139–140.
- Metzger, M. J., Bunce, R. G. H., Jongman, R. H. G., Mürger, C. A. and Watkins, J. W. 2005. A climatic stratification of the environment of Europe. – *Global Ecol. Biogeogr.* 14: 549–563.
- Molinari-Jobin, A., Wölf, S., Marboutin, E., Molinari, P., Woelfl, M., Kos, I., Fasel, M., Koren, I., Fuxjäger, C., Breitenmoser, C., Huber, T., Blazic, M. and Breitenmoser, U. 2012. Monitoring the lynx in the Alps. – *Hystrix* 23: 49–53.
- Montana, L., Caniglia, R., Galaverni, M., Fabbri, E., Ahmed, A., Bolfiková, B. Č., Czarnomska, S. D., Galov, A., Godinho, R., Hindrikson, M., Hulva, P., Jędrzejewska, B., Jelenčič, M., Kotal, M., Saarna, U., Skrbinšek, T. and Randi, E. 2017. Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated wolf population. – *PLoS One* 12: e0176560.
- Mueller, S. A., Reiners, T. E., Steyer, K., von Thaden, A., Tiesmeyer, A. and Nowak, C. 2020. Revealing the origin of wildcat reappearance after presumed long-term absence. – *Eur. J. Wildl. Res.* 66: 94.
- Müller, J., Wölf, M., Wölf, S., Müller, D. W. H., Hothorn, T. and Heurich, M. 2014. Protected areas shape the spatial distribution of a European lynx population more than 20 years after reintroduction. – *Biol. Conserv.* 177: 210–217.
- Munclinger, P., Syrůčková, A., Náhlovský, J., Durka, W., Saveljev, A. P., Rosell, F., Stubbe, A., Stubbe, M., Ulevičius, A., Samiya, R., Yanuta, G. and Vorel, A. 2022. Recovery in the melting pot: complex origins and restored genetic diversity in newly established Eurasian beaver (*Rodentia: Castoridae*) populations. – *Biol. J. Linn. Soc.* 135: 793–811.
- Neff, M. W., Broman, K. W., Mellers, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ziegler, J. S., Ostrander, E. A. and Rine, J. 1999. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. – *Genetics* 151: 803–820.
- Nowak, R. M. and Federoff, N. E. 2002. The systematic status of the Italian wolf *Canis lupus*. – *Acta Theriol.* 47: 333–338.
- Nowak, S. and Mystajek, R. W. 2016. Wolf recovery and population dynamics in Western Poland, 2001–2012. – *Mamm. Res.* 61: 83–98.
- O’Keefe, F. R., Meachen, J., Fet, E. V. and Brannick, A. 2013. Ecological determinants of clinal morphological variation in the cranium of the North American gray wolf. – *J. Mammal.* 94: 1223–1236.
- Ostrander, E. A., Sprague, G. F. and Rine, J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. – *Genomics* 16: 207–213.
- Palmegiani, I., Gazzola, A. and Apollonio, M. 2013. Wolf diet and its impact on the ungulates community in a new recolonized area of Western Alps: Gran Paradiso National Park. – *Folia Zool.* 62: 59–66.
- Palomares, F., Lucena-Pérez, M., López-Bao, J. V. and Godoy, J. A. 2017. Territoriality ensures paternity in a solitary carnivore mammal. – *Sci. Rep.* 7: 4494.
- Pigneur, L. M., Caublot, G., Fournier-Chambrillon, C., Fournier, P., Giralda-Carrera, G., Grémillet, X., Le Roux, B., Marc, D., Simonnet, F., Smits, N., Sourp, E., Steinmetz, J., Urra-Maya, F. and Michaux, J. R. 2019. Current genetic admixture between relictual populations might enhance the recovery of an elusive carnivore. – *Conserv. Genet.* 20: 1133–1148.
- Pilot, M., Jędrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V. E., Jędrzejewska, B., Stachura, K. and Funk, S. M. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. – *Mol. Ecol.* 15: 4533–4553.
- Pilot, M., Branicki, W., Jędrzejewski, W., Goszczyński, J., Jędrzejewska, B., Dykyy, I., Shkvyrya, M. and Tsingarska, E. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. – *BMC Evol. Biol.* 10: 104.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, A. and Lareu, M. V. 2013. An overview of structure: applications, parameter settings, and supporting software. – *Front. Genet.* 4: 98.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155: 945–959.
- Puechmaille, S. J. 2016. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. – *Mol. Ecol. Resour.* 16: 608–627.
- Randi, E., Hulva, P., Fabbri, E., Galaverni, M., Galov, A., Kusak, J., Bigi, D., Bolfiková, B. Č., Smetanová, M. and Caniglia, R. 2014. Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. – *PLoS One* 9: e86409.
- Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Saveljev, A. P., Sidorovich, V., Ozolins, J., Männil, P., Balčiauskas, L., Kojola, I., Okarma, H., Kowalczyk, R. and Schmidt, K. 2014. Long-range gene flow and the effects of climatic and ecological factors on genetic structuring in a large, solitary carnivore: the Eurasian lynx. – *PLoS One* 9: e115160.
- Ražen, N., Brugnoli, A., Castagna, C., Groff, C., Kaczensky, P., Kljun, F., Knauer, F., Kos, I., Krofel, M., Luštrik, R., Majič, A., Rauer, G., Righetti, D. and Potočnik, H. 2016. Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. – *Eur. J. Wildl. Res.* 62: 137–142.
- Reinhardt, I., Kluth, G., Nowak, C., Szentiks, C. A., Krone, O., Ansoorge, H. and Mueller, T. 2019. Military training areas facilitate the recolonization of wolves in Germany. – *Conserv. Lett.* 12: e12635.
- Ripple, W. J. and Beschta, R. L. 2012. Large predators limit herbivore densities in northern forest ecosystems. – *Eur. J. Wildl. Res.* 58: 733–742.
- Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., Berger, J., Elmhagen, B., Letnic, M., Nelson, M. P., Schmitz, O. J., Smith, D. W., Wallach, A. D. and Wirsing, A. J. 2014. Status and ecological effects of the world’s largest carnivores. – *Science* 343: 1241484.
- Rius, M. and Darling, J. A. 2014. How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? – *Trends Ecol. Evol.* 29: 233–242.
- Rosenblatt, E., Creel, S., Becker, M. S., Merkle, J., Mwape, H., Schuette, P. and Simpamba, T. 2016. Effects of a protection gradient on carnivore density and survival: an example with leopards in the Luangwa valley, Zambia. – *Ecol. Evol.* 6: 3772–3785.
- Runte, A. 2002. Why national parks? – *George Wright Forum* 19: 67–71.
- Sagvik, J., Uller, T. and Olsson, M. 2005. Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. – *Conserv. Genet.* 6: 205–211.
- Salari, L., Achino, K. F., Gatta, M., Petronio, C., Rolfo, M. F., Silvestri, L. and Pandolfi, L. 2017. The wolf from Grotta Mora Cavorso (Simbruini mountains, Latium) within the evolution of *Canis lupus* L., 1758 in the Quaternary of Italy. – *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 476: 90–105.
- Shibuya, H., Collins, B. K., Huang, T. H. and Johnson, G. S. 1994. A polymorphic (AGGAAT)_n tandem repeat in an

- intron of the canine von Willebrand factor gene. – *Anim. Genet.* 25: 122.
- Schmidt, K., Jędrzejewski, W., Theuerkauf, J., Kowalczyk, R., Okarma, H. and Jędrzejewska, B. 2007. Reproductive behaviour of wild-living wolves in Białowieża Primeval Forest (Poland). – *J. Ethol.* 26: 69–78.
- Sidorovich, V. and Rotenko, I. 2019. Reproduction biology in grey wolves *Canis lupus* in Belarus: common beliefs versus reality. – *Chatyry Chverci*.
- Sidorovich, V. E., Stolyarov, V. P., Vorobei, N. N., Ivanova, N. V. and Jędrzejewska, B. 2007. Litter size, sex ratio, and age structure of gray wolves, *Canis lupus*, in relation to population fluctuations in northern Belarus. – *Can. J. Zool.* 85: 295–300.
- Silverman, B. W. 1998. *Density estimation for statistics and data analysis*, 1st edn. – Routledge.
- Stansbury, C. R., Ausband, D. E., Zager, P., Mack, C. M. and Waits, L. P. 2016. Identifying gray wolf packs and dispersers using noninvasive genetic samples. – *J. Wildl. Manage.* 80: 1408–1419.
- Szewczyk, M., Nowak, S., Niedźwiecka, N., Hulva, P., Špinkytė-Bačkaitienė, R., Demjanovičová, K., Bolíková, B. Č., Antal, V., Fenchuk, V., Figura, M., Tomczak, P., Stachyra, P., Stępiak, K. M., Zwijacz-Kozica, T. and Mysłajek, R. W. 2019. Dynamic range expansion leads to establishment of a new, genetically distinct wolf population in Central Europe. – *Sci. Rep.* 9: 19003.
- Szewczyk, M. et al. 2021. Genetic support for the current discrete conservation unit of the Central European wolf population. – *Wildl. Biol.* 2021: 1–7.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. and Bouvet, J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. – *Nucl. Acids Res.* 24: 3189–3194.
- Tucker, M. A. et al. 2018. Moving in the Anthropocene: global reductions in terrestrial mammalian movements. – *Science* 359: 466–469.
- Tumendemberel, O., Zedrosser, A., Proctor, M. F., Reynolds, H. V., Adams, J. R., Sullivan, J. M., Jacobs, S. J., Khorloojav, T., Tserenbataa, T., Batmunkh, M., Swenson, J. E. and Waits, L. P. 2019. Phylogeography, genetic diversity, and connectivity of brown bear populations in Central Asia. – *PLoS One* 14: e0220746.
- Valière, N., Fumagalli, L., Gelly, L., Miquel, C., Lequette, B., Poulle, M.-L., Weber, J.-M., Arlettaz, R. and Taberlet, P. 2003. Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. – *Anim. Conserv. Forum* 6: 83–92.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. and Shipley, P. 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. – *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Volokh, A. 2011. Expansion and reproduction of wolf (*Canis lupus* L.) populations in the steppe zone of Ukraine. – <http://elar.tsatu.edu.ua/handle/123456789/4179>.
- Zlatanova, D., Ahmed, A., Valasseva, A. and Genov, P. 2014. Adaptive diet strategy of the wolf (*Canis lupus* L.) in Europe: a review. – *Acta Zool. Bulg.* 66: 439–452.