

Caractérisation génétique des loups gris (*Canis lupus* L. 1758) de Bosnie-Herzégovine : implications pour la conservation

Conservation Genetics (2018) 19:755–760
<https://doi.org/10.1007/s10592-017-1042-7>

SHORT COMMUNICATION



Genetic characterization of grey wolves (*Canis lupus* L. 1758) from Bosnia and Herzegovina: implications for conservation

Dragana Šnjegota¹ · Milomir Stefanović² · Nevena Veličković² · Duško Ćirović³ · Mihajla Djan²

Received: 4 July 2017 / Accepted: 22 December 2017 / Published online: 28 December 2017
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2017

Résumé

Les loups gris de Bosnie-Herzégovine forment une sous-population de la population de loups Dinaric-Balkan et représentent l'une des populations de loups les moins étudiées d'Europe. La population Dinaric-Balkan étant une source précieuse de diversité génétique pour les populations voisines, des évaluations complètes sont justifiées. Nous avons cherché à déterminer la **variabilité génétique** et la structure de la population de loups gris de Bosnie-Herzégovine, ainsi qu'à estimer les niveaux de flux génétique et de consanguinité et à évaluer les signaux génétiques d'un goulot d'étranglement. Pour ce faire, nous avons analysé la variabilité de dix-huit loci microsatellites. **Nous avons trouvé une hétérozygotie génétique modérément élevée pour les loups de Bosnie-Herzégovine, comme cela a été décrit pour d'autres populations de loups Dinariques et Balkaniques.** Nous révélons une faible structuration génétique avec deux groupes génétiques identifiés. Les loups de la partie orientale de la région forment un groupe relativement distinct, tandis que les individus du second groupe se chevauchent assez considérablement avec des individus mélangés. Bien que le signal de la structure génétique soit faible, le regroupement des individus de la partie orientale du pays s'est étendu à toutes les analyses. Ce groupe pourrait donc être considéré comme une unité de gestion distincte, nécessitant peut-être une attention particulière en matière de conservation.

INTRODUCTION

Après une période de déclin au cours des dix-neuvième et vingtième siècles, la taille et l'aire de répartition des loups gris Européens augmentent aujourd'hui grâce à la mise en œuvre de mesures de conservation (Randi 2011 ; Chapron et al. 2014). Kaczensky et al. (2013) ont défini dix populations de loups en Europe, réparties dans 28 pays et occupant plus de $8 \times 106 \text{ km}^2$ (Chapron et al. 2014). Parmi elles, la population de loups Dinaric-Balkan semble avoir été isolée pendant plus d'un siècle (Hindrikson et al. 2016). Elle se compose de ~ 3900 loups habitant huit pays et conserve très probablement une proportion significative de la diversité génétique présente dans la population européenne de loups autrefois répandue et continue (Gomerčić et al. 2010 ; Pilot et al. 2010 ; Djan et al. 2014 ; Fabbri et al. 2014 ; Moura et al. 2014 ; Hindrikson et al. 2016). Des preuves de plus en plus nombreuses confirment que cette population joue un rôle dans la recolonisation des régions voisines (Pilot et al. 2010 ;

Fabbri et al. 2014 ; Ražen et al. 2016) et qu'elle présente une structuration génétique localisée (Fabbri et al. 2014 ; Djan et al. 2014).

Les loups de Bosnie-Herzégovine constituent l'élément central de la population Dinarico-Balkanique et, à ce jour, n'ont pas été suffisamment étudiés en termes de génétique des populations. Selon l'Association de chasse de Bosnie-Herzégovine, 350 loups habitent le pays (<http://www.slobih.ba>), et leur abondance est supposée être en augmentation sur la base du nombre d'animaux tués chaque année. Plusieurs auteurs ont rapporté un déclin de la population et une structuration potentielle (Boitani 2000 ; Djan et al. 2014 ; Šnjegota et al. 2016). Il n'existe pas de législation officielle concernant les loups en Bosnie-Herzégovine. Bien que certaines études antérieures qui ont exploré la diversité génétique des populations de loups Dinariques-Balkaniques aient inclus des individus de Bosnie-Herzégovine (Lucchini et al. 2004 ; Gomerčić et al. 2010 ; Moura et al. 2014 ; Fabbri et al. 2014 ; Djan et al. 2014), la taille limitée des échantillons a empêché la caractérisation génétique de cette sous-population. Les premiers résultats sur la diversité génétique des loups de Bosnie-Herzégovine ont révélé une fragmentation de la population et des signaux génétiques de consanguinité, basés sur la variabilité des microsattellites (Šnjegota et al. 2016). Ces résultats ont donné lieu à une étude génétique des populations plus intensive, avec un échantillon plus important et une zone d'échantillonnage plus vaste. Notre étude a été conçue pour : (i) déterminer la variabilité et la structure génétiques des loups gris de Bosnie-Herzégovine ; (ii) estimer les niveaux de flux génétique et de consanguinité, ainsi que les signaux génétiques d'un goulot d'étranglement ; et (iii) discuter des implications pour la conservation.

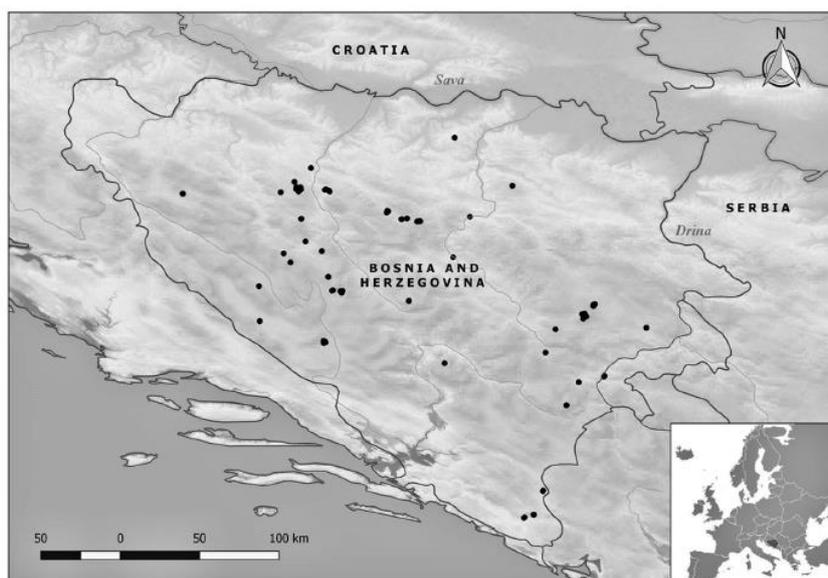


Fig. 1. Carte montrant les lieux d'échantillonnage des loups gris de Bosnie-Herzégovine

MATERIEL ET METHODE

Un ensemble de 68 échantillons de tissus musculaires a été collecté à travers la Bosnie-Herzégovine (Fig. 1) entre 2008 et 2016. Les échantillons de tissus de loups ont été obtenus à partir d'animaux tués sur la route et chassés légalement par des chasseurs et des associations de chasseurs. Aucun animal n'a été tué spécifiquement pour cette étude. L'ADN a été extrait selon une méthode d'isolation de l'ADN au phénol-chloroforme (Sambrook et Russel 2001). **Dix-huit microsattellites** et le locus de détermination du sexe de l'amélogénine ont été amplifiés à l'aide du kit The Canine Genotypes™ Panel 1.1 (Finnzymes, Thermo Fisher

Scientific, Finlande), en suivant les recommandations du fabricant. Le génotypage a été effectué sur un analyseur génétique ABI3730xl (AppliedBiosystem, Californie) et la taille de chaque allèle a été déterminée par GeneMarker (Softgenetics). Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) a été utilisé pour vérifier les erreurs de génotypage telles que les bandes bégayantes, les allèles nuls et les grandes pertes d'allèles.

Le nombre d'allèles par locus (N_a), les hétérozygosités observées (H_o) et attendues (H_e), et le F_{IS} par locus ont été calculés dans ARLEQUIN v.3.5.1.2 (Excoffier et Lischer 2010). Le même logiciel a été utilisé pour tester le déséquilibre de liaison (LD) et les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE). Nous avons appliqué une correction séquentielle de Boniferroni pour les tests multiples (Rice 1989).

STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000 ; Falush et al. 2003) a été utilisé pour affecter les individus à des groupes génétiques sans information a priori. Les simulations ont été effectuées avec un MCMC de 10^6 itérations après un burn-in de 10^5 et en adoptant le modèle de mélange de population avec des fréquences d'allèles corrélées (K variait de 1 à 5, 10 exécutions indépendantes pour chaque K). Le nombre le plus probable de grappes a été évalué sur la base des logarithmes de vraisemblance [$\ln \Pr(X|K)$] et de la méthode ΔK d'Evanno et al. (2005). Le coefficient d'appartenance individuelle Q a été calculé en faisant la moyenne des proportions de mélange individuelles sur les 10 exécutions indépendantes pour K en CLUMPAK estimé (Kopelman et al. 2015). Les résultats ont été interprétés dans une version web interactive du paquet Pophelper (<http://www.pophelper.com/>) dans R. La structure de la population a été estimée en implémentant les coordonnées spatiales comme information a priori dans TESS v.2.3.1 (Chen et al. 2007). Les simulations ont été effectuées avec les modèles de mélange BYM et CARad, un total de 50 000 balayages et 10 000 ajustements (K variait de 2 à 5 ; 10 exécutions pour chaque K). Le nombre le plus probable de grappes a été évalué en prenant 20% des valeurs les plus faibles du critère d'information de déviance (DIC) pour chaque K et en les traçant en fonction de K_{max} , puis la valeur la plus faible du DIC a été choisie comme nombre optimal de K . Les valeurs moyennes de Q pour les K estimés ont été évaluées dans Pophelper et également en appliquant l'interpolation spatiale dans R. GENELAND v.4.0.5 (Guillot et al. 2005) dans R (<http://www.R-project.org/>), qui incorpore également les coordonnées spatiales comme information a priori, a également été utilisé pour évaluer la structuration en utilisant des passes initiales de 10^6 itérations et un burn-in de 20% en post-traitement (K variait de 1 à 5 ; 10 passes pour chaque K). Des modèles corrélés et non corrélés ont été appliqués avec une incertitude de 10 km pour les coordonnées spatiales. K a été choisi en fonction de la probabilité a posteriori de l'appartenance à la population et de l'histogramme des valeurs K estimées pour chaque série. Une fois K déduit, GENELAND a été exécuté avec la valeur K fixe sélectionnée.

Comme approches alternatives à ces algorithmes de clustering, l'Analyse Discriminante des Composantes Principales (DAPC ; Jombart et al. 2010) et l'Analyse Spatiale des Composantes Principales (sPCA ; Jombart 2008) ont été implémentées dans ADEGENET (R.2.11.1 ; R Development Core Team 2008). La DAPC a été utilisée dans un premier temps pour détecter le nombre de clusters en fonction de la valeur la plus faible du critère d'information bayésien (BIC) (Jombart et al. 2010). sPCA a été utilisée pour détecter la structure spatiale de la population, en tenant compte de l'autocorrélation spatiale des

fréquences alléliques. La présence d'un isolement par la distance (IBD) a été testée à l'aide d'un test de Mantel (Mantel1967) implémenté dans ADEGENET.

Les groupes consensuels construits pour la détection et le calcul du nombre d'allèles privés dans GENEALEX (Peakall et Smouse 2012), et le F_{st} par paire et un test exact de différenciation génétique dans ARLEQUIN, ont été définis en fonction des résultats les plus similaires des regroupements d'individus obtenus à partir des analyses STRUCTURE et TESS ; les groupes ne contenaient que des individus assignés aux mêmes groupes dans les analyses TESS (CAR, BYM) et STRUCTURE, avec des probabilités d'appartenance égales/supérieures à 0,8 ($Q \geq 0,8$) pour chaque groupe. Tous les individus qui n'étaient pas regroupés dans le groupe spécifique ($Q < 0,8$) dans les deux analyses ont été considérés comme des individus mélangés et ont été exclus des analyses susmentionnées.

La preuve d'un goulot d'étranglement génétique récent a été testée avec Bottleneck v.1.2.02 (Cornuet et Luikart 1996). Trois modèles de mutation des microsatellites ont été pris en compte : IAM - modèle de l'allèle infini ; SMM - modèle de mutation progressive ; et TPM - modèle à deux phases. La signification de l'excès d'hétérozygotie a été vérifiée en appliquant les tests de Sign et de Wilcoxon (Cornuet et Luikart 1996). La reconstruction de la parenté a été réalisée avec KINGROUP v.2.9 (Konovalov et al. 2004) au niveau de la fratrie complète. Ce programme calcule la probabilité maximale, basée sur la fréquence des allèles et des génotypes, que deux individus partagent des allèles par descendance commune, générant un coefficient de parenté par paire. Les résultats avec $p \leq 0,01$ ont été considérés comme statistiquement significatifs.

RESULTATS

L'échantillon total comprenait 33 femelles (48%) et 35 mâles (52%). Le nombre d'allèles variait de 6 à 13 par locus, avec une moyenne de 9. Des allèles nuls ont été détectés à six loci (AHTk211, REN54P11, AHTh260, FH2054, AHTh171 et INRA 21). L'hétérozygotie moyenne observée ($H_o = 0,70$) était inférieure à celle attendue ($H_e = 0,78$). Cinq loci (AHTk211, REN54P11, AHTh260, FH2054 et AHTh171) s'écartaient de l'HWE et 1/155 paires de loci présentaient un DL. Les valeurs F_{IS} étaient statistiquement significatives pour trois loci (AHTk211, AHTh260 et AHTh171) (Tableau 1). Les loci s'écartant de l'équilibre génétique et pour lesquels les valeurs F_{IS} étaient significatives correspondent à des loci présentant des allèles nuls. Considérant que la présence d'allèles nuls peut influencer les paramètres de variabilité génétique, nous avons exclu ces six loci de nos analyses (Tableau 1 supplémentaire). En excluant ces loci, le H_o moyen était de 0,73 et le H_e moyen de 0,76, et aucune valeur F_{IS} statistiquement significative n'a été trouvée pour les loci restants. Par conséquent, pour éviter de fausses déductions sur la structure de la population (étant donné que les allèles nuls peuvent fausser les évaluations de la structuration de la population), toutes les analyses ultérieures ont été effectuées uniquement sur les loci pour lesquels des allèles nuls n'avaient pas été détectés.

Les résultats de nos analyses STRUCTURE et TESS étaient concordants, définissant tous deux, deux groupes génétiques ($K = 2$) (Fig. 1 supplémentaire, Fig. 2) mais sans différenciation claire (Fig. 2). Le coefficient d'appartenance était inférieur à 0,8 (indiv $Q < 0,8$) pour 17,6% des individus évalués, et ces individus ont été considérés comme mélangés à partir des deux groupes. Après avoir réparti les individus entre les deux groupes détectés,

nous avons remarqué que l'un d'entre eux comprenait principalement des individus de la partie orientale de la Bosnie-Herzégovine (19,1% de l'ensemble des données). Les individus de toutes les autres localités d'échantillonnage appartenaient à un autre groupe (63,2%) et se chevauchaient avec des individus mélangés (17,6%) (Fig. 2 ; Fig. 3 supplémentaire). Les résultats de notre analyse GENELAND n'ont pas confirmé les résultats de regroupement rapportés ci-dessus (méthode non corrélée $K = 3$; méthode corrélée $K = 5$), et le seuil d'appartenance à la population était très bas ($\text{popQ} < 0,6$) (Fig. supplémentaire 4).

Tableau 1. Paramètres de base de la variabilité génétique dans la population de loups gris de Bosnie-et-Herzégovine ($N = 68$)

	Na	Ho	He	HWE	Fis
AHTk211	9	0.66176	0.7854	**	0.15841*
CXX279	9	0.66176	0.7524	–	0.12125
REN169018	9	0.72059	0.70033	–	–0.02915
INU055	8	0.69118	0.74434	–	0.07191
REN54P11	8	0.69118	0.7622	**	0.09381
INRA21	7	0.69118	0.81122	–	0.14892
AHT137	12	0.85294	0.87767	–	0.02838
REN169DO1	10	0.80882	0.86253	–	0.0627
AHTh260	11	0.52941	0.82832	**	0.36258*
AHTk253	7	0.66176	0.77397	–	0.14589
INU005	11	0.86765	0.86743	–	–0.00025
INU030	8	0.76471	0.72647	–	–0.05305
FH2848	7	0.67647	0.70054	–	0.03461
AHT121	11	0.69118	0.77887	–	0.11333
FH2054	13	0.72059	0.83039	**	0.13309
REN162CO4	6	0.51471	0.54248	–	0.05157
AHTh171	8	0.61765	0.78769	**	0.21714**
REN247M23	8	0.83824	0.84444	–	0.00741
Mean	9	0.7034	0.7765		0.09472

Na number of alleles per locus, *Ho* observed heterozygosity, *He* expected heterozygosity, *F_{IS}* coefficient of inbreeding, *HWE* Hardy–Weinberg equilibrium (—no deviation from HWE; * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ —significant deviation after Boniferroni correction)

Dans l'analyse DAPC, les valeurs BIC avaient une valeur minimale de $K = 2$ (Figure supplémentaire 5). Les individus ont été affectés au groupe approprié en fonction des valeurs d'appartenance de $\text{indivQ} \geq 0,8$. (Figure supplémentaire 6). Les grappes détectées présentaient un chevauchement géographique et correspondaient aux grappes détectées dans les analyses STRUCTURE et TESS. La proportion d'individus mélangés était conforme à nos autres analyses (Figure supplémentaire 6). La majorité du premier groupe était constitué d'individus originaires du centre et de l'est de la Bosnie-Herzégovine, ainsi que de quelques individus aberrants originaires d'autres régions du pays. Les individus restants ont formé le deuxième groupe. Notre analyse sPCA a révélé une structure globale unique et statistiquement significative (Figure supplémentaire 7). Cependant, lorsque nous avons cartographié la zone géographique, nous avons observé une très faible structure ouest-est (Figure supplémentaire 8), similaire à nos analyses DAPC. Dix allèles privés sur 6 loci (13,3%) ont été trouvés pour le groupe 1 (représentant la partie orientale du pays), tandis que pour le groupe 2, 43 allèles privés ont été détectés (53,1%) sur l'ensemble des loci évalués. Le F_{ST} par paire entre les groupes était de 0,106 ($p < 0,05$).

Un excès d'hétérozygotie significatif a été détecté dans le cadre du modèle de mutation IAM, tant pour le test de Sign ($p \leq 0,01$) que pour le test de Wilcoxon ($p \leq 0,0004$). Des liens de parenté très significatifs ont été observés entre cinq individus du groupe 1 ($p < 0,01$) et entre 13 individus du groupe 2 ($p < 0,01$). Un individu de la partie orientale du pays (groupe 1) a montré une parenté avec un individu de la partie septentrionale du pays.

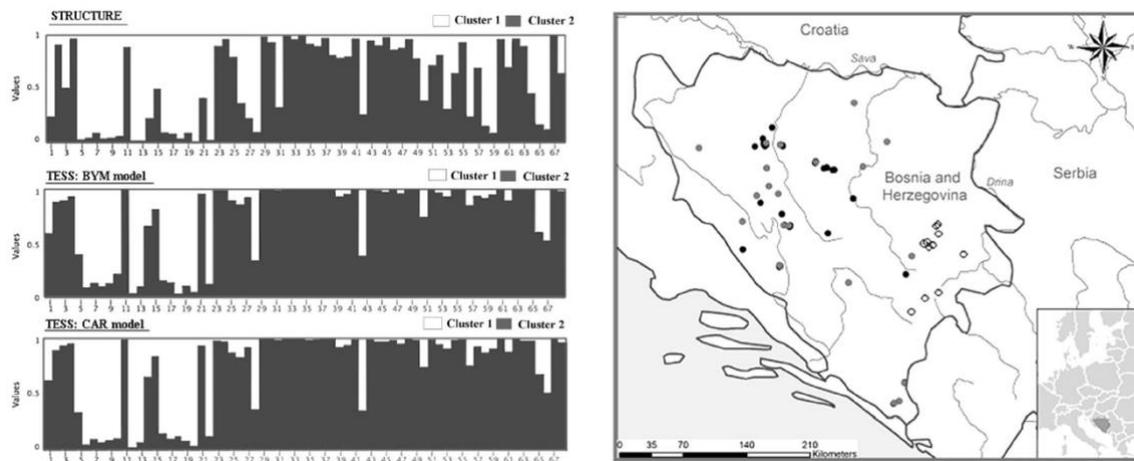


Fig. 2. A gauche : diagrammes à barres des analyses STRUCTURE et TESS montrant le nombre d'amas détectés ($K = 2$). Chaque couleur correspond à un groupe et chaque ligne représente un individu. Les parties claires des diagrammes à barres correspondent aux individus de la partie orientale de la Bosnie-Herzégovine, tandis que les parties sombres représentent les individus des autres parties du pays. Les cercles blancs symbolisent les individus de la partie orientale de la Bosnie-et-Herzégovine appartenant à un groupe détecté ($\text{indivQ} \geq 0,8$), les cercles gris représentent les individus des autres parties du pays appartenant au deuxième groupe détecté ($\text{indivQ} \geq 0,8$), et les cercles noirs indiquent les individus mélangés ($\text{indivQ} < 0,8$)

DISCUSSION

Nos résultats donnent un aperçu de la diversité génétique et de la structure de la population de loups de Bosnie-Herzégovine, sur la base de l'échantillon le plus important et de la couverture géographique la plus large.

Une diversité génétique **modérément élevée** basée sur les hétérozygosités a été observée pour notre échantillon de loups de Bosnie-Herzégovine, comme cela a été observé pour d'autres populations de loups du Dinaric-Balkan (Djan et al. 2016 ; Lucchini et al. 2004 ; Fabbri et al. 2014 ; Moura et al. 2014). Une vaste étude menée par Hindrikson et al. (2016) a révélé les hétérozygosités les plus élevées pour la population Dinaric-Balkan en Europe. Des valeurs F_{IS} significativement élevées ont été détectées pour six loci. Ces valeurs élevées de F_{IS} peuvent être dues à l'augmentation récente de la pression de chasse conduisant à des accouplements incestueux et à l'adoption de mâles immigrés non apparentés qui ne participent pas à la reproduction (Moura et al. 2014), ou à la présence d'allèles nuls. Dans la présente étude, les paramètres génétiques différaient selon que l'on incluait ou excluait les loci présentant une présence significative d'allèles nuls, ce qui nous permet de conclure que les valeurs élevées de F_{IS} que nous avons trouvées sont la conséquence d'allèles nuls.

Nous avons observé un faible signal de structuration génétique sur la base de différentes approches analytiques. Nos analyses ont défini deux groupes génétiques, regroupant les individus de l'est (STRUCTURE, TESS) et du centre-est (DAPC, sPCA) de la région dans un groupe, tandis que les individus restants du deuxième groupe se chevauchaient assez considérablement avec des individus mélangés ($\text{indivQ} < 0,8$). Nous avons trouvé un **mélange** considérable parmi les loups de Bosnie-Herzégovine, comme cela a été rapporté

pour les populations de loups de Croatie et d'Italie (Fabbri et al. 2014) et de Bulgarie et de Serbie (Bakan et al. 2014), ce qui peut indiquer une grande mobilité et un flux de gènes. Les différents résultats obtenus par l'analyse GENELAND concernant le nombre de clusters pourraient refléter la distribution des groupes familiaux plutôt que la structure de la population, comme le suggèrent Moura et al. (2014). Bien que tous les résultats précédents concernant la structure de la population soient concordants et indiquent une structure de population faible, les résultats des valeurs F_{st} par paire et le nombre d'allèles privés indiquent une structure de population non faible. Étant donné que le facteur de parenté peut fausser la structure de la population et que nous avons observé des individus apparentés dans les grappes détectées, il pourrait s'agir de l'une des principales raisons de la détection d'une structure non faible en calculant les valeurs F_{st} et les allèles privés. Les résultats modérément différents observés ici pour différentes méthodes (par exemple, nombre différent de K ou incohérence dans l'affectation des individus aux grappes) peuvent indiquer une faible structuration génétique de la population. **Cependant**, le regroupement distinct des individus de la partie orientale du pays s'est étendu à l'ensemble de nos analyses. Le manque de concordance entre les résultats de nos différentes analyses, ainsi que le grand nombre d'individus mélangés, le modèle de structuration peu clair et le nombre important de frères et sœurs au sein des groupes suggèrent que les loups de Bosnie-Herzégovine devraient être considérés comme une sous-population unique. Cependant, la divergence génétique significative entre les groupes ne doit pas être négligée. Des preuves récentes indiquent que les variations écologiques et environnementales peuvent entraîner une différenciation génétique au sein de nombreux taxons, y compris des espèces très mobiles (Bowen et Karl 2007). La partie montagneuse de l'est de la Bosnie-Herzégovine est celle où l'homme (et les établissements humains) sont les moins nombreux et où la densité de loups est la plus élevée. L'absence de l'homme favorise la persistance des loups, contribuant peut-être à l'établissement d'un groupe génétique stable et distinct (la population « de l'est »). Un modèle de variabilité génétique en fonction de la topographie différente a été rapporté pour la population de loups voisine en Croatie, pour laquelle trois groupes ont été définis correspondant aux régions de Dalmatie, Gorski Kotar et Lika (Fabbri et al. 2014). Bien que nous ne puissions pas prétendre avoir trouvé des preuves d'un groupe génétique fort dans la population de loups de Bosnie-Herzégovine, le groupe génétique supposé « oriental » mérite peut-être une attention particulière en matière de conservation.

Il est évident, d'après la littérature scientifique disponible, que la génétique des sous-populations locales de la population de loups Dinariques et Balkaniques a été principalement étudiée de manière isolée, par exemple la structure génétique basée sur la variabilité des microsatellites a été étudiée chez les loups gris de Croatie (Fabbri et al. 2014) séparément de ceux de Serbie (Djan et al. 2016). **Contrairement à la structuration observée pour les loups gris de Croatie, aucune structure génétique n'a été détectée pour les loups gris de Serbie.** Comme les loups gris de Bosnie-Herzégovine représentent un lien entre ces deux régions (les zones montagneuses de Croatie à l'ouest et de Serbie à l'est), le faible signal de structuration génétique trouvé dans cette étude pourrait refléter une structuration plus large. Il nous semble donc nécessaire d'effectuer des analyses sur l'ensemble de la population de loups gris Dinarique-Balkanique, ce qui permettrait d'obtenir des conclusions définitives sur la structure génétique de cette population. Cela permettrait de définir des unités de gestion de la conservation qui ne seraient pas limitées par des frontières administratives, ce qui faciliterait une bonne gestion de la conservation.

Djan et al. (2014) ont précédemment signalé un goulot d'étranglement pour les loups de Bosnie-Herzégovine. Ici, nous n'avons trouvé qu'un signal génétique pour un déclin récent de la population dans le cadre du modèle de mutation IAM, ce qui va à l'encontre d'une preuve solide d'un goulot d'étranglement récent.

Il existe des preuves que la population Italienne de loups a augmenté celle des Balkans Dinariques (Fabbri et al. 2014 ; Pilot et al. 2014 ; Ražen et al. 2016). Par conséquent, un suivi génétique à grande échelle de la population des Balkans Dinariques permettrait de mieux connaître les populations d'origine et de détecter les individus habitant des zones en Italie, dans les Alpes et dans des zones plus à l'ouest, ainsi que de contribuer à la préservation de sa diversité génétique. Un suivi génétique continu basé sur les résultats de notre étude peut fournir des informations supplémentaires sur la diversité génétique et la structure de la population de loups du Dinaric-Balkan, aider au suivi des individus et fournir des estimations de la contribution des loups du Dinaric-Balkan aux populations de loups nouvellement formées en Europe de l'Ouest.

References

- Bakan J, Vukan L, Popović Z, Paule L (2014) Genetic differentiation of grey wolf population (*Canis lupus* L.) from Balkan and Carpathians. *Balkan J Wild Res* 1(1):87–93
- Boitani L (2000) Action plan for the conservation of wolves in Europe (*Canis lupus*) (No. 18–113). Council of Europe, Strasbourg
- Bowen BW, Karl SA (2007) Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol Ecol* 16(23):4886–4907
- Chapron G, Kaczensky P, Linnell JDC, von-Arxx M, Huber D, Andren H, Lopez-Bao JV, Adamec M, Alvares F, Anders O, Balčiauskas L, Balys V, Bedo P, Bego F, Blanco JC, Breitenmoser U, Broseth H, Bufka L, Bunikytė R, Ciucci P, Dutsov A, Engleder T, Fuxjager C, Groff C, Holmala K, Hoxha B, Iliopoulos Y, Ionescu O, Jeremic J, Jerina K, Kluth G, Knauer F, Kojola I, Kos I, Krofel M, Kubala J, Kunovac S, Kusak J, Kutal M, Liberg O, Majic A, Mannil P, Manz R, Marboutin E, Marucco F, Melovski D, Mersini K, Mertzanis Y, Myslajek RW, Nowak S, Odden J, Ozolins J, Palomero G, Paunovic M, Persson J, Potocnik H, Quenette PY, Rauer G, Reinhardt I, Rigg R, Ryser A, Salvatori V, Skrbinek T, Stojanov A, Swenson JE, Szemethy L, Trajce A, Tsingarska-Sedefcheva E, Vana M, Veeroja R, Wabakken P, Wolf M, Wolff S, Zimmermann F, Zlatanova D, Boitani L (2014) Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science* 346(6216):1517–1519
- Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Mol Ecol Notes* 7(5):747–756
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4):2001–2014
- Djan M, Maletić V, Trbojević I, Popović D, Veličković N, Burazerović J, Čirović D (2014) Genetic diversity and structuring of the grey wolf and suggestions for conservation and management. *Biol Rev* 92(3):1601–1629. <https://doi.org/10.1111/brv.12298>
- Jombart T (2008) Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11):1403–1405
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Gen* 11(1):94
- Kaczensky P, Chapron G, von Arx M, Huber D, Andrén H, Linnell J (2013) Status, management and distribution of large carnivores—bear, lynx, wolf & wolverine—in Europe. European Commission, Brussels
- Konovalov DA, Manning C, Henshaw MT (2004) KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol Ecol Notes* 4(4):779–782
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour* 15(5):1179–1191
- Lucchini V, Galov A, Randi E (2004) Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol Ecol* 13(3):523–536
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27(2 Part 1):209–220
- Moura AE, Tsingarska E, Dąbrowski MJ, Czarnomska SD, Jędrzejewska B, Pilot M (2014) Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conserv Gen* 15(2):405–417
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539
- 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 Evol Biol* 10(1):104
- Pilot M, Dąbrowski MJ, Hayrapetyan V, Yavruyan EG, Kopaliani N, Tsingarska E, Bujalska B, Kamiński S, Bogdanowicz W, Russo D (2014) Genetic variability of the grey wolf *Canis lupus* in the Caucasus in comparison with Europe and the Middle East: distinct or intermedi-

- population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mamm Biol-Z Säugetierkunde* 79(4):277–282
- Djan M, Šnjegota D, Veličković N, Stefanović M, Vidaković DO, Čirović D (2016) Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russian J Gen* 52(8):821–827
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14(8):2611–2620
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10(3):564–567
- Fabbri E, Caniglia R, Kusak J, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Huber D, 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-Z Säugetierkunde* 79(2):138–148
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587
- Gomerčić T, Sindičić M, Galov A, Arbanasić H, Kusak J, Kocijan I, Huber Đ (2010) High genetic variability of grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zool Stud* 49(6):816–823
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Mol Ecol Resour* 5(3):712–715
- Hindrikson M, Remm J, Pilot M, Godinho R, Stronen AV, Baltrūnaitė L, Czarnomska SD, Leonard JA, Randi E, Nowak C, Åkesson M, López-Bao JV, Álvares F, Llaneza L, Echegaray J, Vilà C, Ozolins J, Rungis D, Aspi J, Paule L, Skrbinšek T, Saarma U (2016) Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis
ary population? *PLoS ONE* 9(4):e93828
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945–959
- R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>
- Randi E (2011) Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mamm Rev* 41(2):99–111
- Ražen N, Brugnoli A, Castagna C, Groff C, Kaczensky P, Kljun F, Knauer F, Kos I, Krofel M, Luštrik R, Majić A (2016) Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. *Eur J Wildl Res* 62(1):137–142
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43(1):223–225
- Sambrook JR, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSH Press, New York
- Šnjegota D, Đan M, Veličković N, Stefanović M, Trbojević I, Čirović D (2016) Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) from Bosnia & Herzegovina. *Balkan J Wildl R* 3(1):7–11
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3):535–538