



# UNIVERSITÉ IBNOU ZOHR

## CENTRE DES ÉTUDES DOCTORALES IBN ZOHR

### Formation doctorale Sciences de la Vie et Ressources Naturelles

Établissement Faculté des Sciences d'Agadir

#### THÈSE

Présentée par

Amal KORRIDA

Pour l'obtention du grade de

DOCTORAT NATIONAL

Spécialité : Génétique et Biologie Moléculaire

Les outardes Houbara "*Chlamydotis undulata*" et Macqueen's  
"*Chlamydotis macqueenii*" : Études génétique, morphométrique et  
phylogéographique.

Soutenue le 20 Octobre 2012, devant la commission d'examen composée de :

Mr. Yhya AIT ICHOU  
Mr. Hassan JAZIRI  
Mr. Ahmed BELMOUDEN  
Mr. Hamid RGUIBI IDRISI  
Mr. Aziz BENHOUSSA  
Mme. Amal AMIN-ALAMI

Professeur, Doyen de la Faculté des Sciences, Agadir  
Professeur, Directeur de l'ENS, Rabat  
Professeur, Faculté des Sciences, Agadir  
Professeur, Faculté des Sciences, El Jadida  
Professeur, Faculté des Sciences, Rabat  
Professeur, Faculté des Sciences, Agadir

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Directrice de thèse



قال تعالى: "وَ مَا مِنْ دَابَةٍ فِي الْأَرْضِ وَ لَا طَائِرٌ يَطِيرُ بِجَنَاحِيهِ  
إِلَّا أَمْمَ أَمْثَالَكُمْ مَا فَرَطْنَا فِي الْكِتَابِ مِنْ شَيْءٍ".

سورة الأنعام، الآية 38

*A Papa et Maman*

*A mes frères : Adil, Mossaab et Mohamed El Mehdi*

*A tous ceux qui me sont très chers*

## AVANT PROPOS

Ce travail n'aurait été possible sans l'aide immense et l'accueil de HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz AL SAUD International Foundation for Conservation & Development of Wildlife au sein de son Département de Génétique. J'espère que ce travail de recherche soit le témoignage de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude au regretté Feu SAR Le Prince Sultan Bin Abdul Aziz AL SAUD, pour ses nobles actions en faveur de la protection de l'environnement et de la promotion de la recherche scientifique au Maroc.

Les différents axes de recherche de cette thèse ont été financés par la HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz AL SAUD (IFCDW), le Laboratoire des Substances Naturelles de la Faculté des Sciences de l'Université Ibnou Zohr d'Agadir ainsi que par des apports personnels.

Ce travail est le fruit d'une collaboration internationale multipartite entre le Laboratoire des Substances Naturelles de la Faculté des Sciences de l'Université Ibnou Zohr d'Agadir, la HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz AL SAUD International Foundation for Conservation & Development of Wildlife et le Département des Sciences Aviaires de l'Université de Géorgie Athens aux États-Unis d'Amérique.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier ma Directrice de thèse le Pr. Amal AMIN-ALAMI et le Pr. Saïd BENHISSONNE d'avoir accepté de m'encadrer durant les quatre années de ma formation doctorale. J'ai tant apprécié leurs soutiens continus, leurs disponibilités, leurs sympathies et leurs conseils, surtout durant les moments difficiles. Que le présent travail soit la preuve de ma profonde gratitude et de mon sincère respect.

Le Dr. Sami JADALLAH, Directeur Général de l'IFCDW a été toujours présent et attentif à ma formation. Il n'a cessé de me prodiguer aide et conseils depuis mon inscription au cycle du Masters. Il m'a honoré par sa présence parmi les membres de jury du Masters et lors de son intervention, a pris engagement solennel de me porter aide et assistance durant ma formation de doctorat. Je le remercie infiniment pour ses conseils et encouragements et lui dédie tout particulièrement ce travail.

Le Pr. Mohamed AHRA, Directeur du Laboratoire des Substances Naturelles de la Faculté des Sciences d'Agadir, m'a accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie infiniment pour sa disponibilité, flexibilité et habileté à résoudre les problèmes administratifs et scientifiques. Qu'il soit rassuré de ma reconnaissance à jamais.

Je suis très endettée envers le Pr. Yhya AIT ICHOU, le Doyen de la Faculté des Sciences d'Agadir pour ses conseils précieux, son écoute, et sa compréhension. Je suis également très honorée qu'il soit le Président de jury de ma thèse. Soyez rassuré, Monsieur Le Président, de mon entière reconnaissance et de ma profonde estime.

Je tiens à remercier Monsieur Ahmed BELMOUDEN, Professeur de l'enseignement supérieur et chef du Département de Biologie à la Faculté des Sciences d'Agadir qui, bien avant cette thèse, a été mon professeur de génétique et de biologie moléculaire en licence et membre de jury de mon mémoire du Masters. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Au Professeur Hassan JAZIRI, Directeur de l'École Normale Supérieure de Rabat, j'adresse ma vive reconnaissance d'avoir accepté être rapporteur de ma thèse. Je me souviens aussi de son soutien et de nos discussions sur d'autres projets de génétique des populations comme celui de la moule méditerranéenne initié et encadré par le Pr. Saïd BENHISSONE durant ma formation du Masters ou celui des gazelles dorcas. Qu'il soit assuré de mes remerciements les plus sincères.

Je tiens également à exprimer ma considération au Pr. Hamid RGUIBI-IDRISSI, enseignant chercheur du Département de Biologie à la Faculté des Sciences d'El Jadida, qui a consacré avec bienveillance son temps à l'évaluation de ce travail de thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie aussi le Professeur Aziz BENHOUSSA, enseignant chercheur au Département de Biologie de la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir bien voulu apporter son jugement sur ce manuscrit.

Mes vifs remerciements à la Directrice et les responsables administratifs du Centre d'Études Doctorales IBN ZOHR pour leurs encouragements, services et orientations.

Je ne peux évoquer LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE sans saluer les Professeurs Samuel AGGREY de l'Université de Géorgie Athens aux USA, Juan Pablo GUTIERREZ GARCIA de la Faculté Vétérinaire, Université Complutense de Madrid en Espagne et Samuel NAHASHON de l'Université de Tennessee aux USA pour leur collaboration, patience, "easy-going attitude", enthousiasme et rigueur scientifique.

La maîtrise des logiciels statistiques et des programmes d'analyses nécessite beaucoup de sacrifice et du sang-froid. Pour leurs aides, orientations et soutiens techniques, je remercie vivement : le Dr. Andres PEREZ-FIGUEROA et le Pr. Armando CABALLERO de la Faculté de Biologie à l'Université de Vigo en Espagne, le Pr. Rod PEAKALL du Research School of Biology, The Australian National University, à Canberra en Australie, le Pr. Peter SMOUSE de l'Université de Rutgers au New Jersey aux États-Unis d'Amérique et le Dr. Eildert GROENEVELD de l'Institute of Farm Animal Genetics, à Neustadt en Allemagne.

Un grand merci au Pr. Ole SEEHAUSEN de l'institut de recherche de l'EAWAG à Kastanienbaum en Suisse et à son étudiant le Dr. Manuel SCHWEIZER du Naturhistorisches Museum der Burgergemeinde de Berne pour leurs contributions et collaboration au projet de la phylogéographie.

Je serai toujours reconnaissante de l'aide et du soutien moral du Pr. Issam SADKI, enseignant chercheur au Département de Biologie et membre du Laboratoire des Substances Naturelles de la Faculté des Sciences d'Agadir.

Je remercie aussi le Dr. Jon Martin COLLINSON de la School of Medical Sciences de l'Université d'Aberdeen, au Royaume Uni, pour ses explications et discussions scientifiques sur la taxonomie de l'outarde Houbara et Macqueen's.

Je tiens plus particulièrement à remercier tous mes anciens professeurs à la Faculté des Sciences d'Agadir qui m'ont donnés les bonnes bases, inspirés et initiés aux études universitaires supérieures et à la recherche scientifique.

Je remercie également mes ami(e)s qui m'ont soutenu(e)s durant les quatre années du doctorat surtout : Badiâa IAAZA, Mohamed Naoufal TAMSOURI, Mohamed Taha MOUTAOUAFIQ et Fatima EL AAMRI. Je leur dis aussi "Chokrane" pour les bons et agréables moments passés ensemble.

Une pensée spéciale à tout le personnel, mes camarades et mes collègues de travail au sein de l'IFCDW à Agadir et du DERS à Errachidia pour leur aide précieuse et patience durant la phase de collecte des données et d'échantillons. Sans eux, beaucoup de mesures sur le terrain n'auraient jamais été effectuées.

Finalement, je tiens à exprimer ma reconnaissance aux responsables, scientifiques et vétérinaires de différents organismes et centres internationaux pour les échantillons des ourardes asiatiques et africaines. En leurs noms, je remercie alors le National Wildlife Research Center à Taif en Arabie Saoudite, la National Commission for Wildlife Conservation and Development à Riyad en Arabie Saoudite, la Station d'élevage de la Oliva aux îles Canaries, le Butti Maktoum's Wildlife Center à Dubai aux Émirats Arabes Unis et le Service de Biodiversité du Gouvernement des îles Canaries.

## RÉSUMÉ

Chez les outardes Houbara et Macqueen's de l'écozone du Paléarctique, nous avons testé et quantifié la diversité biologique sur plusieurs niveaux hiérarchiques (espèces, sous-espèces, gènes et métapopulations) en vue de leur conservation *ex-situ*.

Les études génétiques sur les populations sauvages utilisant des loci nucléaires (microsatellites) et un marqueur mitochondrial (un fragment de 1042 pb du gène cytochrome b) ont permis d'évaluer et de tester la diversité génétique, le flux migratoire, les scénarios de colonisation, les relations phylogénétiques, les unités biologiques de conservation et les patrons historiques et démographiques élucidant les distributions biogéographiques contemporaines des trois constituants du genre "*Chlamydotis*". Contrairement aux espèces des zones tempérées et boréales, les périodes glaciaires de l'époque du Pléistocène semblent être à l'origine des expansions démographiques chez les espèces désertiques d'outardes Houbara et Macqueen's. Les tests globaux de différenciation génétique des deux marqueurs moléculaires se sont montrés contradictoires pourtant complémentaires. La discussion des différents facteurs génétiques responsables a pu confirmer ou infirmer le contraste moléculaire observé.

Nous avons mené trois autres études sur des cheptels d'outardes marocaines élevés en captivité. La modélisation mathématique des caractéristiques de croissance chez l'outarde marocaine a facilité la détermination, sous certaines conditions de captivité, du taux de croissance en plus de quatre types de croissances asymptotiques et allométriques. Les résultats ont révélé que le bec et la tarso-métatarsale atteignent rapidement l'asymptote, ce qui explique leur utilisation précoce dans le déplacement et le forage, alors que la plus grande croissance allométrique des ailes permettra aux oiseaux de fuir les prédateurs éventuelles.

L'étude du registre d'élevage d'un troupeau multi-générationnel a montré une généalogie récente et peu profonde, mais a rendu possible la caractérisation de plusieurs paramètres généalogiques. L'intervalle de génération chez l'outarde marocaine a été estimé à 4.6 ans, le coefficient de consanguinité moyen à 1.6% et l'accroissement en paire du coefficient de parenté à 1.3%. L'absence de goulots d'étranglement a été justifiée par des valeurs égales de fondateurs efficaces (*fe*) et d'ancêtres efficaces (*fa*). Cette étude a montré d'un côté, la bonne stratégie d'élevage suivie de 1993 à 2002 visant à augmenter le flux migratoire au sein du troupeau et à freiner l'apparition de la dépression de consanguinité et de l'autre côté, une absence de planification des accouplements à partir de 2004 qui a été mise en évidence par des taux élevés de consanguinité et de parenté.

Finalement, le contrôle de la diversité génétique *via* des approches métapopulationnelles, nous a permis de comparer et de discuter les différentes stratégies et politiques d'élevage conservatoire *ex-situ* de l'espèce marocaine (*Chlamydotis undulata undulata*).

Les résultats et les informations génétiques inférés de ces différents projets d'études populationnelles devraient permettre une meilleure valorisation et un maintien raisonnable et durable de la diversité génétique et biologique de ces ressources naturelles menacées d'extinction.

**Mots clefs :** *Chlamydotis undulata*, conservation *ex-situ*, diversité génétique, gestion des ressources, pedigree, fonction de Gompertz-Laird, phylogéographie, temps de divergence, structure génétique, expansion, microsatellites, dispersion, consanguinité, cytochrome b, modèle *stepping-stone*, outarde Macqueen's, ressources naturelles marocaines.

## ABSTRACT

For *ex-situ* conservation ends, biological diversity of the Houbara and Macqueen's Bustards occurring at the Palearctic ecozone, was assessed at several hierarchical levels including species, subspecies, genes, and metapopulations.

Genetic studies on wild populations have implemented both nuclear loci (microsatellites) and a 1042-bp fragment of the mitochondrial cytochrome b gene, and enabled the assessment of genetic diversity, gene flow, colonization scenarios, phylogenetic relationships, biological units, as well as demographic and historical factors that might explain the current biogeographic distribution of the species that constitute the *Chlamydotis* genus. In contrast to temperate species, glacial periods of the Pleistocene epoch might be responsible for the demographic expansions of the desert-adapted Houbara and Macqueen's species. Global tests of genetic structuring using the two molecular markers were found to be contradictory, however complementary. Discussion of the different responsible factors had confirmed or infirmed the observed molecular contrast.

Three further studies were conducted on Moroccan captive-bred stocks. Modeling the growth characteristics of the birds under particular captivity conditions has made possible the determination of growth rates in addition to four types of asymptotic and allometric growths. The results showed that the early development of the beak and the shank are relatively important to locomotion and foraging, while the highest allometric growth of the wing span indicates its importance for quick flight from potential predators.

The study of a multigenerational studbook has revealed a recent and shallow genealogy although, several genealogical parameters were characterized. For the Moroccan Houbara breed, the average generation interval was computed to 4.64 years, the average inbreeding coefficient to 1.6%, and the paired increase in coancestry to 1.3%. The similar effective numbers of ancestors ( $fa$ ) and founders ( $fe$ ) indicated the absence of bottleneck events within the flock. On one hand, this study highlighted a good breeding strategy that was applied from 1993 to 2002 and aimed to increase migration and to avoid the inbreeding depression within the breed, on the other hand increased coancestry and inbreeding values were detected during the 2004 breeding season, which could reflect the low expertise in the breeding operation.

Finally, genetic diversity evaluation using metapopulational approaches has permitted the comparison and discussion of different strategies and policies with regard to *ex-situ* conservation of Moroccan (*Chlamydotis undulata undulata*).

Genetic information and results inferred from the different population studies should contribute to the future control, valorization, and management of genetic and biological diversity of this natural resource.

**Keywords :** *Chlamydotis undulata*, *ex-situ* conservation, genetic diversity, resource management, pedigree, Gompertz-Laird model, phylogeography, divergence time, genetic structure, expansion, microsatellites, dispersal, inbreeding, cytochrome b, *stepping-stone* model, Macqueen's Bustard, Moroccan natural resources.

## SOMMAIRE

Avant propos	I
Remerciements	II-IV
Résumé	V-VI
Sommaire	VII-VIII
Liste des publications	IX
Liste des figures	X-XI
Liste des tableaux	XII-XIII
Abréviations	XIV-XVI
Déclaration éthique	XVII
 INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS	
	1-14
 <b>SECTION A : ÉTUDES GÉNÉTIQUES SUR LES POPULATIONS SAUVAGES</b>	
 CHAPITRE I : Étude de la diversité génétique des outardes Houbara et Macqueen's par microsatellites	
	16-44
1. Introduction	18
2. Méthodologie	18
a. Échantillonnage et extraction de l'ADN	18
b. Marqueurs génétiques utilisés : Microsatellites	20
c. Amplification en chaîne par polymérase (PCR) et génotypage	21
d. Méthodes d'analyses et logiciels génétiques utilisés	22-28
3. Résultats et discussion (Article 1)	29-44
 CHAPITRE II : Phylogéographie des outardes Houbara et Macqueen's inférée des séquences du gène mitochondrial cytochrome b	
	45-92
1. Introduction	47
2. Méthodologie	47
a. Échantillonnage et extraction de l'ADN	47
b. Marqueur génétique utilisé : l'ADN mitochondrial (cytochrome b)	48
c. Amplification par PCR de séquençage	49
d. Méthodes d'analyses et logiciels génétiques utilisés	52-59
3. Résultats et discussion (Article 2 )	60-91
 <b>SECTION B : ÉTUDES GÉNÉTIQUES ET MORPHOMÉTRIQUE SUR LES POPULATIONS CAPTIVES</b>	
 CHAPITRE III : Modélisation et étude du taux de croissance absolue et allométrique chez les outardes marocaines reproduites en captivité	
	93-105
1. Introduction	95
2. Méthodologie	95
a. Individus de l'expérience	95
b. Étude allométrique	98
c. Modèle de croissance absolue de Gompertz-Laird	98
3. Résultats et discussion (Article 3)	99-105

CHAPITRE IV : Caractérisation de la variabilité génétique des outardes Houbara marocaines ( <i>Chlamydotis undulata undulata</i> ) inférée des analyses du pedigree	106-123
1. Introduction	107
2. Méthodologie : Paramètres généalogiques	108
3. Résultats et discussion (Article 4)	109-123
CHAPITRE V : Contrôle et gestion de la diversité génétique dans le programme de conservation <i>ex-situ</i> d'un cheptel d'outardes Houbara marocaines ( <i>Chlamydotis undulata undulata</i> ) élevé en captivité	129-149
1. Introduction	126
2. Méthodologie	127
a. Échantillonnage	127
b. Purification de l'ADN et amplification par PCR	128
c. Analyses statistiques	128
i. Mesure de la diversité génétique en termes de diversité génique	128
ii. Détection des bottlenecks	129
iii. Mesure de la diversité génétique en termes d'apparentement moléculaire moyen	130
iv. Mesure de la diversité génétique en termes de richesse et de diversité allélique avec raréfaction	130
3. Résultats et discussion	133-144
DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSION	145-160
A. Apports des études génétiques sur les populations sauvages	146-154
1. Analyse par les loci microsatellites	146-148
2. Étude phylogéographique et analyse par le gène cytochrome b	148-149
2.1. Unités biologiques	149
3. Contraste entre les marqueurs mitochondriaux et nucléaires	150-154
B. Apports des études génétiques et morphométrique sur les populations captives	154-160
1. Étude de croissance absolue et allométrique	154-155
2. Étude généalogique	155-157
3. Applications à la gestion et à la conservation <i>ex-situ</i> de l'outarde marocaine	157-159
C. Retombées socio-économique, culturelle et environnementale	159-160
1. Valeur socio-économique	159
2. Valeur culturelle (en relation avec la fauconnerie)	159
3. Valeur environnementale (en relation avec la sensibilisation du public)	160
PERSPECTIVES & RECOMMANDATIONS	161-163
RÉFÉRENCES	164-182
GLOSSAIRE	183-188
ANNEXES & PHOTOS	189-196

## LISTE DE QUELQUES PUBLICATIONS EN RELATION AVEC LA THÉMATIQUE DE THÈSE

**Korrida A**, Jadallah S, Chbel F, Amin-Alami A, Ahra M, Aggrey S (2012) Patterns of genetic diversity and population structure of the threatened Houbara and Macqueen's bustards as revealed by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 11(3): 3207-3221.

**Korrida A** & Schweizer M (2012) Diversification across the Palearctic desert belt throughout the Pleistocene: phylogeography, demographic history and genetic structure in the Houbara-Macqueen's bustard complex as revealed by mitochondrial DNA. *Ibis Journal (soumis)*.

**Korrida A**, Nahashon SN, Amin-Alami A, Aggrey SE (2012) Modeling absolute and allometric growth in Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in captivity. *Atlas Journal of Biology* 2(1): 94-99.

**Korrida A**, Gutiérrez JP, Aggrey SE, Amin-Alami A (2012) Genetic variability characterization of the Moroccan Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) inferred from pedigree analysis. *Zoo Biology* 00:1-14, DOI10.1002/zoo.21030.

**Korrida A** & Idaghdour Y (2005) Official report to the National Wildlife Research Center (Taif, KSA) on Macqueen's (*Chlamydotis macqueenii*) paternity analysis and pedigree inferred from molecular markers.

Idaghdour Y, Broderick D, **Korrida A**, Chbel F (2004) Mitochondrial control region diversity of the Houbara bustard *Chlamydotis undulata* complex and genetic structure along the Atlantic seaboard of North Africa. *Molecular Ecology* 13: 43-54.

Idaghdour Y, Broderick D, **Korrida A** (2003) Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of Great bustards. *Conservation Genetics* 4: 789-792.

Broderick D, Idaghdour Y, **Korrida A**, Hellmich J (2003) Gene flow in Great Bustard populations across the Strait of Gibraltar as elucidated from excremental PCR and mtDNA sequencing. *Conservation Genetics* 4: 793-800.

Chbel F, Broderick D, Idaghdour Y, **Korrida A**, McCormick P (2002) Characterization of 22 microsatellites loci from the endangered Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*). *Molecular Ecology Notes* 2: 484-487

Broderick D, **Korrida A**, Idaghdour Y (2001) Diversity in the last remaining wild population of Bald Ibis (*Geronticus eremita*). Results inferred from mitochondrial DNA sequence data: I.A.G.N.B.I (International Advisory Group of Northern Bald Ibis) Newsletter 1, September 2001.

Idaghdour Y, **Korrida A**, Dawson B (1999) Genetic diversity in the Houbara Bustard captive breeding flock. IFCDW 1998-1999 Annual Report. Morrigan Press. Northern Ireland.

Dawson B, Idaghdour Y, **Korrida A**, Jones C (1999) Molecular genetic analysis of Houbara Bustard populations. IFCDW 1998-1999 Annual Report. Morrigan Press. Northern Ireland.

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

Figure 1	Profil électrophorétique d'une amplification par PCR du locus téra-allélique D 118 chez un échantillon de 34 individus d'outardes Houbara marocaines.
Figure 2	Locations of the 10 sampled populations of Houbara bustards
Figure 3	Minimum Evolution tree showing grouping of the 10 populations of Houbara Bustards.
Figure 4	Mantel test for association between genetic distance and geographic distance.
Figure 5	Houbara Bayesian clustering for (K = 2) and (K = 3).
Figure 6	The average posterior probability LnP(D) of the five runs at each cluster K.

### CHAPITRE II

Figure 1	Ordre des gènes mitochondriaux chez a) la poule ( <i>Gallus gallus</i> ) et b) chez les mammifères et xénope.
Figure 2	Amorces utilisées selon Broderick <i>et al.</i> (2003), leurs compositions nucléotidiques et leurs emplacements sur le fragment de 1042 bp du gène cytochrome b.
Figure 3	Profil électrophorétique d'une amplification par PCR de séquençage d'un fragment du gène mitochondrial cytochrome b chez trois outardes Houbara marocaines.
Figure 4	Exemple d'alignement de séquences d'ADN mitochondrielles.
Figure 5	Profil démographique d'une population ayant connu une augmentation instantanée de taille en passant d'une taille $N_0$ à une taille $N_1$ il y a $t$ générations.
Figure 6	Map depicting sampling locations of Houbara and Macqueen's bustards.
Figure 7	Distribution of mismatch differences among mtDNA haplotypes for a) Cuu (10), b) Cuf (8) and c) Cm (16) specimen.
Figure 8	Minimum spanning network describing the relationships among 39 mtDNA sequence variants from 1042 bp of cytochrome b gene in Houbara and Macqueen's bustards.
Figure 9	Neighbour-joining tree built from the Houbara and Macqueen's mtDNA sequence data and rooted with four other bustards.

### **CHAPITRE III**

Figure 1	Détails d'un squelette aviaire et mesures prises dans cette étude.
Figure 2	Growth curve of the Houbara bustard predicted by the Gompertz model.
Figure 3	Beak and shank length curves of the Houbara bustard predicted by the Gompertz model.
Figure 4	Wing span and girth circumference curves of the Houbara bustard predicted by the Gompertz model.
Figure 5	Allometric growth functions of beak length, shank length, wing span and chest girth versus body weight.

### **CHAPITRE IV**

Figure 1	The completeness level of the Houbara bustard breed assessed by the mean percentage of known ancestors per ascending generations.
Figure 2	The effective population size estimate per year of birth based on the variance of Houbara offspring.
Figure 3	Evolution of the mean inbreeding F and the number of inbred individuals per cohort.

### **CHAPITRE V**

Figure 1	Distribution des allèles et leurs fréquences pour chaque locus étudié.
Figure 2	Structure allélique de chaque population.
Figure 3	Allures de distributions des fréquences alléliques dans chaque population.

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

Tableau 1	Effectifs et coordonnées géographiques des 10 spécimens d'outardes.
Tableau 2	Sept microsatellites utilisés dans cette étude.
Tableau 3	The sample size (n), mean number of alleles per locus ( $N_A$ ), number of private alleles (PA), polymorphic information content (PIC), observed (Ho) and expected (He) heterozygosity, probability of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ) in ten Houbara populations.
Tableau 4	Multilocus F statistics ( $F_{is}$ , $F_{it}$ and $F_{st}$ ) and number of migrants per generation ( $N_e m$ ) across ten Houbara populations.
Tableau 5	Pairwise $F_{st}$ between Houbara Bustard populations and their probability of significance.
Tableau 6	Proportion of membership of each pre-defined population to the two major inferred clusters.
Tableau 7	Hierarchical AMOVA in Houbara and Macqueen's populations.
Tableau 8	Summary of Mantel tests for microsatellite markers.

### CHAPITRE II

Tableau 1	Collection origins, sample sizes, and GenBank numbers for the studied specimens
Tableau 2	Population pairwise $F_{ST}$ and their probability values.
Tableau 3	Haplotype distribution and genetic diversity in the mtDNA cytochrome b within Houbara and Macqueen's populations.
Tableau 4	Hierarchical analysis of molecular variance in Macqueen's and Houbara populations.
Tableau 5	Coalescent analyses in the Houbara-Macqueen's bustard complex.
Tableau 6	Selective neutrality test and demography parameters assessed.

### CHAPITRE III

Tableau 1	Means ( $\pm SD$ ) for body weight (BW), beak length (BL), shank length (SL), wing span (WS), and chest girth (CG) at different ages in Houbara bustard (N=178).
Tableau 2	Estimated coefficients (SE) and confident intervals (CI) for Gompertz growth, beak length, shank length, wing span, and chest girth parameters in Houbara bustard.
Tableau 3	Parameter from reduced maximum axis (RMA) regression estimates ( $\pm SE$ ) and confidence intervals (CI) of allometric growth of some morphometric characters, as a function of body weight in Houbara bustard.

## CHAPITRE IV

Tableau 1	Generation intervals (in years) calculation for the four paths in whole and reference population.
Tableau 2	Estimates of demographic and gene origin parameters for the whole population, reference population and each cohort.
Tableau 3	The top 12 ancestors contributing to genetic variability of the Houbara breed.
Tableau 4	Effective population size by cohorts and for the reference population estimated via individual increase in inbreeding, pairwise coancestry, and regression on equivalent generations.

## CHAPITRE V

Tableau 1	Nombres, origines et dates des collectes des cinq populations d'outardes Houbara étudiées ( $n = 799$ ).
Tableau 2	Diversité génique globale et à l'intérieur de chaque population.
Tableau 3	Analyse Moléculaire de Variance (AMOVA).
Tableau 4	Par paire de populations, valeurs de $F_{ST}$ et du <i>P-value</i> qui leurs correspondent.
Tableau 5	<i>P-values</i> du test de Wilcoxon étudiant les différentes populations sous l'équilibre mutation-dérive génétique pour les 3 modèles IAM, TPM et SMM.
Tableau 6	Paramètres populationnels. $f_{ii}$ : coefficient moyen d'apparentement, $s_i$ : coefficient moyen d'auto-apparentement des individus, $F_i$ : coefficient moyen de consanguinité et $d_{ii}$ : distance entre individus.
Tableau 7	Valeurs de l'apparentement moyen ( $f_{ij}$ ) et la distance génétique minimale de Nei ( $D_{ij(Nei)}$ ) par paire de population $i$ et $j$ .
Tableau 8	Contribution de chaque population à la diversité génique totale.
Tableau 9	Diversité génétique globale ( $DG_T   i$ ) après élimination d'une population $i$ et pourcentage du gain (+) ou de perte (-) de la diversité après retrait de chaque population.
Tableau 10	Nombre d'allèles rares et richesse allélique obtenue après raréfaction sur un nombre commun de 42 gènes par locus K(42).
Tableau 11	Contribution (en %) de chaque population à la diversité allélique totale de la métapopulation.
Tableau 12	Gain (-) ou perte (+) de la diversité allélique (en %) après retrait de chaque population.
Tableau 13	Contribution de chaque population (en %) au pool génétique synthétique possédant le maximum de diversité génétique ( $DG_{pool}$ ).

## ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AI	Insémination artificielle
AIC	Critère d'information d'Akaike
AMOVA	Analyse Moléculaire de Variance
ARN	Acide ribonucléique
<i>b</i>	Coefficient d'allométrie
BL	Longueur du bec
BW <sub>0</sub>	Poids corporel initial
°C	Degré Celsius
CDB	Convention sur la diversité biologique
CG	Circonférence de la poitrine
CI	Intervalle de confiance
CITES	Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction
cm	Centimètre
Cov	Covariance
<i>Cm</i>	<i>Chlamydotis macqueenii</i>
<i>Cu</i>	<i>Chlamydotis undulata</i>
<i>Cuf</i>	<i>Chlamydotis undulata fuertaventurae</i>
<i>Cuu</i>	<i>Chlamydotis undulata undulata</i>
d	Jour
DERS	Desert Ecology Research Station
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
<i>e</i>	Fonction exponentielle
EDTA	Acide éthylène diamine tetra-acétique
<i>e.g</i>	<i>exempli gratia</i>
<i>etc</i>	<i>et cetera</i>
<i>fa</i>	Nombre d'ancêtres efficaces
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<i>fe</i>	Nombre de fondateurs efficaces
<i>fge</i>	Nombre de génomes fondateurs équivalents
Fi/F <sub>is</sub>	Coefficient de consanguinité
<i>fij</i>	Coefficient de parenté
Fit	Coefficient de consanguinité global
F <sub>st</sub>	Indice de fixation
G <sub>A</sub>	Diamètre asymptotique
<i>ge</i>	Nombre d'équivalents-générations
<i>G.I</i>	Intervalle de génération
<i>h</i>	Diversité haplotypique
H <sub>2</sub> O	Molécule d'eau

HPD	Plus haute densité postérieure
HW	Hardy-Weinberg
<i>i.e</i>	<i>id est</i>
IFCDW	International Foundation for Conservation and Development of Wildlife
IRD	Infrared dye
K	Facteur de maturation
kg	Kilogramme
K2-p	Kimura 2-paramètres
L	Taux de croissance instantané quotidien
Ln	Logarithme népérien
M	Molarité
m	Milli/mètre
MA	Million d'années
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
mn	Minute
MSN	Minimum Spanning Network
N/n	Nombre
NaCl	Chlorure de sodium
Ne	Taille efficace de la population
NDV	Maladie de Newcastle
ng	Nanogramme
NJ	Neighbor-joining
<i>N<sub>e</sub>m</i>	Nombre de migrants par génération
p	Pico
pb	Paire de bases
PCR	Amplification en chaîne par polymérisation
PIC	Contenu informatif du polymorphisme
QLB	Tampon de lyse Queensland
r <sup>2</sup>	Régression/corrélation
RMA	Régression par axe majeur réduit
RP	Population référence
s	Seconde/ nombre de sites polymorphes
SA	Longueur asymptotique
SD	Ecart-type
SE	Erreur-type
SL	Longueur de la tarso-métatarsé
SSD	Somme carrée des écarts
<i>t</i>	Nombre de générations/temps/âge
<i>ti</i>	Âge à l'infexion
μ	Micro
UI	Unité internationale
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature

<i>vs</i>	<i>Versus</i>
W <sub>A</sub>	Poids corporel asymptotique
W <sub>i</sub>	Poids à l'infexion
WP	Population complète
W <sub>0</sub>	Poids initial à l'éclosion
W <sub>s</sub>	Longueur asymptotique de l'envergure des ailes
W <sub>t</sub>	Poids de l'individu à l'âge t
$\pi$	Diversité nucléotidique
10 X	Concentration dix fois
%	Pourcentage
$\Sigma$	Somme
$\Delta F$	Taux d'accroissement de consanguinité par génération
$\overline{\Delta F}$	Accroissement "réalisé" du coefficient de consanguinité par génération
$\overline{\Delta c}$	Accroissement "réalisé" en paire du coefficient de parenté
$\text{♀}$	Femelle
$\text{♂}$	Mâle

## DÉCLARATION ÉTHIQUE

Je déclare sur l'honneur que :

- Cette œuvre est originale, authentique, ne présente aucun conflit d'intérêts et qu'elle comporte uniquement la synthèse de mes travaux de recherche scientifique personnels ainsi qu'une analyse bibliographique légalement citée et conforme à la déontologie et à la rigueur qu'exige un tel travail de doctorat
- Les prélèvements des spécimens sanguins et d'organes ont été réalisés avec l'assistance des médecins vétérinaires tout en respectant les principes sanitaires et ceux de la prophylaxie.

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS**



En raison de sa position géographique stratégique à la croisée de la Méditerranée, l’Océan Atlantique, l’Afrique et l’Europe, le Maroc dispose de richesses écologiques et de diversités écosystémiques considérables. Avec plus de 24 000 espèces animales, de 7 000 espèces végétales et d’un taux d’endémisme global de 11% pour la faune et de 25% pour les plantes vasculaires (Étude Nationale sur la Biodiversité 2001), le Maroc fait partie du hotspot de la biodiversité du bassin méditerranéen (Fonds de partenariat pour les écosystèmes critiques 2010). Malheureusement, ces richesses sont menacées par des nuisances environnementales diverses et le coût de la dégradation de l’environnement au Royaume a été évalué en 2003 à 3.7% du Produit Intérieur Brut (Idllalène 2010). Devant cette réalité alarmante, l’État qui a déjà mis en place en 2004, la stratégie nationale pour la conservation et l’utilisation durable de la diversité biologique, a interpellé les Pouvoirs Publics, la Société Civile, les Organisations Non Gouvernementales et les Collectivités Locales sur l’élaboration d’une Charte Nationale de l’Environnement et du Développement Durable suite au discours Royal de la fête du Trône en 2009. L’État a lancé également la création du conseil économique, social et environnemental dans le cadre de la nouvelle constitution marocaine de 2011 (Articles 151, 152 et 153). Dans la même optique, la Fondation Mohamed VI pour la Protection de l’Environnement présidée par Son Altesse Royale la Princesse Lalla Hasnaa a vu le jour en 2001 et des projets nationaux visant de créer une dynamique envers la préservation de l’environnement marocain et ses composantes, ont également été élaborés. Il s’agit par exemple de: la stratégie nationale d’éducation et de sensibilisation à l’environnement et au développement durable en 2008, la gestion durable des ressources naturelles et de la biodiversité au Maroc (Perspectives Maroc 2030) en 2006, le projet "Conservation de la biodiversité par la transhumance dans le versant Sud du Haut Atlas" en 2000 et récemment, le projet de sensibilisation sur la problématique de la grande ourarde (*Otis tarda*) au Maroc.

Le Maroc s'est aussi engagé dans la stratégie environnementale mondiale comme étant un acteur actif qui respecte les valeurs et les principes cardinaux du droit environnemental et du développement durable. Il est alors déjà signataire des principaux protocoles environnementaux tels que : la Convention de Ramsar relative aux zones humides d'importance internationale, particulièrement comme habitats des oiseaux d'eau en 1971, la Convention de Vienne sur la protection de la couche d'ozone en 1985, la Convention de Londres sur la prévention de la pollution des mers résultant de l'immersion de déchets (LC72) en 1972, la Convention des Nations unies sur la lutte contre la désertification (CLD) en 1994,

la Convention de Bonn sur les Espèces Migratrices appartenant à la faune sauvage (CMS) en 1979, la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES) en 1973, la Convention de Berne relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe en 1979, la Convention sur la Diversité Biologique (CDB) élaborée durant les Sommets de la Terre à Rio de Janeiro en 1992 et de Johannesburg sur le développement durable en 2002 et dernièrement en 2011, le protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation à la CDB. Par cette dernière ratification, le Maroc célèbre ainsi la décennie des Nations Unis pour la diversité biologique 2011-2020.

Selon les articles 1, 2, 6, 9, 10, 11, 12 et 13 de la CDB, la conservation des ressources naturelles nécessite le maintien de leurs diversités biologiques dans une perspective de développement durable. Actuellement au Maroc, parmi les ressources naturelles les plus menacées de disparition et qui nécessitent une bonne stratégie de valorisation et de protection, l'ouarde Houbara (*Chlamydotis undulata undulata*) (CITES 2012, IUCN 2011 et Birdlife International 2012). Les principales menaces et causes du déclin de cet oiseau sont : la chasse excessive par les fauconniers, la destruction de son habitat et des sites de nidification par les troupeaux et les véhicules quatre roues motrices (4X4), les collisions avec les lignes électriques, le prélèvement des œufs par les nomades et le surpâturage. Aux années 50 du siècle dernier, l'espèce était localement abondante dans la zone d'Ain Bani Mathar et les zones centrales de la rivière de Moulouya. Cependant, son effectif a connu un déclin et une régression rapide à partir de 1960 (Azafzaf *et al.* 2005). Ensuite, la distribution de l'espèce se réservait aux régions désertiques du Sud et de l'Est du Maroc (Collar 1980). Selon le dernier recensement effectué par la Direction des Eaux et Forêts, le nombre des ourardes marocaines a été estimé entre 2000 et 3000 oiseaux (Haddane 1985). En revanche, aucune information n'est disponible quant aux nombres et effectifs actuels des populations sauvages.

Conformément à la politique environnementale marocaine et aux principaux protocoles et conventions internationales en relation avec la protection des ressources naturelles, une étude de recherche sur cette espèce aviaire pose en fait la nécessité de conception d'une approche globale en matière de conservation. Avant de détailler les grands axes d'une telle démarche de recherche, il importe de mentionner tout d'abord, quelques informations sur la biologie et l'écologie de l'espèce ainsi que sur les programmes déjà établis pour sa conservation au Maroc.

## A/ Biologie et écologie de l'outarde

- *État de conservation et statut taxonomique*

Selon la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN 2011), l'outarde Houbara (*Chlamydotis undulata*) est classée "espèce vulnérable". Cette espèce appartenant à l'ordre des Gruiformes et à la famille des Otididés, constituée de 23 espèces, était considérée comme une seule espèce polytypique composée de 3 formes distinctes : *Chlamydotis undulata undulata*, *Chlamydotis undulata fuertaventurae* et *Chlamydotis undulata macqueenii*. Cependant, en se référant des études menées récemment sur : la vocalisation (Alekseev 1985 et Gaucher *et al.* 1996), le comportement de la parade des mâles (Gaucher *et al.* 1996), la génétique (D'Aloia *et al.* 2001 et Broders *et al.* 2003) et la morphologie (Gaucher *et al.* 1996 et Sangster 1996), le sous-comité taxonomique de l'union Britannique des ornithologues suggère un nouveau remaniement taxonomique des formes du genre *Chlamydotis* avec : une espèce nord-africaine polytypique *C. undulata* appelée Houbara et regroupant les 2 sous-espèces : *C. u. undulata* et *C. u. fuertaventurae* et une espèce asiatique monotypique *C. macqueenii* appelée Macqueen's (Knox *et al.* 2002, Sangster *et al.* 2004 et Collinson 2004).

Domaine	: Eukaryotes
Super-règne	: Opisthocontes
Règne	: Animaux Métazoaires
Embranchement	: Chordés
Sous-embranchement	: Crâniates/Vértébrés
Super-classe	: Gnathostomes
Classe	: Oiseaux
Super-ordre	: Néognathes
Ordre	: Gruiformes
Famille	: Otididés
Genre	: <i>Chlamydotis</i>
Espèces	: <i>Chlamydotis undulata; Chlamydotis macqueenii</i>
Sous-espèces	: <i>Chlamydotis undulata undulata; Chlamydotis undulata fuertaventurae</i>

- *Description de l'espèce*

L'outarde est un oiseau de couleur sableuse avec vermiculures noires sur le dos, au cou mince effilé et aux pattes longues. Souvent terrestre et sauf en cas de danger, elle préfère marcher ou courir au lieu de voler. Selon l'espèce et le sexe, le poids corporel varie entre 1.2 kg et 3.5 kg, la taille entre 50 cm et 70 cm et l'envergure des ailes entre 130 cm et 170 cm. La morphologie et la coloration de plumage changent en fonction des localités géographiques. L'outarde Macqueen's est la plus grande en taille et sa couleur est sableuse pâle, tandis que l'outarde Houbara est de taille intermédiaire et de couleur cannelle brunâtre et celle des îles Canaries est de taille plus petite et de couleur cannelle plus sombre. Le mâle adulte est généralement plus grand que la femelle. Il possède en plus, au centre de sa crête, une touffe de petites plumes blanches et au niveau du cou, qui est grisâtre-blanchâtre, des plumes hérisseées filamenteuses blanches et noires érectiles au moment de la parade nuptiale (Cramp & Simmons 1980 et Hollom *et al.* 1988).

- *Aire de répartition géographique*

Les trois formes du genre *Chlamydotis* diffèrent selon la distribution géographique et la morphologie :

1. *C. u. undulata* est résidente en Afrique du nord. Elle est sédentaire et occasionnellement migratrice (Hingrat 2005). Son effectif a été estimé à environ 10 000 avec plus de 8000 au Maroc et en Algérie (Goriup 1997).
2. *C. macqueenii* est répandue en Asie centrale (de l'Iran en passant par la Mongolie et le désert de Gobi en Chine), à l'Est de l'Egypte, en péninsule Arabique, en Pakistan et en Afghanistan. Elle est généralement migratrice, mais aussi résidente avec des sites d'hivernage au Levant et au Moyen Orient (Irak, Arabie Saoudite, Yémen, Oman et Iran). Son effectif a été estimé entre 39 000 et 52 000 individus avec plus de 35 000 en Kazakhstan (Goriup 1997 et Birdlife International 2012).
3. *C. u. fuertaventurae* vit actuellement aux îles Canaries. Elle est endémique et non migratrice. Cette sous-espèce a été isolée géographiquement des côtes marocaines et son

effectif est estimé à environ 1120 oiseaux avec moins de 20 à la Graciosa, plus de 700 à Lanzarote et environ 400 à Fuerteventura (SEO/Birdlife 2007).

- *Habitat et écologie*

L'outarde vit dans les zones arides et semi-désertiques à faibles ou moyennes latitudes et précipitations. Elle préfère les régions steppiques inhabitées ou faiblement habitées par l'Homme. Elle est rencontrée souvent dans les wadis rocheux ou sableux aux arbrisseaux halophytes de 1 ou 2 m du genre : *Haloxylon*, *Artemisia*, *Tamarix* ou *Salsola* (Cramp & Simmons 1980 et Johnsgard 1991). En Afrique, l'oiseau se distribue le long d'une frange nord saharienne de part et d'autre de l'isohyète des 200 mm (Brosset 1961). Au Maroc, l'outarde Houbara occupe les plateaux de l'oriental, les collines atlasiques ou les plaines. En Tunisie, elle utilise les bordures des dépressions endoréiques comme les sebkhas et les chotts, les surfaces d'épandage, les oueds et les dayas (Chammem *et al.* 2003). Aux îles Canaries, l'outarde est observée sur les dunes côtières et les sols ondulés volcaniques (Collins 1984). En Asie, l'espèce préfère les déserts argileux et salins et les dunes de sable. Dans les zones d'élevage et de reproduction à Kyzylkum par exemple, l'oiseau occupe les environnements argileux et glaiseux de nature alcaline et alluviale, où la végétation est constituée de plantes halophytes du genre *Salsola*, *Arthrophytum* et *Anabasis* (Johnsgard 1991). D'une manière générale, l'outarde est décrite comme un oiseau de plaine (Hingrat 2007).

- *Nourriture et régime alimentaire*

L'outarde est une espèce omnivore, opportuniste et son régime alimentaire varie en fonction des saisons et des répartitions géographiques (Cramp & Simmons 1980 et Bourass *et al.* 2012). Généralement, sa nourriture en matière animale comprend des insectes (criquets, sauterelles, grillons, coléoptères, vers de terre, chenilles de papillon, centipèdes, termites, blattes, fourmis, noctuelles de moissons et araignées) ainsi que des lézards, des escargots et des serpents. La matière végétale se compose des plantes à fleurs (du genre : *Lycium* ou des espèces comme : *Launaea arborescens* et *Jacobaea aquatica*), des plantes à bulbes (ciboulette et oignon), des fruits (organier, jujubier et câprier), des graines (orge, blé, petit pois et soja) et des pousses (du genre : *Artemisia*, *Cymbopogon*, et *Alhagi* ou d'espèces : *Leptadenia spartium* et *Triumfetta rotundifolia*). En plus, l'outarde est adaptée à survivre sans apport régulier en eau en se basant sur l'humidité fournie par les plantes et les végétaux,

cependant des fois, elle peut descendre des puits pour boire et s'alimenter en eau (Aharoni 1912 et Meinertzhagen 1954).

- *Saison de reproduction*

L'outarde est une espèce polygame et grégaire vivant souvent en petits groupes de 4 à 10 individus, surtout en dehors de la période de l'élevage et de reproduction (Johnsgard 1991). Toutefois, en période de copulation, les individus tendent à s'isoler et vivre en solitaires et ce, probablement pour consacrer toute leurs énergies à la reproduction et à la parade nuptiale. La période de reproduction s'étend entre Décembre et Juin et coïncide avec les premiers œufs pondus par les femelles et les premières parades nuptiales des mâles. Les nids sont généralement édifiés par les femelles et construits directement sur un sol peu et légèrement creusé d'un diamètre de 10-15 cm. Dans la nature, la femelle pond 1 à 3 œufs sur un intervalle de 2 jours avec une possibilité de couvées de remplacement. Par contre en captivité, l'intervalle entre deux pontes ou "clutches" est de 1 à 3 jours. La période de l'incubation dure entre 22 et 23 jours et le pic de ponte se situe entre le mois d'Avril et de Mai. Dans la nature, le mâle peut rester au voisinage du nid jusqu'à l'éclosion (Poslawski 1965). Les poussins sont nidifuges, nourris par la femelle, rarement par les mâles et leur rythme de croissance est généralement rapide. Les jeunes outardes quittent leurs nids à partir de l'âge de 35 jours (Cramp & Simmons 1980) et l'âge de maturité sexuelle se situe entre 1 et 3 ans.

- *Comportement social et sexuel*

Chez certaines espèces d'oiseaux, les mâles choisissent et défendent de larges territoires dans lesquels les femelles peuvent pâturer et même nidifier (Ligon 1999 et Morales *et al.* 2001). Ce type d'arènes de reproduction est appelé "lek". Ce sont les femelles qui visitent, habituellement les leks et choisissent parmi les mâles qui paradent, ceux avec qui elles veulent s'accoupler et se reproduire. Il existe deux catégories de leks: les leks ordinaires ou classiques dans lesquels la distance séparant les mâles potentiels est faible (< 500 m) et ceux diffus ou dispersés ayant une distance inter-mâles plus grande (1 km). Chez les populations polygyynes sauvages d'outardes, le système d'accouplement du lek est de type dispersé (Collins 1984, Osborne 2000 et Hingrat & Saint Jalme 2005). Les femelles sont polyandres et peuvent donc accéder à la reproduction en sélectionnant le(s) meilleur(s) partenaire(s) afin de fertiliser leurs œufs, d'assurer leur succès reproducteur et d'avoir une progéniture de bonne qualité par la

suite (la théorie des bons gènes (Hamilton & Zuk 1982) et la théorie : cryptic female choice (Thornhill 1983 et Eberhard 1996)). Quant aux mâles, ils sont très fidèles à leurs sites de reproduction et de parade qui demeurent constants d'une année à l'autre (Alekseev 1985).

## **B/ Diversité génétique au service de la biologie de la conservation**

La biologie de la conservation est une branche multidisciplinaire qui se focalise sur le concept de la diversité biologique qui inclut à la fois des disciplines comme : la génétique, la physiologie, la phylogéographie, les ressources naturelles, les sciences sociales, la génétique des populations, la biologie des populations, la médecine vétérinaire, l'halieutique, l'écophilosophie, le monitorage environnemental, l'écologie...etc. (Frankham *et al.* 2002).

Dans les programmes de gestion des espèces courant le risque d'extinction, le maintien de la diversité génétique est primordial. La conservation de la diversité génétique est la discipline qui étudie les différents facteurs stochastiques qui pourraient affecter la variation génétique intra et inter-populationnelles et qui pourraient conduire par conséquent, à l'extinction des espèces. En effet, l'érosion de la diversité génétique ainsi que l'augmentation de consanguinité peuvent conduire à l'apparition de la dépression de consanguinité, aux goulets d'étranglement, à la non-adaptation aux changements environnementaux et donc, à la disparition des espèces et des populations (Frankham *et al.* 2002).

Suite à la découverte de l'ADN (acide désoxyribonucléique) en 1953 et grâce aux avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire et de bioinformatique, une grande variété d'approches génétiques et statistiques a été proposée pour l'étude de la diversité génétique dans le contexte de conservation. Ces techniques se basent généralement sur la mesure de la diversité génique appelée hétérozygotie espérée de Nei (1973), sur l'héritabilité (Fisher 1918, Wright 1920 et Lush 1945) et sur la diversité ou la richesse allélique (Petit *et al.* 1998, Leberg 2002 et Foulley & Ollivier 2006). La diversité génétique peut être aussi inférée de l'étude des généralogies et des pedigrees en utilisant des marqueurs moléculaires neutres et codominants tels que les microsatellites.

En se basant sur ce genre d'études biologiques et génétiques, des programmes de conservation des outardes Houbara marocaines ont été lancés en 1993 par La Fondation Internationale du SAR le Prince Sultan Bin Abdul Aziz AL SAUD pour la Conservation et le Développement de la Vie Sauvage (IFCDW) et en 1995 par l'Emirates Center for Wildlife Propagation

(ECWP). L'IFCDW a été inaugurée par SAR le Prince Moulay Rachid et par SAR le Prince Faisal Bin Sultan Bin Abdul Aziz en présence d'un grand nombre de responsables et de hauts dignitaires nationaux et internationaux.

### C/ Missions de l'IFCDW au Maroc

La Fondation a été créée en réponse au déclin marqué des effectifs de l'espèce outarde Houbara (*Chlamydotis undulata undulata*) au niveau du Maroc et dans le monde. Depuis sa création, la Fondation avait pour missions principales : l'élevage et la protection de l'espèce, sa réintroduction dans son milieu naturel, la préservation des traditions arabes du désert et la promotion de la recherche scientifique au Maroc. De nombreuses études ont été donc menées pour un développement efficace de protocoles et de méthodologies aussi bien pour la conservation *ex-situ* au centre d'Agadir, que pour la conservation *in-situ* à la Desert Ecology Research Station (DERS) à Errachidia. Il s'agit en l'occurrence des études écologiques sur : la distribution géographique de l'espèce, le choix de l'habitat, le comportement territorial, le succès reproducteur, les techniques de repérage par radio-tracking, en plus des études génétiques sur les tests de profilage et de paternité, l'évaluation de la diversité génétique et du polymorphisme et finalement, des méthodes d'insémination et d'incubation artificielles.

Un stock initial de 153 œufs sauvages a été obtenu sous licence en 1993 et a donné 138 poussins après son transfert au centre d'Agadir. La saison de reproduction de 1995 a reflété les premiers indices sur le succès des techniques de production et d'élevage, avec 29 femelles pondant 169 œufs. La saison de 1996 a davantage confirmé la pertinence des techniques et un total de 309 poussins de cette saison a été retenu pour l'élevage conservatoire. Au cours du temps, la Fondation a réussi de produire entre 1000 et 1500 oiseaux chaque année.

- *Programmes d'insémination et d'incubation artificielle*

La collecte de la semence est probablement l'un des actes les plus exigeants puisqu'il nécessite le savoir-faire, la patience et des années de travail avec les mâles Houbara géniteurs. L'opération de collecte des spermatozoïdes se pratique sur des mâles formés et dressés à répondre à des femelles factices afin de stimuler l'éjaculation. Il est préférable que les semences soient collectées seulement deux fois par semaine pour garantir une qualité maximale des spermatozoïdes. Avant chaque insémination, la qualité de la semence est testée sous microscope photonique pour avoir une idée sur la concentration initiale et la

morphologie des spermatozoïdes et par conséquent, une idée sur leurs pouvoirs fertilisants. Après l'étape de dilution, chaque collecte peut couvrir en moyenne sept inséminations par jour. Les femelles sont donc immédiatement inséminées sauf si la semence sera cryopreserved en vue d'une utilisation ultérieure (Hartley *et al.* 1999).

La collecte des œufs juste après leurs pontes incite les femelles à pondre davantage. Grâce à cette pratique, une femelle peut avoir des couvées ou des "clutches" plus prolongées et presque 20 œufs par saison. L'incubation artificielle est également une étape cruciale de l'élevage conservatoire qui exige et repose sur une bonne connaissance de la biologie de l'espèce. Elle se fait moyennant des incubateurs commercialisés et/ou développés par la Fondation elle-même. Le couvoir dispose d'équipements informatisés assurant des niveaux stables d'hygrométrie et de température 24h/7j.

La garde des poussins est une opération qui nécessite une grande affection pour le poussin puisque le "gamekeeper" doit se comporter comme une "mère de substitution" qui nourrit et prend soin de ses petits jusqu'à ce qu'ils deviennent capables de s'auto-nourrir.

- *"Desert Ecology Research Station"*

La station de recherche écologique (DERS) se situe dans la région orientale du Maroc avec les montagnes du Moyen Atlas au nord et le Sahara au sud. La station est d'une superficie de 100 hectares incluant le logement du personnel, les équipements de recherche et de surveillance et des cages pouvant abriter plus de 1000 oiseaux. A la fin de chaque saison d'élevage, la production annuelle en outardes est transportée du centre d'élevage d'Agadir au DERS d'Errachidia. La première opération de relâcher a eu lieu en 1997 dans la région d'Errachidia au Sud-Est du Maroc et durant les années 1997, 1998 et 1999, les mouvements des oiseaux relâchés ont été étudiés et suivis par satellites afin d'évaluer le succès du programme de réintroduction en termes de survie de l'espèce, de dispersion en plus de sa capacité à cohabiter avec les populations sauvages. Les résultats des premières opérations du relâcher a indiqué un taux de survie allant de 33% à 66% (Peške 1997). Un autre facteur culminant dans le programme de réintroduction de l'espèce est la coopération avec les bédouins et les populations autochtones de la région. En effet, depuis plusieurs années, la Fondation s'est engagée activement à ce processus en mettant en place un plan de recensement régional continu et une démarche de protection des nids contre la prédation et le braconnage, tout en impliquant les bédouins et les communautés locales d'intérêt en tant que

partenaires au programme de conservation. Des aides et des services médicaux et vétérinaires ont été fournis en parallèle.

- *Recherches génétiques*

Le monitorage génétique est un outil stratégique pour réussir les enjeux et les paris des programmes de conservation. Dans sa promotion de la recherche scientifique, la Fondation a inauguré en 1997, le Laboratoire de Génétique qui a pour mission principale la contribution à la gestion du stock d'élevage en captivité ainsi qu'aux décisions sur le système de croisement avec ses contraintes et exigences. Assurément, l'application de l'insémination artificielle dans ce genre d'élevage, requiert un control stricte et un suivi continu de l'ensemble des géniteurs afin de minimiser les risques de consanguinité et d'éviter les croisements entre individus apparentés qui pourraient avoir des conséquences néfastes sur la diversité génétique globale et la fitness du cheptel.

Pour garantir le succès de cette démarche, le Laboratoire de Génétique s'est servi des avancées technologiques dans le domaine de la biologie et génétique moléculaire et a exploité des approches de pointe telles que les PCR et le séquençage moléculaire dans ces recherches. A titre d'exemple, la détermination moléculaire du sexe des poussins juste après leurs éclosions et la caractérisation pour la première fois chez les outardes Houbara, de 22 marqueurs nucléaires appelés microsatellites (Chbel *et al.* 2002), a rendu facile les établissements des pedigrees annuels de la population captive. Le Laboratoire a pu en parallèle développer des techniques d'extraction de l'ADN à partir de plusieurs sources biologiques comme: le sang, la salive, les fèces, les plumes, les organes, et la membrane des coquilles (Broderick *et al.* 2001, Idaghdour *et al.* 2003 et Korrida *et al.* 2010).

Cette structure de recherche assurait aussi une autre mission qui est la prestation des services pour les organismes gouvernementaux et/ou académiques. Dans ce sens, le Laboratoire de Génétique a conduit plusieurs projets de biologie de la conservation et de génétique des populations sur des espèces d'intérêt régional, national ou international courant le risque d'extinction et de disparition, *e.g* : la contribution à plusieurs programmes de protection des ressources naturelles : aviaires (l'ibis chauve, la grande outarde, l'outarde Macqueen's et l'outarde Arabe), mammaliennes (les gazelles dorcas et les carnivores) et marines (la moule méditerranéenne).

Devant la fragilité des outardes Houbara marocaines et celles mondiales et en s'inspirant du discours de Sa Majesté le Roi Mohamed VI du 9 Juillet 2009, qui nécessite la participation et l'adhésion de tous les citoyens marocains dans la politique nationale en matière de conservation des ressources naturelles, de la diversité biologique et du développement durable, une thèse de doctorat est élaborée dans l'espoir de contribuer au renforcement de la conscience environnementale générale et de participer à la consolidation des acquis et des connaissances sur la biologie et la génétique de conservation de l'une des espèces les plus vulnérables dans notre pays.

#### **D/ Objectifs de recherche**

Puisque que le but ultime et final de chaque stratégie de conservation est la restauration des populations viables à partir de celles captives et/ou sauvages, la thématique générale de cette thèse de doctorat se concentre sur l'étude des différents principes et concepts appliqués dans les programmes de conservation animale *ex-situ*.

En effet, pour une meilleure valorisation et évaluation de la diversité génétique et biologique de l'outarde Houbara marocaine et afin d'apporter de nouveaux éléments et connaissances dans le cadre de son élevage et sa préservation en captivité, une panoplie d'outils moléculaires et d'approches biologiques a été mise en œuvre pour étudier les populations sauvages et captives, non seulement marocaines, mais aussi mondiales.

Les recherches menées sont donc réparties en trois grandes sections et se structurent comme suit :

#### I/ Études génétiques sur les populations sauvages :

- Le premier chapitre investigue chez les outardes Houbara et Macqueen's la diversité génétique en termes de distance et de structure génétique, de relations phylogénétiques et évolutives, de scenarios de colonisation et de flux génique en utilisant l'outil moléculaire microsatellites. Cette étude, avec celle qui suit, permettra la re-définition des unités biologiques et de conservation.

- Le deuxième chapitre s'articule sur l'étude de la phylogéographie des outardes Houbara et Macqueen's en utilisant des séquences du gène mitochondrial cytochrome b afin : d'évaluer la variation génétique chez différentes populations provenant de régions allant des îles Canaries jusqu'en Asie et faisant partie de l'écozone du Paléarctique, d'identifier les facteurs démographiques et historiques qui pourraient expliquer les différentes distributions phylogéographiques contemporaines constatées et finalement, afin d'estimer les temps d'expansion et de coalescence.

## II/ Études génétiques et morphométrique sur les populations captives :

- Le troisième chapitre utilise la modélisation mathématique pour étudier le taux de croissance absolue et allométrique chez les outardes marocaines (*Chlamydotis undulata undulata*) reproduites en captivité. Le modèle de Gompertz-Laird a été appliqué pour la détermination des différentes phases de croissance, la croissance asymptotique et les croissances allométriques du poids corporel de la longueur du bec, de la longueur de la tarso-métatarsale, de l'envergure des ailes et de la circonférence de la poitrine.
- Le quatrième chapitre concerne la caractérisation de la variabilité génétique des outardes Houbara marocaines en captivité extraite des analyses des pedigrees et des généalogies. La détermination des paramètres populationnels tel que l'intervalle de génération, le coefficient de consanguinité, le coefficient de parenté, le flux migratoire et la taille efficace de population, permettra de devancer les plans stratégiques de conservation à court et à long terme.
- Le cinquième chapitre est consacré au contrôle et à la gestion de la diversité génétique dans le programme de conservation *ex-situ* d'un cheptel d'outardes Houbara marocaines élevé en captivité. Cette étude, complémentaire de celle du quatrième chapitre, comparera les différentes approches et procédures permettant une meilleure quantification du gain et de perte de la diversité génétique d'un troupeau d'outardes constitué de populations fondatrices sauvages et de populations nées et élevées en captivité, dans le but de tracer des priorités de conservation et de gestion de l'espèce marocaine.

### III/ Étude immunologique sur les gènes du Complexe Majeur d’Histocompatibilité (CMH) :

■ Cet axe de recherche reste inachevé par manque de temps ainsi que pour des raisons financières et logistiques. Il vise à quantifier la diversité allélique dans certains gènes du CMH en utilisant les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Étant donné que le CMH est une famille multigénique du système immunitaire qui est associée à la résistance aux maladies et à la susceptibilité aux pathogènes, une telle étude de recherche pourrait avoir des implications directes et indirectes sur la survie et le succès reproducteur des populations. Les résultats préliminaires se sont montrés très encourageants.

**SECTION A**

**ÉTUDES GÉNÉTIQUES SUR LES POPULATIONS  
SAUVAGES**

## **CHAPITRE I**

**Étude de la diversité génétique des outardes Houbara et  
Macqueen's par microsatellites**

❀ ☈

*L'espèce a un polymorphisme normal et propre qui se manifeste de diverses façons*

*Antoine-Auguste Laugel (1830-1914)*

❀ ☈

## INTRODUCTION

Ce travail de recherche étudie la structure génétique et la variation génétique chez les outardes Houbara nord-africaines *Chlamydotis undulata undulata* et *Chlamydotis undulata fuertaventurae* ainsi que l'outarde Macqueen's asiatique *Chlamydotis macqueenii* qui constituent le genre *Chlamydotis*. Un groupe d'oiseaux distribués sur 10 populations a été testé et génotypé en utilisant sept paires de marqueurs polymorphes microsatellites. L'approche moléculaire suivie est détaillée dans ce qui suit et la discussion des résultats générés est publiée dans un article scientifique au journal *Genetics and Molecular Research* sous le titre :

***Patterns of genetic diversity and population structure of the threatened Houbara and Macqueen's bustards as revealed by microsatellite markers.***

## MÉTHODOLOGIE

### 1. Échantillonnage et extraction de l'ADN

Un total de 266 outardes nord-africaines et asiatiques sauvages provenant des 10 populations présentées dans le (Tableau 1) a été considéré dans cette étude.

Tableau 1 : Effectifs et coordonnées géographiques des 10 spécimens d'outardes utilisés dans cette étude.

	<b>Population sauvage</b>	<b>Localité</b>	<b>Taille de l'échantillon</b>
<i>Chlamydotis undulata undulata</i>	Erfoud (E. Maroc)	31° 25'N 4°14'W	25
	Boudnib (E. Maroc)	31°57'N 3°36'W	21
	Errachidia (E. Maroc)	31°55'N 4°25'W	89
	Laayoune (S. Maroc)	27° 9'N 13° 12'W	18
<i>Chlamydotis undulata fuertaventurae</i>	Fuerteventura (Îles Canaries)	28° 30'N 14° 0'W	21
<i>Chlamydotis macqueenii</i>	Iran	33° 0'N 53° 0'E	16
	Moyen Orient (Jordanie, Désert du Néguev)	31° 0'N 36° 0'E	5
	Balochistan (Pakistan)	27° 30'N 65° 0'E	28
	Origines mixtes (Kazakhstan, 30° 0'N 70° 0'E Pakistan, Arabie Saoudite)		37
	Afghanistan	33° 0'N 65° 0'E	6

L'extraction d'ADN nucléaire a été effectuée sur :

- des échantillons de sang préservés à -20 °C soit dans des tampons d'ACD contenant 0.48% d'acide citrique, 1.32% de citrate de sodium, et 1.47% de sucre dextrose, soit dans du QLB (Queen's Lysis Buffer) contenant 1% du sodium N-lauryl sarcosine, 10 mM d'EDTA, 10 mM de NaCl et 10 mM de Tris (pH = 8.0) à température ambiante.
- des échantillons d'organes stockés dans un tampon salin de lyse contenant 20% de DMSO et 5 mM de NaCl à température ambiante.

La méthode classique du Phénol-Chloroforme (Sambrook *et al.* 1989) a été utilisée dans l'extraction de l'ADN génomique. Cependant dans certains cas, et selon l'état des échantillons, des kits comme le GEN-IAL First DNA et le QIAmp ont été également utilisés. La qualité de l'ADN génomique a été ensuite révélée sur des gels d'agarose de 1% et sa concentration a été quantifiée par fluorométrie *via* une machine de type Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer.

## 2. Marqueurs génétiques utilisés

Un marqueur génétique est une séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou de protéine qui peut être examinée pour révéler les attributs de sa composition et donc sa variation génétique. C'est aussi un caractère génétique à transmission mendéienne qui doit être : codominant (distinguant facilement les hétérozygotes des homozygotes), neutre (ayant la même valeur sélective), non épistasique (n'interagissant pas avec d'autres gènes), non pléiotropique (ne déterminant pas plusieurs phénotypes), multiallèle, économique et polymorphe (variable). Les marqueurs microsatellites, appelés aussi STR (pour Short Tandem Repeats ou SSR pour Simple Sequence Repeats) sont de courtes séquences mono, di, tri ou tétra-nucléotidiques répétées en tandem et aléatoirement distribuées dans le génome nucléaire, chloroplastique ou mitochondrial (Goldstein & Schlötterer 1999). Dans cette étude, sept paires d'amorces polymorphes ont été analysées selon les conditions réactionnelles présentées dans le (Tableau 2) et le paragraphe 3. La caractérisation de ces amorces a été effectuée pour la première fois chez l'outarde Houbara marocaine grâce à une étude de notre Laboratoire de Génétique effectuée en 2002. Pour plus d'informations sur ce travail, voir (Chbel *et al.* 2002).

Tableau 2 : Sept paires de microsatellites utilisés dans cette étude. (pb : paire de bases,  $T_1$  et  $T_2$  : températures d'hybridation, °C : degré Celsius et F/R : amorces sens/anti-sens).

Locus	Numéro d'accession à GenBank	Taille du produit (pb)	Séquences des amorces	$T_1$ (°C)	$T_2$ (°C)
<b>A29</b>	AF512580	163-169	F:GAGAGGGAAAGACACACGT R:AAATTGCTGGAGAGTCAGG	54	56
<b>A112</b>	AF512570	189-195	F:GCAGGCAACCTTGTAAATT R:AAAGCAAATACTGAACAGA	54	57
<b>A120</b>	AF512571	285-293	F: GGAGGAGAACATGCAGCAGGT R: GCATTAAGATGCACCCACAA	52	55
<b>A210</b>	AF512568	146-158	F: CTCCATTTCAACCAATCTTC R: GCGCTCTTTAATAGGTCAA	54	57
<b>D117</b>	AF512583	170-182	F: GCTCGTAAACCAAGTG R: GCCAGACAGAACAGAAGG	53	56
<b>D118</b>	AF512584	265-285	F: AGAACCTGGGTGATGA R: AATCCCTACCTCTCCCTG	54	57
<b>D119</b>	AF512585	245-285	F: ACTCAGCTCTGGGAAGTTATG R: TTCTCTTGATCCTCAATG	54	57

### **3. Amplification en chaîne par polymérisation (PCR pour Polymerase Chain Reaction)**

La PCR est une technique qui consiste à augmenter d'une façon exponentielle ( $2^n$ ) le nombre de séquences d'ADN en répétant les cycles: (i) de dénaturation des deux brins d'ADN, (ii) d'hybridation des deux amorces (primers) et (iii) d'élongation par une enzyme polymérase.

Durant la phase d'optimisation, des séries de PCR gradient ont été effectuées en utilisant des machines thermiques de type Biometra T1 et Techne GeneE. Le Master Mix final de la réaction PCR contenait dans un volume final de 5 µl:

- H<sub>2</sub>O de type MilliQ
- Tampon 10X de Promega
- 25 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 2 mM de dNTPs
- 20 µM d'amorces sens (F pour Forward) et anti-sens (R pour Reverse)
- 1 µM de l'amorce IRD- M13 F (Schuelke 2000)
- 5 U/µl de l'enzyme Taq Polymerase (Promega)
- 20 ng d'ADN génomique.

L'amplification par la technique PCR comprenait les phases suivantes:

1. Une phase de dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C pour un cycle de 3 min
2. Une phase d'hybridation des deux amorces contenant un premier segment de 14 cycles (à 94°C pendant 20 s, à  $T_1$  ou première température d'hybridation pendant 1 min et à 72°C pendant 30 s) et un second segment de 28 cycles (à 94°C pendant 20 s, à  $T_2$  pendant 1 min et à 72°C pendant 30 s)
3. Une phase d'extension par l'enzyme Taq polymérase à 72°C pour un cycle de 10 min.

Les produits PCR ont été ensuite visualisés en utilisant une machine de séquençage automatique de type Li-COR 4000L et à travers un gel d'acrylamide Li-COR KB Plus de 6.5% (Figure 1). Le poids moléculaire des allèles a été déterminé par le marqueur Infra Red Dye (IRD) 800 de LI-COR.

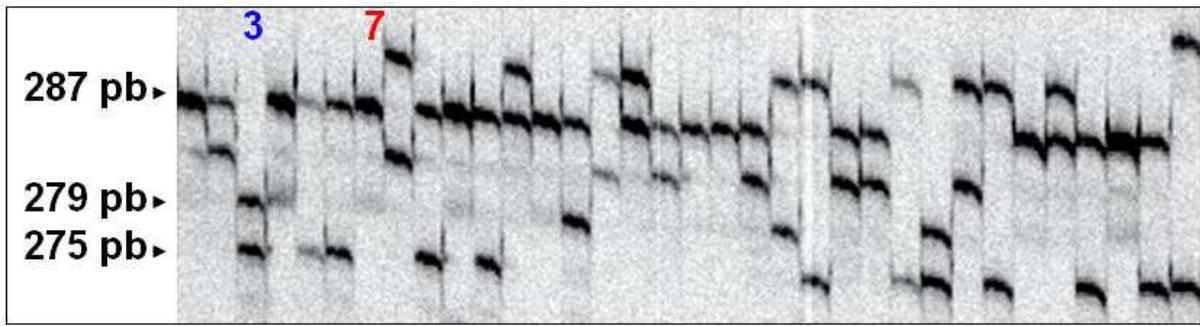


Figure 1 : Profil électrophorétique d'une amplification par PCR du locus tétra-allélique D 118 chez un échantillon de 34 individus d'outardes Houbara marocaines (l'individu 3 est hétérozygote, possédant deux allèles différents de tailles 275 et 279 paires de bases et l'individu 7 est homozygote, possédant deux allèles de même taille de 287 paires de bases).

#### 4. Méthodes d'analyses et logiciels génétique utilisés

Le logiciel Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) a été utilisé pour l'identification des erreurs de génotypage et de profilage.

##### 4.1. Hétérozygotie espérée

L'hétérozygotie attendue à l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), appelée aussi diversité génique de Nei (1987), est définie selon l'équation :  $H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  avec,  $p_i$  la moyenne des fréquences alléliques du  $n$  ième allèle dans toute la population.  $H_e$  est également appelée hétérozygotie espérée totale  $H_T$  et elle est décomposée en diversité génique inter-populationnelle  $D_{ST}$  et en diversité génique intra-populationnelle  $H_S$  ( $H_T = D_{ST} + H_S$ ).

##### 4.2. Hétérozygotie observée

L'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) est le nombre d'hétérozygotes dans tous les loci de la population. Pour chaque population, l'hétérozygotie espérée ( $H_e$ ) et observée ( $H_o$ ) ont été estimées par le logiciel GENETIX 4.03 (Belkhir *et al.* 2003).

### 4.3. Déséquilibre de liaison

C'est l'association statistique significative entre différentes paires de loci qui pourrait être la conséquence d'une sélection, d'une mutation, d'une recombinaison ou d'une structuration populationnelle. Dans ce cas, deux allèles issus de deux loci différents sur le même chromosome, auront des fréquences observées plus grandes que celles espérées dans le cas d'équilibre. Les déséquilibres de liaison ont été testés par le logiciel GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995).

### 4.4. Contenu informatif du polymorphisme (PIC)

Le PIC réfère à la valeur du marqueur microsatellite de détecter le polymorphisme dans une population. Ce paramètre dépend du nombre d'allèles détectables ainsi qu'à la distribution de leurs fréquences (Botstein *et al.* 1980). Le PIC d'un marqueur microsatellite  $i$  se calcule selon l'équation suivante :  $PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$  avec,  $p_{ij}$  la fréquence du  $j$  ième motif du marqueur  $i$ . Le (PIC) a été calculé par le programme Cervus 2.0 (Marshall *et al.* 1998).

### 4.5. Équilibre de Hardy-Weinberg (HW) (Hardy 1908 et Weinberg 1908)

C'est l'équilibre des fréquences génotypiques dans une population infinie où les croisements se font au hasard en absence de mutation, de dérive génétique, de sélection et de migration. Deux allèles  $a_1$  et  $a_2$  aux fréquences géniques  $p$  et  $q$  auront à l'équilibre de HW les fréquences  $p^2$ ,  $q^2$  et  $2pq$  pour les génotypes  $a_1a_1$ ,  $a_1a_2$  et  $a_2a_2$  respectivement. Le maintien de la variation génétique résulte dans ce cas, de la ségrégation des allèles lors de la phase méiotique qui parvient à une distribution génotypique équilibrée après une seule génération. La déviation de l'équilibre de HW pour chaque population a été investiguée par le test exact de Fisher en utilisant le logiciel GENEPOP (Raymond & Rousset 1995) et en considérant 50000 itérations et 20 groupes ou "batches".

#### 4.6. Analyse moléculaire de variance (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992)

C'est une méthode statistique fondée sur le calcul de la matrice de distance génétique qui permet la partition hiérarchique de la variation génétique à l'intérieur et entre les groupes de populations, en estimant les  $\Phi$  statistiques qui sont analogues aux F-statistiques de Cockerham (1969). Dans les cas où l'AMOVA teste les données haplotypiques (mitochondriales) ou celles génotypiques de plusieurs groupes de populations, sans considération du niveau intra-individuel ni de la phase gamétique, la variance moléculaire globale ( $\sigma_T^2$ ) est composée de la covariance due aux différences entre les groupes ( $\sigma_a^2$ ), de la covariance due aux différences entre les populations à l'intérieur des groupes ( $\sigma_b^2$ ) et de la covariance entre les individus à l'intérieur des populations ( $\sigma_c^2$ ). Par extension, la structuration génétique sera estimée par les trois indices suivants:

1. Entre les groupes géographiques par l'indice  $F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$ , en permutant toutes les populations entre les groupes

2. Entre les populations au sein des groupes géographiques par l'indice  $F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}$ , en permutant les génotypes entre populations à l'intérieur des groupes

3. Entre les populations par l'indice de fixation  $F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$ , en permutant les génotypes entre les populations et entre les groupes. Dans le test de signification de l'AMOVA, l'hypothèse nulle  $H\theta_0$  ne suppose aucune différenciation génétique entre les populations ( $F_{ST} = 0$ ) et l'hypothèse alternative  $H\theta_1$ , le contraire ( $F_{ST} > 0$ ). Pour tester si la valeur p (*P-value*) observée est significativement plus grande que celle attendue à l'équilibre, la valeur observée est comparée aux résultats des permutations. Si elle est plus grande que les valeurs permutes (95%), le test sera statistiquement significatif au seuil de 5% et l'hypothèse nulle sera rejetée. Dans ce cas, on annonce l'existence d'une structuration et d'une différenciation entre les groupes ou entre les populations. L'(AMOVA) a été effectuée par le logiciel Arlequin afin de tester et /ou de décrire la structuration hiérarchique de la variance génétique aux niveaux intra et inter-populationnels. La méthode de distance appliquée est "nombre de différents allèles" (Fst).

#### **4.7. Minimum Evolution (ME)**

Cette approche construit l'arbre phylogénétique sous un critère d'évolution minimale qui ne suppose pas un taux constant d'évolution pour les acides aminés ou les nucléotides comme dans le cas de l'arbre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). La typologie sera donc non-racinée puisque la plus petite valeur des sommes de toutes les branches a été considérée dans l'estimation de l'arbre le plus correct. La méthode ME est similaire à la méthode NJ (Neighbour Joining) surtout quand le nombre de taxa est petit. Le logiciel Mega 4.1 (Tamura *et al.* 2007) a été utilisé pour la construction de l'arbre phylogénétique ME selon l'approche de Nei *et al.* (1998).

#### **4.8. Test de Mantel ou test d'isolation par distance**

Le test de Mantel est un test de corrélation entre deux matrices de distances génétiques et de positions géographiques. Le test s'examine par le coefficient de corrélation ( $r$ ) qui varie entre la valeur -1 et 1. Quand  $r = 1$  on dit qu'il y a une corrélation linéaire positive parfaite entre les deux matrices de données et lorsque  $r = -1$ , il y a une relation linéaire négative parfaite entre les deux variables. Quand  $r$  est nul, les deux variables n'ont aucune relation linéaire. La signification du test se fait par permutations aléatoires (appelées aussi randomisations ou shuffles). L'hypothèse nulle  $H\theta_0$  ne suppose aucune relation entre les éléments d'une matrice X et d'une matrice Y ( $r = 0$ ), tandis que l'hypothèse alternative  $H\theta_1$ , considère une relation entre les deux matrices. On dit qu'il y a une isolation par distance quand ( $r > 0$  ou  $< 0$ ). Si  $H\theta_0$  est vraie,  $r$  sera nul après permutations comme attendu sous les conditions de l'équilibre. Si les valeurs observées sont plus grandes que celles obtenues après randomisation, le résultat s'annoncera statistiquement significatif au seuil de 5%. En effet, lorsqu'il y a une relation significative entre les deux matrices, la corrélation observée prendra des valeurs extrêmes (proches de 1 ou de -1) par rapport à celle générée par des permutations aléatoires. La différenciation génétique ( $\Phi_{pt}$ ) et les distances géographiques par paire de populations ont été aussi calculées via le test d'isolation par distance de Mantel intégré dans le programme GenAlex 6.3 (Peakall & Smouse 2006). A signaler également, les distances géographiques qui sont calculées en kilomètre en utilisant les coordonnées (Latitude/Longitude) de chaque population prélevée.

#### 4.9. Indices de fixation de Wright (1951) $F_{IS}$ , $F_{ST}$ et $F_{IT}$

Sewall Wright, en considérant les conditions de panmixie (croisements au hasard), a redéfini l'hétérozygotie espérée totale dans une population globale comme :  $H_T = D_{ST} + H_S$ , l'hétérozygotie espérée moyenne dans une sous-population comme :  $H_S = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  et le paramètre  $H_I$  comme étant l'hétérozygotie observée moyenne par individu. En utilisant ces trois paramètres, la structure génétique des populations est analysée par les F-statistiques suivants :

- $F_{IS}$ , le coefficient de consanguinité décrivant l'écart de l'hétérozygotie observée à celle attendue à l'intérieur des populations en supposant l'équilibre de HW:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

avec,  $H_e$  l'hétérozygotie estimée et  $H_0$  la proportion d'hétérozygotes observée.

- $F_{ST}$ , l'indice de fixation décrivant la réduction en hétérozygotie à l'intérieur des populations par rapport à la population globale à cause de la dérive génétique ou de la sélection :

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

- ⇒ Quand  $0 < F_{ST} < 0.05$  : il y a une faible structuration génétique
- ⇒ Quand  $0.05 < F_{ST} < 0.15$  : la structuration génétique est modérée
- ⇒ Quand  $0.15 < F_{ST} < 0.25$  : la structuration génétique est forte
- ⇒ Quand  $0.25 < F_{ST} < 1$  : la structuration génétique est très forte

- $F_{IT}$ , le coefficient de consanguinité global décrivant la réduction de l'hétérozygotie au sein des individus par rapport à la population totale due à la subdivision de la population et aux croisements non aléatoires à l'intérieur des sous-populations :

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

Les trois indices sont liés par l'équation :  $1 - F_{IT} = [1 - F_{IS}][1 - F_{ST}]$ .

$F_{ST}$  varie donc entre 0 et 1 et peut se montrer négatif dans le cas des populations aux tailles inégales. Des valeurs positives de  $F_{IT}$  et de  $F_{IS}$  suggèrent un déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre qui peut être la conséquence de la dérive génétique, de la consanguinité et/ou de l'effet de Wahlund (1928). Dans le cas contraire, un excès en hétérozygotes rend  $F_{IT}$  et  $F_{IS}$  négatifs. Cet excès peut être induit par la philopatrie aux sites nataux et/ou par l'exogamie à l'intérieur d'une population (Prout 1981, Chesser 1991, Mathews & Porter 1993 et Lowe *et al.* 2004). En utilisant le programme Genetic Data Analysis (Lewis & Zaykin 2001), la structure génétique des populations a été explorée par les indices de fixation de  $F_{is}$ ,  $F_{st}$  et  $F_{it}$  (Wright 1951), mais selon les estimations de Weir & Cockerham (1984) qui considère la méthode du Jackknife pour tester leur niveau de signification statistique.

#### 4.10. Méthode du Jackknife

Cette méthode de ré-échantillonnage estime les paramètres de variation y compris les erreurs type en calculant les valeurs dérivées de la totalité des données, en écartant à chaque fois une donnée et en recalculant les caractères souhaités.

#### 4.11. Flux génique

La migration historique et ancienne des individus entre différentes populations avec succès de procréation a été conclue à partir des valeurs de  $F_{ST}$  en appliquant la formule de Wright (1951) (mais selon Nei (1987)) suivante :  $Ne \cdot m = \frac{1}{4} \left( \frac{1 - F_{ST}}{F_{ST}} \right)$  et en ajustant pour les données diploïdes ( $M = 2 \cdot Ne \cdot m$ ) avec,  $M$  le nombre de migrants par génération,  $Ne$  la taille efficace de la population et  $m$  le taux de migration. Cette estimation indirecte assume le modèle mutationnel en île de Wright (1931).

#### 4.12. Assignation génétique

Le flux génique contemporain a été étudié *via* l'approche d'assignation génétique. Le logiciel STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000 et Falush *et al.* 2003) a été utilisé pour investiguer l'identité génétique des populations d'outardes surtout celles asiatiques aux origines mélangées. Ce programme utilise une méthode Bayésienne dite de "clustering" qui se base sur le modèle mathématique et stochastique complexe de la chaîne de Markov (MCMC pour Markov Chain Monte Carlo) afin d'assigner les individus aux origines incertaines ou n'ayant aucune information *a priori* sur leur origines géographiques, à des populations en évaluant leurs fréquences alléliques.

#### 4.13. *P-value*

La valeur p est un test statistique de signification qui sert à montrer le plus petit niveau auquel on rejette l'hypothèse nulle qui suppose l'absence de différence ou de changement. En d'autres termes, la valeur p est la probabilité de commettre une erreur et de rejeter à tort l'hypothèse nulle et donc, d'obtenir un faux positif. Plus la *P-value* est petite, plus le test est statistiquement significatif et plus l'hypothèse nulle est rejetée.

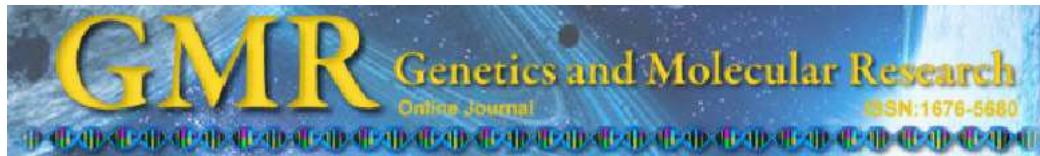
## Article 1

### **Patterns of genetic diversity and population structure of the threatened Houbara and Macqueen's bustards as revealed by microsatellite markers**

#### **Résumé**

L'outarde Houbara (*Chlamydotis undulata*) est une espèce aviaire menacée de disparition en Afrique du Nord, en Asie et aux îles Canaries. Le but de ce travail est l'étude de la structure génétique et de la variation génétique chez *Chlamydotis undulata undulata*, *Chlamydotis undulata fuertaventurae* et *Chlamydotis undulata macqueenii* qui constituent le genre *Chlamydotis*. Un groupe de 266 oiseaux distribués sur 10 populations a été génotypé en utilisant sept marqueurs microsatellites polymorphes. Les analyses des loci microsatellites ont généré 1821 génotypes et 55 différents allèles et l'estimation des diversités génétiques observées était relativement grande et variait de 0.326 à 0.729. L'utilisation de ces marqueurs génétiques neutres a montré une structuration phylogéographique significative entre les populations de l'outarde asiatique. L'Analyse Moléculaire de Variance a révélé un pourcentage de 12.03 de variabilité entre les sous-populations étudiées. Les tests de différenciation populationnelle et d'assignation d'individus à des populations, déduits d'une méthode Bayésienne, ont montré l'existence avec plus de 90% de probabilité, de deux clusters distincts : l'un africain et l'autre asiatique. Au niveau inter-populationnel, une corrélation positive ( $r^2 = 0.302$ ) a été aussi détectée entre les distances géographique et génétique. Dans une perspective de conservation, une bonne évaluation de l'information génétique permettra de jeter plus de lumière sur le statut génétique actuel et les tendances de cette précieuse ressource, ce qui pourra conduire à une meilleure optimisation et amélioration des stratégies et des plans de conservation des populations d'outardes.

**Mots-clés:** Marqueurs microsatellites, outardes Houbara, génétique de conservation, diversité génétique.



# Patterns of genetic diversity and population structure of the threatened Houbara and Macqueen's bustards as revealed by microsatellite markers

A. Korrida<sup>1,2</sup>, S. Jadallah<sup>1</sup>, F. Chbel<sup>3</sup>, A. Amin-Alami<sup>2</sup>, M. Ahra<sup>2</sup> and S. Aggrey<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Genetics Laboratory, HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud,  
International Foundation for Conservation and Development of Wildlife,  
Agadir, Morocco

<sup>2</sup>Laboratoire des Substances Naturelles, Faculté des Sciences d'Agadir,  
Université Ibn Zohr, Agadir, Morocco

<sup>3</sup>Laboratoire National de Police Scientifique, Service Biologie,  
Quartier Palmier, Mâarif, Casablanca, Morocco

<sup>4</sup>Department of Poultry Science, University of Georgia, Athens, GA, USA

Corresponding author: A. Korrida  
E-mail: amalkorrida11@aol.com

Genet. Mol. Res. 11 (3): 3207-3221 (2012)

Received June 15, 2011

Accepted June 20, 2012

Published September 12, 2012

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.12.4>

**ABSTRACT.** The Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*) is a threatened avian species that is rapidly declining throughout its range, especially in North Africa, Asia and the Canary Islands. We examined the population structure and genetic variation for the three Houbara subspecies *C. undulata undulata*, *C. u. fuertaventurae* and *C. u. macqueenii*. A total of 266 birds from 10 populations were genotyped using seven polymorphic microsatellite markers. The analysis of microsatellite loci generated 1821 genotypes and 55 different alleles. Estimates of observed and expected heterozygosities were relatively high and ranged from 0.371 to 0.687 and from 0.326 to 0.729, respectively. For the first time, significant phylogeographic structure among Asian

Houbara populations was found using neutral nuclear markers. Analysis of molecular variance revealed 12.03% population variability among the subspecies. Population structure and assignment tests inferred using a Bayesian approach revealed two distinct clusters with more than 90% likelihood, one Asian and one North African. A positive correlation between genetic distance and geographic distance was detected among populations ( $r^2 = 0.302$ ). For conservation purposes, this genetic information will help understand the current genetic status improving management strategies for Houbara bustard breeds and populations.

**Key words:** Microsatellite markers; Houbara bustard; Genetic diversity; Conservation genetics

## INTRODUCTION

Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*) is an avian polytypic species with habitats in arid and semi-arid environments characterized by lower and middle altitudes, steppes, sandy, and stony wadis with shrubby halophytic vegetation (Cramp and Simmons, 1980). The species belongs to the Otidae family made up of 23 species and is divided into three subspecies according to geographic distribution and morphology. *C. u. undulata* (*Cuu*) (Jacquin, 1784), found in Northern Africa (north Mauritania, Morocco, Algeria to Egypt) is sedentary, rarely vagrant or locally nomadic (Heim de Balsac and Mayaud, 1962). *C. u. macqueenii* (*Cum*) (Gray, 1832), the migratory form of “*Chlamydotis*” genus is found in Asia (from the Middle East to Altai) and lives in Sinai, Arabia, Baluchistan, Jordan, north Caspian Sea, north-west India, Afghanistan, Pakistan, Kazakhstan, Iran, Iraq, and Mongolia. *C. u. fuertaventurae* (*Cuf*) (Rothschild and Hartert, 1894), a non-migratory and endemic subspecies to the Canary Islands resides mainly in Fuerteventura and Lanzarote.

The taxonomic status of the *Chlamydotis* genus remains controversial to this day. According to Sangster et al. (1999), Knox et al. (2002) and Lesobre et al. (2010), the *Chlamydotis* genus consists of two species *C. undulata* and *C. macqueenii* with *C. undulata* comprising two subspecies (*Cuu* and *Cuf*). Other authors, however, posit that the genus is monotypic and made up of three well-differentiated subpopulations [Cramp and Simmons, 1980; Pitra et al., 2002, 2004; Idaghdour et al., 2004; IUCN, 2010; Birdlife International (2010) taxonomic group]. In this paper, we opt for the latter classification. According to the red list of threatened species (IUCN, 2010), Houbara bustard is classified “vulnerable”. The ongoing decrease in the size of the Houbara bustard populations requires that knowledge of the genetic structure, population boundaries and level of connectivity between populations be known for proper management (Haddane, 1985). Furthermore, genetic drift ultimately affects gene flow and as stated by Wright (1951), gene flow may allow the spread of favorable adaptation among populations. Thus, in a species like *C. undulata* divided into populations, gene flow is likely to help the species overcome problems related to loss of adaptive genetic diversity (Keller et al., 1994). Estimates of gene flow between island and mainland Houbara populations or among mainland populations can provide useful information for management initiatives aiming for the long-term persistence and conservation of the species in its natural habitat. In Morocco, the Houbara bustard popula-

tion has declined substantially as a result of overgrazing, habitat destruction and excessive hunting (Birdlife International, 2010). Assessing genetic diversity and population structure of wildlife species using neutral molecular markers allows determination of their extinction risk and to design strategies for their management and conservation (Serrano et al., 2009). Previous genetic studies on Houbara bustards have failed to show an evidence for genetic differentiation between the North African *C. undulata*. Idaghdour et al. (2004) using mtDNA showed extensive structuring among the three subspecies but could not find structure within *Cuu*. Dawson et al. (1999) while performing analysis on the CHD-Z gene, confirmed the absence of size difference products between two Houbara bustard populations from Morocco and the Canary Islands. Lesobre et al. (2010) used both mtDNA and DNA microsatellites as described in Idaghdour et al. (2004) and Chbel et al. (2002), respectively, and did not find solid evidence of structuring within *Cuu* either. Pitra et al. (2004) studied the *macqueenii* population history and showed weak structuring using only four microsatellite markers.

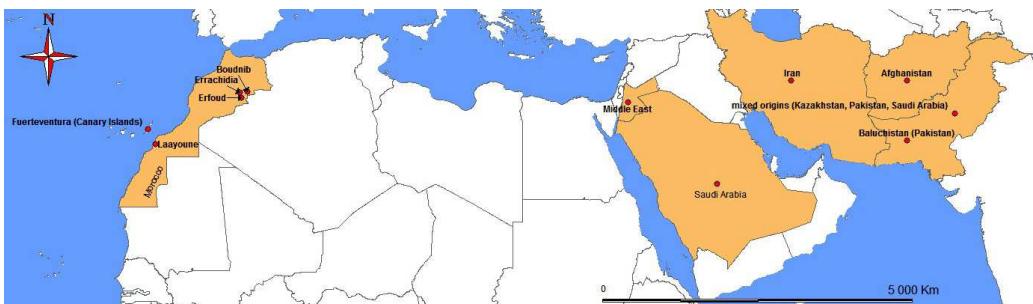
The objective of this research was to implement Chbel et al. (2002) polymorphic SSR markers and extend their use into a larger number of populations in order to pertinently evaluate and assess genetic distance, phylogenetic relationships, genetic diversity, and population differentiation between the North African forms *Cuu* and *Cuf* and the Asian form *Cum*.

## MATERIAL AND METHODS

The isolation of single sequence repeats (SSR) loci was carried out from Moroccan Houbara's extracted DNA. Library construction and primer design were done by Genetic Identification Service Inc. (USA) as described in Chbel et al. (2002). From 1993 to 2007, the three Houbara bustard subspecies were sampled from the 10 different locations listed in Figure 1 and Table 1 avoiding the sampling of close related individuals. A total of 135 blood samples were collected from the *Cuu* founding stock at IFCDW originated from Erfoud, Errachidia and Boudnib areas where each sample represents an egg from a single clutch. Another 18 tissue samples were obtained from hunted birds in Laayoune region in south of Morocco. The *Cum* collection included five different populations. Blood and tissue samples from Iran (N = 16), Jordan (N = 2) and Baluchistan (N = 28) populations were obtained from the National Wildlife Research Center (NWRC) in Taif, Kingdom of Saudi Arabia and samples from the Negev desert (N = 3), Afghanistan (N = 6) and mixed origins of the Asiatic Houbara from Kazakhstan, Saudi Arabia and Pakistan were collected from Sheikh Butti Maktoum's Wildlife Center in the United Arab Emirates. We later labeled samples from Jordan and the Negev desert as the Middle East sample. For *Cuf*, we received 21 blood samples from La Oliva Breeding Station in the Canary Islands. Blood samples were stored in ACD (0.48% citric acid, 1.32% sodium citrate and 1.47% dextrose) or QLB (1% sodium N-lauryl sarcosine, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl and 10 mM Tris, pH 8.0) buffers at either -20°C or room temperature whereas tissue samples in a saline lysis buffer (20% DMSO and 5 mM NaCl) and stored in ambient temperature.

Total genomic DNA was extracted using either phenol-chloroform method (Sambrook et al., 1989), GEN-IAL First DNA, or QIAmp DNA Kits. DNA concentration was quantified using Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer and its integrity checked on 1% agarose gels. Gradient PCRs were conducted during the optimization phase using Biometra T1 and Techne

GeneE thermal cyclers. In a final volume of 5  $\mu\text{L}$ , the PCR master mix contained: 10X Promega buffer, dH<sub>2</sub>O, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, 20  $\mu\text{M}$  forward and reverse primers, 1  $\mu\text{M}$  IRD-M13 forward primer (Schuelke, 2000), 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq Polymerase Enzyme (Promega) and 20 ng template DNA. PCRs were carried out with the following settings: 94°C for 3 min for one cycle; 94°C for 20 s, Ta1 for 1 min and 72°C for 30 s for 14 cycles; 94°C for 20 s, Ta2 for 1 min and 72°C for 30 s for 28 cycles, and 72°C for 10 min for one final cycle. Annealing temperatures for all SSR markers were as in Chbel et al. (2002). PCR products were run and visualized on a Li-COR 4000 L sequencing device through a 6.5% Li-COR KB Plus Gel Matrix and microsatellite allele sizes were determined using an Infra Red Dye 800 size marker.



**Figure 1.** Locations of the 10 sampled populations of Houbara bustards.

## Data analysis

Prior to data analysis, the Micro-Checker 2.2.3 program (Van Oosterhout et al., 2004) was used to identify microsatellite profiling errors. Tests for linkage disequilibrium were performed in GENEPOLP 4.0 (Raymond and Rousset, 1995) and the Arlequin 3.1 software (Excoffier et al., 2006). The expected ( $H_E$ ) and observed heterozygosities ( $H_O$ ) for each population were estimated using the GENETIX 4.03 software (Belkhir et al., 2003) and the polymorphic information content (PIC) was estimated using the Cervus 2.0 program (Marshall et al., 1998). For each population, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested with the Fisher exact test implemented in GENEPOLP based on 5000 iterations and 20 batches. Bonferroni's adjustment (Rice, 1989) was implemented to compensate for multiple comparisons at  $P < 0.05$  level. The analysis of molecular variance (AMOVA) describing the hierarchical partitioning of genetic variance among and within populations was carried out using the Arlequin package. By defining each time the number of groups considered in the structure, the AMOVA used permutation tests to evaluate null hypotheses of no population structure within groups and between groups. The  $F_{ST}$  index was also tested by permuting haplotypes among populations among groups and the  $F_{CT}$  by permuting populations among groups. Population pairwise  $F_{ST}$  values were obtained for all population pairs and their significance values were tested against the assumption of no difference between populations by considering 1000 random permutations of haplotypes. The Arlequin package was also utilized to assess the genetic differentiation ( $F_{ST}$ ;  $P$  values) for all population pairwise combinations considering the number of different alleles as the molecular distance. The Genetic

Data Analysis program (Lewis and Zaykin, 2001) was used to calculate Wright's fixation indices  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$  (Wright, 1951) according to Weir and Cockerham (1984) and using the Jacknifing approach over populations. The MEGA 4.1 software (Tamura et al., 2007) was used to construct the minimum evolution (ME) tree (Nei et al., 1998). Furthermore, pairwise population genetic differentiation ( $\Phi_{pt}$ ) was calculated as well as geographic distance used to perform the Mantel test for isolation by distance implemented in the GENALEX 6.3 program (Peakall and Smouse, 2006). The pairwise geographic distances were calculated in kilometers using the latitude/longitude coordinates of each sampled location. Gene flow was calculated using Wright's formula:  $N_m = 0.25 (1 - F_{ST} / F_{ST})$  (Nei, 1987) and adjusted for diploid data where  $M = 2N_m$ , with  $M$  the number of migrants per generation,  $N$  the effective population size and  $m$  the migration rate. The STRUCTURE 2.2 program (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003) was used to investigate the genetic identity of the Houbara populations especially the *macqueenii* mixed origins. The program implements a Bayesian clustering method to infer and assign the individuals of uncertain origins or without *a priori* information on their exact geographic origin to populations via their estimated allele frequencies. The analysis were carried out using  $K = 2$  to 3 clusters and burns of 25,000 repetitions and 100,000 iteration for Markov chain Monte Carlo (MCMC). Each run was repeated five times to get consistent results.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Genetic variability within populations

The Micro-Checker and GENEPOP packages showed no signs for large allele dropout or for scoring errors due to stuttering and no evidence for null alleles. However, the global Fisher test was significant and revealed two genotypic linkage disequilibria between D119 and A113a and between D118 and D110 loci. For this reason, A113a and D110 loci were eliminated from this study. The seven remaining microsatellite loci were successfully amplified in all 10 Houbara populations and generated 1821 genotypes and 55 alleles for a total of 266 individuals. Measures of genetic variability for the 10 populations are shown in Table 1. The mean number of alleles ranged from 2.14 in the Middle East to 6.00 in Errachidia with an average of 4.64. Eight private alleles were found, one in Laayoune, three in Errachidia, two in Iran, one in the *macqueenii* mixed origins, and one in Afghanistan population. The observed number of alleles reflects historical events of each population, which could include changes in effective population size, impact of natural and artificial selection, introgression, and genetic isolation. Most noticeably is the number of private alleles in the Iranian and Errachidia populations, 2 and 3, respectively. The presence of such private alleles could be due to new accumulated alleles in recently diverged but genetically isolated populations or the result of loss of alleles after bottleneck and divergence. Moreover, the average PIC across populations was calculated to 56%. The Boudnib and Errachidia populations had the highest PIC of 66% and the Middle East population had the lowest PIC value of 25%. The average PIC value indicated thus that the implemented microsatellite markers were informative and appropriate for such genetic studies (Botstein et al., 1980). The low PIC in the Middle East population is possibly due to the low number of segregating alleles.

**Table 1.** The sample size (N), mean number of alleles per locus ( $N_A$ ), number of private alleles (PA), polymorphic information content (PIC), observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities, probability of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) in 10 Houbara populations.

Subspecies	Populations	N	$N_A$	PA	PIC	$H_o$	$H_e$	HWE	$F_{IS}$
<i>Chlamydotis undulata</i>	Erfoud (E. Morocco)	25	4.857	-	0.615	0.636	0.675	0.024	0.058
	Laayoune (S. Morocco)	18	4.571	1	0.615	0.614	0.689	0.024	0.111
	Errachidia (E. Morocco)	89	6.000	3	0.666	0.625	0.717	0.000	0.127
	Boudnib (E. Morocco)	21	5.142	-	0.665	0.687	0.729	0.000	0.059
<i>C. u. fuertaventurae</i>	Fuerteventura (Canary Islands)	21	4.142	-	0.542	0.582	0.618	0.269	0.059
	Iran	16	5.000	2	0.574	0.548	0.633	0.000	0.138
	Middle East	5	2.142	-	0.255	0.371	0.326	0.889	-0.155
	Baluchistan (Pakistan)	28	5.571	-	0.550	0.526	0.599	0.005	0.123
<i>C. u. macqueenii</i>	Afghanistan	6	3.857	1	0.527	0.547	0.634	0.060	0.148
	<i>macqueenii</i> mixed origins (Kazakhstan, Pakistan, Saudi Arabia)	37	5.142	1	0.587	0.590	0.652	0.124	0.094
Mean		-	4.642	-	0.560	0.573	0.627	-	-

The values of the  $H_o$  and  $H_e$  under HWE within each population were also presented.  $H_o$  values ranged from 0.37 in Middle East to 0.68 in Boudnib with an average of 0.57 and  $H_e$  varied from 0.32 in the Middle East to 0.72 in Boudnib with an average of 0.62. The  $H_o$  within each population except for the Middle East one was lower than the  $H_e$ . Additionally, the  $F_{IS}$  value ranged from -0.15 in the Middle East population to 0.14 in the Afghan population and the  $F_{IS}$  for all populations except the Middle East population was positive indicating a significant deficit of heterozygotes owing to inbreeding ( $F_{IS} > 0$ ), samples from sub-populations pooled together (Wahlund effect), and/or genetic drift. However, the negative  $F_{IS}$  value for the Middle East population could be due to by an asymmetrical sex migration that produced an outbreeding effect in the progeny.

Finally, considering the heterozygote deficit as the alternative assumption, six departures from the HWE were detected by the Fisher global test across populations. Indeed, significant multilocus deviations were found within Errachidia, Boudnib, Iran, Baluchistan, Laayoune, and Erfoud populations at the  $P < 0.05$  level. Unfortunately, only few Houbara studies that used SSRs are available for comparison. Lesobre et al. (2010) have studied the genetic characteristics of *Cuu* in North Africa using the same SSR loci. Their estimates of the mean  $H_e$ ,  $H_o$  and  $F_{IS}$  were 0.70, 0.64 and 0.08, respectively, for Moroccan populations. In the current study, we estimated  $H_e$ ,  $H_o$  and  $F_{IS}$  to be 0.70, 0.65 and 0.05, respectively, for the populations we sampled in Morocco, which were mostly similar to the estimates of Lesobre et al. (2010).

### Genetic variability among populations

The structure of subdivided populations is often estimated by F-statistics (Wright 1951). The F-statistics ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  and  $F_{ST}$ ) of the 7 loci are presented in Table 2. The  $F_{IS}$  values per locus varied from 0.06 to 0.12 with a mean of 0.10. The  $F_{ST}$  estimates of population differentiation ranged from 0.09 to 0.13 showing an average  $F_{ST}$  of 0.11. As presented in Table 3, estimates of genetic differentiation between pairs of populations and their P values were significant in the majority of combinations except within Moroccan populations (Boudnib,

Errachidia, Erfoud, and Laayoune). Moreover, our  $F_{ST}$  estimate for *Cum* populations (0.067) was slightly higher than that reported (0.0419) by Pitra et al. (2004) who studied the *Cum* population history where the links between wintering and breeding areas were already defined. Our estimate of the global  $F_{ST}$  in the four Moroccan populations (0.006) was, however, similar to the one reported by Lesobre et al. (2010).

**Table 2.** Multilocus F statistics ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  and  $F_{ST}$ ) and number of migrants per generation ( $N_m$ ) across 10 Houbara populations.

Locus	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$N_m$
A112	0.125	0.230	0.120	1.833
A210	0.103	0.212	0.122	1.799
D119	0.081	0.207	0.136	1.588
D118	0.127	0.228	0.115	1.923
A29	0.069	0.176	0.115	1.923
A120	0.129	0.216	0.099	2.275
D117	0.081	0.197	0.127	1.718
Mean	0.103	0.209	0.119	1.865
Standard deviation	0.058	0.042	0.025	

**Table 3.** Pairwise  $F_{ST}$  between Houbara bustard populations (below diagonal) with probability of significance provided above the diagonal.

	Erfoud	Boudnib	Laayoune	Errachidia	CI	Iran	Baluchistan	MMO	ME	Afghanistan
Erfoud	*	0.054	0.180	0.180	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Boudnib	0.012	*	0.351	0.819	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Laayoune	0.025	0.003	*	0.423	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Errachidia	0.011	0.000	0.002	*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CI	0.147	0.101	0.158	0.108	*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Iran	0.176	0.158	0.156	0.153	0.246	*	0.000	0.009	0.009	0.018
Baluchistan	0.192	0.162	0.180	0.164	0.244	0.050	*	0.000	0.000	0.000
MMO	0.160	0.126	0.133	0.130	0.172	0.031	0.026	*	0.000	0.018
ME	0.348	0.298	0.335	0.304	0.443	0.186	0.201	0.208	*	0.009
Afghanistan	0.198	0.154	0.183	0.161	0.199	0.071	0.090	0.063	0.216	*

CI = Canary Islands; MMO = *macqueenii* mixed origins; ME = Middle East populations.

To analyze hierarchical molecular variance using AMOVA, we first grouped all populations in one set to get a global idea about the genetic structuring and differentiation among and within populations (Table 4). A significant structuring among all sampled populations was found ( $F_{ST} = 0.12$ , P value = 0.000) with 87.97% of molecular variance within populations and only 12.03% among groups. The most probable population groupings and configurations according to four geographic groups where also investigated. Generally, the grouping that exhibits the highest value of among group variation ( $F_{CT}$ ) and is significant indicates the most parsimonious geographic subdivision (Paulo et al., 2002). The [*Cuu*]+[*Cuf*]+[*Cm*]+[*CmMiddle-east*] grouping displayed the highest statistically significant value of among group variation with an  $F_{CT}$  value of 0.145 (P = 0.000). This finding affirms, and is in perfect concordance with, the results shown in Table 3 especially regarding the population of Macqueen's mixed origins and that from the Middle East region.

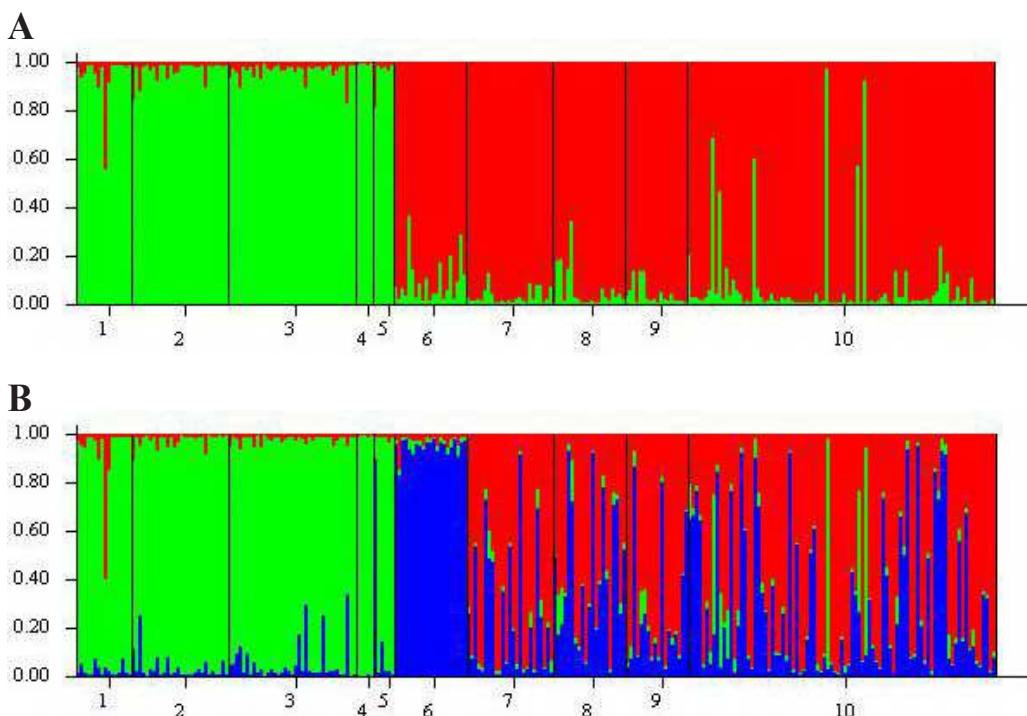
**Table 4.** Hierarchical AMOVA in Houbara and Macqueen's populations.

All populations	Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Significance tests (P)*
1 group [Cuu+Cuf+Cum+CumMiddle-East]	Among populations	9	155.15	0.30	12.03	$F_{ST} = 0.120$ (0.000)*
	Within populations	522	1170.24	2.24	87.97	
	Total	531	1325.39	2.54	100.0	
2 groups [Cuu/Cuf]+[Cum/CumMiddle-East]	Among groups	1	93.61	0.34	12.69	$F_{CT} = 0.126$ (0.01)
	Among populations/within groups	8	61.53	0.11	4.40	
	Within populations	522	1170.24	2.24	82.91	$F_{ST} = 0.170$ (0.000)*
	Total	531	1325.39	2.70	100.0	
3 groups [Cuu]+[Cuf]+[Cum/CumMiddle-East] and [Cuu/Cuf]+[Cum]+[CumMiddle-East] have very similar results	Among groups	2	117.09	0.35	13.43	$F_{CT} = 0.134$ (0.003)
	Among populations/within groups	7	38.06	0.07	2.66	
	Within populations	522	1170.24	2.24	83.91	$F_{ST} = 0.160$ (0.000)*
	Total	531	1325.39	2.67	100.0	
4 groups [Cuu]+[Cuf]+[Cum]+[CumMiddle-East]	Among groups	3	127.93	0.38	14.53	$F_{CT} = 0.145$ (0.000)
	Among populations/within groups	6	27.21	0.04	1.70	
	Within populations	522	1170.24	2.24	83.77	$F_{ST} = 0.162$ (0.000)*
	Total	531	1325.39	2.67	100.0	

$F_{ST}$  and  $F_{CT}$  are fixation indices within populations and among groups, respectively. Cuu = *Chlamydotis undulata undulata*; Cuf = *C. u. fuertaventurae*; Cum = *C. u. macqueenii* populations except Middle East; CumMiddle-East = Middle East *C. u. macqueenii* population.

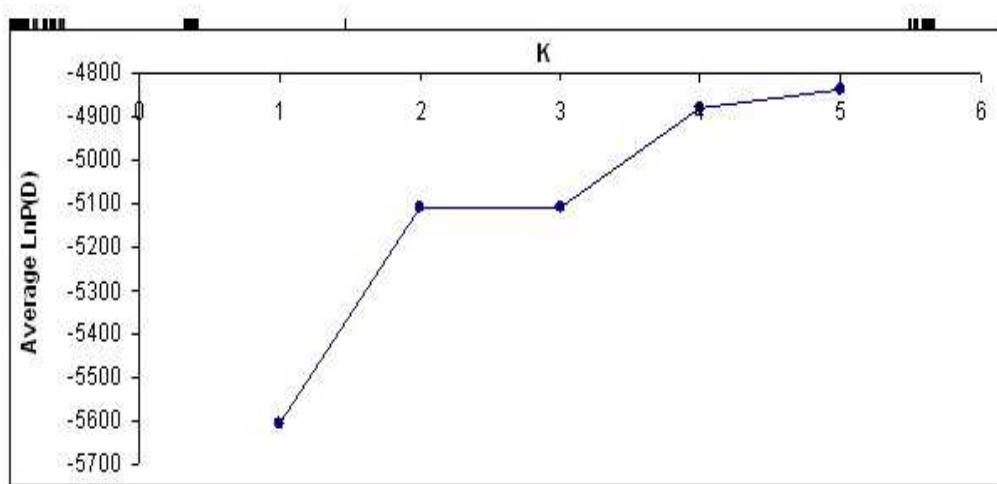
To quantify the sub-structuring for Moroccan Houbara between the South-western and North-eastern populations, we repeated the analysis using separate data for the two groups, which showed an absence of structuring ( $F_{ST} = 0.0021$ ,  $P = 0.128$ ). This estimate corresponded to a number of 238 migrants that were exchanged per generation. Actually, the result was not unexpected as the Houbara have the capacity to disperse over a wide geographic range in Morocco (Idaghdour et al., 2004). Lesobre et al. (2010) also noted that *Cuu* founders from Algeria and Eastern Morocco are bred and managed as a single population and their descendants were used to restock wild populations in south eastern Morocco. Furthermore, gene flow within Morocco was reported to be female-mediated, and its considerable levels were sufficient to genetically homogenize the Moroccan populations (Idaghdour et al., 2004). Using the same approach, an estimate of  $F_{ST} = 0.1117$  was found between *Cuu* and *Cuf*. This Canary Islands *Cuf* differentiation from the Moroccan *Cuu* is due to geographic isolation (sea barrier).

Population structure was further investigated using the STRUCTURE Bayesian clustering method in order to assign individuals to populations based on their genotypes. The most relevant number of clusters was revealed to be  $K = 2$  as shown in Figure 2. This result was supported by the estimated log probability of the data ( $\text{LnP}(D)$ ; Figure 3) and the assessment of the membership percentage to particular clusters (Table 5). The  $\text{LnP}(D)$  increased by 9.75% between  $K = 1$  and  $K = 2$ , remained almost constant between  $K = 2$  and  $K = 3$  and



**Figure 2.** Houbara Bayesian clustering for  $K = 2$  and  $K = 3$  (with its **A** and **B** plots). The thin vertical colored bars refer to the proportion of membership to the North African cluster (in red and blue) or to the Asian cluster (in green). 1: Iran; 2: Baluchistan; 3: Macqueenii mixed origins; 4: Middle East; 5: Afghanistan; 6: Canary Islands; 7: Erfoud; 8: Boudnib; 9: Laayoune; 10: Errachidia.

increased again by 4.72% between  $K = 3$  and  $K = 4$  clusters. The weak variation between  $K = 2$  and  $K = 3$  refers to the plateau reached at  $K = 2$  and showed a good fit to the data. This finding is also confirmed by the individual assignment proportion of more than 92% to either cluster I or cluster II. When the number of clusters was increased to  $K = 3$ , the admixed haplotypes showed lower percentages of membership with values less than 70% especially for Moroccan populations.



**Figure 3.** The average posterior probability [log probability of the data,  $\text{LnP}(D)$ ] of the five runs at each cluster  $K$ .

**Table 5.** Proportion of membership of each pre-defined population to the two major inferred clusters.

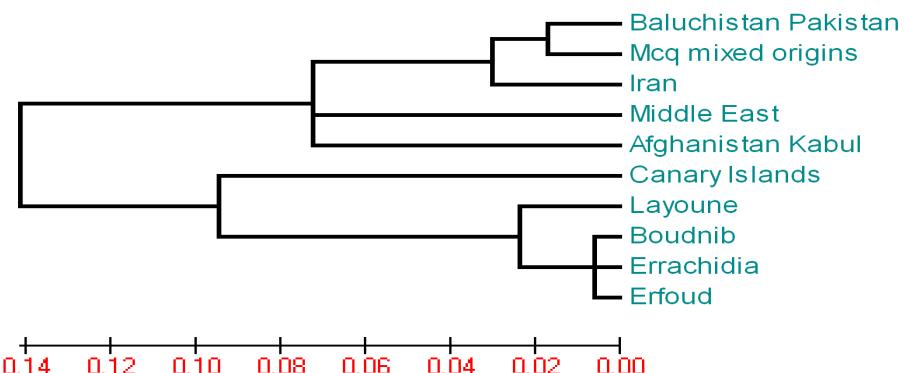
Subspecies	Populations	Cluster I (%)	Cluster II (%)
<i>Cum</i>	Iran	94.50	5.50
	Baluchistan	96.90	3.10
	<i>macqueenii</i> mixed origins	96.80	3.20
	Middle East	99.20	0.80
	Afghanistan	95.50	4.50
<i>Cuf</i>	Canary Islands	9.40	90.60
	Erfoud	3.50	96.50
	Boudnib	5.90	94.10
	Laayoune	4.30	95.70
	Errachidia	8.00	92.00

*Cum* = *Chlamydotis undulata macqueenii*; *Cuf* = *C. u. fuertaventurae*; *Cuu* = *C. u. undulata*.

### Genetic distance and gene flow

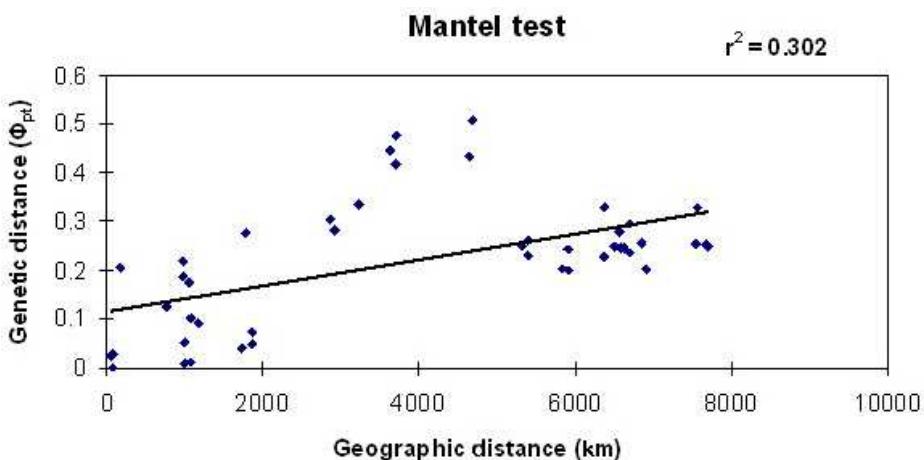
A phylogeny tree was drawn using the ME approach (Figure 4). The dendrogram grouped the majority of Houbara and Macqueen's populations into two main clusters *Cuu/Cuf* and *Cum* and corroborated then the reciprocal monophly of the Houbara and Macqueen's

bustards. Also, the ME tree has shown that the North African populations are monophyletic, which confirms further the genetic structuring found between *Cuu* and *Cuf*.



**Figure 4.** Minimum evolution tree showing grouping of the 10 populations of Houbara and Macqueen's bustards.

In Figure 5 and Table 6, Mantel tests for association between genetic distance, represented by ( $\Phi_{pt}$ ) and geographic distance, revealed that geographic distance plays an important role in the distribution of genetic variation among Houbara populations and showed significant and positive correlations with  $r^2 = 0.302$  and  $r^2 = 0.334$  for the set grouping all populations and the set gathering all population except the one from the Canary Islands, respectively. These genetic findings could be explained by limited genetic connectivity so by relatively high indication of isolation-by-distance between populations. The relationship between genetic differentiation and geographic distance became higher when the *Cuf* population was retrieved from Mantel tests. The decrease in isolation by distance in the first set containing all populations could be explained by the fact that in finite populations such as *Cuf*, the effect of genetic drift is stronger than gene flow at the studied nuclear loci.



**Figure 5.** Mantel test for association between genetic distance and geographic distance.

**Table 6.** Summary of Mantel tests for microsatellite markers.

Populations	$r^2$	P
All ( <i>Cuu</i> , <i>Cuf</i> and <i>Cum</i> )	0.302	0.030*
All except <i>Cuf</i>	0.334	0.040*
All except <i>Cuu</i>	0.355	0.113
All except <i>Cum</i>	0.070	0.250
All <i>Cum</i>	0.543	0.220
All <i>Cum</i> except Middle East	0.836	0.100
All <i>Cuu</i>	0.049	0.420

$r^2$  is the coefficient of correlation between population genetic distance and population genetic differentiation ( $\Phi_{pt}$ ).

\*P < 5%. For abbreviations, see legend to Table 5.

Furthermore, the mean  $N_m$  value was estimated to 1.86 migrant per generation and historical gene flow between *Cuu* and *Cuf*, *Cum* and *Cuu*, and *Cuf* and *Cum* was  $N_m = 4.02$  ( $F_{ST} = 0.111$ ), 2.93 ( $F_{ST} = 0.145$ ), and 1.94 ( $F_{ST} = 0.204$ ), respectively. Using mtDNA markers, Idaghdour et al. (2004) showed that gene flow between *Cuu* and *Cuf* is equal to 1.3 migrants per generation suggesting that males possibly disperse more than females. In fact, the sex-biased dispersal discrepancy is due to larger susceptibility of the female-inherited mtDNA to genetic drift compared to the biparentally inherited microsatellites especially in isolated or differentiated populations (Chesser and Backer, 1996). Idaghdour et al. (2004) reported also that the gene flow is almost exclusively unidirectional from *Cuu* to *Cuf* as expected given the effective population size of each population.

### Scenarios of population differentiation

The significant differentiation between *Cum* and *Cuu* reflected by relatively high  $F_{ST}$  value suggests that *Cum* split from *Cuu* first, then *Cuu* and *Cuf* became differentiated. This is in concordance with the results of Idaghdour et al. (2004) and Lesobre et al. (2010).

Based on the results generated from this study, we think that the differentiation mechanism within *C. undulata* species could have occurred at two stages. The first between *Cum* and *Cuu* and the second between *Cuu* and *Cuf*. Assuming that the origin of Otididae family is thought to be in eastern or southern Africa (Pitra et al., 2002), a first hypothesis of *C. undulata* speciation is an expansion of an ancestral form from eastern Africa to Asia followed by a range expansion all the way to the Atlantic coast of Africa. The second possible hypothesis is that the expansion of the ancestral form occurred at the same time to Asia and North Africa and these two forms were sympatric in Egypt and later separated. Also, the reduction of population size as a result of habitat destruction, excessive hunting and wars (especially that Egypt desert, Middle East and Western-central Asia in Afghanistan, Pakistan, Iran, and Iraq had known long periods of disastrous wars for decades) may be responsible for the currently observed disjunction at the level of Egypt, so in other terms, responsible for the lack of connectivity and isolation resulting in loss of habitat and population fragmentation. Further study on Houbara and Macqueen's mtDNA genes is in progress (Korrida A and Schweizer M, unpublished results) and would shed more light on the two assumptions mentioned above.

For the North African subspecies and according to our measures of microsatellite genetic variability, the most likely mechanism of differentiation between *Cuu* and *Cuf* is a recent colonization of the Canary Islands. This mechanism agrees also with results previously documented using d-loop marker (Idaghdour et al., 2004). Several models have been developed to

describe the effects of colonization on the genetic structure of natural populations (Kimura and Weiss, 1964). With regards to the observations related to the low genetic variability in the Canarian subspecies, the most appropriate colonization model might be the stepping-stone model, which assumes that migration occurs between adjacent populations, and that colonized islands contain only a subset of the genetic information of the source population resulting in the loss of genetic diversity due to founder effects (Nei, 1987).

## IMPLICATIONS FOR CONSERVATION

The Houbara and Macqueen's subspecies constitute the main target of Arab falconry and due to their drastic decline has been the focus of the present study. The novelty of the present study resides in the striking evidence it reports for population genetic structuring within *Cum* being managed currently as a single genetic stock. Indeed, the Middle East population has shown significant levels of genetic differentiation at microsatellite loci, therefore, this very small population would not enable us to draw a decisive conclusion in relation with the definition of management or conservation units as defined by Vogler and Desalle (1994), Moritz (1994) and Crandall et al. (2000). For this end, more samples from the Negev desert, Egypt, Jordan, and/or Sinai areas need to be investigated.

Moreover, our genetic evidence revealed that the geographically isolated Canarian population is also genetically independent and should therefore be considered either as a separate North African evolutionary significant unit (Crandall et al., 2000) or designatable unit (Green, 2005).

The Houbara bustard is a valuable avian resource with great interest for Morocco too. As the four Moroccan populations were found to be very exchangeable with each other, we recommend treating the North-eastern and South-western Moroccan populations as a single management pool. However, similar genetic study should be conducted each time and new samples collected from other Moroccan zones are to be recruited within the captive breeding stocks.

From a wildlife and conservation perspective, we do believe that the current information and results would constitute a reference point and source of knowledge for implementing genetic strategies that could assist in maintaining Houbara bustards' genetic diversity such that the evolvability of population is not at risk, and therefore not compromising chances of adaptation to wild conditions and minimizing the loss of genetic diversity and inbreeding.

Finally, considering that in small and finite populations the risk of extinction within a short time is increased due to over-exploitation, hunting pressure, habitat destruction, pollution, introduced species, and other environmental, genetic and stochastic factors, it is important to mention that beside the information on population structure and heterozygosity estimates held by the neutral genetic markers, direct censuses of the populations could hold more information regarding extinction risk.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the late HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud for his support and for promoting scientific research in Morocco. Thanks are also due to HE Sheikh Mohammed Bin Khalid Bin Hethlein for his encouragements. The authors acknowledge the help of the National Wildlife Research Center at Taif, Kingdom of Saudi Arabia and HE Sheikh Butti Maktoum's

Wildlife Center at the United Arab Emirates for providing Asian Houbara samples. We extend our thanks also to Oliva Breeding Station in Canary Islands for providing Canarian samples. Special thanks go to the anonymous referees of this manuscript, as well as to Dr. Y. Idaghdour from the Centre de Recherche Sainte-Justine, Université de Montréal for their valuable comments on the manuscript. For their help and assistance, we are also indebted to Pr. S. Benhissoune and Pr. Y. Ait Ichou from Agadir Faculty of Sciences, Ibn Zohr University, B. Iazza from the University of Seville, M.T. Moutaouafiq from Laval University, M.N. Tamssouri and J. Abououalid from Agadir Faculty of Sciences.

## REFERENCES

- Belkhir K, Borsig P, Chikhi L, Raufaste N, et al. (2003). GENETIX 4.04, Logiciel Sous Windows™ Pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Adaptations, Umr5171. Université de Montpellier 2, Montpellier.
- Birdlife International (2010). Available at [<http://www.birdlife.org/>]. Accessed August 21, 2010.
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Chbel F, Broderick D, Idaghdour Y, Korrida A, et al. (2002). Characterization of 22 microsatellites loci from the endangered Houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*). *Mol. Ecol. Notes* 2: 484-487.
- Chesser RK and Baker RJ (1996). Effective sizes and dynamics of uniparentally inherited genes. *Genetics* 144: 1225-1235.
- Cramp S and Simmons KEL (1980). The Birds of the Western Palearctic. Vol. II. Oxford University Press, New York.
- Crandall KA, Bininda-Emonds OR, Mace GM and Wayne RK (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 15: 290-295.
- Dawson RJG, Idaghdour Y, Korrida A and Jones C (1999). Molecular genetic analysis of the Houbara bustard populations. *IFCDW Bi-Annual Rep.* 2: 52-55.
- Excoffier L, Lavale G and Schneider S (2006). Arlequin Ver. 3.1: A Software for Population Genetic Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Falush D, Stephens M and Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Gray JE (1832). *Otis macqueenii*. Hardwicke's Illustrator. *Indian Zool.* 2.
- Green DM (2005). Designatable units for status assessment of endangered species. *Conserv. Biol.* 19: 1813-1820.
- Haddane B (1985). The Houbara bustard in Morocco: a brief review. *Bustard Stud.* 3: 109-110.
- Heim de Balsac H and Mayaud N (1962). Les Oiseaux du Nord-Ouest de l'Afrique. Paris.
- Idaghdour Y, Broderick D, Korrida A and Chbel F (2004). Mitochondrial control region diversity of the Houbara bustard *Chlamydotis undulata* complex and genetic structure along the Atlantic seaboard of North Africa. *Mol. Ecol.* 13: 43-54.
- IUCN (2010). The International Union for Conservation of Nature. Available at [<http://www.iucnredlist.org/>]. Accessed May 25, 2010.
- Jacquin (1784). *Psophia undulata*. Beytr Gesch Vogel 24, Plate 9.
- Keller LF, Arcese P, Smith JN, Hochachka WM, et al. (1994). Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* 372: 356-357.
- Kimura M and Weiss GH (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576.
- Knox AG, Collinson M, Helbig AJ, Parkin DT, et al. (2002). Taxonomic recommendations for British birds. *Ibis* 144: 707-710.
- Lesobre L, Lacroix F, Caizergues A, Hingrat Y, et al. (2010). Conservation genetics of Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*): population structure and its implications for the reinforcement of wild populations. *Conserv. Genet.* 4: 1489-1497.
- Lewis PO and Zaykin D (2001). Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data. Version 1.0.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB and Pemberton JM (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- Moritz C (1994). Defining "evolutionary significant units" for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9: 373-375.
- Nei M (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

- Nei M, Kumar S and Takahashi K (1998). The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 12390-12397.
- Paulo OS, Jordan WC, Bruford MW and Nichols RA (2002). Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian Lizard. *Mol. Ecol.* 11: 809-819.
- Peakall R and Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295.
- Pitra C, Lieckfeldt D, Frahnert S and Fickel J (2002). Phylogenetic relationships and ancestral areas of the bustards (Gruiformes: Otididae), inferred from mitochondrial DNA and nuclear intron sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 63-74.
- Pitra C, D'Aloia MA, Lieckfeldt D and Combret O (2004). Genetic variation across the current range of the Asian Houbara bustard (*Chlamydota undulata macqueenii*). *Conserv. Genet.* 5: 205-215.
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Raymond M and Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Rothschild W and Hartert E (1894). On a new bustard from the Palearctic region. *Nov. Zool.* 1: 689.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sangster G, Hazeveld CJ, Van den Berg AB, Roselaar CS, et al. (1999). Dutch avifaunal list: Species concepts, taxonomic instability, and taxonomic changes in 1997-1998. *Ardea* 87: 139-165.
- Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nat. Biotechnol.* 18: 233-234.
- Serrano M, Calvo JH, Martinez M, Marcos-Carcavilla A, et al. (2009). Microsatellite based genetic diversity and population structure of the endangered Spanish Guadarrama goat breed. *BMC Genet.* 10: 61.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley P (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535-538.
- Vogler AP and Desalle R (1994). Diagnosing units of conservation management. *Conserv. Biol.* 8: 354-363.
- Weir BS and Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.



## CHAPITRE II

**Phylogéographie des outardes Houbara et Macqueen's  
inférée des séquences du gène mitochondrial cytochrome b**

❀ ❀

*Life is lived forwards, but understood backwards*

*Søren Kierkegaard (1813-1855)*

❀ ❀

## INTRODUCTION

La phylogéographie a été définie pour la première fois en 1987 par J.C Avise et ses collaborateurs comme la discipline qui étudie les principes régissant les distributions géographiques des lignées phylogénétiques inter et/ou intra spécifiques. Cette nouvelle branche est rapidement devenue l'un des plus intégratifs piliers de biologie évolutive, surtout après son influence par les principes et les modèles mathématiques et statistiques développés dans la théorie de la coalescence (Kingman 1982, Tajima 1983 et Donnelly & Tavaré 1995). Ensuite, la phylogéographie comparative a bénéficié des outils de génétique moléculaire et de systématique/phylogénétique pour jauger davantage les congruences spatio-temporelles des patterns (distributions) phylogéographiques des lignées contemporaines évolutives et aussi, pour tester les hypothèses sur les processus historiques et démographiques qui pourraient être responsables de ces patterns, *i.e* : la vicariance, l'hybridation-introgression, la divergence, les goulots d'étranglements, la structuration des populations ou les expansions/contractions qui sont en relation avec les changements et les oscillations climatiques et environnementales passés. La phylogéographie se situe donc à la croisée de la théorie de macroévolution (biologie phylogénétique, paléontologie, et géographie historique) et de la théorie de microévolution (démographie, éthologie, et génétique des populations).

Dans ce travail de thèse, la phylogéographie du complexe Houbara-Macqueen's vivant dans l'écorégion du Paléarctique a été étudiée et investiguée.

## MÉTHODOLOGIE

### 1. Échantillonnage et extraction de l'ADN

Un total de 43 outardes asiatiques et africaines est analysé dans cette étude. Un lot de 24 individus sont nouvellement séquencés dont six *Chlamydotis undulata undulata* du sud-est du Maroc, six *Chlamydotis undulata fuertaventurae*, huit *Chlamydotis macqueenii* provenant du Balochistan, du désert du Néguev et d'Afghanistan, en plus d'un outgroup de quatre différentes espèces d'outardes africaines : *Eupodotis humilis*, *Eupodotis senegalensis*, *Ardeotis kori* et *Ardeotis arabs*. Pour la comparaison, un autre groupe de 19 séquences a été extrait de la Genbank du National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) (Tableau 1 et Figure 1 de l'article 2).

L'extraction d'ADN nucléaire a été effectuée comme dans le chapitre I.

## 2. Marqueur génétique utilisé: L'ADN mitochondrial

Chez les animaux, la mitochondrie est un organite qui assure la respiration cellulaire et génère de l'énergie nécessaire pour le déroulement des réactions cellulaires sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Au cours de l'évolution, l'ADN mitochondrial a été introduit dans les différents génomes d'animaux en provenance des bactéries aérobies qui pénétraient les cellules eucaryotes par infection et ingestion au lieu des mécanismes cellulaires ordinaires comme les duplications et la reproduction sexuelle (Wallin 1922). Ces procaryotes devenaient alors symbiotes en transférant leurs génomes dans les noyaux des cellules eucaryotes hôtes tout en conservant les gènes nécessaires à leurs fonctions cellulaires. Les mitochondries ont ainsi gardé une trentaine de gènes impliqués dans la respiration cellulaire, en plus de quelques gènes de l'ARNt (acide ribonucléique de transfert). L'origine extracellulaire des mitochondries est aussi affirmée par leur code génétique universel (Griffiths *et al.* 2007).

Le premier génome mitochondrial aviaire complètement cloné et séquencé a été publié par Desjardins & Morais en 1990. Chez la poule (*Gallus gallus*), l'ADN mitochondrial est circulaire et fait 16775 paires de bases de long. Cette structure contient des gènes codant pour 13 protéines (ND1, ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND4L, ND4, ND5, CYTB, ND6), 22 ARNt, 2 ARNr (acide ribonucléique ribosomique) et une région non-codante de contrôle (D-loop). Ce génome code pour les mêmes gènes que chez les autres vertébrés cependant, l'ordre des gènes chez les oiseaux est différent (Mindell 1997). En effet, il y a un réarrangement adjacent à la région de contrôle et du gène cytochrome b chez la poule par rapport à celle des mammifères et du xénope (Figure 1).

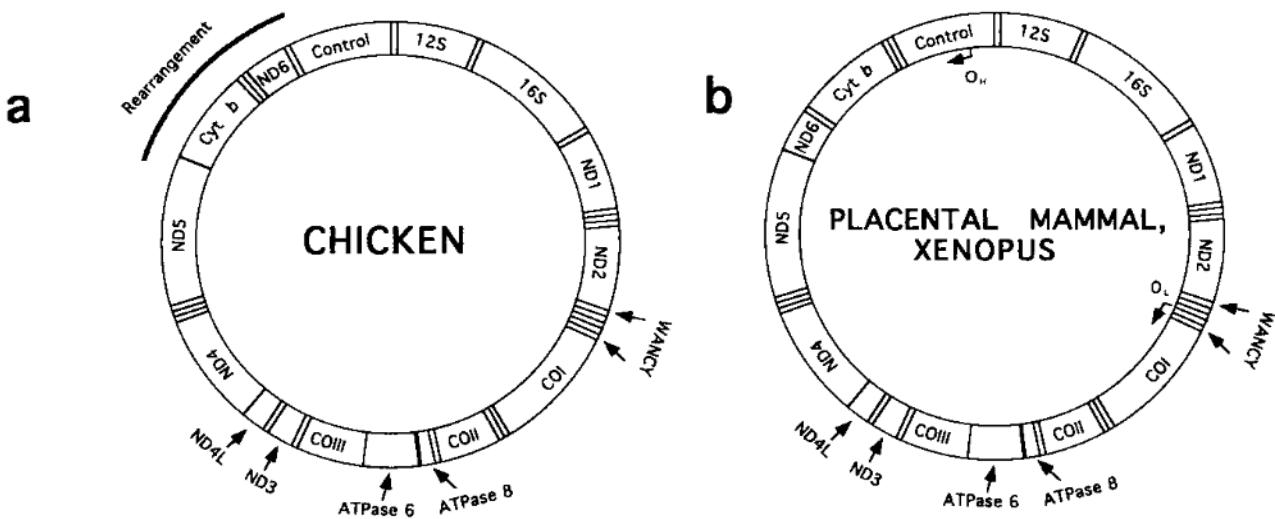


Figure 1: Ordre des gènes mitochondriaux chez a) la poule (*Gallus gallus*) et b) chez les mammifères et le xénope. Cyt b : le gène cytochrome b, 12S : 12S ARNr, 16S : 16S ARNr, Control : région de contrôle ou D-loop,  $O_L$  : origine de réPLICATION du brin tardif (3'-5') de l'ADN mitochondrial,  $O_H$  : origine de réPLICATION du brin précoce (5'-3').

Généralement, dans les études phylogéographiques, les marqueurs moléculaires utilisés sont : l'ADN mitochondrial (Marshall *et al.* 2011, Gongora *et al.* 2011 et Teacher *et al.* 2011), l'ADN chloroplastique (Vachon & Freeland 2011, Wang *et al.* 2011 et Guicking *et al.* 2011) et l'ADN génomique (Schweizer *et al.* 2011, Witt *et al.* 2011 et Mardulyn *et al.* 2011). L'ADN mitochondrial reste le marqueur utilisé par excellence (Suárez *et al.* 2009, Weksler *et al.* 2010, Herman & Searle 2011, Wilson & Orr 2011 et Johnson & Weickstein 2011). Ce choix est dû à plusieurs raisons : (i) un mode de transmission uniparentale et maternelle qui rend réduit la taille efficace des populations de gènes, (ii) une structure circulaire haploïde qui facilite son amplification par séquençage sans recouvre au clonage moléculaire, (iii) une neutralité sélective qui minimise le risque d'apparition des déséquilibres de liaison, (iv) une absence de recombinaison durant la méiose permettant à toute la molécule d'avoir la même histoire généalogique et (v) un temps de coalescence plus rapide que celui des marqueurs nucléaires (de 1/4) favorisant l'étude des origines et des évolutions récentes (*e.g.*: le plus récent ancêtre commun MRCA ou the Most Recent Common Ancestor).

### 3. Amplification par PCR de séquençage

Le séquençage d'un long fragment de 1042 paires de bases du gène mitochondrial cytochrome b, a été facilité par trois paires d'amorces (primers) en chevauchement qui ont été conçues par notre unité de recherche en 2003. Parmi les six amorces, cinq possèdent des

amorces universelles M13F (18 ou 23 mers) et M13R (24 mers) étiquetées par de la fluorescence infra rouge compatible avec la technologie IRD 800 et IRD 700 du séquenceur Li-COR (Figure 2).

CB-M13F(18)	5'-TGTAAAACGACGCCAGTCCAACATCTCTGCTTGAT-3'
HCB3-M13F(23)	5'-AGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGGTGAAGTT-3'

HCB5-M13F(23)	5'-AGGGTTTCCCAGTAACGACGTTGGTTGCTGGGTGAAGTT-3'
LCB2a	5'-TAGGATATGTTCTACCATGAGG-3'

LCB4-M13R(24)	5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGGCCAACCTACTAGGGGACCCAGA-3'
HCB6-M13F(24)	5'-AGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGGTTACAAGACCAATGTT-3'

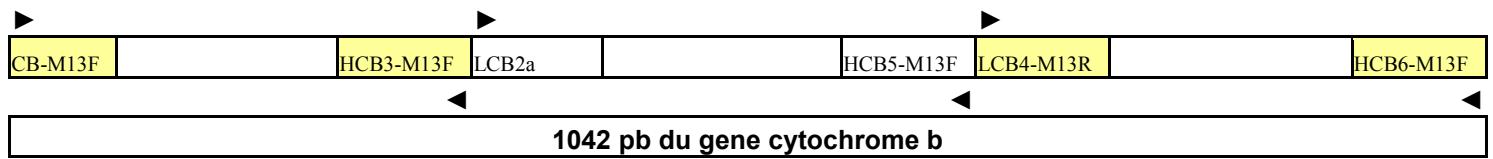


Figure 2: Amorces utilisées selon Broderick *et al.* (2003), leurs compositions nucléotidiques et leurs emplacements sur le fragment de 1042 bp du gène cytochrome b.

En utilisant des machines thermiques de type Biometra T1 et Techne GeneE. Le Master Mix de la réaction PCR contenait dans un volume final de 20 µl:

- H<sub>2</sub>O de type MilliQ
- Tampon 10X Promega
- 25 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 200 µM de dNTPs et de ddNTPs
- 8 pM d'amorces sens (F ou Forward) et anti-sens (R ou Reverse)
- 1 µM de l'amorce IRD- M13 F (Schuelke 2000)
- 0.08% de Nonidet P40
- 0.3 U/µl de l'enzyme Taq Polymerase (Promega)
- 20 ng d'ADN génomique
- Une goutte de l'huile minérale.

L'amplification par technique PCR comprenait les phases suivantes:

1. Une phase de dénaturation des deux brins d'ADN à 90°C pour un cycle de 1 min
2. Une phase d'hybridation des deux amorces de 30 cycles à : 56°C pendant 30 s, 72°C pendant 45 s, 95°C pendant 1 s et à 90°C pendant 10 s
3. Une phase d'extension par l'enzyme Taq polymerase à 72°C pour un cycle de 2 min.

Les produits PCR ont été ensuite séparés sur un gel d'acrylamide Li-COR KB Plus de 6.5% (Figure 3) en utilisant une machine de séquençage automatique de type Li-COR 4000L et à travers

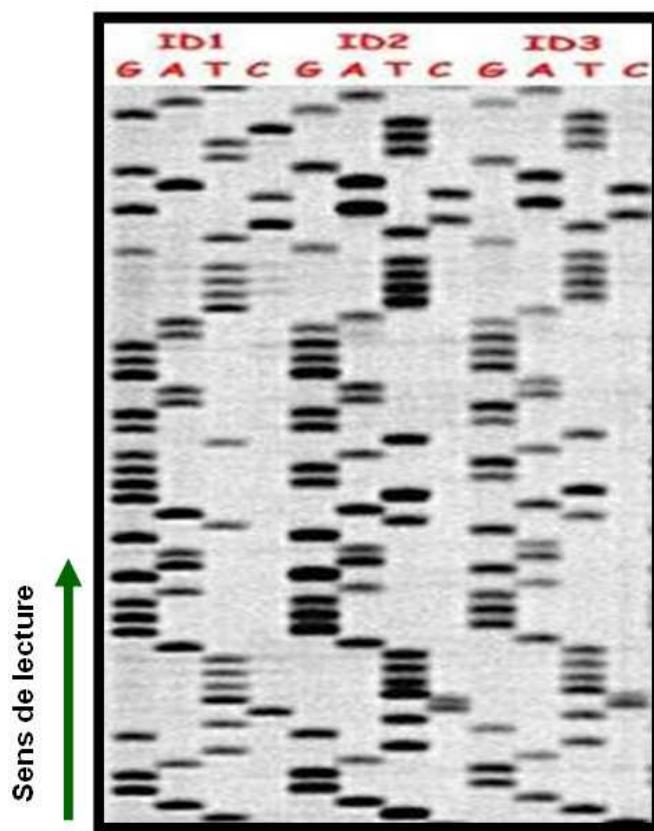


Figure 3: Profil électrophorétique d'une amplification par PCR de séquençage d'un fragment du gène mitochondrial cytochrome b chez trois ourardes Houbara marocaines. G = Guanidine, A = Adénine, T = Thymine et C = Cytosine. Pour chaque individu (IDx) correspondent quatre colonnes de nucléotides GATC constituant la séquence d'ADN amplifiée.

## 4. Méthodes d'analyses et logiciels génétiques utilisés

L'alignement des séquences mitochondrielles obtenues a été réalisé par les logiciels Proseq v.2.43 (Filatov 2002), T-Coffee (Notredame *et al.* 2000) et revérifié visuellement (Figure 4).

SEQUENCE NAME	LENGTH										
Morocco1_Cuu	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Morocco2_Cuu	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Morocco3_Cuu	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Morocco4_Cuu	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Morocco5_Cuu	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Morocco6_Cuu	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Canary_Islands	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Canary_Islands	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Canary_Islands	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Canary_Islands	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Canary_Islands	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Canary_Islands	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Pakistan1_Cum	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Pakistan2_Cum	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Pakistan3_Cum	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Afghanistan1_C	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C
Afghanistan2_C	1042	G	C	C	T	C	C	G	T	A	C

Figure 4: Exemple d'alignement de séquences d'ADN mitochondrielles.

### 4.1. Minimum Spanning Network (MSN)

La MSN reconstruit des relations phylogénétiques entre les différents mitotypes (haplotypes mitochondriaux) à partir de la matrice des distances génétiques par paires estimées entre tous les haplotypes. Cette reconstruction a été faite par les programmes Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) et TCS (Clement *et al.* 2000).

### 4.2. Nombre de sites polymorphes (S)

C'est le nombre des loci utilisés montrant plus d'un allèle par locus.

### 4.3. Diversité haplotypique ( $h$ ) (Nei 1987)

C'est la diversité génique définie comme la probabilité que lorsque l'on tire au hasard deux haplotypes, ils soient différents. La diversité haplotypique est calculée selon l'équation :

$$h = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

avec,  $n$  le nombre de copies de gènes,  $k$  le nombre d'haplotypes et  $p_i$  la fréquence du  $i$ ème haplotype.

#### 4.4. Diversité nucléotidique ( $\pi$ ) (Tajima 1983)

C'est la probabilité que lorsque l'on tire au hasard deux nucléotides homologues, ils soient différents. La diversité nucléotidique est calculée selon l'équation :

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

avec,  $d_{ij}$  le nombre de mutations depuis la divergence entre l'haplotype  $i$  et  $j$ ,  $k$  le nombre d'haplotypes,  $p_i$  et  $p_j$  sont les fréquences des haplotypes  $i$  et  $j$  respectivement et  $L$  le nombre de loci. D'une façon similaire, le terme :  $\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij}$  est le nombre moyen de différences en paires (pairwise differences).

#### 4.5. Disparité des distributions ou "mismatch differences"

Selon le modèle mutationnel des sites infinis (voir glossaire), la distribution du nombre des différences observées entre les paires de séquences mitochondriales ou "mismatch differences" (Rogers & Harpending 1992) a été comparée avec les différences attendues par paires "pairwise differences" sous l'hypothèse d'une expansion instantanée de la population. La forme et le mode de distributions "mismatch" dans une population indiquent le type et l'histoire de ses changements démographiques. Une population en équilibre démographique présente une distribution espérée de forme multimodale, tandis qu'une population en expansion démographique récente, revendique une distribution "mismatch" de forme unimodale (*i.e* : sous forme d'une courbe en cloche). Les distributions "mismatch differences" ont été visualisées en utilisant DnaSP v.5 (Librado & Rozas 2009)

#### 4.6. Expansion : Méthode non-linéaire généralisée des moindres carrés

En considérant le modèle mutationnel à nombre infini de sites sans recombinaison, l'expansion populationnelle a été aussi analysée selon la méthode non-linéaire généralisée des moindres carrés de Schneider & Excoffier (1999) et ce, afin d'estimer :

1. Le paramètre mutationnel  $\tau$  défini par l'équation :  $\tau = 2\mu t$  avec,  $\mu$  le taux de mutation et  $t$  le temps d'expansion
2. La taille de la population avant l'expansion  $\theta_0$  définie par l'équation :  $\theta_0 = 2\mu N_0$  avec,  $N_0$  la taille de la population au temps 0
3. La taille de la population après l'expansion  $\theta_1$  définie par la formule :  $\theta_1 = 2\mu N_1$  avec,  $N_1$  la taille de la population après l'expansion.

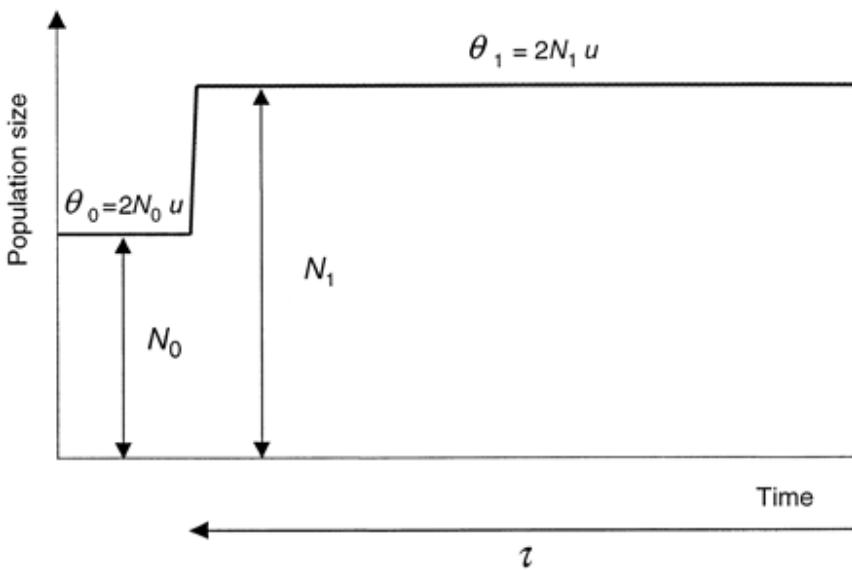


Figure 5: Profil démographique d'une population ayant connu une augmentation instantanée de taille en passant d'une taille  $N_0$  à une taille  $N_1$  il y a  $t$  générations (d'après Schneider & Excoffier 1999).

#### 4.7. Somme carrée des écarts (SSD pour Sum of square deviations)

Le logarithme de Hooke & Jeeves (1963) a été utilisé pour déterminer les paramètres qui minimisent la SSD entre les distributions "mismatch" observées  $F_{i-obs}$  et celles attendues

$F_{i-esp}$ . La SSD est défini comme :  $SSD = \sum_{i=0}^n (F_{i-obs} - F_{i-esp})^2$ . Le test statistique de la SSD a

été aussi utilisé pour valider l'hypothèse nulle  $H\theta_0$  supposant les données observées sous un modèle d'expansion instantanée. La valeur p du test est approximée par l'équation :  $P_{value} = (\text{nombre } SSD_{simulé} \geq \text{nombre } SSD_{observé})$  après plusieurs cycles de simulations des données.

#### 4.8. Indice de "raggedness" (Harpending 1994)

Cet indice se calcule selon la formule :  $r = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2$ , les  $x$  sont les fréquences relatives observées des classes du "mismatch" et  $d$  le nombre maximal des différences observées entre les haplotypes. La signification et la validité du test est similaire à celle du SSD.

#### 4.9. Test de neutralité sélective de Tajima (1989)

Le principe de ce test est de comparer l'estimation du paramètre de mutation  $\theta = 2N\mu$  obtenue à partir du  $n$  nombre de sites polymorphes  $S$  à celle obtenue à partir du nombre moyen de différences entre 2 gènes  $\pi$ . Tajima a ainsi défini la statistique  $D$ , sous le modèle de

$$\text{sites infinis } i, \text{ comme : } D = \frac{\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_S}{\sqrt{Var(\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_S)}} \text{ avec, } \hat{\theta}_\pi = \pi \text{ et } \hat{\theta}_S = \frac{S}{\sum_{i=0}^{n-1} \left( \frac{1}{i} \right)}$$

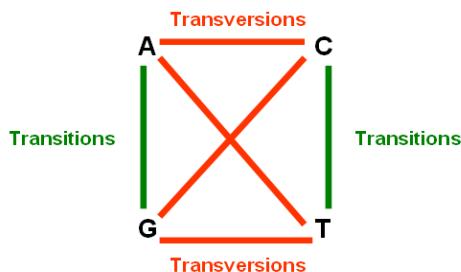
En pratique, ce test consiste à comparer la valeur de la statistique  $D$  à celles obtenues à partir d'échantillons simulés sous l'hypothèse nulle de neutralité et de stationnarité d'une population de paramètre de mutation  $\theta_S$ . Pour chaque échantillon simulé, on calcule la statistique  $D$  et on obtient empiriquement la probabilité associée à  $D$  :  $P-value$  ( $D_{simulé} \leq D_{observé}$ ). Des valeurs significatives de  $D$  (soit négatives soit positives) indiquent l'écart à la neutralité sélective. Ce test dépendra donc de la différence entre  $\theta_S$  et  $\theta_\pi$ . En effet, les valeurs positives significatives ( $P-value < 0.05$ ) du test de Tajima D suggèrent la signature d'une sélection balancée et de goulets d'étranglement et celles significativement négatives indiquent un événement d'expansion populationnelle. La déviation de l'hypothèse de neutralité sélective ou de la stationnarité populationnelle s'est basée sur 10000 simulations de coalescence.

#### **4.10. $F_{ST}$ par paire de populations, leurs valeurs p au seuil 0.05, la différenciation et la variance génétique intra et inter-populationnelle par l'AMOVA**

En définissant chaque fois le nombre de groupes à considérer, l'AMOVA a appliqué des permutations pour tester l'hypothèse nulle d'absence de structuration à l'intérieur et entre les groupes. L'indice  $F_{ST}$  a été ainsi calculé en permutant les haplotypes entre les populations et entre les groupes et l'indice  $F_{CT}$ , en permutant les populations entre les groupes. Les valeurs de  $F_{ST}$  par paire de différentes populations ont été estimées et leurs valeurs p ont été testées contre l'hypothèse nulle en considérant 1000 permutations aléatoires des haplotypes. Le programme Arlequin a été implémenté pour évaluer les paramètres : ( $s$ ), ( $\pi$ ) ( $h$ ), (SSD), l'expansion populationnelle, l'indice de "raggedness", le test de Tajima, les  $F_{ST}$  par paires et l'AMOVA. L'ensemble de ces tests a considéré le modèle de distance génétique de Kimura à 2-paramètre (1980).

#### **4.11. Modèle de distance génétique : Kimura 2 paramètres (K 2-p)**

Le modèle de Kimura (1980) prend en considération les transitions (changement d'une purine (A ou G) par une purine et d'une pyrimidine (C ou T) par une pyrimidine) ainsi que les transversions (substitution d'une purine par une pyrimidine) dans le calcul du taux de substitution.



#### **4.12. Arbre phylogénique "Neighbor Joining" (NJ)**

La construction de l'arbre NJ (Saitou & Nei 1987) se fait selon un logarithme compliqué de Nei & Kumar (2000). D'une façon plus simple, cette méthode est une variante

de la méthode ME et donc, emploie des mesures de distances dans la construction des typologies qui exhibent la plus petite valeur des sommes de toutes les branches comme étant le paramètre de l'arbre le plus correcte. L'arborescence est non-enracinée puisque la méthode ne considère pas un taux d'évolution constant (sauf exceptions). La construction de l'arbre phylogénique Neighbor Joining (NJ), l'estimation des valeurs du bootstrapping et les calculs des distances génétiques ont été effectuées en utilisant le programme Mega v.4.1 (Tamura *et al.* 2007).

#### **4.13. Taux de mutation (substitution) et taux de divergence**

À cause des taux de mutation très variables des gènes mitochondriaux aviaires, des distributions conservées des "priors" ont été appliquées dans le calcul des taux de substitution allant de 0.005 à 0.025 substitution/lignée/site/million d'années et correspondant respectivement, aux taux de divergence de 1% et de 5% par million d'années (MA).

Le taux de mutation  $\mu$  se calcule selon le taux de divergence (% par MA) considéré et suivant la formule :

$$\mu = \text{taux de divergence } (\%/\text{MA}) \times \text{longueur de la séquence (pb)} \times \text{temps de génération / 2} \times \text{MA}$$

Le taux de substitution est donc obtenu soit en (générations), soit en années, dans le dernier cas on ne multiplie pas par le temps de génération.

#### **4.14. Approche Bayésienne**

C'est une approche statistique qui se base sur le théorème de Bayes et utilise les données et la distribution *a priori* d'un paramètre ou d'une probabilité pour inférer une distribution *a posteriori* actualisée de cette dernière. Des analyses phylogénétiques Bayésiennes ont été réalisées par le logiciel Beast v.1.6.1 (Drummond & Rambaut 2007) pour calculer les temps de divergence en utilisant une horloge moléculaire Bayésienne décontractée avec des distributions log normales non corrélées des longueurs de branches.

#### **4.15. Valeurs du Critère d'Information d'Akaike (AIC pour Akaike Information Criterion)**

C'est un modèle de sélection développé par Hirotugu Akaike en 1974 qui sert à tester la validité de l'ajustement (goodness-of-fit) d'un modèle statistique donné. Dans les domaines de l'écologie, de génétique et d'évolution, ce type de modèles est de plus en plus utilisé au lieu des approches traditionnelles et classiques comme le Chi<sup>2</sup> et l'hypothèse nulle. Selon ce modèle, plusieurs hypothèses sont mises en compétition et sont simultanément confrontées à l'ensemble de la base de données. L'hypothèse qui montre la plus faible valeur de l'AIC est considérée la meilleure (Johnson & Omland 2004). D'une manière générale, l'AIC établie le lien entre l'approche statistique du maximum de vraisemblance (Maximum likelihood) et l'information de Kullback-Leibler (Burnham & Anderson 2002) et se calcule selon l'équation suivante :  $AIC = 2k - 2\ln(L)$ , avec k le nombre des paramètres (*i.e* : le nombre de variables et d'interceptes) considérés dans le modèle statistique et L l'estimateur du maximum vraisemblance du modèle évalué. Différents horloges et modèles de substitution ont été utilisés pour les différentes positions des codons en s'appuyant sur les valeurs (AIC) et en appliquant le MrModeltest 2.3 (Nylander 2004). Des distributions des priors par défaut ont été choisies et le MCMC a été lancé pour  $30.10^6$  générations tout en re-échantillonnant le lot chaque 1000 générations.

#### **4.16. Priors**

Le "prior" est la distribution des probabilités des valeurs d'un paramètre donné avant l'observation des données (Beaumont & Bruce 2004). En variant les paramètres démographiques des effectifs populationnels à travers le temps (taille constante, croissance exponentielle et croissance-expansion), des priors fondés sur l'arbre de coalescence ont été comparés. Le programme Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond 2007) a été employé pour confirmer les tailles efficaces des distributions postérieures pour chaque analyse.

#### **4.17. Intervalle ou région de plus haute densité postérieure 95% (HPD pour highest posterior density)**

L'HPD est un intervalle de confiance où la majorité des distributions doivent s'y trouver. Cette région remplit les conditions suivantes :

- a) une probabilité postérieure de  $100 \times (1-\alpha)\%$
- b) la densité minimale à n'importe quel point de cet intervalle est supérieure ou égale à n'importe quel point à l'extérieur.

Les distributions des âges moyens et la 95% (HPD) pour chaque nœud ont été analysées avec le logiciel FigTree v.1.2.1 (Rambaut 2008). La pertinence des deux priors a été évaluée par les facteurs de Bayes (Kass & Raftery 1995 et Brown & Lemmon 2007) en utilisant le logiciel Tracer et une estimation de la vraisemblance marginale des données selon la méthode de Suchard *et al.* (2001) (Kass & Raftery 1995 et Brown & Lemmon 2007).

L'interprétation et la discussion des résultats générés sont présentées dans l'article 2 soumis au Journal Ibis.

## Article 2

### **Diversification across the Palearctic desert belt throughout the Pleistocene: phylogeography, demographic history and genetic structure in the Houbara-Macqueen's bustard complex as revealed by mitochondrial DNA**

#### **Résumé**

L'influence des changements climatiques du Pléistocène sur les espèces aviaires adaptées aux zones arides du Holarctique est comparativement peu étudiée. Contrairement aux espèces des zones tempérées, les populations aviaires d'espèces adaptées aux zones arides pourraient montrer une faible différenciation génétique en raison de leurs temps de divergence qui auraient coïncidé avec les courtes périodes interglaciaires, alors que les événements d'expansion pourraient avoir lieu dans les longues périodes glaciaires durant lesquelles une végétation ressemblant à celle steppique aurait été fréquente. Dans la présente étude, cette hypothèse a été testée chez un taxon largement répandu dans la zone désertique du Paléarctique : l'outarde Houbara-Macqueen's. Ce taxon contient l'espèce d'outarde Houbara *Chlamydotis undulata* (Cu), composée des sous-espèces nord-africaines *Chlamydotis u. undulata* (Cuu) et *Chlamydotis u. fuertaventurae* (Cuf) et l'espèce d'outarde Macqueen's asiatique *Chlamydotis macqueenii* (Cm). Un total de 1042 paires de bases du gène mitochondrial cytochrome b a été investigué chez 39 individus représentant les deux espèces afin d'évaluer la structure génétique et l'histoire démographique et aussi afin de calculer les temps de divergence en utilisant une horloge moléculaire Bayésienne décontractée se basant sur différents priors de coalescence. Tandis que les deux espèces ont été génétiquement différencierées, une faible structuration intraspécifique a été signalée. Les temps d'isolation des deux espèces concordaient avec des périodes d'extrême aridité il y a environ 900 000 ans qui, vraisemblablement, auraient eu comme conséquence un épisode de vicariance est-ouest le long du désert Arabo-Sarahien. La différenciation à l'intérieur des populations appartenant au complexe Houbara-Macqueen's se déroulait après, c'est-à-dire durant le Pléistocène supérieur et comme prévu, les périodes d'expansion auraient été probablement concomitantes à des périodes glaciaires.

**Mots-clés :** Aridification, changements climatiques, cytochrome b, expansion glaciaire, outarde Houbara, outarde Macqueen's, phylogéographie, Pleistocene, expansion de population.



**Diversification across the Palearctic desert belt throughout the Pleistocene: phylogeography, demographic history and genetic structure in the Houbara-Macqueen's bustard complex as revealed by mitochondrial DNA**

Journal:	<i>Ibis</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	KORRIDA, Amal; IFCDW, ; Faculté des Sciences Agadir, Laboratoire des Substances Naturelles SCHWEIZER, Manuel; Naturhistorisches Museum der Burgergemeinde Bern,
Category:	Palearctic, evolution: genetics, other non-passerines

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5 **Diversification across the Palearctic desert belt throughout the Pleistocene:**  
6 **phylogeography, demographic history and genetic structure in the**  
7 **Houbara-Macqueen's bustard complex as revealed by mitochondrial DNA**  
8  
9  
10  
11  
12  
13

14 Amal KORRIDA<sup>1,2</sup> and Manuel SCHWEIZER<sup>3</sup>  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

<sup>1</sup> HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud International Foundation for Conservation and Development of Wildlife, Genetics Laboratory, P.O. Box 116, Inezgane 80350, Agadir, Kingdom of Morocco.

<sup>2</sup> Laboratoire des Substances Naturelles, Faculté des Sciences Agadir, B.P. 28/S. Université Ibn Zohr, Agadir 80000, Royaume du Maroc.

<sup>3</sup> Naturhistorisches Museum der Burgergemeinde Bern, Bernastrasse 15, CH-3005, Bern, Switzerland.

## ABSTRACT

Studies on the influence of Pleistocene climatic alterations and associated habitat changes on arid-adapted bird species living in the Holarctic region are comparatively rare. In contrast to temperate species, the populations of arid-adapted avian species might be characterized by low genetic differentiation because periods of population isolation were associated with the short interglacial periods, while population expansion events might have occurred during the longer glacial periods when steppe-like vegetation might have been prevalent. In this study we tested this hypothesis in a widespread arid-adapted taxon of the Palearctic desert belt, the Houbara-Macqueen's bustard complex. It contains the Houbara species *Chlamydotis undulata* (Cu), comprising the North African subspecies *Chlamydotis u. undulata* (Cuu) and *Chlamydotis u. fuertaventurae* (Cuf) from the Canary Islands, and the Asian Macqueen's species *Chlamydotis macqueenii* (Cm). A total of 1042 bp of the cytochrome b gene were investigated in 39 individuals representative of the two species to assess genetic structure, demographic history and to compute divergence time estimates using a Bayesian relaxed molecular clock approach based on different coalescent priors. While the two species were genetically clearly separated, we found little intraspecific genetic differentiation. The divergence time of the two species falls within a period of extreme aridity at around 0.9 million years ago which most likely resulted in an east-west vicariance along the Arabo-Saharan deserts. Differentiation within Houbara and Macqueen's bustard occurred later during the upper Pleistocene and as predicted, periods of range spread and expansion were most probably associated with glacial periods.

**Keywords:** aridification, climate changes, cytochrome b, glacial expansion, Houbara bustard, Macqueen's bustard, phylogeography, Pleistocene, population expansion.

## INTRODUCTION

Studies on species' phylogeography are believed to explain evolutionary processes that shape species' genetic diversity and speciation processes over time (Avise, 2000). The climate alterations over the last millions of years had a strong influence on distribution and diversification patterns of extant biota. While many studies dealing with the influence of historical processes on the assembly of biota have focused on temperate and boreal regions of the northern hemisphere (e.g. Lovette, 2005, Weir and Schluter, 2004, Hewitt, 2004, Taberlet et al., 1998, Klicka and Zink, 1997), the evolutionary history of arid zone biota is still comparatively poorly studied (cf. Byrne et al., 2008). Arid zone biomes are widespread on earth and the desert regions in the northern hemisphere of the old world spanning from much of North Africa over the Arabian Peninsula into Central and South Asia can be divided into the Saharo-Sindian (Sahara to the Thar desert of Pakistan and India) and Caspio-Central Asian deserts (Cowan, 1996). Aridification in these regions began during the Miocene with an increased stepwise aridification since the Pliocene with three shifts towards more arid conditions near 2.8, 1.7 and 1.0 million years ago (Mya) at least in Africa (Wu et al., Guo et al., 2002, Flower and Kennett, 1994, Douady et al., 2003, DeMenocal, 2004, Guillaumet et al., 2008). The beginning of the aridification of the Sahara was revealed as a vicariance agent in elephant shrews (*Macroscelidae*) (Douady et al., 2003). Moreover, climate variability from the Pliocene onwards with stepwise increased aridity mediated faunal changes in Africa (DeMenocal, 2004) and led to vicariance across the Saharo-Sindian deserts in *Galerida* larks (Guillaumet et al., 2008). However, the Sahara was found not to be a permanent barrier through geological times (Guillaumet et al., 2008) and the role of the stepwise aridification of these deserts for the diversification of animal species is still poorly understood.

The last period of stepwise aridification was followed around 0.9 Mya by an intensification of climatic-cycles leading to an accentuation in the sequence of glacial and interglacial periods (Guillaumet et al., 2008, DeMenocal, 2004, Hewitt, 2000). During the glacial cycles of this late Pleistocene period, populations of steppe- and arid-adapted forms in the Holarctic might have been conversely affected than those of temperate taxa. While the populations of temperate species might have been isolated and restricted to refugia during the longer glacial periods, steppe- or arid-adapted forms might have reached their maximum range extent during glacial periods when steppe-like communities expanded (Garcia et al., 2011a, Garcia et al., 2011b). Range restrictions and isolation might have thus only happened during the short interglacial times. As a consequence, a low genetic structuring should be expected among

1  
2 populations of widespread steppe- or arid-adapted bird species due to shorter time spent in  
3 isolation (Garcia et al., 2011a, Garcia et al., 2011b).  
4  
5

6 A bird species typical of the Saharo-Sindian and Caspio-Central Asian deserts is the Houbara  
7 bustard (*Chlamydotis undulata*, s. l., Houbara-Macqueen's bustard complex hereafter). These  
8 bustards live almost exclusively in arid environments and belong to the *Otididae* family  
9 (Cramp and Simmons, 1980, Sibley and Ahlquist, 1990). *C. undulata* has for a long time been  
10 regarded as a polytypic species divided into three subspecies according to geographic  
11 distribution and morphology (Cramp and Simmons, 1980). The nominate subspecies, *C. u.*  
12 *undulata* (Jacquin 1784) (Cuu hereafter), is found across North Africa from Morocco and  
13 Northern Mauritania to western Egypt, while the populations found in the Canary Islands  
14 have been separated as *C. u. fuertaventurae* (Rothschild et al. 1894) (Cuf hereafter). *C. u.*  
15 *macqueenii* (Gray 1832) (Cm hereafter) occurs further east from eastern Egypt, Arabia,  
16 Pakistan to Central Asia. Houbara bustard is considered as threatened throughout its range  
17 and classified as "vulnerable" (IUCN 2012). The different populations have suffered  
18 substantial declines in recent times mainly from habitat alterations, overgrazing and hunting  
19 pressures (Malik, 1985, Lavee, 1988).  
20  
21

22 Several recent molecular genetic studies of the Houbara-Macqueen's bustard complex  
23 have demonstrated that Cuu/Cuf and Cm form reciprocally monophyletic population groups  
24 with a unique and divergent evolutionary history (Broders et al., 2003, Idaghdour et al., 2004,  
25 Pitra et al., 2004, Lesobre et al.). Based on these results and studies on courtship behaviour  
26 and plumage features (Gaucher et al., 1996), as well as, vocalization (Alekseev, 1985,  
27 Gaucher et al., 1996), the taxonomic subcommittee of the British ornithologist union has  
28 recommended that the Houbara bustard should be treated as two separate species according to  
29 the guidelines of Helbig et al. (2002) with the monotypic Macqueen's bustard *C. macqueenii*  
30 and the polytypic Houbara bustard *C. undulata* comprising the subspecies *C. u. undulata* and  
31 *C. u. fuertaventurae* (Knox et al., 2002, Sangster et al., 2004, Collinson, 2004).  
32  
33

34 The biogeographic history and temporal diversification patterns of the Houbara-  
35 Macqueen's bustard complex in the context of the climate alterations during the last million  
36 of years has been controversially discussed. Idaghdour et al. (2004) used demographic  
37 approaches and an approximation of the mutation rate in the mitochondrial control region to  
38 estimated divergence times of the different Houbara and Macqueen's populations. They  
39 inferred that Cm split from Cuu/Cuf around 430 000 years ago and assessed a coalescent time  
40 for Cuf and Cuu at around 25 000 years ago. In contrast, Pitra et al. (2004) found a much  
41 older divergence time estimate between Cuu/Cuf and Cm at around one Mya using a constant  
42  
43

cytochrome b mutation rate as estimated from fossil information assuming a split between *Otis* and *Chlamydotis* at about four Mya. Moreover, they estimated the age of the most recent common ancestor of Cm between 32 800 and 36 100 years ago. Notwithstanding, they were suspicious about the molecular clock they implemented and its associated biases. They thus recommended the use of further powerful dating approaches to approve their findings.

The goal of the present work was thus to provide a temporal framework for the diversification of the Houbara-Macqueen's bustard complex using a Bayesian relaxed molecular clock approach based on cytochrome b sequences stemming from individuals sampled over the whole complex's distribution area. We moreover aimed at quantifying the genetic variation between and within the different populations of the entire complex and at identifying the historical and demographic factors which might have shaped its phylogeographic patterns. Based on the conflicting results of previous studies (Idaghdour et al., 2004, Pitra et al., 2004), we wanted to test if the phylogeographic structure of the Houbara-Macqueen's bustard complex was shaped by periods of increased aridification of the Sahara and adjacent desert regions from the Pliocene until the middle Pleistocene, or if it was influenced by glacial cycles in the late Pleistocene. Moreover, we wanted to infer if periods of population expansions indeed fall into glacial periods as was predicted for steppe- and arid adapted species.

## METHODS

### *Source of samples, DNA extraction and PCR amplification*

A total of 43 bustard individuals were subject of the present study. Twenty four samples were analyzed newly, comprising six Cuu from eastern and southern Morocco, six Cuf from Fuerteventura (Canary Islands), eight Cm from Baluchistan, Negev desert and Afghanistan, in addition to one *Eupodotis humilis*, one *Eupodotis senegalensis*, one *Ardeotis kori* and one *Adeotis arabs* as outgroup taxa from Africa. Another sample of 19 cytochrome b sequences was extracted from Genbank for comparison (Table 1 and Fig. 1). Blood and tissue samples were stored either in acid citric dextrose (ACD), ethanol 80%, phosphate-buffered saline (PBS) or in Queen's lysis buffer (QLB) buffer. DNA was isolated using phenol-chloroform procedure (Sambrook et al., 1989) and DNA concentration was quantified using Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer. Genomic DNA samples were used as templates with appropriate negative controls. A 1042 base pairs fragment of the cytochrome b gene was

1  
2  
3 amplified using 3 sets of overlapping M13 forward and reverse primers as in Broderick et al.  
4 (2003). CB-M13F (5'-TGT AAAACGACGGCCAGTCCAACATCTCTGCTTGAT-3') with  
5 HCB3-M13F (5'-  
6 AGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGGTGGTGAATGACTGTTGCACCTC-3'), LCB2a (5'-  
7 GTAGGATATGTTCTACCATGAGG-3') with HCB5-M13F (5'-  
8 AGGGTTTCCCAGTAACGACGTTGGTTGCTGGGTGAAGTT-3') and LCB4-  
9 M13R (5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGGCCAACCTACTAGGGGACCCAGA-3')  
10 with HCB6-M13F (5'-  
11 AGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGGTTACAAGACCAATGTTT-3'). PCR  
12 reactions were run in a Biometra T1 cycler in a total of 20μl with a mineral oil overlay. The  
13 reaction mix master contained 200 μM of dNTPs, 2.5 mM magnesium chloride, 8 pM of each  
14 primer, 10 mM Tris-HCl (ph 8.8 at ambient temperature), 50 mM KCl and 0.08% Nonidet  
15 P40 to which was added 0.3 U of Taq DNA polymerase (MBI, Fermentas). The PCR profile  
16 used in all reactions started with an initial denaturation at 90°C for 1 min followed by 30  
17 amplification cycles of 30s at 56°C, 45s at 72°C, 1s at 95°C and 10s at 90°C and completed  
18 with a terminal cycle of 2 min at 72°C. PCR products were loaded on a 1% low melting point  
19 agarose gel (Kodak International Biotechnologies. INC) containing 1μg of ethidium bromide  
20 and visualized under ultraviolet light. Band size was assessed using pUC Mix Marker 8 (MBI,  
21 Fermentas). The fragments were then excised from agarose gel by freeze-squeeze method  
22 (Sambrook et al., 1989). A block of agarose containing the band of interest was removed from  
23 the gel and placed in 0.5 ml tube then incubated at -20°C for 30 min and centrifuged at 15000  
24 rpm for 20 min.

25 Recovered DNA was directly used as a template for sequencing. Samples were  
26 bidirectionally sequenced using SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit-LC from  
27 Epicentre Technologies. The sequencing technology was based on using IRD-800 infra-red  
28 dye labeled M13 reverse and forward universal primers which anneal to complementary tails  
29 attached to primers of the original PCR (Schuelke, 2000). Sequences were electrophoresed  
30 and analyzed on a LiCor 4000 automated DNA sequencing device through a 6.5% LiCor KB  
31 Plus Gel Matrix.

### 53 *Mitochondrial DNA analysis*

54 The resulting sequences were aligned using T-Coffee software (Notredame et al., 2000) and  
55 checked visually. To draw the genealogical relationships among haplotypes and construct the  
56 Minimum spanning network (MSN), we used Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier and Lischer) and  
57

TCS (Clement et al., 2000). Arlequin was also utilized to assess the number of segregating sites (s), nucleotide ( $\pi$ ) and haplotype ( $h$ ) diversities, pairwise  $F_{ST}$  and their probability values at the 5% level, the population subdivision and genetic variance partitioning among and within populations via the hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA). By defining each time the number of groups considered in the structure, the AMOVA used permutation tests to evaluate null hypotheses of no population structure within groups and between groups. The  $F_{ST}$  index was also tested by permuting haplotypes among populations among groups and the  $F_{CT}$  by permuting populations among groups. Population pairwise  $F_{ST}$  values were obtained for all population pairs and their significance values were tested against the assumption of no difference between populations by considering 1000 random permutations of haplotypes. For both AMOVA and  $F_{ST}$  calculations, the Kimura 2-parameters (K2p) (1980) distance model was considered.

Mismatch difference plots were constructed using DnaSP v.5 (Librado and Rozas, 2009). Neighbor Joining (NJ) tree construction and genetic distance calculations were done using Mega v.4.1 (Tamura et al., 2007). K2p distance that takes into account variation in the transversion/transition ratio was used.

The demographic history of Houbara-Macqueen's bustard populations was investigated by several parameters and approaches. The distribution of observed number of differences between pairs of mtDNA sequences or mismatch distribution (Rogers and Harpending, 1992) was compared with the expected pairwise differences under the sudden population expansion assumption. The patterns of mismatch distribution indicate the type of population historical changes such that populations at demographic equilibrium exhibit multimodal ragged distributions and those that have undergone a recent and sudden expansion show unimodal distributions. The validity of those tests was checked by calculating the sum of squared deviations (SSD) (Schneider and Excoffier, 1999) in addition to the raggedness index of the observed distributions (Harpending, 1994). Population expansion was further tested using the generalized non-linear least-square method of Schneider & Excoffier (1999) to assess the mutational parameter ( $\tau$ ), population size before expansion ( $\theta_0$ ) and after expansion ( $\theta_1$ ) under the infinite site model of mutations without recombination. The relationship between the mean number of nucleotides differences and the number of segregating sites were tested under the theory of mutation neutrality proposed by Tajima (1989), where significant positive Tajima D values ( $P$ -value  $< 0.05$ ) refer to population balancing selection and bottlenecks,

1  
2 whereas significant negative values indicate population expansion. The departure from  
3 neutrality or stationary was based on 10000 coalescent simulations.  
4  
5

6 Bayesian phylogenetic analyses were carried out using Beast v.1.6.1 (Drummond and  
7 Rambaut, 2007) to estimate divergence times using a relaxed molecular clock approach with  
8 uncorrelated lognormal distribution of branch lengths. Due to the fact there is a wide variation  
9 of cytochrome b mutation rates in birds (e.g. Nabholz et al., 2009), we used a rather  
10 conservative prior distribution for substitution rates similar to Johnson & Weckstein (2011). A  
11 uniform distribution between 0.005 and 0.025 substitutions/site/branch/millions of years  
12 (s/s/b/My) was chosen for the mean rate (parameter ucld.mean) with the standard deviation  
13 for this (parameter ucld.stdev) uniformly bounded between 0.0 and 10.0 s/s/b/Myr. We used  
14 different clock and substitution models for the different codon positions with the latter  
15 selected based on Akaike information criterion (AIC) values using MrModeltest 2.3  
16 (Nylander, 2004). We compared different coalescent-based tree priors with varying  
17 parametric demographic functions of population size through time (constant size, exponential  
18 growth and expansion growth). Default prior distributions were chosen for all other  
19 parameters and the MCMC was run for 30 million generations with sampling every 1000  
20 generations. Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond, 2007) was used to confirm appropriate  
21 burn-in and the adequate effective sample sizes of the posterior distribution for each run. The  
22 resulting mean ages and 95% highest posterior density (HPD) distributions of each estimated  
23 node were analyzed with FigTree v.1.2.1 (Rambaut, 2008). The relevance of the two different  
24 prior settings was evaluated with the Bayes factor (BF) (Kass and Raftery, 1995, Brown and  
25 Lemmon, 2007) using Tracer with the marginal likelihood of the data estimated based on the  
26 approach proposed by Suchard *et al.* (2001) (smoothed estimate method, 1000 bootstrap  
27 replicates) (Kass and Raftery, 1995, Brown and Lemmon, 2007). A more complicated model  
28 was favored over a simpler model if  $2\ln\text{BF}$  was greater than 10 (Brown and Lemmon, 2007).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

## 48 RESULTS

49  
50

### 51 *Genetic variation in cytochrome B gene*

52 The alignment of cytochrome b sequences from 39 individual birds across the range of the  
53 Houbara-Macqueen's complex generated 11 haplotypes with 28 segregating sites (Table 3).  
54 The newly 24 obtained sequences were deposited in GenBank under the accession numbers  
55 (xxx). The final alignment was 1042 base pairs in length, it contained no stop codons or indels  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 and all aligned sequences could be successfully translated into amino acids proving that they  
4 were functional. A total of 7 out of the 11 haplotypes were found within the Asian species, 3  
5 within the populations of Morocco and Algeria and 2 within the Canary Islands population.  
6 Cuu and Cuf samples shared the same and most common haplotype (Hap1) (Fig. 3 and Table  
7 3).  
8  
9

10 Nucleotide diversity ( $\pi$ ) ranged from 0.0192% to 0.186% and was highest in Cm, lowest in  
11 Moroccan and Algerian Cuu and intermediate in Cuf subspecies (Table 3). Meanwhile,  
12 haplotype diversity (h) ranged from 0.250 to 0.766 and was lowest in Cuf, intermediate in  
13 Cuu and again highest in Cm (Table 3).  
14  
15  
16  
17

18  
19 *Population genetic structure*  
20

21 Population pairwise  $F_{ST}$  were all high and significant except between Cuu and Cuf ( $F_{ST} =$   
22 0.03, *P-value* = 0.684) (Table 2). To analyze hierarchical molecular variance using AMOVA,  
23 we first gathered all populations in one group to get a first idea about the genetic structuring  
24 and differentiation among and within populations (Table 4). The results of this single-level  
25 AMOVA revealed significant structuring among all sampled populations ( $F_{ST} = 0.962$ , *P-*  
26 *value* < 0.000) with the majority of molecular variance found among groups (96.22%  
27 compared to only 3.78% within populations). We then tested the most likely population  
28 groupings and configurations according to the 3 geographic zones: North Africa, Sinai-Negev  
29 and remaining Asia. The grouping that shows the highest value of among group variation  
30 ( $F_{CT}$ ) and is statistically significant indicates the most parsimonious geographic subdivision  
31 (Contreras-Díaz *et al.* 2003). The grouping of [Cuu/Cuf]+[Cm]+[CmSinai-Negev] displayed  
32 the highest value of among group variation with a  $F_{CT}$  value of 0.9698 although it was not  
33 significant (*P-value* = 0.162). The  $F_{CT}$  values were not significant either for the other possible  
34 population groupings. The computation of the mean K2p genetic distances among lineages  
35 considered a uniform rate among cytochrome b sites and was estimated to 1.8% between Cuu  
36 and Cm, 2.1% between Cuu and Sinai-Negev Cm, 0% between Cuu and Cuf and 0.3%  
37 between Cm and Negev-Sinai Cm.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51  
52 *Phylogenetic analysis and molecular dating*  
53

54 A NJ dendrogram revealed a division into two major clusters, one North African comprising  
55 Cuu and Cuf and one Asian containing all Cm individuals (Fig. 4). Within Cm, a cluster  
56 consisting of the birds from the Sinai-Negev area was robustly supported. The MSN (Fig. 3)  
57  
58  
59  
60

provided further support for the two clades which were separated by 17 mutational steps. The most common haplotypes, represented by the biggest circles, corresponded to 78% of the variation in the North Africa (Hap 1, Table 3) and 42% (Hap 2, Table 3) in the Asian clade respectively.

The comparison of the two independent runs of Beast for each of the three different coalescent-based tree priors applied revealed high convergence among the different parameters. The two runs were then combined with 10% burn-in for each. Effective samples sizes were > 1000 for the posterior distribution and > 200 for all other parameters and the maximum clade credibility tree was then estimated from 54000 trees. The results between the three different coalescent-based tree priors applied were similar and did not differ significantly in their likelihood as evaluated with the computation of the Bayes factors (BF). Mean substitution rates for the three codon positions were also found to be similar among the different runs with the highest rate revealed for the third codon position and smaller rates for the first and second codon position (Table 5a). The mean values indicated that the initial split between Cuu/Cuf and Cm occurred between 0.77 and 0.94 Mya (see Table 5b for 95% highest posterior density (HPD) intervals). Diversification within Cm started between 0.26 and 0.38 Mya, while the first divergence event within Cuu/Cuf occurred later between 0.19 and 0.31 Mya. Hence, the intervals were partially overlapping. The first divergence event within Cm always separated the Sinai/Negev birds from the remaining individuals.

### *Population demographic history*

For the Cm from the Sinai-Negev desert, the computations of the pairwise number of differences, could not be performed due to the existence of only one haplotype in this sample (Table 6). For this reason, the Negev/Sinai sample was discarded from the other tests in relation with the mismatch differences analysis. The mismatch distributions of the three populations of the Houbara-Macqueen's bustard complex showed unimodal curves and did not fit to any of the simulated distribution for stationary or population in demographic equilibrium (Fig. 2). Furthermore, when Cuu and Cuf were joined in one group according to the AMOVA analyses, Cu (18) haplotype mismatch plot showed a similar unimodal pattern as in Figure 2 a) and b).

The assumption of population expansion could not be rejected by either SSD or raggedness index tests (Table 6). The SSD showed small values that were not significant at the 5% level. The raggedness index was estimated to 0.371 in Cu (18) and to 0.126 in Cm (16) and their

1  
2 probability values were also not significant, indicating that the null assumption assuming  
3 population expansion could not be rejected.  
4

5 Neutrality test revealed negative signs and was significant (*P-value* < 0.05) for Cu (18) and on  
6 the limit of significance in Cm (16) rejecting the assumption of neutrality and suggesting  
7 recent population expansions (Table 6). The mutational parameter  $\tau$  was estimated to 3.00 for  
8 Cu (18) and 1.027 for Cm (16) respectively (Table 6). To compute the time of population  
9 expansion, we used the extreme values of 0.005 and 0.025 substitutions/lineage/site/My (1%  
10 and 5% divergence) from the range of substitution times used for the coalescent analyses.  
11

12 Using Rogers' (1995) equation  $t = \frac{\tau}{2\mu s}$ , where  $\mu$  is the mutation rate and  $s$  the sequence  
13 length in base pairs, the time of population expansion ( $t$ ) was calculated to have happened  
14 between 288 and 56 kya for Cu (18) and between 99 and 20 kya for Cm (16).  
15

## DISCUSSION

### *Genetic variation and demographic history*

The range of the Houbara-Macqueen's bustard complex extends almost continuously over the  
Saharo-Sindian and Caspio-Central Asian desert region. Our comparisons revealed that the  
North African Houbara bustards (Cu) and the Asian Macqueen's bustards (Cm) are  
significantly differentiated and reciprocally monophyletic in their mtDNA sequences. We thus  
confirmed the results of other studies (Pitra et al., 2004, Idaghdour et al., 2004), but using a  
broader sampling over basically the whole distribution area of the Houbara-Macqueen's  
bustard complex.

We found only weak phylogenetic structure in the mtDNA of Cm in congruence with Pitra et  
al. (2004) and only the birds from the Negev-Sinai seemed to be separated from the remaining  
Cm. Similarly, the mitochondrial DNA data of the four individuals from the Sinai analyzed by  
Pitra et al. (2004) consisted of one widely distributed haplotype and three private haplotypes.

When analyzing 17 microsatellite markers, Riou et al. (2012) found barely any population  
structure in Central Asian Macqueen's bustards. However, the sampled individuals from  
resident populations in Egypt and south-eastern Arabia differed significantly from each other  
and from the central Asian migratory populations. Both, our study and Pitra's et al. (2004)  
did not sample individuals from the population of resident birds in south-eastern Arabia.

Similarly, no phylogenetic structure was revealed in Cu, and Cuu and Cuf turned out not to be reciprocally monophyletic. A congruent picture was found for mtDNA control region sequences (Lesobre et al., 2010, Idaghdour et al., 2004). Even when analyzing microsatellite markers, Lesobre (2010) found only little genetic differentiation between different populations of Cuu across its whole range in North Africa. In our sample, one individual of the Canary Islands population (Cuf) had a private haplotype, while the seven other individuals of Cuf shared with eight North African birds the most common haplotype of Cu. Although Cuf and Cuu currently seem to be isolated from each other, there were probably periods of extended gene flow between Houbara bustards from the African mainland and the Canary Islands in the past (Idaghdour et al., 2004). In the latter study, a reduced genetic diversity was revealed in Cuf compared to Cuu in mtDNA control region data and interpreted as consequence of genetic drift in the contemporary small population of Cuf. However, we only found a reduced haplotype diversity of Cuf compared to Cuu in our cytochrome b data.

The unimodal mismatch distributions in both, Houbara and Macqueen's bustards, and the significant negative values generated by Tajima's D test were consistent with a scenario of an ancient population expansion. In addition, the minimum spanning network was characterized by star-like patterns for both the African and Asian cluster with haplotypes radiating out from central ancestral haplotypes, which further suggests signatures of population expansions. The ancestral haplotypes are generally distributed around the origin of the expansion while the derived haplotypes are encountered at the leading edge of the range expansion (Rowe et al., 2004, Guillaumet et al., 2008). For Cm, a newly derived haplotype with three-mutational step distant from the ancestral haplotype was found in the Negev-Sinai sample indicating that most probably this population is occurring at the leading edge of a range expansion.

Different assumptions about substitution rates have been used recently to estimate expansion times in the Houbara-Macqueen's bustard complex (Pitra et al., 2004, Broders et al., 2003, Idaghdour et al., 2004) which makes any comparison very tough. When computing expansion times with the extreme values of the range of substitution times used for the coalescent analyses, the resulting intervals for range expansions in both, Houbara and Macqueen's bustards, broadly overlap with the last glacial period (Petit et al., 1999, Tzedakis et al., 2003, Kohler et al., 2010). These results are discussed in the next section.

1  
2     *Divergence times and phylogenetic history*

3  
4 Given the inherent difficulties in estimating divergence times from molecular sequence data  
5 due to lineage- and time-dependent variation in mutation rates (e.g. Nabholz et al., 2009, Ho  
6 et al.), we implemented a conservative approach using rather wide uniform priors for the  
7 mutation rates based on different demographic models. As consequently expected, our  
8 divergence time estimates showed rather large confidence intervals. Nonetheless, we compare  
9 our results based on mean estimates with those of other studies and discuss them in the  
10 context of past climate alterations.

11 Our mean estimates for the separation between Cu and Cm ranged between 0.77 and 0.94  
12 Mya and were thus similar to the results of Pitra et al. (2004). In contrast, Idaghdour et al.  
13 (2004) revealed this split to have occurred at a much younger age around 430,000 years ago.  
14 However, their estimates were based on a comparison of divergence rates between the control  
15 region and cytochrome b assuming a rather low range of variation in cytochrome b divergence  
16 rates and no among lineage variation. While Idaghdour et al. (2004) assumed that the control  
17 region has diverged approximately 2.7 times faster than cytochrome b, other studies on birds  
18 and snakes have shown that the substitution rate of the control region can be similar or even  
19 lower than that of cytochrome b (e.g. Ursenbacher et al., 2006, Randi et al., 2001, Questiau et  
20 al., 1998, Crochet and Desmarais, 2000).

21 Different periods of increased aridity associated with an expansion of the Sahara desert might  
22 have promoted vicariance events in different taxa (Guillaumet et al., 2008, Nittinger et al.,  
23 2007, Franck et al., 2001). Our timescale for the separation of Cu and Cm indeed corresponds  
24 with an interval of increased aridity in Africa lasting between 1.2-0.8 Mya (DeMenocal,  
25 2004). As pointed out by Guillaumet et al. (2008), deserts in the Arabian Peninsula and  
26 further east might have been similarly affected during this time period. This could have led to  
27 east-west vicariance along the Arabo-Saharan deserts of widespread ancestral species as was  
28 hypothesized for the arid-adapted *Galerida* larks (Guillaumet et al., 2008). Such a scenario  
29 might also be plausible for Houbara and Macqueen's bustards and hyper-arid areas in eastern  
30 Egypt or the Sinai-Negev area might have then promoted vicariance between Cu and Cm.  
31 Similarly, hyper-arid regions such as the Rub' Al Khali in the Arabian Peninsula seem to be  
32 barriers to gene flow in Houbara-Macqueen's bustards today (Riou et al., 2012). Cu and Cm  
33 occur west and east of the Red Sea respectively. This water area is believed to have acted as a  
34 barrier to biotic dispersal for African and Arabian fauna from the Miocene-Pliocene boundary  
35 (Voelker and Light, 2011). This predates the split between Cu and Cm, does not support  
36 therefore the idea considering the Red Sea as a driver of vicariance in the Houbara-  
37 Macqueen's bustard. The separation between Cu and Cm is therefore likely to be older than the  
38 Miocene-Pliocene boundary.

Macqueen's bustards complex, and intermittent land-bridges between Africa and Arabia during the glacial maxima in the last 500,000 years (Girdler, 1991, Ross and Schlee, 1973) did not lead to gene exchange among Cu and Cm.

The apparent synchronous onset of diversification in Central Asian (except Sinai-Negev birds) and North African Houbara bustard populations implies that it had a similar ultimate cause. In both species, the diversification started in the late Pleistocene, a time period characterized by major glacial periods. Although the mean values from the different coalescent priors spanned a rather large interval of more than 0.1 million years, they all lied in glacial periods. Accordingly, population expansion in both, Cu and Cm (excluding Sinai-Negev bird), occurred most likely during the last glacial period. As predicted for steppe- and arid-adapted species (Garcia et al., 2011a, Garcia et al., 2011b), glacial periods in the upper Pleistocene might have therefore been associated with range spread and expansion in the Houbara-Macqueen's bustard complex. Range restrictions and isolation might have thus only happened during the short interglacial times and might explain the lack of strong phylogeographic structuring and population differentiation observed in the mitochondrial data of both Cm (except birds from Negev-Sinai, see above) and Cu as was also revealed by other studies (Pitra et al., 2004, Lesobre et al., 2010). Riou et al. (2012) interpreted the lack of strong genetic structure in their microsatellite data in migratory Central Asian populations of Cm, despite the fact that radio tracking suggested a migratory divide and philopatry as evidence for recent common ancestry and recent population expansion. However, it has to be taken into account here, that the fast evolving microsatellite markers cover a different time frame than the slower evolving cytochrome b sequences.

As the populations of Cm from the Sinai-Negev area might be on the leading edge of a population expansion, these areas might have been most probably colonized from further east. In contrast, Riou et al. (2012) suggested an initial expansion of Cm from the Middle East into Arabia followed by Central Asia. However, this scenario was formulated on the assumption that Egyptian populations of Cm were ancestrals and the branching pattern of a neighbor joining tree which was arbitrarily rooted with that population.

## CONCLUSION

Environment conditions of the Pleistocene epoch had certainly shaped the demographic history and genetic constitution of the different populations of the Houbara-Macqueen's

bustard complex. The initial diversification between African and Asian population leading to the Houbara and the Macqueen's bustards seemed to have been caused by an east-west vicariance along Arabo-Saharan deserts during a period of increased aridification in the middle Pleistocene. Differentiation with Houbara and Macqueen's bustards occurred later during the upper Pleistocene. In contrast to temperate species, glacial periods in the upper Pleistocene seemed to have been associated with population expansions as has been postulated for other steppe and arid-adapted birds (Garcia et al., 2011a, Garcia et al., 2011b). To gain a better understand on the evolutionary history of arid zone biota, further studies have to elucidate if other species or species complexes of open areas sharing a comparable distribution range were similarly affected.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author AK dedicates the present study to the late Crown Prince, HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud, sponsor and patron of the International Foundation for Conservation and Development of Wildlife for his dedications, leadership and generosity to the environment and protection of Moroccan wildlife. The authors would like to thank all the persons with whom the achievement of this study was possible especially D. Broderick, F. Chbel, M. Collinson, G. Heckel, S.T. Hertwig, Y. Idaghdour, S. Jadallah, P. McCormick, L. Rüber, and O. Seehausen. Moreover, we acknowledge the help of A. Delgado from the Biodiversity Service in the Canary Islands Government, P. Calabuig Mirinda from La Oliva breeding station in the Canary Islands, the National Wildlife Research Center in Taif, Saudi Arabia and Sheikh Butti Maktoum's Wildlife Center in Dubai, United Arab Emirates for the Macqueen's, the Canarian and the outgroup samples.

## REFERENCES

- Alekseev, A. F. 1985. The Houbara bustard in the northwest Kyzylkum. *Bustard Studies* **3**: 87-92.
- Avise, J. C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*, Cambridge, MA: Harvard Univ. Press.
- Broderick, D., Idaghdour, Y., Korrida, A. & Hellmich, J. 2003. Gene flow in great bustard populations across the Strait of Gibraltar as elucidated from excremental PCR and mtDNA sequencing. *Conservation Genetics* **4**: 793-800.

- 1  
2  
3 Broders, O., Osborne, T. & Wink, M. 2003. A mtDNA phylogeny of bustards (family  
4 Otididae) based on nucleotide sequences of the cytochrome b-gene. *Journal of  
5 Ornithology* **144**: 176-185.
- 6 Brown, J. M. & Lemmon, A. R. 2007. The importance of data partitioning and the utility of  
7 Bayes factors in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* **56**: 643-655.
- 8 Byrne, M., Yeates, D. K., Joseph, L., Kearney, M., Bowler, J., Williams, M. A. J., Cooper, S.,  
9 Donnellan, S. C., Keogh, J. S., Leys, R., Melville, J., Murphy, D. J., Porch, N. &  
10 Wyrwoll, K. H. 2008. Birth of a biome: insights into the assembly and maintenance of  
11 the Australian arid zone biota. *Molecular Ecology* **17**: 4398-4417.
- 12 Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene  
13 genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1659.
- 14 Collinson, M. 2004. Are there really two species of Houbara? A response from the TSC.  
15 *British Birds* **97**.
- 16 Cowan, P. J. 1996. Desert birds of the Caspio-Central-Asian desert. *Global Ecology and  
17 Biogeography* **5**: 18-22.
- 18 Cramp, S. & Simmons, K. E. L. (1980) *The birds of the Western Palearctic. Vol 2. Hawks to  
19 Bustards*, Oxford: Oxford University Press.
- 20 Crochet, P. A. & Desmarais, E. 2000. Slow rate of evolution in the mitochondrial control  
21 region of gulls (Aves: Laridae). *Molecular Biology and Evolution* **17**: 1797-1806.
- 22 DeMenocal, P. B. 2004. African climate change and faunal evolution during the Pliocene-  
23 Pleistocene. *Earth and Planetary Science Letters* **220**: 3-24.
- 24 Douady, C. J., Catzeffis, F., Raman, J., Springer, M. S. & Stanhope, M. J. 2003. The Sahara  
25 as a vicariant agent, and the role of Miocene climatic events, in the diversification of  
26 the mammalian order Macroscelidea (elephant shrews). *Proceedings of the National  
27 Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8325-8330.
- 28 Drummond, A. J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling  
29 trees. *Bmc Evolutionary Biology* **7**.
- 30 Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform  
31 population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology  
32 Resources* **10**: 564-567.
- 33 Flower, B. P. & Kennett, J. P. 1994. The middle Miocene climatic transition - east Antarctic  
34 ice-sheet development, deep-ocean circulation and global carbon cycling.  
35 *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **108**: 537-555.
- 36 Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. & Cornuet,  
37 J. M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and  
38 mitochondrial data. *Heredity* **86**: 420-430.
- 39 Garcia, J. T., Alda, F., Terraube, J., Mougeot, F., Sternalski, A., Bretagnolle, V. & Arroyo, B.  
40 2011a. Demographic history, genetic structure and gene flow in a steppe-associated  
41 raptor species. *Bmc Evolutionary Biology* **11**: 11.
- 42 Garcia, J. T., Manosa, S., Morales, M. B., Ponjoan, A., de la Morena, E. L. G., Bota, G.,  
43 Bretagnolle, V. & Davila, J. A. 2011b. Genetic consequences of interglacial isolation  
44 in a steppe bird. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **61**: 671-676.
- 45 Gaucher, P., Paillet, P., Chappuis, C., SaintJalme, M., Lotfikhah, F. & Wink, M. 1996.  
46 Taxonomy of the Houbara bustard *Chlamydotis undulata* subspecies considered on the  
47 basis of sexual display and genetic divergence. *Ibis* **138**: 273-282.
- 48 Girdler, R. W. 1991. The Afro-Arabian rift system - an overview. *Tectonophysics* **197**: 139-  
49 153.
- 50 Guillaumet, A., Crochet, P. A. & Pons, J. M. 2008. Climate-driven diversification in two  
51 widespread Galerida larks. *Bmc Evolutionary Biology* **8**: 22.
- 52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- Guo, Z. T., Ruddiman, W. F., Hao, Q. Z., Wu, H. B., Qiao, Y. S., Zhu, R. X., Peng, S. Z., Wei, J. J., Yuan, B. Y. & Liu, T. S. 2002. Onset of Asian desertification by 22 Myr ago inferred from loess deposits in China. *Nature* **416**: 159-163.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population-growth in a low-resolution mitochondrial-DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**: 591-600.
- Helbig, A. J., Knox, A. G., Parkin, D. T., Sangster, G. & Collinson, M. 2002. Guidelines for assigning species rank. *Ibis* **144**: 518-525.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **359**: 183-195.
- Ho, S. Y. W., Lanfear, R., Bromham, L., Phillips, M. J., Soubrier, J., Rodrigo, A. G. & Cooper, A. Time-dependent rates of molecular evolution. *Molecular Ecology* **20**: 3087-3101.
- Idaghdour, Y., Broderick, D., Korrida, A. & Chbel, F. 2004. Mitochondrial control region diversity of the Houbara bustard *Chlamydotis undulata* complex and genetic structure along the Atlantic seaboard of North Africa. *Molecular Ecology* **13**: 43-54.
- Johnson, K. P. & Weckstein, J. D. 2011. The Central American land bridge as an engine of diversification in New World doves. *Journal of Biogeography* **38**: 1069-1076.
- Kass, R. E. & Raftery, A. E. 1995. Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association* **90**: 773-795.
- Klicka, J. & Zink, R. M. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: A failed paradigm. *Science* **277**: 1666-1669.
- Knox, A. G., Collinson, M., Helbig, A. J., Parkin, D. T. & Sangster, G. 2002. Taxonomic recommendations for British birds. *Ibis* **144**: 707-710.
- Kohler, P., Bintanja, R., Fischer, H., Joos, F., Knutti, R., Lohmann, G. & Masson-Delmotte, V. 2010. What caused Earth's temperature variations during the last 800,000 years? Data-based evidence on radiative forcing and constraints on climate sensitivity. *Quaternary Science Reviews* **29**: 129-145.
- Lavee, D. 1988. Why is the Houbara (*Chlamydotis undulata macqueenii*) still an endangered species in Israel? *Biological Conservation* **45**: 47-54.
- Lesobre, L., Lacroix, F., Caizergues, A., Hingrat, Y., Chalah, T. & Saint Jalme, M. 2010. Conservation genetics of Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*): population structure and its implications for the reinforcement of wild populations. *Conservation Genetics* **11**: 1489-1497.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Lovette, I. J. 2005. Glacial cycles and the tempo of avian speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 57-59.
- Malik, M. M. 1985. The distribution and conservation of Houbara bustard in North West frontier province. *Bustard Studies* **3**: 81-85.
- Nabholz, B., Glemin, S. & Galtier, N. 2009. The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *Bmc Evolutionary Biology* **9**: 13.
- Nuttinger, F., Gamauf, A., Pinsker, W., Wink, M. & Haring, E. 2007. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology* **16**: 1497-1517.
- Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* **302**: 205-217.

- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Uppsala University Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre.
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J. M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V. Y., Lorius, C., Pepin, L., Ritz, C., Saltzman, E. & Stievenard, M. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**: 429-436.
- Pitra, C., D'Aloia, M. A., Lieckfeldt, D. & Combrea, O. 2004. Genetic variation across the current range of the Asian Houbara bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). *Conservation Genetics* **5**: 205-215.
- Questiau, S., Eybert, M. C., Gaginskaya, A. R., Gielly, L. & Taberlet, P. 1998. Recent divergence between two morphologically differentiated subspecies of bluethroat (Aves: Muscicapidae: *Luscinia svecica*) inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Molecular Ecology* **7**: 239-245.
- Rambaut, A. 2008. FigTree 1.2., published by the author.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.5, available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Randi, E., Lucchini, V., Hennache, A., Kimball, R. T., Braun, E. L. & Ligon, J. D. 2001. Evolution of the mitochondrial DNA control region and cytochrome b genes and the inference of phylogenetic relationships in the avian genus *Lophura* (Galliformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 187-201.
- Riou, S., Combrea, O., Judas, J., Lawrence, M., Al Baidani, M. S. & Pitra, C. 2012. Genetic differentiation among migrant and mesident populations of the threatened Asian Houbara bustard. *Journal of Heredity* **103**: 64-70.
- Rogers, A. R. & Harpending, H. 1992. population-growth makes waves in the distribution of pairwise genetic-differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552-569.
- Ross, D. A. & Schlee, J. 1973. Shallow structure and geologic development of southern Red-Sea. *Geological Society of America Bulletin* **84**: 3827-3848.
- Rowe, K. C., Heske, E. J., Brown, P. W. & Paige, K. N. 2004. Surviving the ice: Northern refugia and postglacial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10355-10359.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual* , Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangster, G., Collinson, M., Helbig, A. J., Knox, A. G. & Parkin, D. T. 2004. The taxonomic status of Macqueen's Bustard. *British Birds* **97**: 60-67.
- Schneider, S. & Excoffier, L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates very among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* **152**: 1079-1089.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**: 233-234.
- Sibley, C. G. & Ahlquist, J. E. (1990) *Phylogeny and classification of birds*, New Haven: Yale University Press.
- Suchard, M. A., Weiss, R. E. & Sinsheimer, J. S. 2001. Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1001-1013.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G. & Cosson, J. F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**.

- 1  
2  
3 Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics  
4 analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-  
5 1599.
- 6 Tzedakis, P. C., McManus, J. F., Hooghiemstra, H., Oppo, D. W. & Wijmstra, T. A. 2003.  
7 Comparison of changes in vegetation in northeast Greece with records of climate  
8 variability on orbital and suborbital frequencies over the last 450 000 years. *Earth and*  
9 *Planetary Science Letters* **212**: 197-212.
- 10 Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelstrom, H. & Fumagalli, L. 2006.  
11 Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from  
12 mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* **15**: 3425-3437.
- 13 Voelker, G. & Light, J. E. 2011. Palaeoclimatic events, dispersal and migratory losses along  
14 the Afro-European axis as drivers of biogeographic distribution in *Sylvia* warblers.  
15 *Bmc Evolutionary Biology* **11**: 13.
- 16 Weir, J. T. & Schlüter, D. 2004. Ice sheets promote speciation in boreal birds. *Proceedings of*  
17 *the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 1881-1887.
- 18 Wu, F. L., Fang, X. M., Herrmann, M., Mosbrugger, V. & Miao, Y. F. Extended drought in  
19 the interior of Central Asia since the Pliocene reconstructed from sporopollen records.  
20 *Global and Planetary Change* **76**: 16-21.
- 21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TABLES****Table 1.** Collection origins, sample sizes, and GenBank numbers for the studied specimens.

Sub/species	Origin	Number	Accession No.	Reference
<i>Chlamydots undulata undulata</i>	Morocco	6	xxx	This study
	Algeria	3	AJ511448-AJ511450	Broders <i>et al.</i> 2003
	North Africa	1	AY078582	Pitra <i>et al.</i> 2004
<i>Chlamydots undulata fuertaventurae</i>	Fuerteventura	6	xxx	This study
	Canary Islands	1	AJ511463	Broders <i>et al.</i> 2003
	Canary Islands	1	AY078583	Pitra <i>et al.</i> 2004
<i>Chlamydots macqueenii</i>	Baluchistan [Pakistan]	3	xxx	This study
	Pakistan	3	AJ511460-AJ511462	Broders <i>et al.</i> 2003
	Kazakhstan	3	AJ511457-AJ511459	Broders <i>et al.</i> 2003
	Sinai	3	AJ511454-AJ511456	Broders <i>et al.</i> 2003
	Saudi Arabia	3	AJ511451-AJ511453	Broders <i>et al.</i> 2003
	Negev	2	xxx	This study
	Afghanistan	3	xxx	This study
	Asia	1	AY078581	Pitra <i>et al.</i> 2004
<b>Outgroup</b>				
<i>Eupodotis humilis</i> [Little brown bustard]	Africa	1	xxx	This study
<i>Eupodotis senegalensis</i> [White-bellied bustard]	Africa	1	xxx	This study
<i>Ardeotis kori</i> [Kori bustard]	Africa	1	xxx	This study
<i>Ardeotis arabs</i> [Arabian bustard]	Africa	1	xxx	This study

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
**Table 2.** Population pairwise  $F_{ST}$  (below the diagonal \*) and their probability values (above  
8 the diagonal \*). Cu (18) = Cuu and Cuf samples, Cm (21) = all Cm samples, Cm (5) =  
9 Sinai/Negev sample and Cm (16) = Cm without Sinai/Negev sample.  
10  
11  
12  
13  
14  
15

	Cuu (10)	Cuf (8)	Cu (18)	Cm (21)	Cm (16)	Cm (5)
Cuu (10)	*	0.684	-	0.000	0.000	0.000
Cuf (8)	0.003	*	-	0.000	0.000	0.009
Cu (18)	-	-	*	0.000	0.000	0.000
Cm (21)	0.928	0.924	0.941	*	-	-
Cm (16)	0.962	0.959	0.968	-	*	0.000
Cm (5)	0.993	0.992	0.991	-	0.786	*

IBIS Review Copy

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5 **Table 3.** Haplotype distribution and genetic diversity in the mtDNA cytochrome b within Houbara and Macqueen's populations. (the numbers in  
6 the uppermost row are variable sites,  $n$  is the total number of sequences,  $s$  the number of segregating sites,  $k$  the number of haplotypes,  $h$  gene or  
7 haplotype diversity to and  $\pi$  nucleotide diversity).  
8  
9

	129	186	226	300	330	454	488	504	549	558	587	607	622	630	634	647	711	741	753	771	777	786	789	795	891	894	981	994	Cuu	Cuf	Cm	n
Hap1	T	C	C	T	G	C	T	C	C	C	A	A	G	A	C	A	A	C	T	G	G	A	T	C	C	C	C	G	7	7	0	14
Hap2	C	.	T	C	A	.	T	T	T	.	.	.	G	T	.	G	.	C	A	.	G	C	T	T	.	T	A	0	0	9	9	
Hap3	C	.	T	C	A	.	T	T	T	.	.	.	G	T	.	G	.	C	A	A	G	C	T	T	.	T	A	0	0	3	3	
Hap4	C	.	T	C	A	.	T	T	T	.	.	.	T	.	G	.	C	A	.	G	C	T	T	.	T	A	0	0	1	1		
Hap5	C	T	T	C	A	A	.	T	T	T	.	.	G	T	G	G	C	A	.	G	C	T	T	.	T	A	0	0	5	5		
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	0	0	2	
Hap7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1	
Hap8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1	
Hap9	C	.	T	C	A	.	T	T	T	G	.	.	G	T	.	G	.	C	A	.	G	C	T	T	.	T	A	0	0	1	1	
Hap10	C	.	T	C	A	.	C	T	T	T	.	.	G	T	.	G	.	C	A	.	G	C	T	T	.	T	A	0	0	1	1	
Hap11	C	.	T	C	A	.	T	T	T	.	.	G	T	.	G	T	C	A	A	G	C	T	T	A	T	A	0	0	1	1		
<i>n</i>																												10	8	21	39	
<i>s</i>																												2	1	9	28	
<i>k</i>																												3	2	7	11	
<i>h</i>																												0.5111	0.2500	0.7667	0.772	
$\pi$																												0.000192	0.000240	0.001869	0.00996	

1  
2  
**Table 4.** Hierarchical analysis of molecular variance in Macqueen's and Houbara populations.  
3  
( $F_{ST}$  and  $F_{CT}$  are fixation indices within populations and among groups, respectively).  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

	Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Significance tests* [p-value]
<hr/>						
All populations: 1 group						
[Cuu]+[Cuf]+[Cm]+[CmSinai-Negev]	Among populations	3	191.02	6.89	96.22	$F_{ST} = 0.962^* [0.000]$
	Within populations	35	9.47	0.27	3.78	
	Total	38	200.50	7.16	100	
Both clades: 2 groups						
[Cuu/Cuf]+[Cm/CmSinai-Negev]	Among groups	1	179.13	8.83	90.21	$F_{CT} = 0.921 [0.342]$
	Among populations/within groups	2	11.89	0.68	7.02	
	Within populations	35	9.47	0.27	2.76	$F_{ST} = 0.972^* [0.000]$
	Total	38	200.50	9.79	100	
Both clades: 3 groups						
[Cuu/Cuf]+[Cm]+[CmSinai-Negev]	Among groups	2	190.91	8.11	96.98	$F_{CT} = 0.969 [0.162]$
	Among populations/within groups	1	0.11	-0.01	-0.21	
	Within populations	35	9.47	0.27	3.23	$F_{ST} = 0.967^* [0.000]$
	Total	38	200.50	8.37	100	
Both clades: 3 groups						
[Cuu]+[Cuf]+[Cm/CmSinai-Negev]	Among groups	2	179.25	6.32	78.03	$F_{CT} = 0.780 [0.145]$
	Among populations/within groups	1	11.77	1.51	18.63	
	Within populations	35	9.47	0.27	3.34	$F_{ST} = 0.966^* [0.000]$
	Total	38	200.50	8.10	100	

**Table 5.** Coalescent analyses in the Houbara-Macqueen's bustard complex. (HPD is the 95% highest posterior density). a) Mean values and HPD intervals for the substitutions rate revealed for the different codon positions based on different coalescence priors. b) Mean values and HPD intervals for the divergence time estimates within and between Cu and Cm based on different coalescent priors.

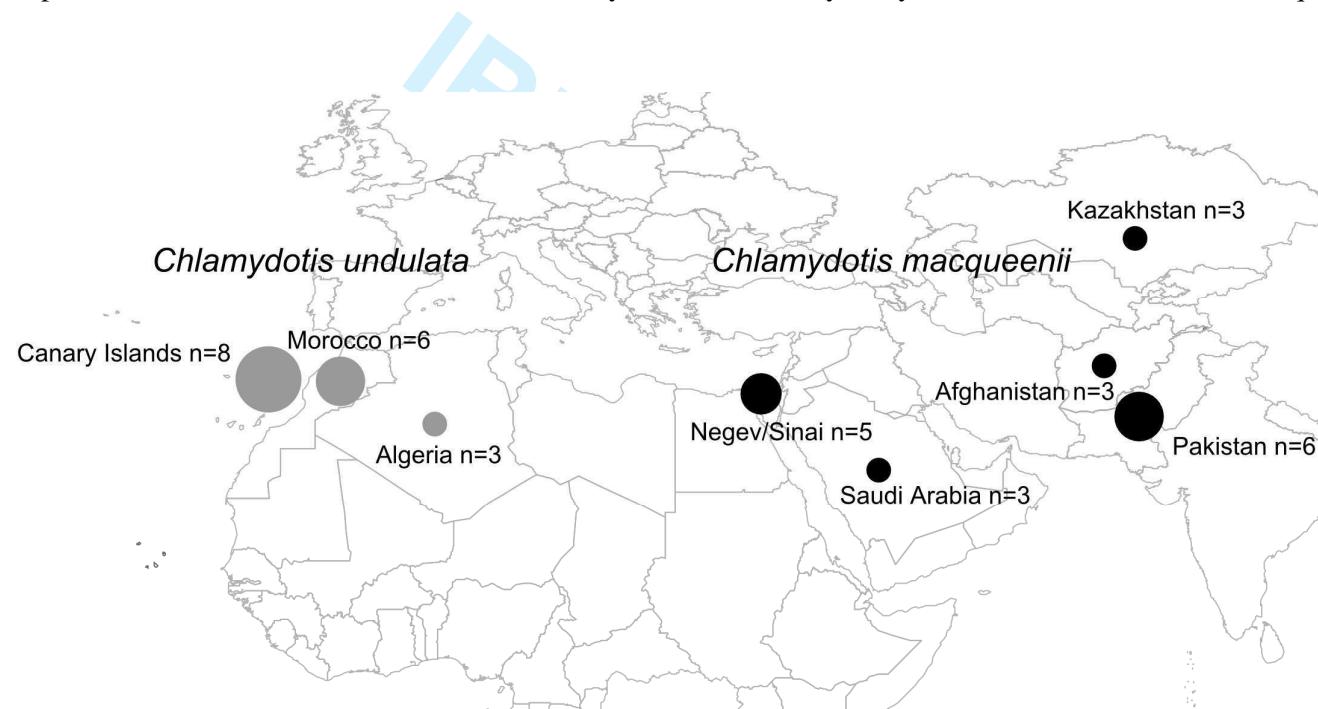
Model	1st codon position		2nd codon position		3d codon position	
	Mean	95% HPD	Mean	95% HPD	Mean	95% HPD
Coalescent constant size	0.0097	0.005-0.0178	0.0128	0.005-0.0233	0.0199	0.0125-0.0250
Coalescent expansion growth	0.0108	0.005-0.0197	0.0126	0.005-0.0232	0.0204	0.0133-0.0250
Coalescent exponential growth	0.0102	0.005-0.0186	0.0132	0.005-0.0235	0.0204	0.0123-0.0250
Model	Divergence between Cu and Cm		Divergence within Cu		Divergence within Cm	
	Mean	95% HPD	Mean	95% HPD	Mean	95% HPD
Coalescent constant size	0.9444	0.2260-1.8023	0.312	0.0527-0.6216	0.3843	0.0805-0.7278
Coalescent expansion growth	0.8079	0.2204-1.6026	0.2537	0.0500-0.5435	0.3207	0.0755-0.6480
Coalescent exponential growth	0.7666	0.2100-1.5148	0.1915	0.0312-0.4213	0.2582	0.0675-0.5317

**Table 6.** Selective neutrality test and demography parameters assessed: ( $\tau$ ) mutational parameter, ( $\theta_0$ ) population size before expansion, ( $\theta_1$ ) population size after expansion, ( $\mu$ ) mutation rate, (SSD) sum of squared deviation, and ( $t$ ) expansion time. (Cuu (18) = Cuu and Cuf samples, Cm (21) = all Cm samples, Cm (5) = Sinai/Negev sample and Cm (16) = Cm without Sinai/Negev sample.)

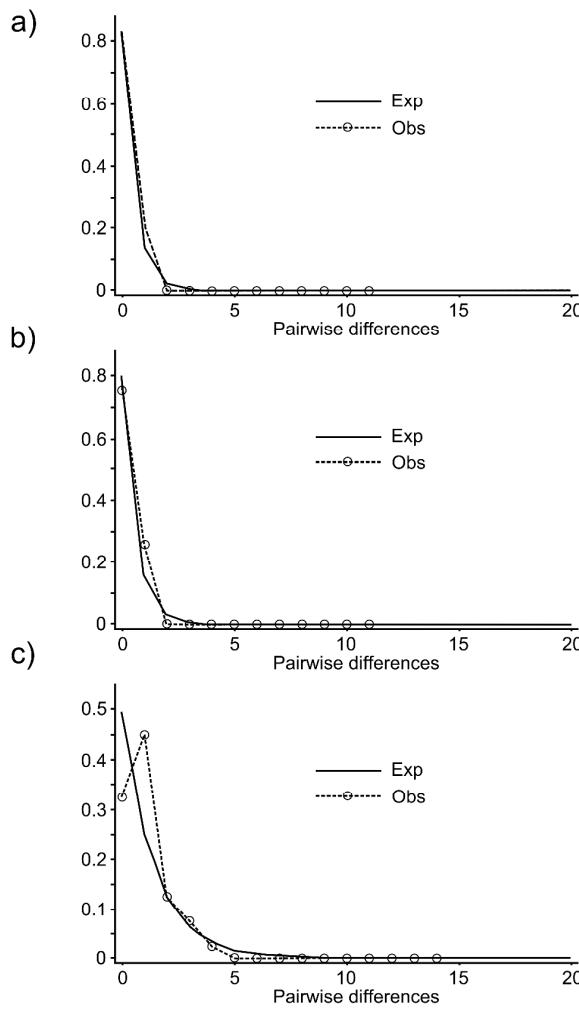
Demographic parameters	Cuu (10)	Cuf (8)	Cu (18)	Cm (21)	Cm (16)	Cm (5)
$\tau$	0.699	2.929	3.00	3.28	1.027	0
$\theta_0$	0	0.9	0	0	0	0
$\theta_1$	1000000	3.6	1000000	3.6	1000000	0
SSD	0.020	0.279	0.00237	0.033	0.012	0
P-value	0.350	0.06	0.4700	0.34	0.450	0
Raggedness index	0.180	0.312	0.371	0.105	0.126	0
P-value	0.650	0.600	0.630	0.35	0.400	0
1% Divergence rate = 0.005 Subst/lineage/site/My						
$\mu$	0.000024	0.000024	0.000024	0.000033	0.000033	0
$t$	67 082.53	281 094.0	287 907.87	314 779.27	98 560.46	0
5% Divergence rate = 0.025 Subst/lineage/site/My						
$\mu$	0.000120	0.000120	0.000120	0.000167	0.000167	0
$t$	13 416.51	56 218.81	57 581.57	62 955.85	19 712.09	0
<b>Neutrality test</b>						
Tajima's D	-1.11	-1.05	-1.50	-0.75	-1.48	0
P-value	0.20	0.21	0.04	0.25	0.06	1.00

## FIGURES

**Fig 1.** Map depicting sampling locations of Houbara and Macqueen's bustards. The size of the circle and n refers to the number of individuals sampled. Two more individuals of unknown locality were additionally analysed for each, Houbara and Macqueen's bustard.

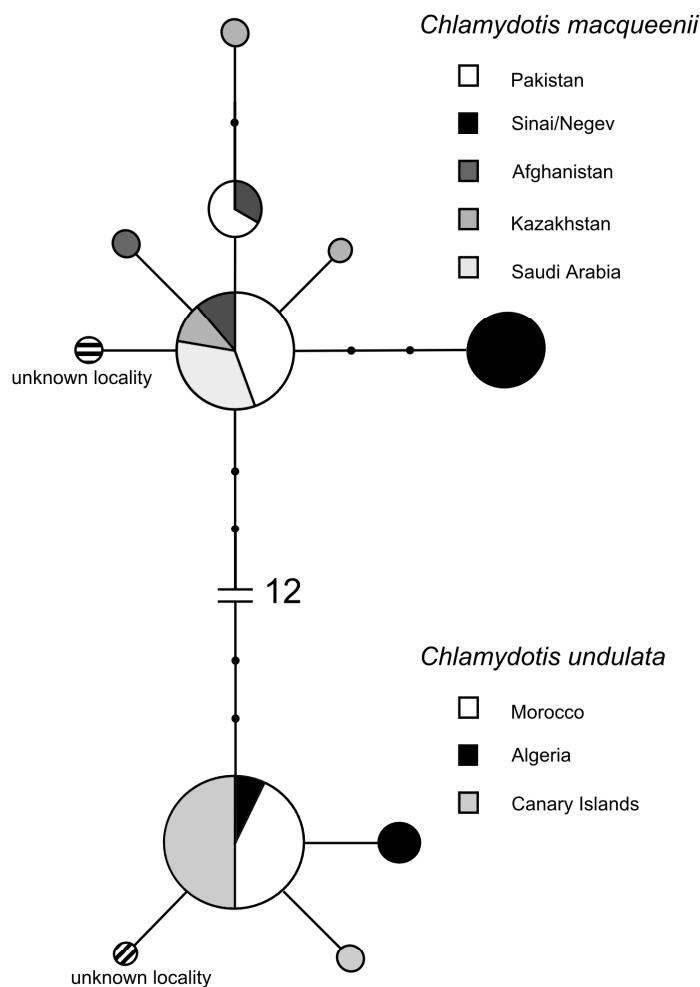


1  
2  
3 **Fig 2.** Distribution of mismatch differences among mtDNA haplotypes for a) Cuu (10), b) Cuf  
4 (8) and c) Cm (16) specimen. Observed distributions of pairwise differences are plotted  
5 against the expected curves predicted under the assumption of past population expansion.  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

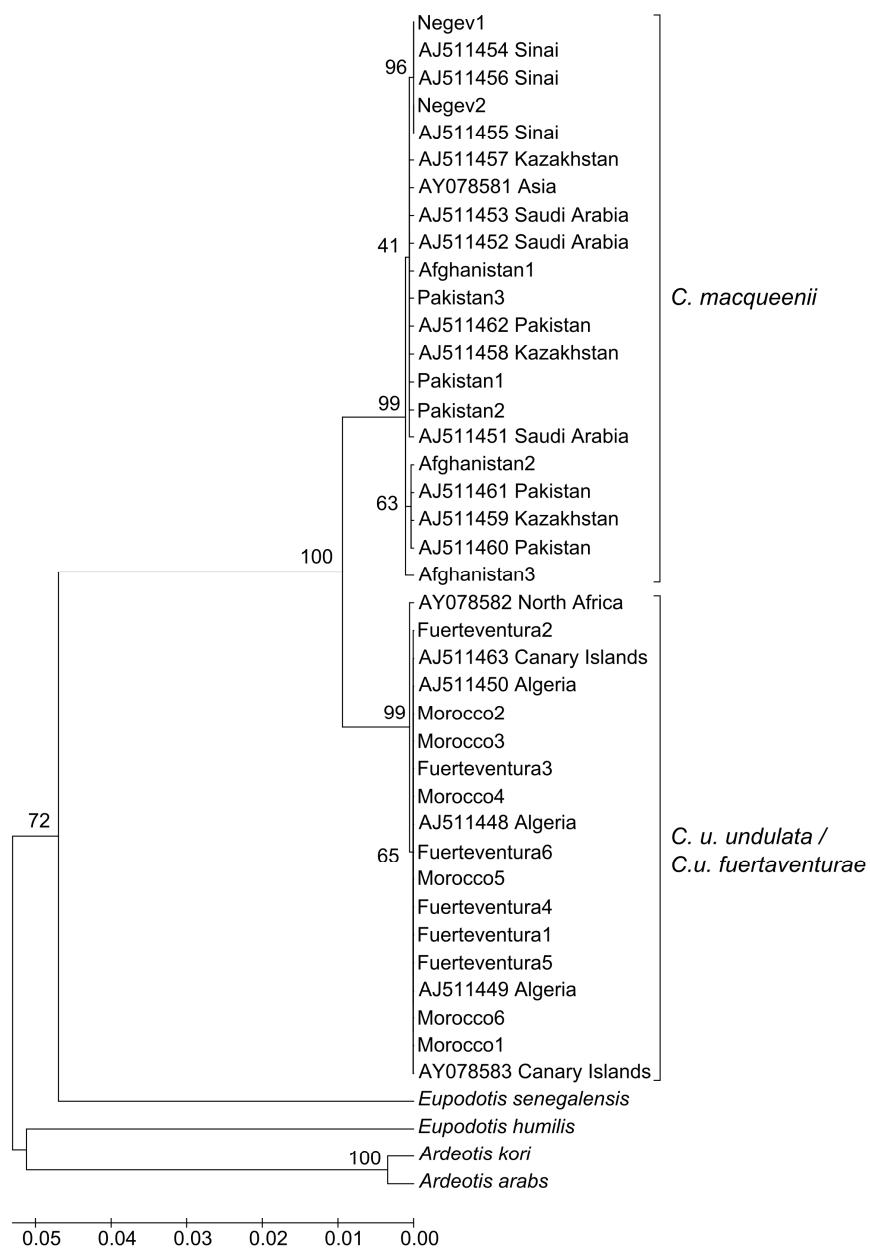


copy

1  
2  
3  
4  
5 **Fig 3.** Minimum spanning network describing the relationships among 39 mtDNA sequence  
6 variants from 1042 bp of cytochrome b gene in Houbara and Macqueen's bustards.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Fig 4.** Neighbour-joining tree built from the Houbara and Macqueen's mtDNA sequence data and rooted with four other bustards (Little-brown bustard *Eupodotis humilis*, White-bellied bustard *Eupodotis senegalensis*, Kori bustard *Ardeotis kori* and Arabian bustard *Ardeotis arabs*). Bootstrap support values are shown above the main interior branches.



**SECTION B**

**ÉTUDES GÉNÉTIQUES SUR LES POPULATIONS  
CAPTIVES**

## **CHAPITRE III**

**Modélisation de la croissance absolue et allométrique chez  
les outardes marocaines reproduites en captivité**



*It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change*

*Charles Darwin (1809-1882)*



## INTRODUCTION

La modélisation des caractéristiques de croissance chez les animaux en général et les oiseaux en particulier, permet d'appréhender les liens et les corrélations entre les capacités individuelles innées de croissance et le développement des parties et des organes du corps. L'étude qui investigue la relation entre la croissance d'une partie du corps ou d'un organe et la croissance corporelle totale est l'allométrie (Huxley 1932).

Beaucoup de travaux ont étudié l'allométrie aviaire et la modélisation des trajectoires de croissance de taille ou du poids vif (Anthony *et al.* 1991, Barbato 1991, Mignon-Gratseau *et al.* 2000, Aggrey 2002, Koncagul & Cadirci 2010 et Nahashon *et al.* 2010). Chez la poule domestique (*Gallus gallus domesticus*), une des fonctions mathématiques les plus utilisées est celle de Laird *et al.* (1965) modifiée à partir du modèle de Gompertz (1925).

Dans ce chapitre, nous étudierons l'allométrie et la dynamique de croissance absolue chez une population captive et aléatoire d'outardes Houbara marocaines, en utilisant le modèle mathématique non-linéaire de Gompertz-Laird dans le but de :

1. Décrire les paramètres et les taux de croissance absolue
2. Caractériser la croissance asymptotique
3. Déterminer les croissances allométriques du bec, de la tarso-métatarsse, de l'envergure des ailes et de la circonférence de la poitrine relatives au poids vif de l'animal.

## MÉTHODOLOGIE

### 1. Individus de l'expérience

Un total de 178 poussins nés en captivité à l'(IFCDW) en 2010 fait l'objet de cette expérience. Ce lot a été vacciné contre la variole aviaire et la maladie de Newcastle (une pseudo-peste aviaire). Les poussins ont été nourris par le "gamekeeper" chaque deux heures surtout pendant les premiers quatorze jours (Photo 3). Le régime alimentaire contenait :

- Des granules mouillées expulsées de viande et composées d'environ 25% de protéines brutes, de 1.5% de calcium, de 1% de phosphore, de 20000 UI de vitamine A, de 2000 UI de vitamine D<sub>3</sub> et de 200 UI de vitamine E (Photo 3)

- Un supplément de vers du ténébrion meunier (*Tenebrio molitor*) (Photo 1 et 4)
- Un supplément de criquets (*Gryllus bimaculatus*)
- Des carottes
- De la viande hachée
- De la luzerne fraîche (*Medicago sativa L.*) (Photo 4).

Des miettes alimentaires ont été régulièrement administrées pour aider les poussins à picoter. Le poids corporel (Photo 2), la longueur du bec, la longueur de la tarso-métatarse, l'envergure des ailes et la circonférence de la poitrine (Figure 1) ont été mesurés pour chaque oiseau juste après l'éclosion, au 7<sup>ème</sup>, 30<sup>ème</sup>, 60<sup>ème</sup>, 90<sup>ème</sup> et au 120<sup>ème</sup> jour.



**Photo 1 : Supplément en *Tenebrio molitor***



**Photo 2 : Prise de poids d'un juvénile**



**Photo 3 : Groupe de poussins nourris à la main**



**Photo 4 : Poussin capable de s'auto-nourrir**

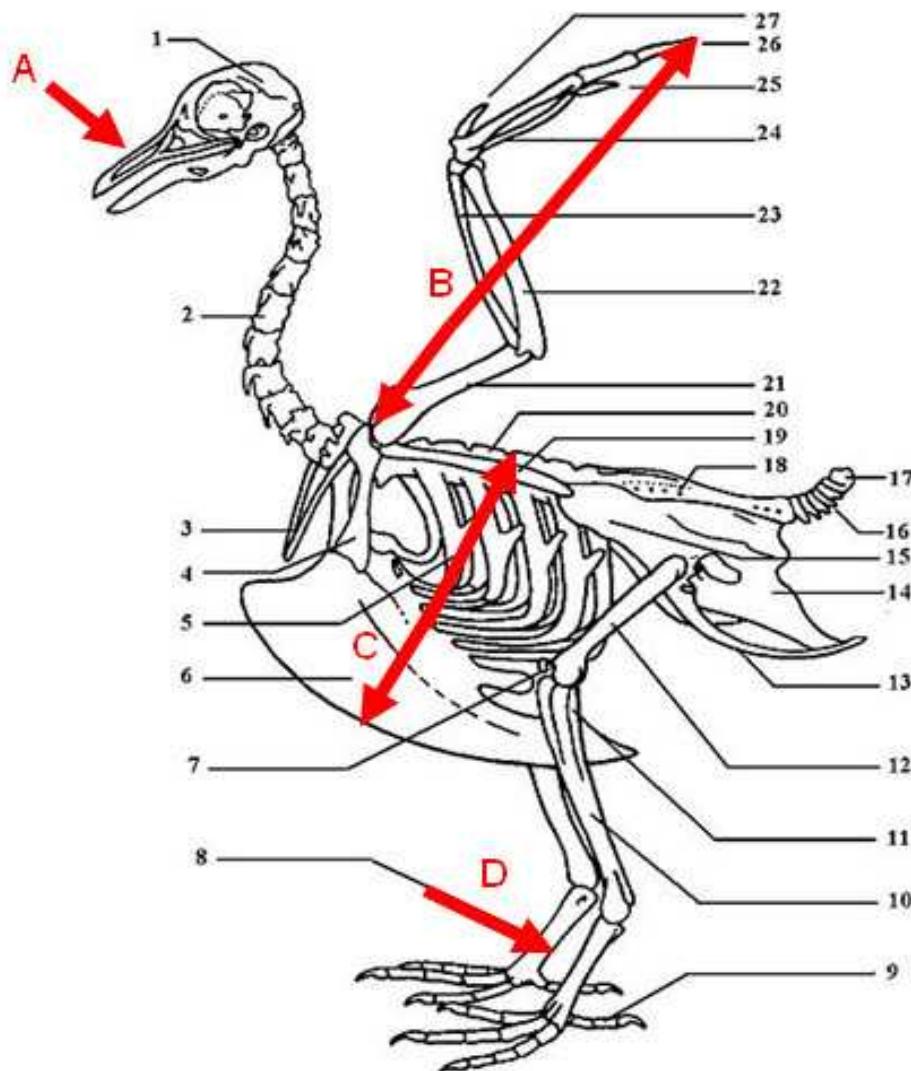


Figure 1: Détails d'un squelette aviaire et mesures prises dans cette étude (A, B, C et D).

1. Crâne	10. Tibio-tarse	19. Scapula
2. Vertèbres cervicales	11. Fibula	20. Vertèbres
3. Furcula	12. Fémur	21. Humérus
4. Coracoïde	13. Pubis	22. Ulna
5. Côte	14. Ischium	23. Radius
6. Bréchet	15. Ilium	24. Carpo-métacarpe
7. Patella	16. Vertèbres caudales	25. 1er doigt, 2 phalanges
8. Tarso-métatarse	17. Pygostyle	26. 3ème doigt, 1 phalange
9. Phallange	18. Synsacrum	27. 2ème doigt, 2 phalanges

→ A = longueur du bec, B x 2 = envergure des ailes, C = circonférence de la poitrine et D = longueur de la tarso-métatarse.

## 2. Étude allométrique

L'allométrie désigne l'étude de corrélation entre le poids ou la taille d'un organisme et l'un de ses organes ou parties du corps (*e.g.*: le poids du cœur par rapport à celui du corps). Les paramètres du modèle de croissance absolue se calculent selon la formule logarithmique linéaire de Huxley (1932) suivante :  $\ln(Y) = \ln(a) + b \ln(X)$  avec, X le poids corporel, Y la taille ou le poids de l'organe, b le coefficient d'allométrie (ou la pente de la ligne droite de régression) et  $\ln(a)$  l'interception de la ligne de régression sur l'axe des ordonnées. Quand ( $b = 1$ ), on parle d'une isométrie de croissance: l'organe et le poids corporel ont le même taux de croissance. Quand ( $b < 1$ ), l'allométrie est négative et minorante (hypoallométrie), dans ce cas le taux de croissance de l'organe est inférieur à celui du poids corporel et quand ( $b > 1$ ), l'allométrie est positive et majorante (hyperallométrie) et indique un taux de croissance de l'organe supérieur à celui de la masse corporelle totale. Les relations linéaires ont été analysées en utilisant la régression par axe majeur réduit (RMA pour Reduced Major Axis) de Sokal & Rohlf (1995) et les coefficients de régression ont été calculés par le logiciel RMA pour JAVA v. 1.21 (Bohonak & van der Linde 2008).

## 3. Modèle de croissance absolue de Gompertz-Laird

Ce modèle est utilisé dans le but d'estimer des mesures espérées à un certain âge de l'individu. La courbe de croissance de Gompertz-Laid est décrite par la formule suivante:

$W_t = W_0 e^{\frac{L}{K}(1-e^{-Kt})}$  avec,  $W_t$  le poids de l'individu à l'âge  $t$ ,  $W_0$  le poids initial à l'éclosion,  $L$  le taux de croissance instantané quotidien et  $K$  le taux ou facteur de maturation, appelé aussi le taux (ou la vitesse) de décroissance exponentielle du taux de croissance initial spécifique. Les paramètres dérivant de cette fonction sont :

1. Le poids à l'infexion :  $W_i = W_0 e^{\frac{K}{L}}$
2. Le poids corporel asymptotique :  $W_A = W_0 e^{\frac{L}{K}}$
3. L'âge à l'infexion :  $t_i = \frac{1}{K} \ln\left(\frac{L}{K}\right)$

Les courbes des paramètres de croissance ont été établies en utilisant le programme PROC NLIN (Marquart algorithm) (SAS Inst, Inc. 2002). L'interprétation et la discussion des résultats générés sont publiées dans l'article 3 paru dans l'Atlas Journal of Biology.

## Article 3

### **Modeling absolute and allometric growth in Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in captivity**

#### **Résumé**

Un travail de recherche sur la croissance absolue et allométrique a été mené chez les outardes Houbara marocaines (*Chlamydotis undulata undulata*) en captivité. La fonction mathématique de croissance de Gompertz-Laird a été ajustée dans cette étude pour décrire les modèles et les motifs de croissance, en effectuant des mesures du poids vif allant du jour de l'éclosion au jour 120 de l'âge des animaux. Le modèle utilisé a sous-prédit le poids à l'éclosion (34 vs 40 g) cependant, la prédiction du poids asymptotique était concordante avec les données (1193 g). La même fonction de croissance a permis de décrire les caractéristiques de croissance du bec, de la longueur de la tarso-métatarsale, de la circonférence de la poitrine et de l'envergure des ailes. Le bec a atteint la maturité plus rapidement que la tarso-métatarsale, la circonférence de la poitrine et l'envergure des ailes. L'équation de la transformation logarithmique de Huxley a permis la détermination des relations allométriques entre le poids vif corporel et la longueur du bec, la tarso-métatarsale, la circonférence de la poitrine et l'envergure des ailes. Les analyses de croissance allométrique ont montré que, par rapport au poids vif de l'animal, la longueur du bec, de la tarso-métatarsale, de la circonférence de poitrine et de l'envergure des ailes exhibent une allométrie minorante négative ( $b < 1$ ). Pourtant, l'envergure des ailes montrait la plus grande croissance allométrique en comparaison avec les autres mesures, ce qui évoque l'importance évolutive du développement des ailes chez les outardes pour fuir leurs prédateurs.

**Mots-clés :** Outarde Houbara, Modèle de Gompertz, allométrie, croissance, élevage en captivité.

# Modeling Absolute and Allometric Growth in Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in Captivity

Amal Korrida<sup>1,2,\*</sup>, Samuel N. Nahashon<sup>3</sup>, Amal Amin-Alami<sup>2</sup>, Sami Jadallah<sup>1</sup>, and Samuel E. Aggrey<sup>4</sup>

<sup>1</sup> HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud International Foundation for Conservation and Development of Wildlife, Genetics department, Agadir 80350, Morocco; <sup>2</sup> Laboratoire des Substances Naturelles, Faculté des Sciences d'Agadir, Équipe d'Océanographie Biologique, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc ; <sup>3</sup> Department of Agriculture, University of Tennessee, Nashville, TN, USA; <sup>4</sup> Department of Poultry Science, University of Georgia, Athens, GA 30602-2772, USA.

Received: April 11, 2012 / Accepted: May 6, 2012

## Abstract

Absolute and allometric growth of Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) were studied. Using body weight measurements from hatch till 120 days of age, the Gompertz-Laird growth model was used to describe the growth pattern of the Houbara. Whereas the model underpredicted the hatching weight (34 vs 40 g), the predicted asymptotic body weight was in concordance with the data (1193 g). The same growth model was also used to describe the growth pattern of beak and shank length, chest girth and wing span. The beak reached asymptotic length faster than the shank, chest girth and wing span. We used the log transformed relationship of Huxley to determine the allometric relationship of beak length, shank length, chest girth and wing span relative to body weight from hatch to 120 days. The allometric growth analysis indicated that, beak length, shank length, chest girth and wing span all followed a hypometric allometry ( $b < 1$ ) relative to body weight growth. However, the wing span has the highest allometric growth compared to the other measurements indicating the evolutionary importance of developing wings for quick flights from predators.

**Keywords:** Houbara Bustard, Gompertz model, allometry, growth, captive breeding.

## Introduction

The Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata*) is a medium sized Bustard of the Otididae family which breeds in deserts and arid sandy areas with relatively large range of habitats. The Houbara Bustard species can be found in the Canary Islands (*Chlamydotis undulata fuertaventurae*) and North Africa (*Chlamydotis undulata undulata*) from Morocco to Egypt, whereas the Macqueen's species (*Chlamydotis macqueenii*) occurs in the Middle East, and Asia (Iran, India, Pakistan, Kazakhstan and China). The two species are the prized quarry for Arab falconers, and widespread hunting and loss of habitat have greatly reduced their numbers. The International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2011) classifies the Houbara species as vulnerable. The Houbara is also prohibited from international trade (CITES, 2012).

Since the early 1990s, several conservation centers have been established in Northern Africa and the Middle East to propagate the Houbara and Macqueen's in captivity and establish proper conservation practices in order to preserve the Houbara. Since then there have been studies on the biology (Saint Jalme et al., 1994; Tieleman et al., 2002), captive breeding (Gélinaud et al., 1997; Hémon et al., 2000) diseases (Ostrowski et al., 1995; Bailey et al., 2008), ecology (van Heezik and Ostrowski, 2001), behavior (Gaucher et al., 1996; van Heezik and Seddon, 1998), genetics (Chbel et al., 2002; Idaghdour et al., 2004; Lesobre et al., 2010) and phylogeny (Granjon

\* Corresponding author: amalkorrida11@aol.com

et al., 1994; Broders et al., 2003) of the Houbara. However, data on the entire growth characteristics of the Houbara is very scant. This is because most of the Houbara bred in captivity are released into the wild at the middle or end of the breeding season. To date, only few studies exist on the juvenile growth characteristics of the Houbara and Macqueen's (Lawrence et al., 1999; van Heezik and Seddon, 2001; Stiévenart, 2002).

Prediction of growth patterns has been studied extensively in other avian species, especially domestic fowl (Grossman and Bohren, 1982; Barbato, 1991; Aggrey, 2002; Aggrey, 2004). Growth comprises of hyperplasia, hypertrophy, cell division and apoptosis, however, these processes can also be affected by environmental fluctuations, dietary status, diseases and other by random events causing growth to fluctuate thereby making the study at a single point unattractive. Also, the pattern of growth reflects the architecture of body composition (Aggrey, 2002). In a species, such as the Houbara, the body weight at sexual maturity may become important because of the difference in growth patterns. Mathematical equations have been used to model growth characteristics (e.g., Gompertz, 1925; Richards, 1959). Growth characteristics derived from such mathematical equations smoothens body weigh fluctuations and uses previous and future weights to predict age-weight points (DeNise and Brinks, 1985).

The objective of this study was to use the Gompertz model to determine multiple growth phases, and asymptotic growth of the Houbara, and also determine the allometric growth of the beak length, shank length, chest girth, and wing span relative to body weight.

## Materials and Methods

### Flock and Experimental Design

Data were collected on a total of 178 birds that were hatched from a captive breeding program at HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud International Foundation for Conservation and Development of Wildlife (IFCDW). The Houbara Bustards hatched and were raised from eggs laid by a captive-bred flock vaccinated against the avian poxvirus using an attenuated live vaccine and against the Newcastle disease virus (NDV) using an inactivated vaccine. The Houbara chicks were raised artificially and handfed every 2 hours for 14 days with a diet consisting of wet poultry meat extruded pellets (~25% crude protein; 1.5% calcium, 1% phosphorus, 20,000IU vitamin A, 2,000IU vitamin D3, and 200IU vitamin E), supplemented with meal worms (*Tenebrio molitor*), crickets (*Grillus bimaculatus*), carrots, minced meat and fresh alfalfa. Feed crumbs were always available to stimulate pecking at food. The chicks were raised indoors in small boxes in groups of 3 or 4 at 25 °C. After 7 days, they are moved into an outdoor facility with very small pebble gravels as substrate and hereafter, transitioned into feeding independently and stimulate locomotion. The chicks were monitored at feeding times and abnormalities were reported to veterinarians who attended to them immediately. Body weight, beak length, shank length, chest girth (circumference at the largest portion of the breast) and wing span were measured on day of hatch, days

14, 30, 60, 90 and 120. Wing span was measured by placing the bird on its feet and the wings held at the wrist joints, and the distance was measured between the tips of the longest primary feathers on each wing.

### Absolute Growth Model

In order to estimate the expected body weight, beak length, shank length, chest girth and wing span at a specific age, the Laird form of the Gompertz equation (Laird et al., 1965) was fitted to the data. The following Gompertz equation was used to describe the data:

$$W_t = W_0 e^{\frac{L}{K}(1-e^{-Kt})}$$

Where,  $W_t$  is the measurement, e.g. body weight of bird at age  $t$ ,  $W_0$  is the initial (hatch) measurement,  $L$  is the instantaneous growth rate (per day),  $K$  is the rate of exponential decay of the initial specific growth rate,  $L$ , which measures the rate of decline in the growth rate. The asymptotic measurement  $W_A$  was derived as:

$$W_A = W_0 e^{\frac{L}{K}}$$

Growth curve parameters were estimated using PROC NLIN (Marquart algorithm) (SAS Inst. Inc., (2002).

### Scaling Relationships

We tested the hypotheses on the scaling of beak length, shank length, wing span, and chest girth on body weight using the power function  $Y = ax^b$  (Huxley, 1932) in its log transformed form:

$$\ln(Y) = \ln(a) + b \ln(x)$$

In isometric relationships, the expected slope (b) is 1.0 as both  $Y$  and  $x$  are of linear dimension. We analyzed all linear relations using reduced major axis (RMA) regression because it accounts for the error in the 'independent' variable (Sokal and Rohlf, 1995). The RMA regression coefficients were computed using RMA for JAVA v. 1.21 (Bohonak and van der Linde, 2008).

## Results and Discussion

The means and standard deviations for body weight, shank length, wing span and chest girth are presented in Table 1. Like most longitudinal data, the standard deviations increased with age. The means and standard errors (SE) of growth and body dimensions predicted with the Gompertz model are presented in Table 2. Except for beak length, the Gompertz model underpredicted the hatching measurements. The hatching weight predicted by the Gompertz model (34.5g) was lower than the measured weight (40.3g). The underprediction of initial measurement is a common feature of most growth models, and as a result, Grossman and Bohren (1982) suggested constraining the initial measurement. However, Pasternak and Shalev (1994) recommended weighting the initial measurement by the inverse

**Table 1.** Means ( $\pm$ SD) for body weight (BW), beak length (BL), shank length (SL), wing span (WS), and chest girth (CG) at different ages in Houbara Bustard (N=178).

Age (days)	BW (g)	BL (cm)	(SL) cm	WS (cm)	CG (cm)
0	40.33 $\pm$ 4.85	1.46 $\pm$ 0.21	1.95 $\pm$ 0.23	10.82 $\pm$ 0.72	10.11 $\pm$ 0.94
7	65.22 $\pm$ 10.17	2.03 $\pm$ 0.21	2.77 $\pm$ 0.29	16.93 $\pm$ 2.06	12.13 $\pm$ 1.09
14	146.79 $\pm$ 22.93	2.60 $\pm$ 0.25	3.67 $\pm$ 0.35	30.02 $\pm$ 3.84	14.82 $\pm$ 1.27
30	408.89 $\pm$ 59.52	3.36 $\pm$ 0.30	5.84 $\pm$ 0.48	69.90 $\pm$ 9.69	21.56 $\pm$ 2.26
60	852.35 $\pm$ 128.29	3.94 $\pm$ 0.38	8.32 $\pm$ 0.55	106.07 $\pm$ 6.70	30.36 $\pm$ 2.89
90	1026.21 $\pm$ 176.71	4.03 $\pm$ 0.33	8.97 $\pm$ 0.60	115.35 $\pm$ 5.23	31.66 $\pm$ 2.71
120	1194.06 $\pm$ 213.51	4.17 $\pm$ 0.41	8.85 $\pm$ 0.54	116.09 $\pm$ 6.24	32.46 $\pm$ 3.24

**Table 2.** Estimated coefficients (SE) and confident intervals (CI) for Gompertz growth, beak length, shank length, wing span, and chest girth parameters in Houbara Bustard.

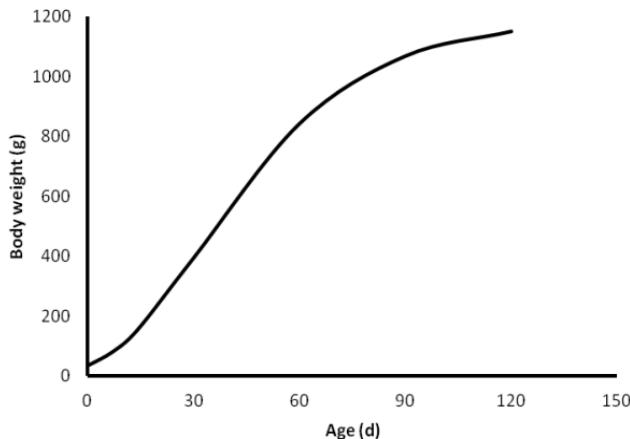
Parameter	Coefficient	95% CI
	Body Weight	
Hatching weight ( $W_0$ ), g	34.5326 $\pm$ 2.96	28.7329 – 40.3323
Initial growth rate ( $L_b$ ), g/d	0.1374 $\pm$ 0.01	0.1242 – 0.1506
Rate of decay ( $K_b$ ), g/d	0.0388 $\pm$ 0.00	0.0366 – 0.0410
Asymptotic weight <sup>1</sup> ( $W_A$ ), g	1192.9300	
Beak Length	Beak Length	
Hatching length ( $B_0$ ), cm	1.4569 $\pm$ 0.02	1.4219 – 1.4920
Initial growth rate ( $L_b$ ), cm/d	0.0598 $\pm$ 0.00	0.0562 – 0.0634
Rate of decay ( $K_b$ ), cm/d	0.0588 $\pm$ 0.00	0.0561 – 0.0616
Asymptotic length <sup>1</sup> ( $B_A$ ), cm	4.0248	
Shank Length	Shank Length	
Hatching length ( $S_0$ ), cm	1.8621 $\pm$ 0.02	1.8167 – 1.9076
Initial growth rate ( $L_s$ ), cm/d	0.0666 $\pm$ 0.00	0.0641 – 0.0692
Rate of decay ( $K_s$ ), cm/d	0.0418 $\pm$ 0.00	0.0406 – 0.0430
Asymptotic Length <sup>1</sup> ( $S_A$ ), cm	9.1546	
Wing Span	Wing Span	
Hatching weight ( $WS_0$ ), cm	7.3616 $\pm$ 0.24	6.8925 – 7.8307
Initial growth rate ( $L_{ws}$ ), cm/d	0.1509 $\pm$ 0.00	0.1441 – 0.1577
Rate of decay ( $K_{ws}$ ), cm/d	0.0545 $\pm$ 0.00	0.0531 – 0.0558
Asymptotic length <sup>1</sup> ( $WS_A$ ), cm	117.5562	
Chest Girth	Chest Girth	
Hatching girth ( $G_0$ ), cm	9.5129 $\pm$ 0.11	9.2951 – 9.7307
Initial growth rate ( $L_g$ ), cm/d	0.0430 $\pm$ 0.00	0.0407 – 0.0453
Rate of decay ( $K_g$ ), cm/d	0.0341 $\pm$ 0.00	0.0326 – 0.05772
Asymptotic diameter <sup>1</sup> ( $G_A$ ), g	33.5572	

<sup>1</sup>Derived parameters.**Table 3.** Parameter from reduced maximum axis (RMA) regression estimates ( $\pm$ SE) and confidence intervals (CI) of allometric growth of some morphometric characters, as a function of body weight in Houbara Bustard.

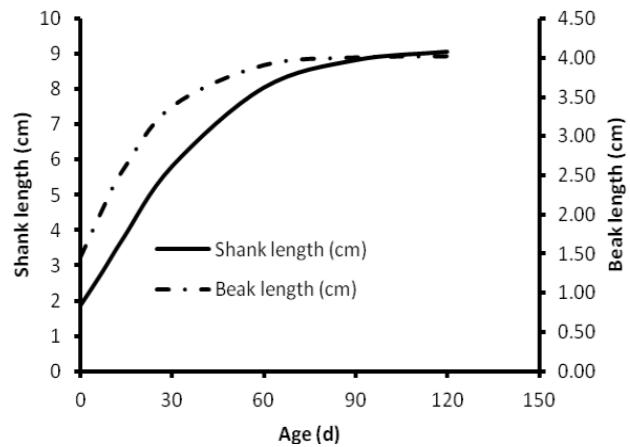
	Intercept	95% CI	Slope	95% CI	R <sup>2</sup>	Allometry
<b>Beak length</b>	-0.66 $\pm$ 0.02	-0.69 --0.62	0.31 $\pm$ 0.00	0.30 – 0.31	0.8763	Negative
<b>Shank length</b>	-0.94 $\pm$ 0.02	-0.98 --0.92	0.45 $\pm$ 0.00	0.45 – 0.46	0.9644	Negative
<b>Wing span</b>	-0.26 $\pm$ 0.02	-0.31 --0.22	0.73 $\pm$ 0.01	0.72 – 0.74	0.9719	Negative
<b>Chest girth</b>	0.99 $\pm$ 0.01	0.96 – 1.01	0.35 $\pm$ 0.00	0.35 – 0.36	0.9571	Negative

of the variance. The fits of the absolute growth measurements are presented in Figures 1, 2 and 3. It is expected that the lower the initial growth rate, the earlier the asymptotic measurement is reached (Aggrey, 2002). From the estimates in Table 2, body weight and wing span had the highest instantaneous rates compared to beak and shank lengths, and chest girth. Beak length reached its asymptote earlier than shank length (Figure 2). In

the wild, the Houbara Bustard mainly feeds on seeds, invertebrates and small vertebrates, and underdevelopes beak to limit its ability to feed. Thus, the beak growing to maturity earlier than other measurements signifies its importance in early feeding ability and survival. The shank grew at a rate of 0.07 cm per day until the age of maximum growth, and hereafter, grew at 0.04 cm per day until maturity. Improper development of the



**Figure 1.** Growth curve of the Houbara Bustard predicted by the Gompertz model.

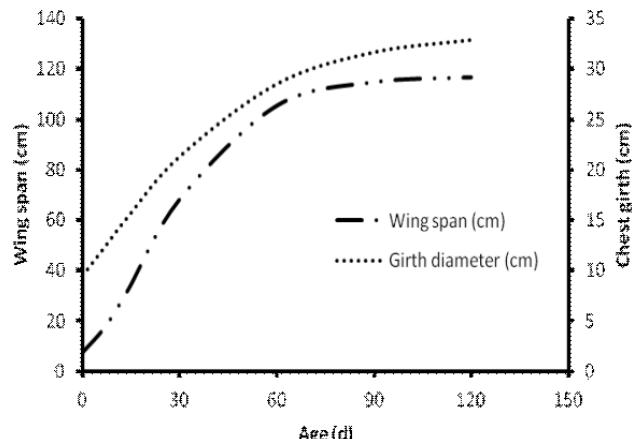


**Figure 2.** Beak and shank length curves of the Houbara Bustard predicted by the Gompertz model.

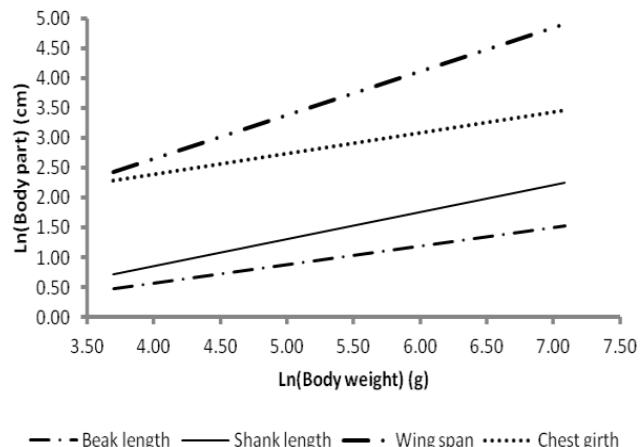
skeletal system can be significant in the health of the Houbara. According to Naldo et al., (1998), rotational and angular limb development, rolled toes and fractures are common limb abnormalities that affect Bustards. Growth analysis of the metatarsus, tibiotarsus and humerus in Houbara (Naldo et al., 2000) suggests the growth pattern of the shank in this study was within expectation of the general skeletal development of Houbaras.

The initial growth rate of the chest girth lags behind wing span and overall growth. Wing span has the highest initial growth rate compared to the overall growth. In the wild, the Houbara makes high thrust initial flight from predators but these flights are of shorter durations. Perhaps the initial growth rate allows them to develop wing span necessary for such high thrust flights, but underdeveloped keel could be responsible for their short duration. Similar to most avian species (Barbato, 1991; Aggrey, 2002), the correlation between the L and K growth parameters are high ( $r = 0.92-0.96$ ).

The literature is scant on growth characteristics and modeling in the Houbara Bustard, however, graphical representation of growth by Naldo et al., (2000) suggests that the growth data



**Figure 3.** Wing span and girth circumference curves of the Houbara Bustard predicted by the Gompertz model.



**Figure 4.** Allometric growth functions of beak length, shank length, wing span and chest girth versus body weight.

from the current study was in concordance with expectation. Even though the Houbara exhibit sexual dimorphism, the birds used in this study were not sexed. Future studies should include gender and data should be conducted for a longer duration to encompass both summer and winter in order to understand how the Houbara regulate its body weight through different seasons.

Allometry allows for the study of the proportional change in the dimensions of one character relative to another. In essence, it is the scaling relationship between characters. The log transformed relationship of Huxley (1932) often reveals linear allometry with a slope of  $b$  (Figure 4), and such allometries are classified according to the value of  $b$ . Characters scale hypometrically when  $b < 1$ , isometrically, when  $b = 1$ , and hypermetically when  $b > 1$ . The scaling exponent of the allometric analysis indicated that the beak, girth, shank, and wing span all exhibited negative allometric growth in relation to body weight (Table 3, Figure 4). However, of all the parts measured, the wing grew fastest compared to the beak in relation to body weight. The disproportionate growth of different parts of the body relative to body weight is an indication of the relative importance of the

different parts to the survival of the Houbara. In early development, the beak and shank are relatively important to foraging and locomotion as the parents shelter the chicks against predators. However, the wing span has the highest allometric growth compared to the other measurements indicating the evolutionary importance of developing wings for quick flights from predators.

Captive breeding of Houbara Bustard is arduous, and survival of the hatchling is crucial. Hand-feeding of chicks may introduce variation in chick body weight especially when there are multiple gamekeepers undertaking the feeding. Nevertheless, this study presents the first unique insight into the absolute growth and allometric growth characteristics of the Houbara. The average hatching weight was about 40 g, and by 4 months, the average body weight was approximately 1200 g. The beak reaches mature length faster than shank, chest girth and wings, however, the wing span even though has a negative allometry to body weight, still grows faster than the beak, shank and chest girth illustrating the evolutionary importance of developing an appropriate sized wings for quick but short flights from potential predators.

## Acknowledgements

The authors dedicate the present study to the late Crown Prince, His Royal Highness Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud, sponsor and patron of the Foundation for his dedications, leadership and generosity to the environment and protection of wildlife. We would like also to extend our gratitude to Sheikh Mohamed Bin Khalid Bin Hethlain for his supports and encouragements. This work was made possible also by the support of colleagues and technical staff from IFCDW in Agadir and DERS in Errachidia centers, especially A, S and S. Bouaich, M and A. Agouram, H. Idaghdour, A. Bayla, J. Amghar, S. Boucham, A. Zagmouz, A. El Abbassi, L and H. Gaboula, Y. Redouane, D. Moujani, Y. Debiani, M. Lahrar and A. Louzani. We thank also the anonymous referees for reviewing and evaluating this manuscript. This work is a part of the doctoral thesis of Amal Korrida on Houbara Bustard genetics.

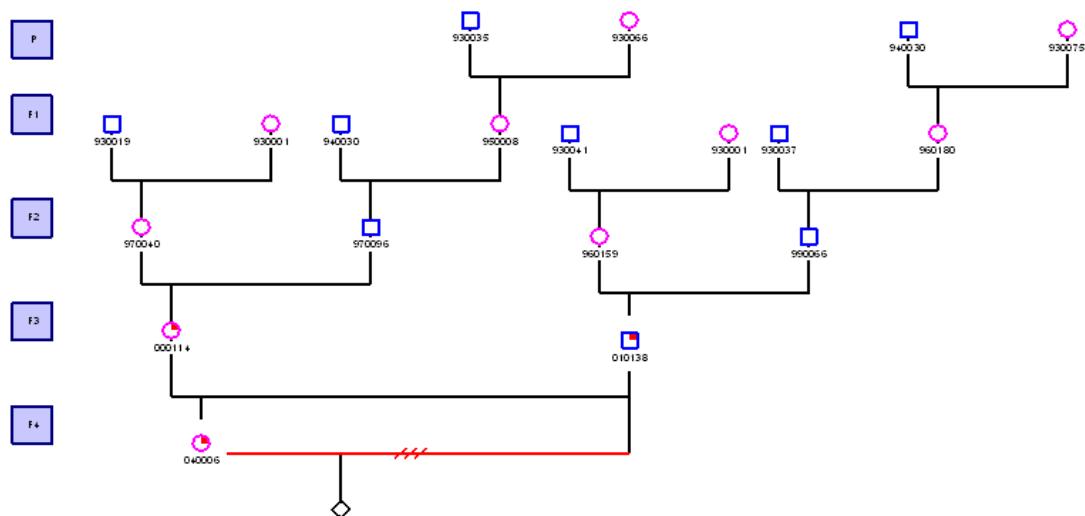
## References

- Aggrey SE (2002) Comparison of three nonlinear and spline regression models for describing chicken growth curves. *Poultry Science* 81: 1782-1788.
- Aggrey SE (2004) Modelling the effect of nutritional status on pre-asymptotic and relative growth rates in a random-bred chicken population. *J Anim Breed Genet* 121: 260-268.
- Bailey TA, P McKinney, and C Stiévenart (2008) Neonatal Diseases. In Disease and medical management of Houbara Bustards and other Otididae. Bailey TA Ed. (Emirates Printing Press LLC, Dubai), 301-317.
- Barbato GF (1991) Genetic architecture of growth curve parameters in chickens. *Theor Appl Genet* 83: 24-32.
- Bohonak AJ, and K van der Linder (2008) RMA for JAVA v.1.21. <http://www.bio.sdsu.edu/pub/andy/RMA.html> (Accessed October 10, 2011).
- Broders O, T Osborne, and M Wink (2003) A mtDNA phylogeny of Bustards (family Otididae) based on nucleotide sequences of the cytochrome b-gene. *J Ornithol* 144: 176-185.
- Chbel F, D Broderick, Y Idaghdour, A Korrida, and P McCormick (2002) Characterization of 22 microsatellites loci from the endangered Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*). *Molecular Ecology Notes* 2: 484-487.
- CITES (2012) The convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. ([www.cites.org](http://www.cites.org)).
- DeNise RSK, and JS Brinks (1985) Genetic and environmental aspects of growth curve parameters in beef cows. *J Anim Sci* 61: 1431-1440.
- Gaucher P, P Paillat, C Chappuis, M Saint Jalme, F Lotfikhah, and M Wink (1996) Taxonomy of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* subspecies considered on the basis of sexual display and genetics divergence. *Ibis* 138: 273-282.
- Gélinaud G, O Combreau, and PJ Seddon (1997) First breeding success in captive-born reintroduced Houbara Bustards. *Journal of Arid Environments* 35: 527-534.
- Gompertz B (1925) On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new method of determining the value of life contingencies. *Phil Trans Royal Soc* 115: 513-585.
- Granjon L, P Gaucher, A Greth, P Paillat, and M Vassart (1994) Allozyme study of two subspecies of Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata undulata*). *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 775-779.
- Grossman M, and BB Bohren (1982) Comparison of proposed growth curve functions in chickens. *Growth* 46: 259-274.
- Hémon S, P Paillat, Y van Heezik, and J Judas (2000) Captive breeding of Houbara Bustard in Saudi Arabia: 11 successful years. *British Poultry Science. Special Issue: Proceedings of the International Conference on Bird Reproduction, Tours, France, September 1999, Volume 41, Supplement 1 S49-S50*.
- Huxley JS (1932) Systematics of lizard family Pygopodidae with implications for the diversification of Australian temperate biotas. *Syst Biol* 52: 757-780.
- Idaghdour Y, D Broderick, A Korrida, and F Chbel (2004) Mitochondrial control region diversity of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* complex and genetic structure along the Atlantic Seabord of North Africa. *Mol Ecol* 13: 43-54.
- IUCN (2011) The International Union for Conservation of Nature. ([www.iucnredlist.org/](http://iucnredlist.org/))
- Laird AK, SA Tyler, and AD Barton (1965) Dynamics of normal growth. *Growth* 29: 233-248.
- Lawrence M, J Deag, and B Dawson (1999) Growth rates of Houbara Bustard chicks. IFCDW Annual Report, R.J.G Dawson and C. Lindsay edition (1999).
- Lesobre L, F Lacroix, A Caizergues, Y Hingrat, T Chalah, and M Saint Jalme (2010) Conservation genetics of Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*): population structure and its implications for the reinforcement of wild populations. *Conserv Genet* 4: 1489-1497.
- Naldo JL, TA Bailey, and JH Samour (1998) Musculoskeletal disorders in Bustard pediatric medicine. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 12: 82-90.
- Naldo JL, TA Bailey, and JH Samour (2000) Radiographic analysis of the growth rate of long bones in Bustards. *Res Vet Sci* 69: 233-240.
- Ostrowski S, M Ancrenaz, M Saint Jalme, and A Greth (1995) Concurrent avian pox and Newcastle disease infection in a Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata*). *Avian Pathology* 24: 573-577.
- Pasternak H, and BA Shalev (1994) The effect of a feature of regression disturbance on the efficiency of fitting growth curves. *Growth Dev. Aging* 58: 33-39.

- Richards FJ (1959) A flexible growth function for empirical use. *J Exp Botany* 10: 290-300.
- Saint Jalme M, P Gaucher, and P Paillat (1994) Artificial insemination in Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*): influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 93-103.
- SAS Institute (2002) SAS/STAT User's Guide. Version 6. 5th Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sokal RR, and FJ Rohlf (1995) Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman.
- Stiévenart C (2002) Monitoring of growth in Houbara Bustard *Chlamydotis [undulata] macqueenii* chicks. Proceedings of the 27th World Veterinary Congress (September 2002, Tunis) 178-179.
- Tieleman BJ, JB Williams, F Lacroix, and P Paillat (2002) Physiological responses of Houbara Bustards to high ambient temperatures. *The Journal of Experimental Biology* 2054: 503-511.
- van Heezik Y, and S Ostrowski (2001) Conservation breeding for reintroductions: assessing survival in a captive flock of Houbara Bustards. *Animal Conservation* 4: 195-201.
- van Heezik Y, and PJ Seddon (1998) Ontogeny of behaviour of hand-reared and hen-reared captive Houbara Bustards. *Zoo Biology* 17: 245-255.
- van Heezik Y, and PJ Seddon (2001) Influence of group size and neonatal handling on growth rates, survival, and tameness of juvenile Houbara Bustards. *Zoo Biology* 20: 423-433.

## CHAPITRE IV

### Caractérisation de la variabilité génétique des outardes Houbara marocaines (*Chlamydotis undulata undulata*) inférée des analyses du pedigree



## INTRODUCTION

Au Maroc, depuis 1993 la sous-espèce (*Chlamydotis undulata undulata*) fait l'objet d'un programme de préservation à Agadir à la Fondation du Prince Sultan Bin Abdul Aziz AL SAUD (IFCDW) et à Errachidia au Desert Ecology Research Station (DERS). Grâce aux fichiers d'élevage et aux outils de génétique moléculaire, une base de données généalogiques a été établie pour répertorier toutes les souches des géniteurs et leurs progénitures en fonction des années. Afin d'évaluer la pertinence de la stratégie de conservation déjà élaborée, l'analyse de la variabilité génétique et de son évolution à partir de l'information des pedigrees s'est avérée nécessaire. En effet, l'analyse des généalogies et des studbooks permet de tester le danger potentiel de la perte de la variabilité génétique, d'évaluer le flux génique et d'investiguer la structure génétique de la population à conserver. Dans la présente étude plusieurs procédures et paramètres généalogiques ont été appliqués. Il s'agit en l'occurrence :

- 1) Des paramètres démographiques comme : (i) l'intervalle de génération  $G.I$  (James 1977), (ii) le pourcentage d'ancêtres connus par rang d'ascendance (ou pedigree completeness) (MacClauer *et al.* 1983) et (iii) le nombre d'équivalents-générations  $ge$  (Maignel *et al.* 1996)
- 2) De la probabilité d'origine des gènes étudiant : (i) le nombre de fondateurs efficaces  $fe$ , (ii) le nombre d'ancêtres efficaces  $fa$  et (iii) le nombre de génotypes fondateurs équivalents  $fge$
- 3) Du coefficient de consanguinité  $F_i$  (Meuwissen & Luo 1992), du coefficient de parenté  $f_{ij}$  (Malécot 1948) et de la taille efficace de la population  $N_e$  évaluée *via* quatre approches différentes :
  - a. Le taux d'accroissement de consanguinité par génération  $\Delta F$  selon Meuwissen & Luo (1992)
  - b. L'accroissement "réalisé" du coefficient de consanguinité par génération  $\overline{\Delta F}$  selon Gutiérrez *et al.* (2009)
  - c. L'accroissement "réalisé" en paire du coefficient de parenté  $\overline{\Delta C}_{jk}$  selon Cervantes *et al.* (2011)
  - d. La variance de la taille de la famille selon Hill (1979).

La terminologie généalogique utilisée est définie dans l'encadré en bas et l'ensemble de la méthodologie appliquée ainsi que les résultats obtenus sont publiés dans l'article 4 paru dans Zoo Biology Journal.

### Encadré : Paramètres généalogiques

#### **Coefficient de consanguinité ( $F_i$ ) (Wright 1951)**

C'est la probabilité pour qu'en un locus choisi d'une façon aléatoire chez un individu, les deux allèles parentaux soient identiques par descente. Le coefficient de consanguinité d'un individu = le coefficient de parenté entre ses deux parents.

#### **Coefficient de parenté ( $f_{ij}$ ) entre deux individus (Malécot 1948)**

C'est la probabilité pour qu'en un locus donné, les deux allèles tirés au hasard soient identiques par descente.

#### **Taille efficace de la population (ou effectif génétique) ( $N_e$ )**

C'est le nombre d'individus d'une population qui se reproduisent et contribuent par leurs allèles à la génération suivante. C'est aussi la taille d'une population idéale présentant le même taux d'accroissement de consanguinité par génération ( $\Delta F$ ) que celui observé dans la population étudiée ( $N_e = \frac{1}{2\Delta F}$ ). La taille efficace de la population est influencée par l'augmentation de la consanguinité et par la dérive génétique.

#### **Taux d'accroissement de consanguinité ( $\Delta F$ ) (Meuwissen & Luo 1992)**

Ce taux est calculé pour chaque génération en appliquant l'équation suivante :  $\Delta F = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$  avec,  $F_t$  et  $F_{t-1}$  les moyennes de consanguinité à la génération  $t$  et  $t-1$  respectivement.

#### **Intervalle de génération (G.I) (James 1977)**

C'est l'âge moyen des parents quand leurs progénitures sont sélectionnées pour procréer.

#### **Pourcentage d'ancêtres connus par rang d'ascendance ou qualité de la généalogie (McCluer *et al.* 1983)**

C'est le pourcentage d'ancêtres connus par génération pour chaque descendant.

#### **Nombre d'équivalents-générations (ge) (Maignel *et al.* 1996)**

Il est calculé pour chaque individu en sommant tous les ancêtres connus selon la formule :  $\left(\frac{1}{2}\right)^n$  avec,  $n$  le rang d'ascendance de l'ancêtre.

#### **Nombre de fondateurs efficaces (fe) (Lacy 1989)**

C'est le nombre de fondateurs qui, s'ils contribuent tous de la même façon, conduiront à la même variabilité génétique que dans la population étudiée.

#### **Nombre d'ancêtres efficaces (fa) (Boichard *et al.* 1996)**

C'est le nombre d'ancêtres (considérés comme fondateurs ou non) qui, s'ils contribuent tous de la même façon, conduiront à la même variabilité génétique que dans la population étudiée. Ce paramètre prend en considération les goulots d'étranglement (bottleneck) surtout quand  $fa < fe$ .

#### **Nombre de génotypes fondateurs équivalents (fge) (Lacy 1989)**

C'est le nombre de génotypes que l'on peut reproduire à partir des gènes encore existants dans la population. Ce paramètre met en évidence la dérive génétique au sein d'une population.

La perte de la diversité génétique par génération se calcule par les deux équations :  $1 - \left(\frac{1}{fe}\right)$  et/ou  $1 - \left(\frac{1}{fge}\right)$ .

## Article 4

### **Genetic variability characterization of the Moroccan Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) inferred from pedigree analysis**

#### **Résumé**

Le pedigree de l'outarde Houbara marocaine a été analysé dans le but d'évaluer la variabilité génétique d'un troupeau élevé en captivité en utilisant des procédures généalogiques. Un groupe d'oiseaux élevés de 1993 à 2004 (WP), contient un total de 531 individus avec 346 femelles et 185 mâles. La population référence (RP) comprenant des individus en âge de reproduction, contient 198 oiseaux répartis sur les cohortes de 2000 à 2004. La proportion des ancêtres enregistrés et connus a été évaluée à 98.23% pour la génération parentale, à 41.19% pour la génération des grands-parents et à 7% pour celle des arrière-grands-parents. L'intervalle de génération chez l'outarde Houbara marocaine a été estimé à 4.64 années. La perte de la variabilité génétique a été caractérisée par les paramètres généalogiques : taille efficace de la population ( $N_e$ ), nombre de génotypes fondateurs équivalents ( $fge$ ), nombre de fondateurs efficaces ( $fe$ ) et nombre d'ancêtres efficaces ( $fa$ ), et ce pour la population référence (RP) ainsi que pour chaque cohorte. Les résultats ont montré l'absence de goulots d'étranglement au sein du troupeau, mais ont révélé une perte de la diversité génétique juste après la phase de l'établissement du programme de conservation. La taille efficace annuelle se calculant moyennant l'accroissement "réalisé" du coefficient de consanguinité ( $\overline{\Delta F}$ ) était égale à 207 individus pour la population référence (RP) et à 1000 pour la population entière (WP). Dans une perspective d'élevage conservatoire, l'information généalogique élucidée par cette étude, se montre utile et souligne l'effet positif de migration pratiquée dans l'élevage et les stratégies de croisements qui pourra garantir une bonne gestion de la variabilité génétique de cette population.

**Mots-clés :** Conservation, taille efficace de population, généalogie, consanguinité, outarde Houbara marocaine.

## RESEARCH ARTICLE

# Genetic Variability Characterization of the Moroccan Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) Inferred from Pedigree Analysis

Amal Korrida,<sup>1\*</sup> Juan Pablo Gutiérrez,<sup>2</sup> Samuel E. Aggrey,<sup>3</sup> and Amal Amin-Alami<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Substances Naturelles, Département de Chimie, Faculté des Sciences d'Agadir, Université Ibn Zohr, Agadir, Morocco

<sup>2</sup>Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Poultry Science, University of Georgia, Athens, Georgia

A Moroccan Houbara Bustard pedigree was analyzed to evaluate the genetic variability in captive breeding population using genealogical approaches. The whole Houbara breeding flock (WP) for the period 1993–2004 was made up of 531 birds comprising 346 females and 185 males. The reference population (RP) comprised 198 individuals ready for reproduction from 2000 to 2004 cohorts. The corresponding percentage of known ancestors was estimated as 98.23% for the parent generation, 41.19% for the grandparent generation and 7.00% for the great grandparents generation. The average generation interval for Houbara was computed as 4.64 years. Genetic variability loss per generation was ascertained using the effective population size ( $N_e$ ), the founder genome equivalent ( $f_{ge}$ ), the effective number of ancestors and founders ( $f_a$ ) and ( $f_e$ ), respectively, for the RP and across each cohort. The results showed no bottleneck events in the breed but some loss of genetic variability just after the initiation of the conservation program. However, the annual effective population size based on the realized increase in inbreeding ( $\Delta F$ ) was estimated to be 207 for the RP and 1,000 for the WP. With regard to conservation breeding schemes, the genealogical evidence presented here is very useful as it revealed the positive effect of migration on Houbara breeding. The mating

\*Correspondence to: Amal Korrida, Laboratoire des Substances Naturelles, Faculté des Sciences d'Agadir, Université Ibn Zohr, Agadir, Royaume du Maroc  
E-mail: amalkorrida11@aol.com

Received 1 February 2012; Revised 18 May 2012; Accepted 25 May 2012

DOI 10.1002/zoo.21030

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

strategies will assist in the future control and management of the genetic variability of this population. *Zoo Biol.* 00:1–14, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Keywords:** conservation; effective population size; genealogy; inbreeding; Moroccan Houbara

## INTRODUCTION

The Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata*) is an avian species that belongs to the Otididae family. It is divided into three subspecies. *Chlamydotis undulata undulata* [Jacquin, 1784] is found in Northern Africa (north Mauritania, Morocco, Algeria to Egypt). *Chlamydotis undulata macqueenii* [Gray, 1832] is found in Asia (from the Middle East to Altai) and lives in Sinai, Arabia, Baluchistan, Jordan, north Caspian Sea, north-west India, Afghanistan, Pakistan, Kazakhstan, Iran, Iraq, and Mongolia. *Chlamydotis undulata fuertaventurae* [Rothschild et al., 1894] is the endemic subspecies to Canary Islands. The International Union for Conservation of Nature [IUCN, 2011] classifies the Houbara species as “vulnerable.” The Houbara is also prohibited from international trade [CITES, 2012]. In Morocco, since 1993, the subspecies has been bred under captivity in HRH Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud International Foundation for Conservation and Development of Wildlife (IFCDW) at Agadir city (30°28'N, 9°55'W) and in the Desert Ecological Research Station at Errachidia city (31°58'N, 4°20'W). A total of 107 clutches were collected from north-eastern Morocco between 1993 and 1995 out of which 19 males and 58 females were artificially hatched and used as “wild stock founders” to establish the breeding and conservation program at IFCDW. During the 1996 breeding season 15 wild birds, and in 1998 five additional wild birds, were collected from Errachidia-Erfoud-Boudnib zone and randomly recruited to be part of the foundation breeding population [IFCDW, ]. A total of 1,455 chicks were successfully hatched in captivity between 1995 and 2000, and 454 were released into the wild. At the onset of the Houbara breeding programme, selection of breeding pairs was not based on molecular profiling nor on paternity tests and the breeding operation was planned only according to breeders’ behavioral charts and cycles (artificial insemination [AI], display, semen collection, and egg laying). However, more attention was given to avoid the most critical mating combinations such as: father/daughter, mother/son, and sister/brother. Fortunately, the majority of the necessary records and database about those breeding charts were kept and electronically stored in Houbara studbook and software.

The continual maintenance of genetic diversity is essential and crucial when conserving local threatened breeds. Furthermore, the level of genetic diversity is linked to population adaptability and consequently to the breed’s capacity to cope and respond to selection [Mäki-Tanila et al., 2010]. Since 1997, Houbara Bustard genetic diversity for both captive and wild birds has been studied and assessed using an array of molecular markers [Dawson et al., 1999; Idaghdour et al., 2004] but no genealogical study has ever been carried out from bustard populations.

The objective of this study was to analyze the genealogical information of the Moroccan captive Houbara Bustards, to ascertain their generation intervals, genetic diversity, inbreeding, and coancestry, and to compare four different approaches computing the  $N_e$  in order to advance genetic and breeding management initiatives and strategies.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling and Paternity Tests

A total of 531 Houbara constitutes the whole population (WP) containing all founders, ancestors, and their offspring. A sample of 110 birds (base population) was made up of wild founders and individuals with unknown parents, and another of 198 individuals from the 2000 to 2004 breeding seasons constitutes the reference population (RP) defined as the population of interest that include living reproductive breeders approaching the last generation. The remaining 223 individuals constitute the population of dead animals from the 1993 to 1999 cohorts. The establishment of the Houbara pedigree and the assessment of paternities were made possible by the utilization of both breeding and molecular information. A set of 22 microsatellites [Chbel et al., 2002] was used to determine paternity of the progeny generated from artificial insemination. Females are usually inseminated by semen mixed from several males in order to enhance the fertilization process and increase the egg production and female reproductive performance.

### Genealogical Parameters

Pedigree information was analyzed by computing demographic parameters for WP, the RP as well as for each cohort using Endog 4.8 [Gutiérrez and Goyache, 2005] genetic software. POPREP program [Groeneveld et al., 2009] was used to illustrate the trends of the mean inbreeding across years.

#### *Demographic parameters*

To reveal the consequences of the applied random mating system and obtain critical information on the variation of the flock and its evolution over time, three demographic analyses were performed. First, the pedigree depth was assessed by computing the proportion of ancestors known per generation for each offspring [MacCluer et al., 1983]. Second, the equivalent complete generation parameter, called also the mean equivalent generation (*ge*) was calculated as defined by [Maignel et al., 1996] as the sum of all known ancestors  $(\frac{1}{2})^n$  where, *n* is the number of the *i<sup>th</sup>* generation separating the individual to each known ancestor, i.e., parents = 1, grandparents = 2, great-grandparents = 3 . . . etc. Third, the evaluation of Houbara generation interval, defined as the mean age of parents when their progeny is selected to be parent, was characterized along four pathways: Mother-Daughter, Mother-Son, Father-Daughter, and Father-Son [James, 1977].

#### *The probability of gene origin*

The probability of transmission of a neutral gene from a parent to its offspring is  $\frac{1}{2}$ , from a grandparent to its progeny is  $\frac{1}{4}$ , from a great-grandparent to its descendant is  $\frac{1}{8}$ , and so on. The pedigree of an individual could be traced back to calculate the probability of the contribution of its eventual founders and/or ancestors to its genome. By definition, ancestors refer to the first two reproductive and unrelated parents at generation 0 whereas founders refer to ancestors with unknown parents. Thus the ancestors could be founders or not. The probability of gene origin allows the study of population genetic structure and the assessment of the contribution of ancestors and founders to the global genetic make up.

#### 4 Korrida et al.

Houbara genetic diversity was characterized by computing the total effective number of founders,  $fe$  [Lacy, 1989] and the total effective number of ancestors,  $fa$  [Boichard et al., 1997]. The parameter  $fe$  is the number of founders that, if contributing in a balanced way, would be expected to produce the same genetic diversity as in the current population. This parameter is computed following the expression  $fe = \frac{1}{\sum_{j=1}^f q_j^2}$  where,  $q_j$  is the probability of genes contributed by the  $j^{th}$  founder and  $f$  is the initial genetic stock of founders. The sum of the probabilities of gene origin  $q_j$  over all founders is equal to 1. It is important to mention that the initial number of founder genes  $f$  is often not completely transmitted to the current population because considerable portions are lost by genetic drift. When all founders equally contribute to the population,  $f$  is equal to  $fe$ .

Parameter  $fa$  refers to the minimum number of ancestors, not necessarily founders, whose contribution to the reference subpopulation is higher than that of their descendants, thus making allowances for bottlenecks in the pedigree.  $fa$  is calculated using the formula  $fa = \frac{1}{\sum_{i=1}^f p_i^2}$  where,  $p_i$  is the probability of genes contributed by the  $i^{th}$  ancestor and  $f$  is the total initial genetic stock of the founders. Sometimes, the application of intensive AI programs within populations could lead to sudden reduction in  $N_e$ , in this case, the effective number of ancestors becomes lower than the effective number of founders ( $fa < fe$ ). Furthermore, in order to determine the most significant ancestors with the major genetic marginal contributions within a population or cohort (i.e. all selected individuals in a particular year or breeding season), we applied Boichard's et al. [1997] algorithm. For each ancestor  $i$ , the computation of the marginal contribution  $p_i$ , defined as the contribution not yet explained by the other already selected ancestors, was performed in an iterative way by subtracting the contribution of the already considered ancestor  $a_i$  from the probabilities of gene origin  $q_i$  following the equation:  $p_i = q_i(1 - a_i)$ . The probabilities of gene origin were then divided by the total number of individuals with the gene of interest so that the ancestor contributions sum to 1. Finally, by ordering the ancestors based on their genetic contributions from the biggest to the smallest, the computation of the most contributing ancestors explaining a desired percentage of genetic diversity in a particular cohort was possible (e.g., 50%).

The concentration of gene origin was also assessed by calculating the number of founder genome equivalents ( $fge$ ) [Lacy, 1989], defined as the number of founders that still exist in the actual population and would be expected to produce the same genetic diversity as in the population under study if the founders were equally represented and no loss of alleles occurred. The parameter  $fge$  was computed as:  $fge = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{2f} f_n^2$ , where  $f_n$  is the gene frequency of the  $n^{th}$  founder and  $f$  is the initial genetic stock of the founders. The  $fge$  takes into account all causes of genetic drift.

To calculate the loss of genetic diversity per generation in a particular RP, i.e., the expected heterozygosity originated by limited numbers of founders and its balanced contribution, we used the  $1 - (\frac{1}{fe})$  equation. A similar formula was applied on the founder genome equivalent parameter  $1 - (\frac{1}{fge})$  as it is directly related to the present coancestry.

### Inbreeding, coancestry, and $N_e$

By definition, the inbreeding coefficient ( $F$ ) is the probability that an individual carries two alleles identical by descent (IBD) [Wright, 1931].  $F$  was computed following Meuwissen and Luo [1992] and the mean  $F$  for each cohort from 1998 to 2004 was obtained by averaging  $F$  of the total individuals  $n$ . The coancestry coefficient between two individuals is the probability that two alleles at a locus taken at random are IBD [Malécot, 1948]. The mean coancestry and inbreeding coefficient of the entire metapopulation and the mean coancestry of subpopulations were used to obtain Wright's [1978]  $F$ -statistics ( $F_{IS}$ ).

An important parameter that describes population genetic diversity as well as viability and conservation strategies is the effective population size ( $N_e$ ). This population estimator defined by Wright [1931], as the number of breeding individuals of an idealized population that would lead to the same calculated inbreeding coefficient, loss of heterozygosity or variance in allele frequency under random genetic drift, is found to be sensitive to inbreeding effect and to selection [Crow and Kimura, 1970; Tallmon et al., 2004]. The ( $N_e$ ) parameter was computed by comparing three different genetic methodologies and one demographic approach. First, via the increase in inbreeding per generation  $\Delta F$  ( $N_{e(b)}$ ) [Meuwissen and Luo, 1992].  $N_e$  was obtained by computing the regression coefficient ( $b$ ) of the individual inbreeding coefficient over the equivalent complete generations, and considering the corresponding regression coefficient as the increase in inbreeding between two generations and consequently,  $N_e = \frac{1}{2\Delta F}$ . Second, based on individual increase in inbreeding coefficient ( $\overline{N}_{e(\Delta F)}$ ) of Gutiérrez et al. [2009] computed as:  $\Delta F = \sqrt[1-t]{1 - F_i}$  where,  $F_i$  is the individual  $F$  coefficient and  $t$  the equivalent complete generation. Effective population size ( $\overline{N}_e$ ), named "realized effective size" by Cervantes et al. [2008], was computed from  $\overline{\Delta F}$  as  $\overline{N}_e = \frac{1}{2\overline{\Delta F}}$  by averaging the  $\Delta F_i$ 's of the  $n$  individuals in a given reference subpopulation. In this study, only individuals with at least two equivalent generations known were used. Third, using the paired increase in coancestry ( $\overline{N}_{e(\Delta c)}$ ) proposed by Cervantes et al. [2011] as  $\Delta c_{jk} = 1 - \sqrt[\frac{g_j+g_k}{2}]{1 - c_{jk}}$  where,  $g_j$  and  $g_k$  are the equivalent discrete generations of the parents  $j$  and  $k$  and  $c_{jk}$  is the inbreeding  $F$  of the  $j$  and  $k$ 's progeny. For idealized populations under random mating, a realized effective population size based on coancestry is computed as  $\overline{N}_{ec} = \frac{1}{2\Delta c}$  by averaging the increase in coancestry for all pairs of individuals in a reference subpopulation. In this study, only individuals with at least one equivalent generation known were used. Finally,  $N_e$  estimator was inferred, using a demographic approach, from the variance family size as proposed by Hill's [1979] equation as:

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{16ML} \left[ 2 + \sigma_{mm}^2 + 2 \left( \frac{M}{F} \right) \text{cov}(mm, mf) + \left( \frac{M}{F} \right)^2 \sigma_{mf}^2 \right] \\ + \frac{1}{16FL} \left[ 2 + \left( \frac{F}{M} \right)^2 \sigma_{fm}^2 + 2 \left( \frac{F}{M} \right) \text{cov}(fm, ff) + \sigma_{ff}^2 \right] \quad (1)$$

where,  $M$  and  $F$  are the number of male and female individuals born or sampled for breeding each time period,  $L$  the average generation interval  $\sigma_{mm}^2$  and  $\sigma_{mf}^2$  are the variances of the male and female offspring of a male,  $\sigma_{fm}^2$  and  $\sigma_{ff}^2$  are the variances

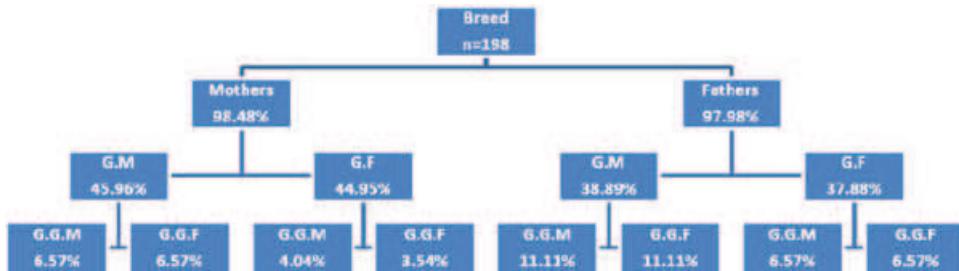


Fig. 1. The completeness level of the Houbara bustard breed assessed by the mean percentage of known ancestors per ascending generations. (G. M and G. F = grandparents, G .G. M and G. G. F = great grandparents).

**TABLE 1.** Generation interval (in years) calculations for the four paths in the whole and reference population

Parents-offspring	WP			RP		
	N	Years	SE	N	Years	SE
Mother-Daughter	57	3.95	0.17	13	4.49	0.57
Mother-Son	26	3.83	0.26	10	4.34	0.42
Father-Daughter	55	4.05	0.20	13	5.26	0.59
Father-Son	24	3.96	0.31	9	4.30	0.62
Total	162	3.97	0.11	45	4.64	0.25

of the male and female offspring of a female, and  $\text{cov}(mm, mf)$  and  $\text{cov}(fm, ff)$  the respective covariances.

## RESULTS

### Demographic Parameters

In Figure 1, the details of the pedigree quality in Houbara RP are shown. The percentage of completeness was computed as 98.23% for the parental generation, 41.19% for the grandparent generation and 7.00% for the third-generation of the great-grandparents. Table 1 gives generation lengths for the four selection paths (parents/offspring) in the WP and RP. The mean generation interval for the RP was equal to 4.64 years and slightly higher than for the WP estimated to 3.97 years. Furthermore, for both populations, generation interval for the selection path between the father and its daughter is the longest (4.05 years in WP and 5.25 years in RP). Across the last 9 years, the mean equivalent generation has known a nonregular increase in its numbers and varied from 0.80 in 1995 to 2.05 in 2004. This could be justified by the irregular inclusions of wild animals, mainly during the 1996 and 1998 breeding seasons. The low values in 2002 are due to the low number of individuals so, to the slightest level of pedigree information (Table 2).

### The Probability of Gene Origin

Table 2 describes the evolution of gene concentration in the WP and RP in addition to within each cohort. The WP and RP have roughly the same effective

**TABLE 2.** Estimates of demographic and gene origin parameters for the whole population, reference population and each cohort

	WP	RP	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2004
Number of individuals	531	198	40	17	20	52	78	58	68	86	67	9	36
Number of founders	113	99	—	—	15	53	47	55	56	68	60	25	45
Number of ancestors	113	99	—	—	15	50	46	53	54	68	58	7	41
Effective number of founders ( <i>fe</i> )	32	34	—	—	11	42	24	36	28	34	29	18	20
Effective number of ancestors ( <i>fa</i> )	32	34	—	—	11	41	24	35	28	34	28	9	20
No. Ancestors explaining 50%	12	13	40	17	4	20	9	14	11	13	10	5	8
Founder genome equivalent ( <i>fge</i> )	—	28	—	—	9	36	21	26	23	26	21	9	13
Mean equivalent generation ( <i>ge</i> )	1.00	1.50	—	—	0.80	0.40	0.90	1.05	1.10	1.26	1.48	1.16	2.05
Generation interval (GI)	3.97	4.64	—	—	1.92	2.93	3.72	3.48	4.90	4.43	5.00	3.82	3.90
<i>F<sub>is</sub></i>	−0.0110	−0.0114											

**TABLE 3.** Top 12 ancestors contributing to genetic variability of the Houbara breed

Ancestors	Sex	Year of birth	Genetic variance (%)	Progeny
930019	♂	1993	8.72	55
930035	♂	1993	6.60	38
930041	♂	1993	6.42	29
930037	♂	1993	5.81	40
930021	♂	1993	4.70	25
930096	♀	1993	3.89	18
930001	♀	1993	3.35	14
940030	♂	1994	2.89	16
960100	♂	1996	2.48	17
940010	♂	1994	2.33	18
930079	♀	1993	1.85	14
940023	♂	1994	1.73	13

number of founders and ancestors (32/32 and 34/34), respectively indicating that no bottlenecks were detected as a combination of an almost nonrandom mating policy and a short pedigree depth. To explain 50% of the genetic variability, a total of 12 and 13 ancestors were enough, respectively in the WP and RP. For the patterns of genetic diversity in the current population, a total of 28 founder genome equivalents were found in the RP. The contribution of the main ancestors to the RP is reported in Table 3. The 12 wild birds explained more than half of the genetic variability within the breed. In terms of number of progeny, the most represented ancestors are the first four sires born in 1993 with 162 chicks and more than quarter of genetic variance. Also, more than 86% of the total founders have contributed to the RP.

The lost genetic diversity using the effective number of founders was calculated to 97.05% per generation and using the founder genome equivalent to 96.42% per generation.

### Inbreeding, coancestry, and $N_e$

The evolution of the average inbreeding ( $F$ ) in relation with the number of inbred animals across years is shown in Figure 2. The number of inbred individuals in 1998, 2000, 2001, and 2004 was 1, 3, 1, and 7, respectively. The total was 11 in RP. The average inbreeding coefficient curve fluctuated according to the number of inbred individuals in each cohort and ranged from 0.22% in 1998 to 1.61% in 2004. The realized increase in inbreeding ( $\Delta F$ ) was concluded from Table 4 and was the same for 1998 and 2000 cohorts (6.525%), estimated to 0.547% for the 2004 season and to 1.125% for the RP. In the same way, paired increase in coancestry ( $\Delta c$ ) was calculated to be 1.113, 1.049, 1.149, 1.204, and 1.297% for 1998, 2000, 2001, 2004 cohorts, and RP, respectively. For inbreeding and coancestry calculations, only cohorts with inbred animal were included. Also, at least two equivalent generations were used in the computation of the  $\Delta F$  parameter otherwise there was no chance of having common ancestors of parents. In turn, if there was no inbred individual in the chosen cohort, the  $N_e$  parameter becomes infinity. For the calculation of  $\Delta c$ , ENDOG uses animals with at least 1 equivalent generation known as they can have common ancestors.

Table 4 represents the effective population size estimates in four cohorts with the number of inbred individuals in RP and compares results following Gutiérrez's

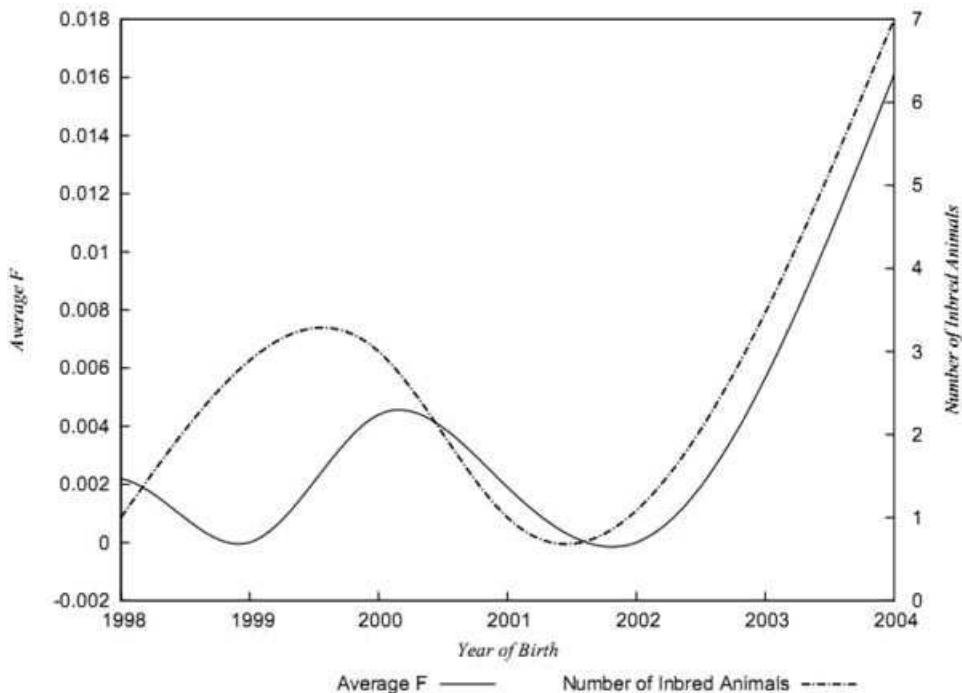


Fig. 2. Evolution of the mean inbreeding  $F$  and the number of inbred individuals per cohort.

**TABLE 4. Estimated effective population size by cohorts and for the reference population**

Cohorts	$n$	$\overline{N}_{e(\Delta F)}$	$n$	$\overline{N}_{e(\Delta c)}$	$N_{e(b)}$
1998	2	8	53	44.92	$\infty$
2000	6	8	86	47.65	-1.06
2001	15	—	66	43.49	$\infty$
2004	22	91.38	36	41.52	13.78
RP	44	44.41	194	38.54	51.79

Estimates are based on individual increase in inbreeding ( $\overline{N}_{e(\Delta F)}$ ), pairwise coancestry ( $\overline{N}_{e(\Delta c)}$ ), and regression on equivalent generations ( $N_{e(b)}$ ).

$n$  refers to the total number of individuals included in calculations.

et al. [2008 and 2009] and Cervantes' et al. [2011] approaches. The estimation of  $N_e$  computed via regression on equivalent generations was calculated to 51.79 and to 44.41 based on realized  $\Delta F$  parameter. Within cohorts, the  $N_e$  via individual increase in coancestry seemed to be the estimate the most stable and reliable and ranged from 41.52 in 2004 to 47.65 in 2000. The same parameter gives a value 38.54 in the RP. The assessment of  $N_e$  from the variance of the family size was presented in Figure 3. This methodology includes strictly individuals being grandparents, so issued from 1993 to 1999 cohorts only. The estimated  $N_e$  ranged from 28 to 67 and was pretty stable along the whole period. Though, the small  $N_e$  value of 28 in 1995 was most likely due to the low number of the breeding animals in this year with only eight females and three males for a  $N_e$  of 20 individuals (results not shown).



Fig. 3. The effective population size estimate per year of birth based on the variance of Houbara offspring.

## DISCUSSION

Moroccan Houbara population was formed from wild birds and eggs collected under license from Errachidia-Boudnib-Erfoud plateau in northeast Morocco. The Houbara bird has a very recent history and a genealogy that could be traced back to 1993. The low mean equivalent generations reflects further the shallowness of Houbara pedigree. The average generation interval of the Houbara population was estimated to 4.64 years and efforts provided in minimizing the inbreeding depression and kinship within the breed explained the increase in generation length parameter over years.

The IFCDW policy has respected the commonly minimum number of 20–30 contributing founders recommended at the foundation of any captive breeding program for the endangered species. Except for the 2002 cohort, the effective number of ancestors  $fa$  and founders  $fe$  were equals in general, and indicated the absence of bottlenecks in the Houbara breed. The founder genome equivalent  $fge$  parameter is fluctuating across generations and this instability is due to the genetic drift phenomenon within Houbara breeding flock. The founding operation was somehow, beneficial for the set up of the Houbara captive flock's genetic characteristics.

In the context of conservation, genetic diversity is inferred from the measure of gene diversity [Wright, 1951] called also Nei's expected heterozygosity [Nei, 1973] and/or from allelic richness [Foulley and Olliver, 2006; Leberg 2002; Petit et al., 1998]. As populations become endangered or size reduced, levels of genetic variation are most probably to be lost and result in a reduction of general fitness as well as in the apparition of inbreeding depression. Moreover, when dealing with finite and threatened species and after the establishment of any conservation system, the diminution of genetic diversity is not often unavoidable [Álvarez et al., 2008; Álvarez et al., 2010; Royo et al., 2007]. In fact, the genetic diversity decrease could be influenced by a multitude of factors such as: the short generation length, the homogenization effect due to the small  $N_e$  or the initial adaptation difficulties to captivity. The captive Houbara was, unfortunately, not an exception to this rule.

To characterize inbreeding depression, the coancestry rate in addition to the inbreeding rate, might constitute the alternative choice [González-Recio et al., 2007]. However, the former two parameters, when working with genealogies, are pedigree (knowledge and deepness) dependant. With regard to heterozygosity also, minimizing coancestry is strongly recommended to maximize the retention of genetic variation of threatened species in captivity [Frankham, 2002]. Álvarez et al. [2008], while working on the loss of genetic variability of the rare Xalda sheep breed, confirmed that for species with shallow pedigrees, coancestry is a more suitable parameter to monitor losses of genetic polymorphism than expected homozygosity and inbreeding especially during the first generations just after the foundation phase of the in situ preservation program. This could be of a great utility for the Houbara species as it would help in a better prediction of the future genetic variability loss within the captive breed.

The average increase in inbreeding was estimated to be 0.235% per generation for the WP and 1.125% for the RP. Even if the latter value is in the top range of the acceptable level of 0.5–1% recommended by the FAO [1998] guidelines for the live-stock populations [Bijma, 2000; Nicholas, 1989], the inbreeding tendency is, however, believed to be low and reflects the management strategy efficiency based on migration. The  $F_{IS}$  parameter deviated from Hardy Weinberg equilibrium and was negative for the (WP = −0.01018) and for the (RP = −0.01432). This small departure from the equilibrium could be interpreted by an outbreeding effect on the resulting offspring. Therefore, it is obvious that in our breeding scheme, the AI procedure have enhanced genetic flux within the Houbara population, thereby limiting inbreeding depression in the population.

The effective population size reveals losses in fitness as well as in genetic variability and is considered as one of the most fundamental parameters that strongly influence the nature and the rate of genetic information transmission across generations, population viability, conservation strategies and wildlife management [Luikart et al., 2010; Waples, 2002]. Different approaches have been employed to calculate the effective population size estimator [Beaumont, 2003; Crow and Kimura, 1970; Hayes et al., 2003; MacLeod et al., 2009; Peel et al., 2004; Tallmon et al., 2008; Wang, 2009; Wright, 1931]. However, the  $N_e$  parameter remains difficult to assess and there is no particular good or magical approach for its calculation [Cervantes et al., 2008; Groeneveld et al., 2009; Luikart et al., 2010].

Our computations of  $N_e$  based on regression of inbreeding on equivalent generations ( $N_{e(b)}$ ) generated a negative value in the 2000 season, indicating that inbreeding in the involved period is not constant and is decreasing. This could happen when the mating policy aims to lower the coancestry after a period in which the crossings between close relative individuals was favored [Cervantes et al., 2008; Gutiérrez et al., 2008].

The plot of  $N_e$  based on family size variance follows the same classical curve as for the captive breeding process with its three major stages: foundation, growth, and maintenance. For Houbara Bustard, the foundation phase corresponded to the 1993–1995 period, the growth stage coincided with 1996 and the maintenance stage started at the end of the 1997 breeding season. In managed small populations, inbreeding and loss of reproductive performance and fitness are inevitable during the foundation stage. Also, as  $N_e$  measures genetic diversity within populations, the decrease of  $N_e$  based on family size variance after the beginning of the conservation program is most in accord with the decrease in genetic diversity during the same period. Our

## **12 Korrida et al.**

methodologies showed that in the case of nonstructured populations like the Houbara, the  $N_e$  estimation from the variance of progeny as well as from the realized coancestry worked well and provided roughly the same  $N_e$  value of 45 individuals.

Small populations are more prone to genetic diversity loss. The breeding and conservation policies consist habitually, in maintaining high the genetic diversity of the stock and minimizing or avoiding inbreeding depression of their future generations. Sometimes, the genealogical information is not sufficient to ascertain genetic variability within small and finite populations with shallow pedigrees. Moreover, the logistic, technical, and financial difficulties and demands encountered when registering pedigrees, suggest the exploration and implementation of tools based on breeding techniques (e.g., cryopreservation) and molecular information both to describe and manage them. In other words, when special breeding strategies are a condition for the financial support of endangered breeds, a critical judgment of the mating system becomes more important [Baumung and Sölkner, 2003]. Indeed, rendering threatened local breeds profitable is, the most likely, the best conservation practice for their survival as it could act independently from the continuous financial assistance and support [Meuwissen, 2009].

## **CONCLUSION**

To our knowledge, there have been no genetic studies on pedigree analysis of the Houbara avian species and this is the first time genetic parameters needed for conservation are computed in bustards. The application of genealogical parameters to characterize the Moroccan captive Houbara breed during 11 years was of great conservation relevance. Actually, despite the strong gene flow signal within the Houbara captive flock, the genetic evidence presented herein, revealed some deficiencies in the breeding strategies during the 2004 breeding season mainly. The increased values in inbred individuals, coancestry, and inbreeding could indeed reflect the low expertise in the breeding operation. This also could be interpreted as a direct consequence of the arbitrary overuse of the artificial insemination technique as well as an absence of a particular vision toward the breed conservation. Since loss of genetic diversity is influenced by the average increase in inbreeding in outbred populations, and in order to achieve a balanced and sustained exploitation of the animal breeders and their gene origins, we do stress on the necessity of regular assessments of the annual and generational inbreeding levels and the set up of a pertinent selection program in parallel besides the routine control of genetic variability, breed characteristics and its specific tendencies under captivity conditions.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to the late Crown Prince, His Royal Highness Prince Sultan Bin Abdul Aziz Al Saud, sponsor and patron of the IFCDW, for His dedication, leadership, and generosity to the environment and protection of Moroccan natural resources and wildlife. We would like also to extend our gratitude to Sheikh Mohamed Bin Khalid Bin Hethlain and to Dr. S. Jadallah for their support and continuous encouragement. We are indebted to Dr. F. Chbel for her early contribution to the pedigree establishment and to two anonymous referees of this manuscript for their highly valuable comments and remarks. Thanks go also to all the persons and former

staff from the IFCDW who had participated from near or far in this work. This study forms a part of the doctoral thesis of the author A. Korrida on Houbara Bustard genetics.

## REFERENCES

- Álvarez I, Royo LJ, Gutiérrez JP, Fernández I, Arranz JJ, Goyache F. 2008. Relationship between genealogical and microsatellite information characterising losses of genetic variability: empirical evidence from the rare Xalda sheep breed. *Livest Sci* 115:80–88.
- Álvarez I, Royo LJ, Pérez-Pardal L, Fernández I, Payeras L, Goyache F. 2010. Assessing losses of genetic variability in the endangered Mallorquí horse. *Czech J Anim Sci* 55:456–462.
- Baumung R, Sölkner J. 2003. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. *Genet Sel Evol* 35:369–383.
- Beaumont MA. 2003. Estimation of population growth or decline in genetically monitored populations. *Genetics* 164:1139–1160.
- Bijma P. 2000. Long-term genetic contributions: Predictions of rates of inbreeding and genetic gain in selected populations. [PhD Dissertation]. Veenendaal, the Netherlands: Wageningen University.
- Boichard D, Maignel L, Verrier E. 1997. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet Sel Evol* 29:5–23.
- Cervantes I, Goyache F, Molina A, Valera M, Gutiérrez JP. 2008. Application of individual increase in inbreeding to estimate realised effective sizes from real pedigrees. *J Anim Breed Genet* 125:301–310.
- Cervantes I, Goyache F, Molina A, Valera M, Gutiérrez JP. 2011. Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigree populations. *J Anim Breed Genet* 128:56–63.
- Chbel F, Broderick D, Idaghdour Y, Korrida A, McCormick P. 2002. Characterization of 22 microsatellites loci from the endangered Houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*). *Mol Ecol Notes* 2:484–487.
- [CITES] The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2012. Available from: <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>.
- Crow JF, Kimura M. 1970. An introduction to population genetics theory. New York: Harper & Row.
- Dawson R. 1999. Aspects of genetic diversity for captive breeding and release of the Houbara Bustard. In: Dawson RJG, Lindsay C, editors. IFCDW Annual Report. Bangor, Northern Ireland: Morrigan Press. p 50–55.
- FAO. 1998. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans: management of small populations at risk. Rome: FAO.
- Foulley JL, Ollivier L. 2006. Estimating allelic richness and its diversity. *Livest Sci* 101:150–158.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- González-Recio O, López de maturana E, Gutiérrez JP. 2007. Inbreeding depression on female fertility and calving ease in Spanish dairy cattle. *J Dairy Sci* 90:5744–5752.
- Gray JE. 1832. *Otis macqueenii*. Illustrations of Indian zoology, chiefly selected from the collection of Major - General Hardwicke. Vol. 2. London.
- Groeneveld E, Westhuizen BD, Maiwashe A, Vorwerd F, Ferraz JB. 2009. POPREP: a generic report for population management. *Genet Mol Res* 8:1158–1178.
- Gutiérrez JP, Cervantes I, Goyache F. 2009. Improving the estimation of realized effective population sizes in farm animals. *J Anim Breed Genet* 126:327–332.
- Gutiérrez JP, Cervantes I, Molina A, Valera M, Goyache F. 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating realized effective sizes from pedigrees. *Genet Sel Evol* 40:359–378.
- Gutiérrez JP, Goyache F. 2005. A note on ENDODG: a computer program for analyzing pedigree information. *J Anim Breed Genet* 122:172–176.
- Hayes BJ, Visscher PM, McPartlan HC, Goddard ME. 2003. Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Res* 13:635–643.
- Hill WG. 1979. A note on effective population size with overlapping generations. *Genetics* 92:317–322.
- Idaghdour Y, Broderick D, Korrida A, Chbel F. 2004. Mitochondrial control region diversity of the Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*) complex and genetic structure along the Atlantic Seabord of North Africa. *Mol Ecol* 13:43–54.
- IFCDW. 1999. Annual report. Bangor, Northern Ireland: Morrigan Press.
- [IUCN] The International Union for Conservation of Nature. 2011. Available from: <http://www.iucnredlist.org/>.
- Jacquin JFFV. 1784. *Psophia undulata*. In: *Beyträge zur Geschichte der Vögel*. p 24.
- James JW. 1977. A note on selection differentials and generation length when generations overlap. *Anim Prod* 24:109–112.
- Lacy RC. 1989. Analysis of founder representation in pedigrees: founder equivalent and founder genome equivalents. *Zoo Biol* 8:111–123.
- Leberg PL. 2002. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Mol Ecol* 11:2445–2449.

- Luikart G, Ryman N, Tallmon DA, Schwartz MK, Allendorf FW. 2010. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conserv Genet* 11:355–373.
- MacCluer J, Boyce B, Dyke L, Weitzkamp D, Pfennig A, Parsons C. 1983. Inbreeding and pedigree structure in standard bred horses. *J Hered* 74:394–399.
- MacLeod IM, Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. 2009. A novel predictor of multilocus haplotype homozygosity: comparison with existing predictors and its use to estimate changing ancestral population sizes. *Genet Res* 91:413–426.
- Maignel L, Boichard D, Verrier E. 1996. Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bull* 14:49–54.
- Mäki-Tanila A, Fernandez J, Toro M, Meuwissen T. 2010. Local cattle breeds in Europe. Development of policies and strategies for self-sustaining breeds. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Malécot G. 1948. Les mathématiques de l'hérédité. In: Masson, Cie, editors. Paris. p 1–64.
- Meuwissen T. 2009. Genetic management of small populations: a review. *Acta Agr Scand A* 59:71–79.
- Meuwissen TI, Luo Z. 1992. Computing inbreeding coefficients in large populations. *Genet Sel Evol* 24:305–313.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321–3323.
- Nicholas FW. 1989. Incorporation of new reproductive technology in genetic improvement programmes. In: Hill WG, Mackay TFC, editors. Evolution and animal breeding. Wallingford, UK: CAB International.
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL. 2004. *NEESTIMATOR*: software for estimating effective population size. Version 1.3. Brisbane, Australia: Department of Primary Industries and Fisheries, Queensland, Australia.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12:844–855.
- Rothschild W, Hartert E. 1894. On a new bustard from the Palearctic region. *Nov Zool* 1:689.
- Royo LJ, Alvarez I, Gutiérrez JP, Fernández I, Goyache F. 2007. Genetic variability in the endangered Asturcón pony assessed using genealogical and molecular information. *Livest Sci* 107:162–169.
- Tallmon DA, Luikart G, Beaumont MA. 2004. Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate Bayesian computation. *Genetics* 167:977–988.
- Tallmon DA, Koyuk A, Luikart G, Beaumont MA. 2008. ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Mol Ecol Resour* 8:299–301.
- Wang J. 2009. A new method for estimating effective population size from a single sample of multilocus genotypes. *Mol Ecol* 18:2148–2164.
- Waples RS. 2002. Evaluating the effect of stage-specific survivorship on the Ne/N ratio. *Mol Ecol* 11:1029–1037.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97–159.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15:323–354.
- Wright S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago, IL: University of Chicago Press.

## CHAPITRE V

**Contrôle et gestion de la diversité génétique dans le programme de conservation *ex-situ* d'un cheptel d'outardes Houbara marocaines (*Chlamydotis undulata undulata*) élevé en captivité**

**⊗⊗**

*It is absolutely imperative that we protect, preserve and pass on this genetic heritage for man and every other living thing in as good a condition as we received it*

*David Ross Brower (1912-2000)*

**⊗⊗**

## INTRODUCTION

Dans les programmes de gestion des espèces en péril élevées en captivité, le maintien et la préservation de la diversité génétique est capital. La perte et la détérioration de la diversité génétique ainsi que l'augmentation de consanguinité peuvent conduire à l'apparition de la dépression de consanguinité, aux goulots d'étranglement, à la non-adaptation aux changements environnementaux et par conséquent, à l'extinction des espèces et des populations (Frankham *et al.* 2002). Parallèlement à l'essor technologique dans le domaine de la biologie moléculaire et de bioinformatique, une grande variété de recommandations et d'approches génétiques et statistiques ont été proposées pour l'étude de la diversité génétique dans le contexte de conservation (Hall & Bradley 1995, Thaon d'Arnoldi *et al.* 1998, Notter 1999, Pritchard *et al.* 2000, Caballero & Toro 2000 et Simianer 2005). Ces techniques se basent généralement sur la mesure de la diversité génique appelée aussi hétérozygotie espérée de Nei (1973) et/ou sur la richesse allélique (Petit *et al.* 1998, Leberg 2002 et Foulley & Ollivier 2006). En 1992, Weitzman a utilisé des méthodes phylogénétiques à base de distances génétiques dans l'analyse de la diversité génétique globale afin de déterminer les priorités de conservation. Cependant, cette démarche a été critiquée du fait qu'elle ne prend pas en considération la diversité intra-populationnelle dans son estimation (Caballero & Toro 2002).

Plus récemment, pour l'étude de la diversité génétique extraite soit à partir des généralogies (pedigrees), soit à partir des marqueurs moléculaires neutres tels que les microsatellites, la stratégie la plus plausible et la plus acceptée est celle visant à minimiser l'apparentement global (Kinship) dans une métapopulation en optimisant et maximisant la contribution des parents aux générations suivantes (Ballou & Lacy 1995, Montgomery *et al.* 1997 et Caballero & Toro 2000). Effectivement, dans le cas des populations subdivisées ou peu structurées, il était montré que cette pratique joue en faveur de la diversité génétique en augmentant l'hétérozygotie espérée et la taille efficace d'une population (Fernández & Toro 1999 et Caballero & Toro 2000).

Outre cela, parmi les causes de diminution de la diversité génétique, la réduction de la taille efficace d'une population ( $N_e$ ). Cette réduction se caractérisant par une réduction du nombre d'allèles, peut agir à long terme sur la pérennité et la survie des espèces. Dans le jargon de génétique des populations et de la biologie de la conservation, le terme goulot d'étranglement ou bottleneck fait référence aux différents processus par lesquels, la variation

génétique se perd suite aux diminutions sévères de la taille des populations. Cornuet & Luikart (1996) et Luikart & Cornuet (1998) ont proposé différents tests et modèles de mutation (IAM, SMM et TPM) pour détecter ce genre d'anomalies et pour décrire la distribution des fréquences alléliques dans une population.

Il est aussi recommandé, dans l'établissement des programmes de conservation pour les espèces élevées en captivité au sein desquelles différentes populations, races, variétés ou sous-populations existent, de savoir quelles sont les unités de conservation qui contribueront le plus à la population finale à préserver et sous quelles proportions. Dans ce chapitre, nous irons dans cette direction et nous étudierons et comparerons les différentes approches qui permettent de mieux quantifier le gain et la perte de la diversité génétique d'un troupeau d'outardes Houbara marocaines de généalogie récente, constitué de populations fondatrices sauvages en plus d'une populations née et élevée en captivité, dans le but de tracer des priorités de conservation et de gestion de l'espèce marocaine.

## MÉTHODOLOGIE

### 1. Échantillonnage

Un total de 799 oiseaux appartenant à 5 populations différentes fait l'objet de cette étude populationnelle. Les individus sont répartis comme suit:

Tableau 1 : Nombres, origines et dates des collectes des cinq populations d'outardes Houbara étudiées ( $n = 799$ ).

Population	Nombre	Origine/localité	Date de la collecte
Population 1	25	Sauvage d'Erfoud	1993-1994
Population 2	21	Sauvage de Boudnib	1993-1994
Population 3	89	Sauvage d'Errachidia	1993-1994
Population 4	562	Captive issue des populations 1, 2 et 3	10 cohortes de: 1995 à 2004
Population 5 (CO6)	102	Sauvage de l'Est du Maroc (vers l'Algérie)	2006

La généalogie des individus nés en captivité (population 4) est disponible grâce au service de paternité fourni par le Département de Génétique de l'IFCDW.

## 2. Purification de l'ADN et amplification par PCR

De l'ADN génomique a été extrait à partir des échantillons du sang stockés dans une solution tampon d'ACD contenant 0.48% d'acide citrique, 1.32% de citrate de sodium et 1.47% de dextrose et amplifié suivant le même protocole cité dans le chapitre I. Les individus ont été génotypés par PCR en utilisant 4 paires d'amorces polymorphes : A210, D117, D110 et A205 dont la première étape de clonage moléculaire, l'isolation et la conception ont été faites par le Genetic Identification Service Inc, USA comme décrit dans (Chbel *et al.* 2002). La révélation des produits PCR a été effectuée par le séquenceur automatique Li-COR.

## 3. Analyses statistiques

### a) Mesure de la diversité génétique en termes de diversité génique ou d'hétérozygotie espérée

L'hétérozygotie totale ( $H_T$ ) et les fréquences alléliques ont été calculées en utilisant les programmes Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) et GenAlex v.6.3 (Peakall & Smouse 2006).  $H_T$  est décomposée en diversité génique inter-populationnelle  $D_{ST}$  et en diversité génique intra-populationnelle  $H_S$  ( $H_T = D_{ST} + H_S$ ). Elle est aussi égale à

l'hétérozygotie espérée totale définie comme:  $H_T = \frac{2n}{2(n-1)} \left( 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)$  avec,  $p_i$  la moyenne

des fréquences alléliques du  $n$  ième allèle dans toutes les populations ou sous-populations

étudiées. Le nombre efficace d'allèles ( $N_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$ ) (Crow & Kimura 1970) et l'indice de

diversité ou d'information de Shannon (1948) ( $I = - \sum_{i=1}^n p_i \ln(p_i)$ ) ont été estimés aussi par

GenAlex. Le logiciel Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) a été utilisé pour l'identification des erreurs de génotypage. La déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg pour chaque population a été investiguée par le test exact de Fisher en utilisant le logiciel GENEPOP (Raymond & Rousset 1995) et en considérant 50000 itérations et 20 "batches".

L'analyse moléculaire de variance (AMOVA) effectuée par Arlequin a permis la quantification de la structuration hiérarchique de la variance génétique aux niveaux intra et inter-populationnels. Le même programme a estimé la différenciation génétique  $F_{ST}$  et sa valeur de probabilité (*P-value*) entre les différentes paires de populations.

### **b) Détection des goulots d'étranglement**

Le programme BOTTLENECK v.1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996 et Piry *et al.* 1999) a permis de tester la prédition théorique suggérant la relation entre l'apparition des goulots d'étranglement et la réduction rapide de la diversité allélique par rapport à la diversité génique. Ce genre d'événements est mis en évidence par l'étude de l'écart à l'équilibre (dérive génétique-mutation). Chez les populations en équilibre, les allèles au niveau des loci sélectivement neutres et leurs hétérozygosités, fluctuent au tour de l'équilibre car ils peuvent être perdus par dérive génétique ou être créées par phénomène de mutation génétique. En dehors des conditions idéales, la réduction de la taille efficace entraîne une réduction du nombre d'allèles et de leurs diversités génétiques. Cependant, la diversité allélique se perd plus rapidement que la diversité génique à cause des allèles rares. Ceci conduit à une diversité génique observée de Nei (1987) (appelée aussi l'hétérozygotie de Hardy-Weinberg) plus grande que la diversité génique espérée sous l'hypothèse de l'équilibre (dérive-mutation) ( $H_{eN} > H_{eq}$ ). Les populations dont les loci exhibent cet excès en hétérozygotie ont été révélées par les modèles mutationnels IAM (Infinite Allele Model), TPM (Two-Phase Model) et SMM (Stepwise Mutation Model). Le test de Wilcoxon, recommandé pour tout nombre de loci supérieur ou égale à 4 et pour n'importe quelle taille de population, a été considéré pour tester la signification de l'excès en hétérozygotie quand la *P-value* est inférieure à 0.05. Le modèle TPM a été simulé pour 10000 itérations avec une variance de 30% et une proportion de 70% en SMM. La présence ou l'absence de bottlenecks a été aussi explorée par des courbes de distributions alléliques (Luikart *et al.* 1998) où une population en équilibre (mutation-dérive) reflète une courbe en mode L (L-shaped), par opposition au mode "Shift" dans le cas des bottlenecks.

**c) Mesure de la diversité génétique en termes d'apparentement moléculaire moyen  $f_{ij}$**

Selon les théories proposées par Caballero & Toro en 2000 et en 2002, la diversité génétique totale ( $DG_T$ ) correspond au complément du coefficient d'apparentement moléculaire global d'une métapopulation ( $DG_T = 1 - \bar{f}$ ). Le coefficient de parenté (appelé aussi coefficient d'apparentement dans le cas de la sélection de parentèle) ( $f_{ij}$ ), est défini comme étant la probabilité que deux allèles tirés au hasard au sein d'une population soient identiques. Les théories de Caballero & Toro (2000) et (2002) sont applicables aussi bien sur les données généalogiques, que sur celles générées par les marqueurs moléculaires neutres. La seule exigence entre les deux approches c'est que le coefficient ( $f_{ij}$ ) entre toutes les paires d'individus, doit être calculé en considérant "l'identité par descendance" dans le cas des pedigrees (Malécot 1948) et en considérant "l'identité en état" dans le cas des marqueurs neutres. D'une manière générale, si l'on considère une métapopulation composée de  $n$  populations de  $N_i$  individus, le coefficient moyen de consanguinité de la population  $i$  est: ( $F_i = 2s_i - 1$ ) avec,  $s_i$  l'auto-apparentement moyen de  $N_i$  individus issus d'une population  $i$ . Dans une matrice de  $f_{ij}$ , le  $s_i$  est la somme des valeurs de la diagonale. La distance

moyenne entre les individus de la population  $i$  et  $j$  est définie comme:  $D_{ij} = \left[ \frac{(s_i + s_j)}{2} \right] - f_{ij}$ .

La distance minimale de Nei (1987) est calculée en appliquant l'équation :

$$D_{ij(Nei)} = D_{ij} - \left[ \frac{(D_{ii} + D_{jj})}{2} \right] = \left[ \frac{(f_{ii} + f_{jj})}{2} \right] - f_{ij} \quad \text{avec, } (f_{ii}) \text{ le coefficient moyen}$$

d'apparentement d'une population  $i$ .

Ainsi, au niveau intra-populationnel, la moyenne:

- Du coefficient moyen d'apparentement s'énonce comme :  $\tilde{f} = \frac{\sum_{i=1}^n f_{ii} N_i}{N_T}$
- De l'auto-apparentement comme:  $\tilde{s} = \frac{\sum_{i=1}^n s_i N_i}{N_T}$

- Du coefficient de consanguinité comme:  $\tilde{F} = \frac{\sum_{i=1}^n F_i N_i}{N_T}$
- De la distance entre individus comme:  $\tilde{D} = \tilde{s} - \tilde{f} = \frac{\sum_{i=1}^n D_{ii} N_i}{N_T}$  avec,  $N_T = \sum_{i=1}^n N_i$  la taille globale de la métapopulation.

L'apparentement moyen et la distance génétique de la métapopulation entière sont

$$\overline{f} = \tilde{f} - \overline{D} = \frac{\sum_{i=1}^n f_{ii} N_i}{N_T} - \overline{D} = \frac{\sum_{i,j=1}^n f_{ij} N_i N_j}{N_T^2} = \sum_{i=1}^n \frac{N_i}{N_T} \left[ f_{ii} - \frac{\sum_{j=1}^n D_{ij} N_j}{N_T} \right] \quad \text{et} \quad \overline{D} = \frac{\sum_{i,j=1}^n D_{ij} N_i N_j}{N_T^2}$$

respectivement. La diversité génique totale ( $DG_T = 1 - \overline{f}$ ) est ainsi composée de la diversité inter-populations ( $DG_{InterP} = \tilde{f} - \overline{f}$ ) et de la diversité intra-populations ( $DG_{IntraP} = 1 - \tilde{f}$ ).

Cette dernière est la somme de la diversité intra-individus ( $DG_{IntraI} = 1 - \tilde{s}$ ) et de la diversité inter-individus ( $DG_{InterI} = \tilde{s} - \tilde{f}$ ). Les contributions  $c_i$  et  $c_j$  de chaque population  $i$  et  $j$  à la génération suivante, peuvent être extraites de la diversité génique totale en appliquant l'équation suivante:  $DG_T = 1 - \overline{f} = 1 - \sum_{i,j=1}^n f_{ij} c_i c_j = 1 - \sum_{i=1}^n c_i \left( f_{ii} - \sum_{j=1}^n D_{ij} c_j \right)$ .

L'ensemble de ces analyses a été effectué à l'aide du logiciel METAPOP v.2.0.a3 (Pérez-Figueroa *et al.* 2009 en version beta 2011) et le calcul de l'apparentement moyen de la métapopulation par le programme MOLKIN v.3.0 (Gutiérrez *et al.* 2005).

#### **d) Mesure de la diversité génétique en termes de richesse et de diversité allélique avec raréfaction**

La richesse allélique ou le nombre d'allèles par locus est estimée en se basant sur la méthode classique de raréfaction proposée par El Mousadik & Petit (1996) et Petit *et al.* (1998). Cette méthode permet de corriger le biais qui résulte des différences de tailles des échantillons et ce, en considérant le nombre d'allèles attendus d'un échantillon dont la taille ( $g$ ) est inférieure à celle d'un autre de taille plus large ( $N_i$ ). Si  $N_i$  représente le nombre total

de gènes d'une population  $i$  et  $N_{ik}$  le nombre de copies du  $k_{ième}$  allèle d'un échantillon appartenant à une population donnée, la richesse allélique dans un locus donné est :

$$A_i = \sum_{k=1}^K (1 - P_{ik}) \text{ avec, } P_{ik} = \frac{\binom{N_i - N_{ik}}{g}}{\binom{N_i}{g}}.$$

Par analogie au coefficient de différentiation génétique  $F_{ST}$ , un coefficient de différenciation de la richesse allélique a été proposé aussi par El Mousadik & Petit (1996):

$$\rho_{ST} = \frac{R_T - R_S}{R_T - 1} \text{ avec, } (R_S = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i) \text{ la richesse allélique intra-populationnelle moyenne,}$$

$R_T$  la richesse allélique totale et  $a_i$  le nombre d'allèles.

La nouvelle méthodologie de Caballero & Rodríguez-Ramilo (2010) se basant sur le principe de raréfaction et la partition de la richesse allélique en une diversité inter et intra-populationnelle, a été également appliquée afin de comparer les deux approches avec raréfaction. Dans ce cas, la diversité allélique intra-populationnelle se calcule comme:

$A_S = R_S - 1 = \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i \right] - 1$  tandis que, la distance allélique moyenne entre les populations  $i$  et

$j$  comme:  $d_{A,ij} = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^K [(1 - P_{ik}) P_{jk} + P_{ik} (1 - P_{jk})]$ . La distance moyenne entre toutes les

populations est donc égale à :  $D_A = \frac{1}{n^2} \left( \sum_{i,j=1}^n d_{A,ij} \right)$ . Par conséquent, la diversité allélique totale

est:  $A_T = A_S + D_A = \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( a_i + \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n d_{ij} \right) \right] - 1 = \left[ \frac{1}{n^2} \sum_{k=1}^K \sum_{i,j=1}^n (1 - P_{ik} P_{jk}) \right] - 1$ . La contribution de

chaque population à la diversité génétique totale peut être aussi déduite de cette équation ainsi

que le coefficient de différenciation allélique qui est égale à:  $A_{ST} = \frac{D_A}{A_T} = \frac{A_T - A_S}{A_T}$ .

Finalement, La méthode de Kirkpatrick *et al.* (1983) s'appuyant sur le logarithme de recuit simulé (simulated annealing), a été utilisée pour ranger les différentes populations en fonction de leurs contributions optimales à un pool génétique artificiel (germoplasme) possédant une diversité génétique maximale. Selon cette approche, les contributions optimales peuvent être appliquées en considérant un facteur populationnel  $\lambda$  qui, selon l'intérêt et la stratégie de conservation, donne du poids et de l'importance à la diversité génique intra et/ou inter-populationnelle ( $H_T = \lambda H_S + D_{ST}$ ) (Fernández *et al.* 2003 et 2008). L'ensemble de ces analyses a été effectué à l'aide du logiciel METAPOP.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### a) Diversité génique et différenciation génétique

Le test de Fisher n'a révélé aucun déséquilibre de liaison génotypique entre les différents loci. Le logiciel Micro-checker n'a également détecté aucun signe de marginalisation d'allèles larges, d'erreurs de génotypage et de profilage, ni d'existence d'allèles nuls. L'amplification des quatre microsatellites a généré 28 allèles au total pour les 799 individus des 5 populations d'outardes étudiées. Aucun allèle privé ou rare n'est détecté pour les populations sauvages d'Erfoud, Errachidia, Boudnib, ni pour la population captive de 1995-2004 par contre, parmi les individus de la population sauvage de 2006 (CO6), 3 allèles (162) ont été révélés au locus D117 (ce qui correspond à une fréquence allélique de 0.015) et 8 allèles (233) au locus A205 (ce qui correspond à une fréquence allélique de 0.039) (Figure 1).

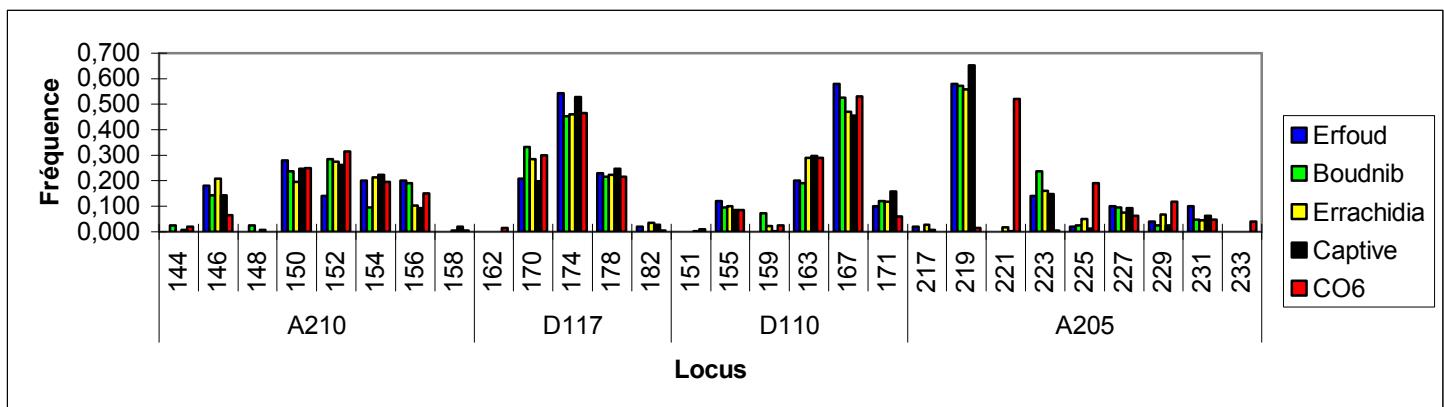


Figure 1: Distribution des allèles et leurs fréquences pour chaque locus étudié.

(N. B: Pour le locus D110, l'allèle 151 a été détecté dans la population CO6 et captive de 1995-2004 mais à une très faible fréquence allélique (0.003) pour la dernière).

La structure allélique détaillée de chaque population est présentée sur la Figure 2.

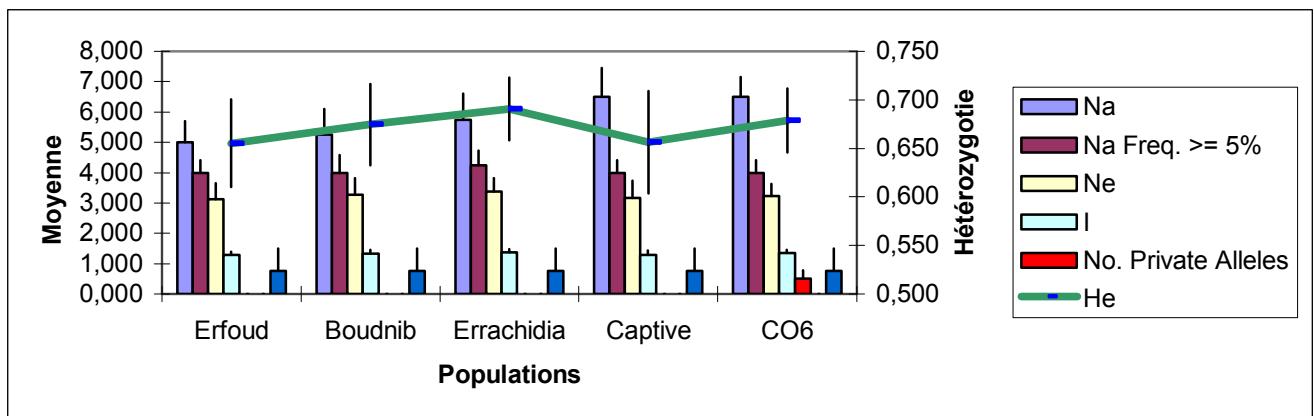


Figure 2: Structure allélique de chaque population. Na: nombre d'allèles, Ne: nombre d'allèles efficaces, I: Indice de Shannon, He: Hétérozygotie espérée et en rouge, le nombre d'allèles rares.

Le Tableau 2 montre l'hétérozygotie espérée ( $H_e$ ) qui varie entre 0.656 et 0.694 pour la population captive et celle d'Errachidia et la valeur de la  $H_e$  totale estimée à 0.686.

Tableau 2: Diversité génique globale et à l'intérieur de chaque population.

Locus	Erfoud	Boudnib	Errachidia	Captive	CO6	Hét. Tot
1	0.8057	0.8141	0.7915	0.7922	0.7769	0.7930
2	0.6232	0.6538	0.6609	0.6217	0.6501	0.6322
3	0.6114	0.6771	0.6738	0.6740	0.6265	0.6670
4	0.6342	0.6190	0.6524	0.5399	0.6740	0.6533
Moyenne	0.6686	0.6910	0.6946	0.6569	0.6819	<b>0.6864</b>
Écart-type	0.0918	0.0854	0.0651	0.1057	0.0662	0.0725

La variabilité génétique quantifiée par l'AMOVA a montré une légère structuration entre les populations d'outardes Houbara, avec 92.25% de variation à l'intérieur des populations contre seulement 7.75% entre les populations. Le coefficient de différenciation s'est montré significatif au seuil 5% ( $F_{ST} = 0.077$ ,  $P\text{-value} < 0.05$ ) (Tableau 3).

Tableau 3: Analyse Moléculaire de Variance (AMOVA).  
(Indice de fixation  $Fst$ : 0.07752) ( $P\text{-value} < 0.05$ ).

Source de variation	Degré de liberté	Somme des carrés	Pourcentage de variation
Inter-populations	4	64.693	7.75
Intra-populations	1593	1520.577	92.25
Totale	1597	1585.270	100.00

Les indices de fixations  $F_{ST}$  et leurs *P-values* entre les différentes paires de populations sont présentés sur le Tableau 4. La population sauvage de 2006 est statistiquement différente de toutes les autres populations captive et fondatrices.

Tableau 4: Par paire de populations, valeurs de  $F_{ST}$  (au dessous de la diagonale) et du *P-value* (au dessus de la diagonale) qui leurs correspondent.

	Erfoud	Boudnib	Errachidia	Captive	CO6
Erfoud	*	0.6666	0.5135	0.5945	0.0000
Boudnib	- 0.0046	*	0.7297	0.2522)	0.0000
Errachidia	- 0.0001	- 0.0046	*	0.2703)	0.0000
Captive	- 0.0017	0.0042	0.0043	*	0.0000
CO6	0.1349	0.1301	0.1227	0.1554	*

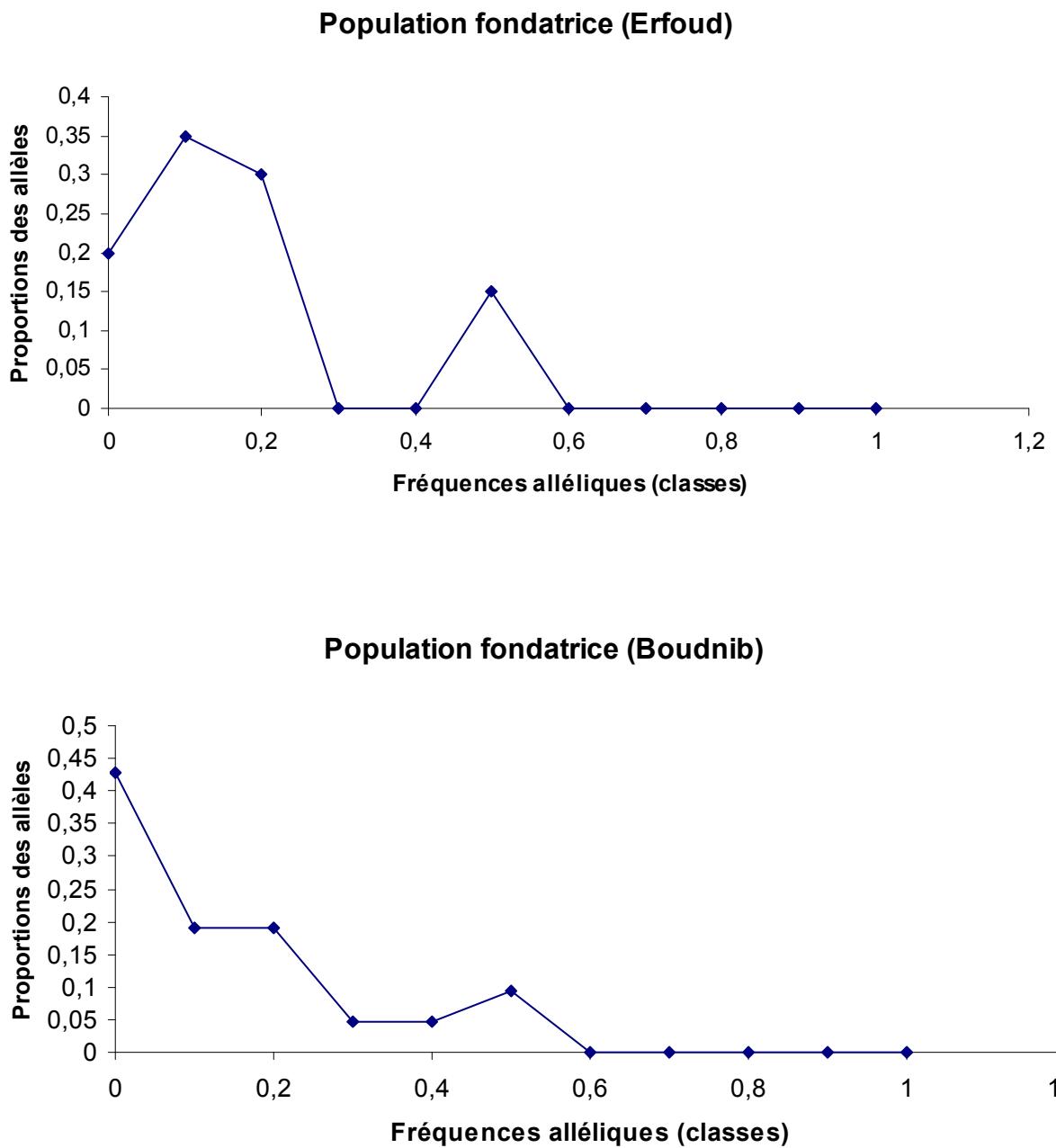
### b) Détection des goulots d'étranglement

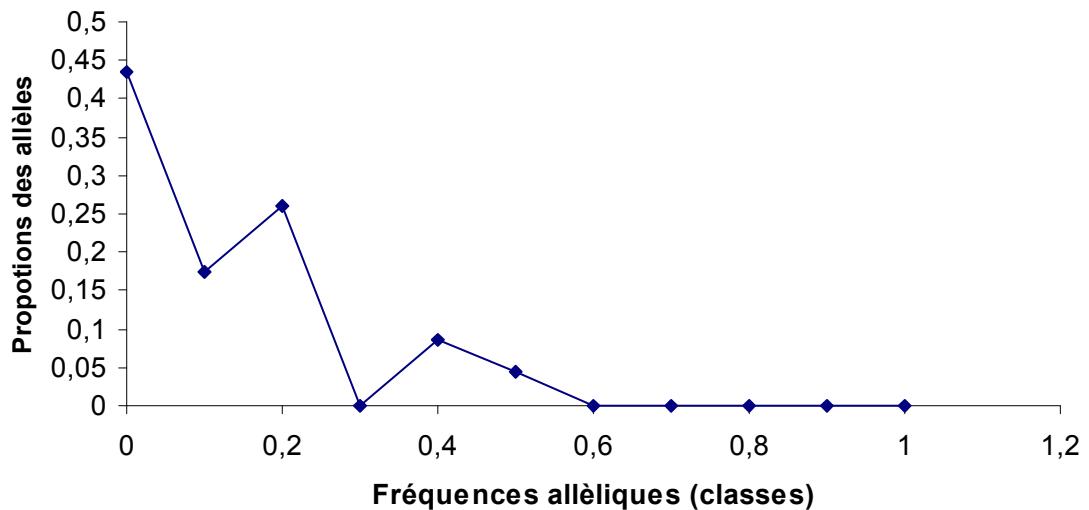
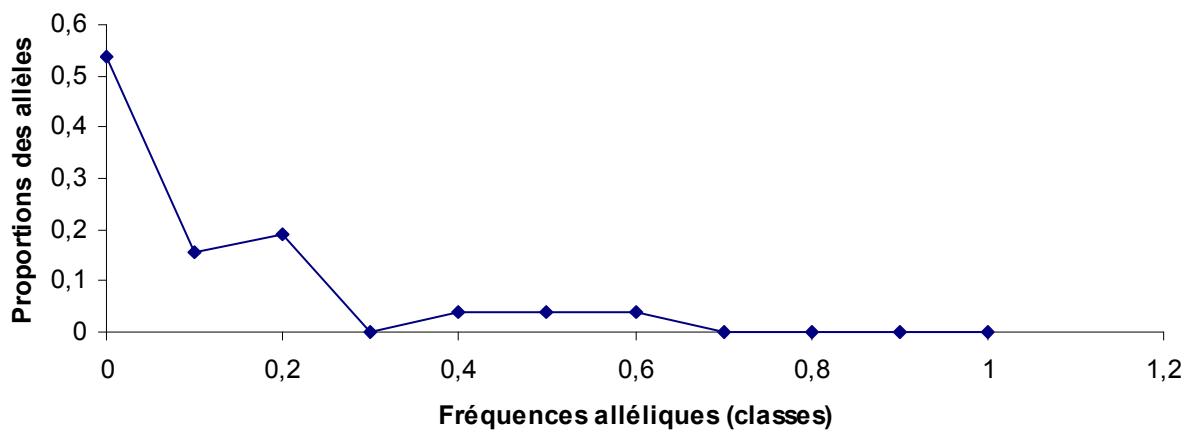
La distribution de l'hétérozygotie espérée ( $H_{eq}$ ) obtenue par le test de Wilcoxon en considérant des méthodes de coalescence sous les modèles IAM, TPM et SMM a été comparée à l'hétérozygotie observée de Nei (1987) ( $H_{eN}$ ) afin de tester l'hypothèse nulle  $H\theta_0$  (absence d'excès d'hétérozygotie). Le Tableau 5 résume les résultats obtenus en appliquant un test unilatéral où la zone de rejet de l' $H\theta_0$  est située dans une seule extrémité lorsque  $P < 0.05$ . Des déviations significatives de l'équilibre (dérive-mutation) et des signes de déclin de la population d'Errachidia, Captive (de 1995 à 2004) et sauvage (de 2006) ont été détectées sous le modèle mutationnel IAM (*P-value* = 0.031 < 0.05)\*. Pourtant, sous les modèles TPM et SMM, aucun test ne s'est montré significatif.

Tableau 5: *P-values* du test de Wilcoxon étudiant les différentes populations sous l'hypothèse nulle de l'équilibre (mutation-dérive génétique) pour les 3 modèles IAM, TPM et SMM.  
*Distribution unilatérale (excès d'hétérozygotie) au seuil  $\alpha = 5\%$ .*

Population	IAM	TPM	SMM
Erfoud	0.062	0.156	0.437
Boudnib	0.062	0.156	0.562
Errachidia	0.031*	0.072	0.437
Population captive de (1995-2004)	0.031*	0.156	0.562
Population sauvage de 2006 (CO6)	0.031*	0.093	0.937

La distribution graphique des fréquences alléliques a révélé que pour la quasi-totalité des populations, les allures des courbes présentent un mode normal sous forme de L, à l'exception de la population fondatrice d'Erfoud, qui montre une distribution en mode shift et suggère la possibilité d'un événement de bottleneck récent (Figure 3).



**Population fondatrice (Errachidia)****Population captive de (1995-2004)**

### Population sauvage de 2006

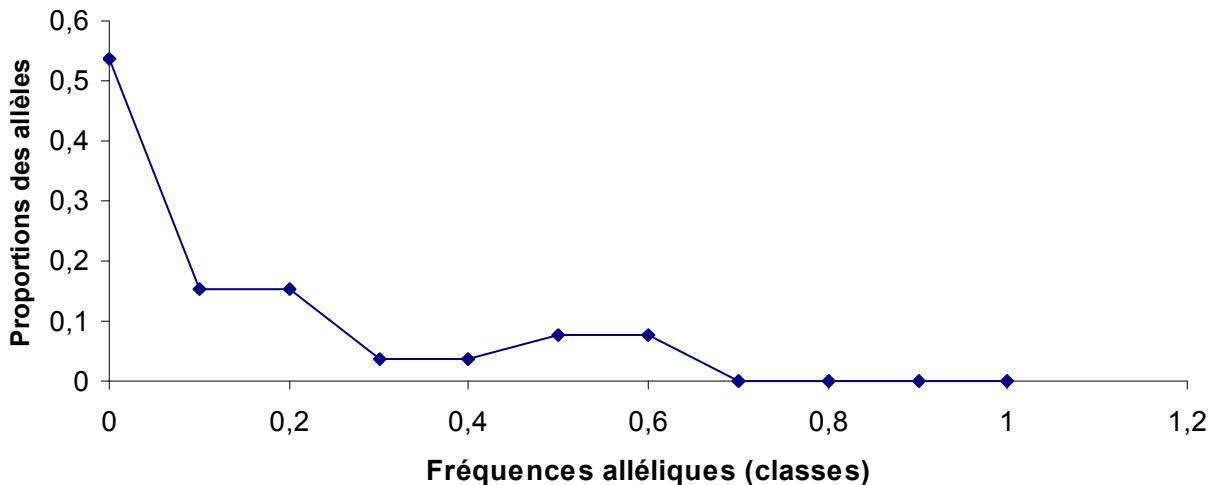


Figure 3: Allures de distributions des fréquences alléliques dans chaque population.

La distribution des fréquences alléliques est une méthode descriptive et qualitative cependant, quand le nombre d'individus dans un échantillon est inférieur à 30, cette méthode pourrait présenter des erreurs et des biais affectant ainsi négativement les tests statistiques (Luikart *et al.* 1998). Du fait que les modèles IAM et SMM représentent les deux modèles extrêmes de mutation (Chakraborty & Jin 1992), il est recommandé de se baser plus sur le modèle intermédiaire TPM dans le test du bottleneck (Piry *et al.* 1999). En effet, il est confirmé que ce modèle est plus plausible et plus approprié dans le cas des microsatellites (Di Rienzo *et al.* 1994 et McEachern *et al.* 2011). Dans la présente étude et sous ce modèle, toutes les populations d'outardes se montraient stables et en équilibre (mutation-dérive). Ceci exclu donc tout changement démographique récent pour ces populations.

#### **c) Mesure de la diversité génétique et de l'apparentement moléculaire moyen**

Le nombre d'allèles par chaque locus et les fréquences alléliques sont présentés dans la Figure 1. La richesse allélique varie entre 5 et 9 pour les loci D117 et A205 respectivement. Les paramètres populationnels ( $f_{ii}$ ,  $s_i$ ,  $F_i$  et  $d_{ii}$ ) et leurs moyennes sont groupés dans le Tableau 6. La population Captive annonce les plus grandes valeurs de consanguinité ( $F_i = 0.4014$ ), d'apparentement moléculaire ( $f_{ii} = 0.3430$ ) et d'auto-apparentement individuel ( $s_i = 0.7007$ ), ceci coïncide aussi avec la baisse de la diversité génétique juste après l'établissement

du programme d'élevage en captivité (Figure 2) et peut donc, évoquer l'éventualité d'un entretien de cette population sous un système rigoureusement fermé.

Tableau 6: Paramètres populationnels.  $f_{ii}$ : coefficient moyen d'apparentement,  $s_i$ : coefficient moyen d'auto-apparentement des individus,  $F_i$ : coefficient moyen de consanguinité et  $d_{ii}$ : distance entre individus.

Population	$f_{ii}$	$s_i$	$F_i$	$d_{ii}$
Erfoud	0.3344	0.6667	0.3333	0.3223
Boudnib	0.3254	0.6429	0.2857	0.3175
Errachidia	0.3094	0.6676	0.3352	0.3582
Captive	0.3430	0.7007	0.4014	0.3577
CO6	0.3216	0.6955	0.3910	0.3739
Moyenne	$\tilde{f} = 0.3361$	$\tilde{s} = 0.6938$	0.3875	0.3576

Parallèlement aux analyses effectuées par le logiciel METAPOP, le coefficient d'apparentement moyen de la métapopulation a été calculé par MOLKIN v.3.0 (Gutiérrez *et al.* 2005) et a été estimé à  $\bar{f} = 0.313104$ . Comme déjà signalé, la population Captive est issue des croisements entre individus des populations fondatrices d'Erfoud, d'Errachidia et de Boudnib ceci peut expliquer d'une part, les valeurs élevées des coefficients  $f_{ij}$  par paires entre cette population et les populations fondatrices (0.3354, 0.3221 et 0.3232) et d'autre part, les faibles valeurs de distance minimale de Nei qui leurs correspondent (0.0070, 0.0042 et 0.0109) (Tableau 7).

La population sauvage de 2006 (CO6) est la plus distante des autres populations d'outardes constituant le cheptel en captivité ( $D_{ij}$  variant de 0.0794 à 0.0986). La distance minimale moyenne de Nei de la métapopulation entière est estimée à ( $D_{ij} = 0.0226$ ). Elle est aussi égale à la diversité génétique inter-populationnelle  $\tilde{f} - \bar{f} = [1 - \bar{f}] - [1 - \tilde{f}]$ . Ce résultat vient en support à celui obtenu par Arlequin dans le Tableau 3, *i.e:* la valeur significative de structuration génétique mesurée à par l'indice  $F_{ST}$  à 0.07752 (AMOVA).

Tableau 7: Valeurs de l'apparentement moyen ( $f_{ij}$ ) et de la distance génétique minimale de Nei ( $D_{ij(Net)}$ ) par paire de population  $i$  et  $j$ .

Populations	$f_{ij}$	$D_{ij(Net)}$
Erfoud – Boudnib	0.3220	0.0105
Erfoud – Errachidia	0.3171	0.0096
Erfoud – Captive	0.3354	0.0070
Erfoud – CO6	0.2412	0.0912
Boudnib – Errachidia	0.3101	0.0073
Boudnib – Captive	0.3232	0.0109
Boudnib – CO6	0.2346	0.0886
Errachidia – Captive	0.3221	0.0042
Errachidia – CO6	0.2360	0.0794
Captive – CO6	0.2337	0.0986

Si les différentes populations sont forcées à contribuer à la génération suivante, les composantes de la diversité génique globale de la métapopulation seront réparties comme

$$\text{suit: } DG_T = 1 - \bar{f} = \left[ \left( 1 - \tilde{s} \right) + \left( \tilde{s} - \tilde{f} \right) \right] + \left[ \tilde{f} - \bar{f} \right] = \left[ 1 - \tilde{f} \right] + \left[ \tilde{f} - \bar{f} \right] = 0.3062 + 0.3576 +$$

$0.0226 = 0.6639 + 0.0226 = 0.6865$  (Tableau 8). La population née en captivité contribue le plus à la diversité totale avec 70% (0.4796). Ceci est peut être dû au nombre élevé d'individus mais surtout, à sa diversité génétique intra-populationnelle qui est égale à 0.4621. La diversité génétique totale inférée est similaire à celle estimée par la méthode de Nei (1987) (Tableau 2).

Tableau 8: Contribution de chaque population à la diversité génique totale.

Population	Contribution à la $DG_{IntraI}$	Contribution à la $DG_{InterI}$	Contribution à la $DG_{IntraP}$	Contribution à la $DG_{InterP}$	Contribution à la $DG_T$
Erfoud	0.0104	0.0101	0.0205	0.0007	0.0213
Boudnib	0.0094	0.0083	0.0177	0.0006	0.0183
Errachidia	0.0370	0.0399	0.0769	0.0022	0.0792
Captive	0.2105	0.2516	0.4621	0.0175	0.4796
CO6	0.0389	0.0477	0.0866	0.0089	0.0955
Total	$1 - \tilde{s} = 0.3062$	$\tilde{s} - \tilde{f} = 0.3576$	$1 - \tilde{f} = 0.6639$	$\tilde{f} - \bar{f} = 0.0226$	$1 - \bar{f} = \mathbf{0.6865}$

L'estimation de la perte et du gain de la diversité génétique permet une meilleure gestion des stocks et des variétés à conserver. Cette estimation se fait en écartant une ou plusieurs populations du pool génétique et en recalculant la diversité génique totale (ou sa contrepartie, *i.e.*: l'apparentement moyen) (Tableau 9). Le retrait de la population Captive augmentera la diversité génique globale de la métapopulation de 4.89%. Par contre, un retrait de la population sauvage CO6 entraînera une perte de 3.40% en diversité génique globale à cause de la diminution de la diversité ou de la distance inter-populationnelle (-3.07 %).

Tableau 9: Diversité génétique globale ( $DG_T | i$ ) après élimination d'une population  $i$  et pourcentage du gain (+) ou de perte (-) de la diversité génique ( $H_T$ ) après retrait de chaque population.

Population retirée	$DG_T   i$	Intra-population (intra-individus)	Intra-population (inter-individus)	Inter-populations	$H_T$
Erfoud	0.6870	-0.1274	0.1662	0.0331	0.07
Boudnib	0.6863	-0.2002	0.1580	0.0160	-0.02
Errachidia	0.6853	-0.4781	-0.0098	0.3141	-0.17
Captive	0.7218	2.2777	-0.0115	2.6324	4.89
CO6	0.6639	0.0381	-0.3588	-3.0796	-3.40

#### d) Mesure de la richesse et de la diversité allélique avec raréfaction

Le Tableau 10 donne les richesses alléliques K sans raréfaction et K(42) avec raréfaction pour l'ensemble des populations étudiées.

Tableau 10: Nombre d'allèles rares et richesse allélique obtenue après raréfaction sur un nombre commun de 42 gènes K(42).

Population	No. allèles privés	No. allèles/locus (K)	No. allèles/locus après raréfaction K(42)
Efroud	0	5.00	4.88
Boudnib	0	5.25	5.25
Errachidia	0	5.75	5.19
Captive	0	6.50	4.82
CO6	11	6.50	5.23
Total	11	7.00	5.29

Les proportions de contribution de chaque population à la diversité allélique totale obtenues après raréfaction sont résumées dans le Tableau 11. La diversité allélique totale est

estimée à  $A_r = 4.6723$  et correspond à la somme de la diversité allélique intra-populationnelle ( $A_s = 4.0733$ ) et inter-populationnelle ( $D_A = 0.5990$ ). Grâce à sa distance allélique inter-populationnelle  $D_A$ , la population sauvage CO6 contribue le plus à la diversité allélique totale avec une valeur égale à 1. Les populations Captive et celle d'Erfoud, contribuent le moins à la diversité allélique avec 0.88 et 0.87 respectivement. La CO6 est en effet, la plus divergente des autres populations en raison du nombre d'allèles privés dont elle dispose. À partir des résultats du Tableau 11, le coefficient de différenciation allélique  $A_{ST}$  a été estimé à 0.1282.

Tableau 11: Contribution (en %) de chaque population à la diversité allélique totale de la métapopulation.

Population	Niveau (intra-population)	Niveau (inter-population)	Total
Erfoud	0.7766	0.0961	0.8727
Boudnib	0.8500	0.1069	0.9569
Errachidia	0.8387	0.1064	0.9450
Captive	0.7620	0.1248	0.8868
CO6	0.8461	0.1649	1.0109
Total	$A_s = 4.0733$	$D_A = 0.5990$	$A_T = 4.6723$

Le Tableau 12 représente les pourcentages du gain (-) et de perte (+) de la diversité allélique recalculés après élimination de chaque population d'outardes. Les résultats obtenus sont en concordance avec ceux du Tableau 11 et montrent bien que la population CO6 est la plus favorable pour le programme et les priorités de conservation, surtout à long terme, contrairement à la population Captive et celle d'Erfoud.

Tableau 12: Gain (-) ou perte (+) de la diversité allélique (en %) après retrait de chaque population.

Population écartée	Niveau (intra-population)	Niveau (inter-population)	Total
Erfoud	-1.0181	-0.9190	-1.9371
Boudnib	0.9455	-0.0617	0.8838
Errachidia	0.6421	-0.5114	0.1307
Captive	-1.4094	0.5196	-0.8897
CO6	0.8399	3.1249	3.9648

Les contributions optimales de chaque population à une banque de germoplasme avicole ou à une lignée artificielle, sont présentées dans le Tableau 13 en considérant différentes valeurs du facteur populationnel  $\lambda$ . Quand ( $\lambda = 1$ ), la population d'Errachidia et sauvage de 2006 contribueront le plus à la diversité génétique maximale (= 0.7239) avec 52.3% et 46.1% respectivement. Selon les fins de chaque programme de conservation, si l'objectif est la maximisation de la composante inter-populationnelle de l'apparentement  $f_{ij}$  (*i.e.*: maximiser la distance entre populations), le facteur  $\lambda$  doit être nul à telle sorte que  $H_T = D_{ST}$ . Si l'on s'intéresse à minimiser l'apparentement total et donc à maximiser diversité totale  $H_T$ ,  $\lambda$  doit prendre une valeur égale à 1. Enfin, si plus d'importance est donnée à la composante intra-populationnelle, la valeur de  $\lambda$  doit être supérieure à 1.

Tableau 13: Contribution de chaque population (en %) au pool génétique synthétique possédant le maximum de diversité génétique ( $DG_{pool}$ ).

Population	Contribution (%)			
	$\lambda = 0$	$\lambda = 1$	$\lambda = 2$	$\lambda = 5$
Erfoud	3.10	0.00	0.00	0.00
Boudnib	3.40	1.50	0.00	0.00
Errachidia	0.00	52.3	57.7	69.3
Captive	44.1	0.00	0.00	0.00
CO6	49.1	46.1	42.3	30.70
$DG_{pool}$	0.7167	0.7239	0.7237	0.7201

Au terme de cette étude comparative, il est éminent de mentionner les points suivants :

A/ La partition de la richesse allélique proposée par Petit *et al.* (1998) est dépendante uniquement du nombre d'allèles privés présents dans une population, à telle sorte que la population ne peut contribuer à la richesse allélique totale, que si elle possède des allèles rares et uniques sans quoi, sa contribution sera nulle. Par opposition à El Mousadik & Petit (1996) et à Petit *et al.* (1998), la procédure proposée par Caballero & Rodríguez-Ramilo (2010), tient en compte les allèles rares et les allèles communs dans l'estimation des différences alléliques inter-populationnelles.

B/ Dans une perspective à long terme, la richesse allélique se voit plus avantageuse que la diversité génique et ce pour deux raisons. Premièrement, elle est la plus sensible aux événements de bottlenecks et donc reflète mieux les fluctuations anciennes de la taille d'une population donnée (Leberg 2002) et deuxièmement, la limite de la réponse à la sélection est souvent déterminée par le nombre initial d'allèles dans une population (James 1970). En revanche, les réponses à court terme à la sélection et à la dépression de consanguinité dépendent directement de la diversité génique.

## **DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSION**



La mise en œuvre d'une stratégie de conservation *ex-situ* des outardes Houbara et Macqueen's repose sur la connaissance de leurs biologies, structures métapopulationnelles et histoires démographiques. La présente thèse de doctorat a procédé à une démarche scientifique multidisciplinaire afin de contribuer efficacement aux mesures de gestion et de préservation de deux ressources aviaires mondiales courant le danger d'extinction (*Chlamydotis undulata*) et (*Chlamydotis macqueenii*). Pour ce faire, la diversité biologique a été mesurée et quantifiée sur plusieurs niveaux (*e.g.* : espèces, sous-espèces, gènes, cheptels et stocks élevés en captivité) et des critères de natures démographiques, morphologiques, biogéographiques et génétiques ont été considérés pour son évaluation et sa quantification. Les résultats générés des différentes études et recherches renforceront la compréhension scientifique sur les outardes Houbara et Macqueen's sauvages et auront des retombées directes et indirectes sur la gestion des populations captives marocaines.

#### **A/ Apports des études génétiques sur les populations sauvages**

Le couple de marqueurs génétiques neutres "microsatellites - ADN mitochondrial" a permis de définir les normes phylogéographiques des populations d'outardes Houbara et Macqueen's de la zone du Paléarctique ainsi que leurs diversités et structures génétiques. L'avantage de l'implémentation des marqueurs moléculaires neutres réside dans leurs pouvoirs à mieux décrire l'histoire des populations, contrairement aux paramètres morphologiques qui sont souvent influencés par les facteurs environnementaux soumis à la sélection naturelle (Avise 1994).

- Analyse par les marqueurs nucléaires microsatellites

Dans les études inter et intra-populationnelles du chapitre I, les microsatellites se sont montrés très utiles surtout lorsqu'il s'agissait de la quantification de la diversité génétique et de la différenciation génétique. Effectivement, ces marqueurs modérément informatifs et variables (PIC = 56%), ont :

- mis en évidence une différenciation génétique significative entre les sous-espèces nord-africaines *Chlamydotis undulata undulata* (Cuu) et *Chlamydotis undulata fuertaventurae* (Cuf) ( $F_{ST} = 0.111$ ), qui pourrait être la conséquence de l'isolement géographique par l'Océan

Atlantique des populations de l'archipel des Îles Canaries de celles des côtes marocaines. Vu d'une part, la proximité géographique entre l'Afrique et les Îles Canaries ( $\sim 110$  km) et d'autre part, les faibles valeurs de variabilité génétique insulaire par rapport à celle continentale, le mécanisme de différenciation le plus probable serait une colonisation selon le modèle migratoire "stepping-stone". Ce modèle qui est plus convenable aux populations naturelles que le modèle en île de Wright (1931), suppose que la migration entre les dèmes et les populations contigües induit une érosion de la diversité génétique due à l'effet fondateur. Comme il était discuté dans les études précédentes de Gaucher *et al.* (1996) et d'Idaghdour *et al.* (2004), ce phénomène de migration aurait été aussi effectué d'une manière exclusivement unidirectionnelle c'est-à-dire, du continent africain vers les îles adjacentes de Fuerteventura et/ou de Lanzarote.

- affirmé le statut taxonomique des espèces africaine (Cuu/Cuf) et asiatique (Cm) surtout par l'analyse de l'arbre phylogénique ME et la méthode Bayésienne de clustering.
- révélé l'absence de structuration génétique significative entre les quatre populations d'outardes marocaines issues d'Errachidia, de Boudnib, d'Erfoud, et de Laayoune ( $F_{ST} Global = 0.006$ ,  $P-value = 0.137$ ), ce qui suggère une capacité relative de dispersion et met en évidence un flux migratoire considérable entre ces populations. Certes ce résultat est en accord avec les résultats de l'étude d'Idaghdour *et al.* (2004) toutefois, l'utilisation de l'analyse des microsatellites dans le chapitre V a montré une légère différenciation génétique lorsqu'une population sauvage récente de 2006 collectée dans les régions orientales limitrophes de l'Algérie, a été incluse dans l'étude ( $F_{ST} Global = 0.077$ ,  $P-value < 0.05$ ). Cette subdivision microgéographique pourra être expliquée par le nombre d'allèles privés révélé dans cette population qui devrait constituer un nouveau réservoir génétique de variation. Ce qui évoquerait donc, l'éventualité d'une fixation de la population (et des allèles) suite à une adaptation locale.

Lesobre *et al.* (2010), en utilisant les résultats de notre précédent travail de recherche (Idaghdour *et al.* 2004) -qui étudiait un fragment de 854 de paires de base de la région mitochondriale de contrôle- et en testant certains de nos marqueurs microsatellites caractérisés dans Chbel *et al.* (2002), ont également signalé une faible structuration génétique entre les populations marocaines et algériennes mais dans leur conclusion finale, ils ont considéré ces deux populations comme une seule unité de conservation. Selon l'échantillonnage, les valeurs

de  $F_{ST}$  changent fréquemment. Dans notre étude même si le spécimen sauvage collecté en 2006 est large et statistiquement significatif ( $n = 102$ ), l'identification des unités biologiques en utilisant les loci microsatellites demeure difficile. Devant ce dilemme, une collecte vaste et représentative de plusieurs populations de l'aire de répartition de la sous-espèce *Chlamydotis undulata undulata* surtout dans le territoire algérien, pourra apporter une réponse pertinente et irrévocable à cette ambiguïté (*i.e.* : différenciation microgéographique (ou Kin group)).

- Étude phylogéographique par le marqueur mitochondrial cytochrome b

L'information phylogéographique joue un rôle important dans l'établissement des stratégies et plans de conservation et plus particulièrement, dans la définition des unités biologiques à préserver. Certes la diversité phylogénétique, l'endémisme et la richesse spécifique constituent les critères en vigueur déterminant des unités de conservation toutefois, le rôle des inférences phylogéographiques réside dans leurs capacités à délimiter les zones d'intérêt aux histoires évolutives particulières qui constituent les unités géographiques de conservation (Hickerson *et al.* 2010).

Dans notre recherche, le séquençage d'un fragment de 1042 paires de bases du gène mitochondrial cytochrome b chez les outardes Houbara et Macqueen's a permis d'examiner la variation génétique chez différentes populations sauvages provenant des régions allant des îles Canaries jusqu'en Asie, d'identifier les facteurs démographiques et historiques qui pourraient expliquer les différentes distributions phylogéographiques contemporaines constatées et finalement, d'estimer les temps de coalescence et de divergence.

L'étude de la phylogéographie comparative, en apportant de nouveaux éléments de réflexion, a pu aussi argumenter les hypothèses sur les scénarios de différenciation et d'expansion populationnelles évoqués dans le premier chapitre. En effet, l'analyse sur la coalescence du complexe Houbara-Macqueen's a soutenu le mécanisme de différenciation suggéré pour les espèces du genre *Chlamydotis*, en mettant en évidence une première isolation entre Houbara (Cu) et Macqueen's (Cm) estimée entre 0.77 et 0.94 millions d'années (MA), suivie d'une seconde phase de divergence à l'intérieur du clade asiatique (Cm) qui eût dû se produire entre 0.26 et 0.38 MA et enfin, un troisième événement de séparation à l'intérieur du clade nord-africain (Cu) qui eût daté à environ (0.19-0.31) MA.

Cette étude a également discuté les processus évolutifs et historiques pouvant expliquer les structures actuelles des différentes populations. Alors que la majorité des phases

de divergence chez les espèces des zones boréales et tempérées sont apparues durant les longues périodes glaciaires, on pense que celles des espèces habitant les zones arides étaient, vraisemblablement, apparues durant les courtes phases interglaciaires comme il a été élucidé chez l'outarde canepetière (*Tetrax tetrax*) par Garcia et ses collaborateurs en 2011. Dans ce cas, les processus d'expansion démographique ne pourraient coïncider qu'avec les longues périodes glaciaires caractérisées par une végétation steppique abondante. Par ailleurs, de faibles structurations phylogéographiques entre les différentes populations d'une même sous-espèce ou métapopulation sont souvent attendues à cause des temps de divergence limités apparus durant les interglaciaires du Pléistocène (Garcia *et al.* 2011 a et b) et Riou *et al.* (2011). Cette théorie est donc explorée chez les outardes Houbara et Macqueen's par la présente étude phylogéographique et les résultats livrés ont révélé que la divergence entre le clade (Cu) et (Cm), correspondait à un intervalle d'extrême aridité associée à l'expansion des déserts au niveau du Paléarctique. Cette expansion pourrait être à l'origine d'événements de vicariance des outardes dans la zone hyperaride du Sinaï/Néguev et de la péninsule Arabique. Il est opportun de signaler qu'à l'exception des outardes du Sinaï/Néguev, prouvées être en voie d'expansion sur leur aire de répartition, les débuts des temps de divergence à l'intérieur des clades (Cu) et (Cm) étaient plus ou moins synchrones et avaient apparus durant les courtes phases interglaciaires du Pléistocène entre 0.191 et 0.384 MA, tout comme prévu pour les espèces des zones arides et désertiques.

### Unités biologiques

Parallèlement au succès empirique des études phylogéographiques, une multitude d'unités biologiques a été proposée dans la littérature scientifique pour identifier les entités biologiques sous-spécifiques (sous-espèces, sous-populations...*etc.*). Ryder était le premier à évoquer en 1986 la terminologie: unités évolutives significatives ou Evolutionary Significant Units (ESU) pour mettre en évidence les populations discrètes exprimant une haute priorité en matière de conservation, existantes à l'intérieur d'une espèce donnée et dans une zone géographique donnée. Ce concept a fait l'objet de beaucoup de critiques durant les deux dernières décennies ce qui a fait émerger de nouvelles définitions, normes et caractéristiques en relation avec les actions et les plans de conservation (Moritz 1994, Waples 1995, Crandall *et al.* 2000, Fraser & Bernatchez 2001, Green 2005 et Cronin 2006). Une des notions les plus utilisées aussi a été définie par Craig Moritz en 1994 pour discerner les composantes des espèces courant le risque d'extinction : les unités de gestion ou Management Units (MU). Ce

terme réfère à toute population démographiquement indépendante ou à tout ensemble de populations réciproquement monophylétiques caractérisées par des différences significatives dans leurs fréquences haplotypiques mitochondrielles et/ou dans leurs fréquences alléliques nucléaires sans considération des différences phylogénétiques des allèles.

En 2000, Crandall et ses collègues ont également proposé une nouvelle théorie pour définir les unités biologiques en se basant sur l'échangeabilité génétique et écologique, récente ou ancienne. Selon ce concept, les événements de migration ou de flux génique correspondent à l'échangeabilité génétique tandis que, les facteurs écologiques qui délimitent les niches subissant des forces stochastiques telles que la dérive génétique et la sélection naturelle, correspondent à l'échangeabilité écologique.

Certaines études génétiques ont effectivement employé ce genre de concepts pour définir les unités biologiques chez les populations d'outardes (Cu) et (Cm). Tandis que Pitra *et al.* (2004) ont confirmé la partition géographique définissant les groupes isolés et anciens de (Cm) et (Cu) comme étant deux sous-espèces ou ESU, et les populations de Macqueen's des régions de reproduction *vs* celles de résidence et d'hivernage comme étant des MU opérationnelles, Idaghdour *et al.* (2004) ont considéré (Cuu) et (Cuf) comme des MU indépendantes puisqu'elles sont géographiquement isolées et démographiquement indépendantes. Récemment aussi, Riou *et al.* (2011) ont révélé une connectivité réduite et des valeurs limitées mais significatives de différenciation génétique entre les populations de Macqueen's résidentes en Egypte et au Yémen et celles migratrices d'Asie Centrale (Iran, Pakistan, Kazakhstan et Mongolie). Ils ont donc considéré comme unités distinctes, les populations issues de l'Ouest du Kazakhstan et du Nord-Ouest de la péninsule Arabique et comme ESU, les Macqueen's de l'Est de la péninsule Arabique.

En se basant sur les résultats de la présente étude phylogéographique et selon la classification dite du "Crosshair" proposée par Crandall *et al.* (2000) et celle proposée par Green 2005, il serait recommandé de traiter (Cuu) et (Cuf) comme deux unités désignables (DU pour Designatable Units) ou ESU ainsi que les populations de Macqueen's Cm *vs* Cm de (Sinaï/Néguev) démontrées être sur le point d'expansion/diversification dans leur zone de répartition.

- *Contraste entre le marqueur mitochondrial et ceux nucléaires*

Le test global de différenciation génétique utilisant le marqueur génétique mitochondrial cytochrome b a montré un niveau de structuration plus élevé de huit fois que

celui employant les marqueurs nucléaires microsatellites (96.22% de variation distribuée entre les sous-espèces vs 12.03%). Cette différence a été aussi ratifiée précédemment en étudiant le marqueur mitochondrial D-loop par Idaghdour *et al.* (2004). Des études génétiques récentes ont également mis en évidence des résultats contradictoires en utilisant les deux types de marqueurs neutres (Paetkau *et al.* 1998, Petit *et al.* 2001, Kerth *et al.* 2002, Johnson *et al.* 2003, Chappell *et al.* 2004, Bowen *et al.* 2005, Brown *et al.* 2005 et Rodríguez *et al.* 2010) dont plusieurs facteurs peuvent expliquer.

**1.** Le taux élevé de mutations des microsatellites par rapport à l'ADN mitochondrial peut induire soit une différenciation génétique considérable qui nécessitera des milliers de générations pour que les différences soient accumulées et fixées à l'intérieur des populations séparées et isolées géographiquement (Whitlock & McClauey 1999), soit au contraire et par erreur, une magnitude faible de différenciation génétique et donc, des valeurs importantes de flux génique entre les populations isolées. Ceci pourrait être expliqué par un événement d'homoplasie et des niveaux importants de polymorphisme intra-populationnel (Hedrick 1999). Seulement, cette dernière éventualité n'a pas eu d'influence sur nos résultats puisque les différents loci ont montré des niveaux élevés et statistiquement significatifs de différenciation surtout entre les groupes et les sous-espèces (chapitre I).

**2.** Dans les populations en équilibre et qui sont caractérisées par des flux géniques égaux entre les deux sexes, la petite taille efficace ( $N_e$ ) des marqueurs mitochondriaux conduit à des valeurs  $F_{ST}$  (ou  $\Phi_{ST}$ ) plus importantes que celles estimées par des marqueurs nucléaires (Kenny *et al.* 2005). En effet, à cause du mode de transmission maternelle des marqueurs d'ADN mitochondriaux et de leur haploïdie, leur taille efficace est quatre fois plus réduite que celle des marqueurs génomiques ou nucléaires (Grobler *et al.* 2011). C'est donc pour cette raison que le système mitochondrial atteigne l'équilibre plus tôt que le système nucléaire (Wilson *et al.* 1985, Birky *et al.* 1989 et Edwards 1997). Toutefois, Chesson & Baker (1996) en comparant les tailles efficaces des loci maternels, paternels et biparentaux selon six scénarios de stratégies de dispersion et de systèmes de reproduction, ont montré que chez les espèces aviaires à lek dont le comportement social de dispersion est contrôlé par des femelles polyandres, la taille efficace  $N_e$  des loci mitochondriaux est trois fois plus grande que celle des loci nucléaires. Plus récemment, en étudiant la génétique des populations du tétras des prairies (*Tympanuchus cupido pinnatus*), Halfmann (2002) et Johnson *et al.* (2003) venaient

aussi confirmer la pertinence du modèle définit par Chesson & Baker en 1996 concernant les espèces aviaires polygynes et à lek, ce qui pourrait expliquer davantage les différentes structures génétiques obtenues dans notre étude.

Le contraste en question ne se justifierait pas uniquement par la ( $N_e$ ) du marqueur génétique neutre considéré mais aussi, par le comportement de dispersion des individus et par la non-stationnarité des populations.

**3.** D'après le modèle simple de structuration populationnelle de Wright (1931), ( $F_{ST}$ ) dépend de la taille efficace de la population à long terme (long-term  $N_e$ ) en plus du taux de migration  $m$  (chapitre I). Cependant, malgré un taux de migration relativement considérable, c'est surtout une  $N_e$  à long terme réduite qui conduit le plus à une différenciation génétique. Chez le guillemot de Brünnich, un oiseau marin appartenant au genre *Uria*, Friesen et ses collaborateurs ont montré en 1996 que dans le cas où un déséquilibre génétique existe au niveau inter-groupe, la structuration génétique intra-groupe sera la plus accentuée et la plus remarquée, qu'il s'agit d'un marqueur nucléaire ou mitochondrial. Grâce à une méthodologie mathématique, ils ont également montré que le temps requis pour atteindre l'équilibre génétique dans une population, est retardé (plus grand) quand la  $N_e$  à long terme est grande et le taux de migration est faible.

Si l'on suppose que l'importante différenciation génétique estimée par le fragment mitochondrial est une conséquence de populations qui sont dans un état de déséquilibre génétique, l'explication la plus vraisemblable à ce phénomène serait un flux migratoire récent mais restreint entre les différentes sous-espèces, régions ou groupes, ce qui implique des fréquences alléliques nucléaires n'ayant pas encore divergé (Friesen *et al.* 1996). Or, selon les résultats de notre étude phylogéographique (chapitre II), l'isolation des trois constituants du genre *Chlamydotis* était bien ancienne et non récente puisqu'elle coïncidait avec les périodes de glaciation du Pléistocène allant de 192 000 à 944 000 années, ce qui montre que (Cuu), (Cuf) et (Cm) avaient suffisamment de temps pour parvenir à l'équilibre génétique. En plus, l'absence de mitotypes partagés entre les ourardes nord-africaines (Cuu et Cuf) et celles asiatiques (Cm) confirme également ces arguments.

4. Le comportement de dispersion demeure alors, le seul mécanisme pouvant élucider les différences de structure génétique entre les marqueurs co-dominants génomiques et mitochondriaux.

La dispersion depuis le group natal pour se reproduire est un trait qui évolue en réponse à la pression de la sélection naturelle. Ce comportement populationnel a été étudié chez les outardes sauvages et réintroduites dans la région de Merzouga et de Boudnib au Sud-Est marocain du printemps 1997 en automne 1999. Les mouvements des outardes ont été suivis par des techniques de télémétrie en plaçant des émetteurs radio (Biotrack, Ltd) et des émetteurs satellites (Microwave Telemetry, Inc) de 20 et 30g sur les dos des individus sujets de l'étude écologique. Les résultats ont confirmé la territorialité des mâles et ont montré que les distances parcourues par des femelles variaient de 10 à 200 km depuis les sites habituels de reproduction (Peške 1999).

La dispersion peut aussi avoir d'importantes conséquences sur le pool génétique des populations (Ferriere *et al.* (2000) et Clobert *et al.* (2001)) et peut être biaisée selon le sexe des individus et selon la nature du système de reproduction d'une espèce ou d'une sous-espèce donnée (*e.g.*: promiscuité, polygynie, monogamie...*etc.*). Très souvent chez les oiseaux, ce biais est en faveur des femelles par contre chez les mammifères, il est en faveur des mâles (Greenwood 1980, Dobson 1982, Clarke *et al.* 1997 et Miller *et al.* 2011). Pour la majorité des espèces aviaires polygynes avec des systèmes socio-reproducteurs de type lek, la dispersion des femelles joue un rôle crucial dans la promotion de la philopatrie et de la territorialité chez les mâles (Haartmann 1949 et Greenwood 1980). Assurément, les mâles philopatriques et fidèles à leurs lieux de naissance, exhibent une meilleure protection et défense des ressources nécessaires pour l'alimentation de leurs partenaires femelles et ce, grâce à leur parfaite connaissance de leurs propres sites nataux. Quant aux femelles, habituellement plus nomades et plus errantes, elles tirent bénéfice de ce type de dispersion en évitant les accouplements entre individus apparentés, ce qui conduit à une réduction globale du risque de consanguinité (Wolff & Plissner 1998 et Nagy *et al.* 2007).

Mais, la sédentarité et la philopatrie des mâles peut aussi induire l'apparition de consanguinité chez les oiseaux (Friesen *et al.* 1996). Ce phénomène pourra être justifié par les valeurs positives des coefficients de fixation  $F_{IS}$  générées à l'intérieur de la quasi-totalité des populations d'outardes sauvages étudiées dans le chapitre I de cette thèse. Malheureusement des fois, lorsque la dispersion est biaisée en faveur du sexe féminin, les patrons de différenciation génétique deviendront difficiles à prédire et à expliquer puisque le flux

migratoire des femelles tend à homogénéiser la distribution des haplotypes mitochondriaux et des génotypes nucléaires, ce qui dissimule généralement l'effet des flux géniques restreints chez les mâles (Piertney *et al.* 2000). Seule une comparaison des loci nucléaires ciblant typiquement les chromosomes sexuels masculins (*i.e.* : le gène CHD-Z) avec ceux maternellement transmis (*i.e.* : de l'ADN mitochondrial), peut remédier à ce problème. Ceci permettrait également d'élucider les non-congruences potentielles rencontrées lors de la quantification des différenciations et des structurations génétiques par les marqueurs génétiques génomiques et mitochondriaux. Actuellement chez les oiseaux, aucun marqueur nucléaire n'est disponible pour élaborer une telle démarche comparative.

## B/ Apports des études génétiques et morphométrique sur les populations captives

- Étude de croissance absolue et allométrique

L'étude allométrique et la description de l'évolution des courbes de croissance absolue est rendue possible grâce à l'application des paramètres et des modèles mathématiques qui sont biologiquement interprétables. Le travail présenté dans le chapitre III constitue la première et unique étude sur les caractéristiques de croissance allométrique et absolue chez les outardes Houbara marocaines. Les analyses ont montré que sous des conditions particulières de captivité, le poids moyen à l'éclosion était de 40g et atteignait le poids de 1.2 kg dans seulement 4 mois. L'allométrie de l'espèce a révélé aussi des valeurs négatives pour la longueur du bec, la circonférence de la poitrine, la tarso-métatarsale et l'envergure des ailes par rapport au poids corporel. Le modèle mathématique de Gompertz-Laird de croissance absolue a également indiqué que les ailes connaissaient une croissance instantanée quotidienne (L) plus rapide que celle de la tarso-métatarsale et du bec, ce dernier qui toutefois atteignait la maturité et l'asymptote plus tôt que tous les autres organes. Ceci pourra expliquer l'importance de chaque partie du corps pour la rémanence et la survie de l'espèce. En effet, le développement rapide des ailes permettra aux oiseaux de faire face aux prédateurs potentiels alors que, chez les poussins Houbara qui dépendent dès leurs bas âges de la protection et des soins de leurs mères, le développement précoce du bec et de la tarso-métatarsale, leurs seront relativement utiles pour le forage et le déplacement.

Il convient aussi de mentionner que pour ce genre d'études morphométriques qui se basent sur les modèles mathématiques de croissance, la sous-prévision des mesures et des pesées initiales est souvent envisageable. Pour corriger ce "biais" et selon les systèmes ou les

espèces étudiées, Grossman & Bohren (1982) ont proposé de restreindre la mesure initiale du poids corporel ( $BW_0$ ), tandis que Pasternak & Shalev (1994) ont recommandé d'utiliser l'inverse de la variance pour mesurer le ( $BW_0$ ). Dans autres études, Mignon-Grasteau *et al.* (1999) suggèrent de fixer le ( $BW_0$ ) entre deux écart-types ( $\sigma$ ) de la moyenne du ( $BW_0$ ) et Koncagul & Cadirci (2010) ont considéré dans une première situation, la moyenne de tous les ( $BW_0$ ) observés au lieu du ( $BW_0$ ) et dans une seconde situation, ils ont fait varier le ( $BW_0$ ) dans un intervalle de  $\pm 3\sigma$  au tour de la moyenne des ( $BW_0$ ) observés. Dans le cas des ourardes Houbara, aucune restriction du ( $BW_0$ ) n'a été effectuée.

Sur le plan pratique, la compréhension du fonctionnement de ces modèles biologiques, pourra fournir une base solide pour la conception et le développement d'une stratégie d'élevage qui facilite la manipulation des trajectoires de croissance selon les fins et les besoins du programme de conservation. Evidemment, les courbes de croissance pourront être exploitées pour :

1. Estimer la période d'âge durant laquelle la croissance squelettique est complète
  2. Donner une idée sur la diététique suivie et comparer les différences entre les régimes alimentaires afin d'éviter les malnutritions et les mortalités éventuelles
  3. Évaluer l'âge des oiseaux découverts à l'état sauvage
  4. Définir l'âge idéal d'abattage
  5. Déterminer les effets de la sélection artificielle.
- Étude généalogique

L'information génétique en cas des populations animales captives peut être extraite de l'étude des pedigrees ou *via* des approches moléculaires utilisant des marqueurs moléculaires comme les microsatellites. Dans cette thèse, ces deux approches ont été utilisées pour explorer l'évolution de la variabilité génétique et l'efficacité du programme de conservation des ourardes marocaines (Cuu) au sein de l'IFCDW.

L'étude du pedigree a permis de décrire pour la première fois, les tendances de la variabilité génétique chez les ourardes Houbara élevées en captivité depuis la création de l'IFCDW en 1993 jusqu'à 2004. L'analyse des fichiers généalogiques ou studbooks a révélé une histoire récente et une généalogie peu profonde du cheptel étudié. Cette faible qualité

d'information est aussi confirmée par le nombre d'équivalents-générations ( $0.8 < ge < 2.05$ ). Les critères générés de la probabilité d'origine des gènes ont dénoté l'absence de goulots d'étranglement dans le stock étudié. Ceci a été mis en évidence par les valeurs relativement similaires et équilibrées des nombres d'ancêtres efficaces ( $fa$ ) et ceux de fondateurs efficaces ( $fe$ ). En revanche, des fluctuations des nombres de génomes fondateurs ( $fge$ ) au cours des générations ont été détectées. Ces instabilités des ( $fge$ ) sont vraisemblablement, la conséquence de la dérive génétique au sein du cheptel.

L'intervalle de génération a connu une augmentation progressive depuis la phase de fondation et a pu mettre en valeur les efforts fournis quant à la limitation de la dépression de consanguinité, surtout entre 1995 et 2002. La bonne stratégie de l'IFCDW à inclure au programme d'insémination artificielle, des individus sauvages en 1996 et 1998, a joué favorablement pour le flux génique et par conséquent, a pu limiter l'apparition de la dépression de consanguinité.

Le dispositif d'établissement des pedigrees a permis aussi d'évaluer *a posteriori* le coefficient de consanguinité, le coefficient de parenté et le taux d'accroissement de consanguinité, en plus de comparer plusieurs méthodes pour calculer l'effectif génétique ( $N_e$ ). Ce dernier paramètre a été évalué à 45 individus reproducteurs pour une population ayant un intervalle de génération de 4.64 années. Selon les directives et les recommandations de la FAO (1998) et afin d'esquiver le phénomène de dépression de consanguinité, la taille efficace d'une population doit être supérieure ou égale à 50 et son taux d'accroissement de consanguinité inférieur ou égal à 1% par génération. Néanmoins, en 2004 des valeurs et des niveaux relativement élevés ont été calculés pour le nombre d'individus consanguins ( $n = 7$ ) et le coefficient de consanguinité moyen (1.61%). De même, l'estimation de l'accroissement en paire du coefficient de parenté ( $\Delta c$ ) et du taux d'accroissement réalisé de consanguinité ( $\overline{\Delta F}$ ) pour la population référence (RP) étaient autant élevées avec des valeurs de 1.297% et de 1.125% respectivement.

Devant cette réalité alarmante, plusieurs explications peuvent émerger: soit il y a un abus de l'opération des accouplements, soit une non-maîtrise de la technique d'insémination artificielle ou tout simplement, une absence voulue de planification des croisements surtout quand le but principal du responsable de l'élevage favorise juste la production et le nombre d'oiseaux (quantité) et non pas la conservation et le maintient de la diversité génétique (qualité).

Toutefois, la méthodologie fondée sur l'analyse du pedigree s'est montrée économique, facile et peu coûteuse car elle s'articule uniquement sur l'étude profonde des livres et des chartes généalogiques. Pour mieux devancer les programmes et les stratégies de conservation à court et à long terme, il est pourtant recommandé, dans le cas des structures généalogiques peu profondes ou ayant des histoires démographiques récentes, de compléter ce type d'études par une approche analysant les variations alléliques et donc, la diversité génétique par des marqueurs moléculaires (Boichard *et al.* 1996) (Voir chapitre V).

- Applications à la gestion et à la conservation *ex-situ* de l'espèce d'ouïarde Houbara marocaine

La gestion de la variation génétique est primordiale aussi bien pour les espèces critiques, celles vulnérables élevées en captivité dans des réserves, des parcs aquatiques, des zoos, des jardins botaniques, que pour les espèces animales sauvages vivant dans leurs milieux originaux et naturels (*in-situ*). Dans les systèmes de reproduction et d'élevage en captivité, le recrutement régulier de nouvelles populations sauvages est souvent bénéfique pour un maintien stable et durable de la variabilité génétique. Cependant, les populations fondatrices sauvages peuvent être spatialement structurées et fragmentées et cette différenciation, en cas de populations finies et isolées, peut conduire à l'apparition de consanguinité et à l'homogénéité génétique et par conséquent, à la détérioration de la variabilité génétique globale.

Chez les ouïardes Houbara élevées en captivité, l'utilisation des marqueurs moléculaires sélectivement neutres a permis une meilleure évaluation et quantification de la diversité génétique (*i.e.*: diversité génique et allélique) et de ses composantes intra et inter-populationnelle. En conséquence, plusieurs conclusions ont émergé et se sont montrées efficaces pour les priorités et les politiques de conservation *ex-situ* de l'espèce. Contrairement au résultat généré dans le chapitre I sur les populations marocaines de Boudnib, d'Erfoud, d'Errachidia et de Laayoune, le coefficient de différentiation  $F_{ST}$  global a indiqué une légère structuration à l'intérieur du nouveau cheptel étudié dans le chapitre V. Les calculs de la diversité génétique totale et de chaque population ont montré que les populations sauvages d'Errachidia, de Boudnib et CO6 possèdent le plus de diversité par rapport à la population sauvage d'Erfoud et Captive de (1995-2004). Les valeurs moyennes d'apparentement et de consanguinité ont confirmé l'origine de la population Captive issue de celles sauvages du

plateau Erfoud-Errachidia-Boudnib. La partition de la diversité génétique totale a également rendu facile l'optimisation de la contribution de chaque population à un pool génétique artificiel ayant le maximum de diversité génétique. Selon Eding *et al.* (2002), Fernández *et al.* (2003) et (2008) et Fabuel *et al.* (2004), le choix de la valeur du facteur populationnel  $\lambda$  dépendra de l'objectif et du but final à atteindre dans cette optimisation. En effet, si l'on vise une réponse à la sélection à court terme, les allèles les plus fréquents et les plus communs doivent être favorisés, dans ce cas, le paramètre  $\lambda$  prendra de petites valeurs. Dans la situation inverse, si l'on veut maintenir et conserver les allèles privés dans la population artificielle, le facteur  $\lambda$  doit prendre des valeurs plus grandes.

Dans une perspective plus générale de conservation et de gestion du troupeau d'outardes de l'IFCDW notamment, si l'objectif final de conservation est de maintenir la diversité inter-populationnelle, la population sauvage CO6 et celle Captive seront les plus favorisées car:

- (i) Elles sont les plus distantes ( $D_{ij} = 0.986$ )
- (ii) Les proportions de contribution à une population synthétique sont considérables (49.1% et 44.1% pour une valeur de  $\lambda = 0$ ).

Cependant, plus de vigilance s'impose durant les opérations de croisements afin d'esquiver le risque de dépression d'exogamie. Dans le cas où la stratégie et les priorités de conservation opteraient pour la préservation de la diversité intra-populationnelle, la population d'Errachidia et celle sauvage CO6 devraient être favorisées vu leurs importantes proportions de contribution pour ( $\lambda = 2$  et  $\lambda = 5$ ).

En pratique également, l'approche la plus adoptée aussi bien pour le maintien de la diversité génétique, que pour la restriction et la limitation de la dépression de consanguinité, est celle visant à optimiser les contributions parentales à la génération suivante *via* la minimisation de l'apparentement global d'une métapopulation (Ballou & Lacy 1995). Cette stratégie conduit à une maximisation de la diversité génétique globale en termes d'hétérozygotie espérée et de taille efficace de la population (Fernández & Toro 1999 et Saura *et al.* 2008).

En réalité, à la sélection des parents géniteurs, doit s'ajouter le système des croisements pratiqués en captivité, étant donné que la structuration et la différenciation génétique dans une métapopulation est directement liée au type de régime d'accouplement

appliqué (circulaire, rotationnel...etc.). Toutefois, l'impact de ce dernier sur la maximisation de la diversité génétique demeure généralement moins important que la contribution des parents géniteurs.

Finalement, la diversité allélique et génique constituent deux critères importants, qui ne sont pas nécessairement équivalents mais, qui sont complémentaires surtout quand il s'agit de la préservation de la diversité génétique et de l'identification des unités de conservation.

### **C/ Retombées socio-économique, culturelle et environnementale**

L'outarde Houbara est une espèce d'intérêt régional, national et international qui constitue une ressource naturelle avec des valeurs, socio-économique, culturelle et environnementale.

- Valeur socio-économique

Selon la FAO (2006), des races et des variétés bien adaptées à des environnements locaux et régionaux spécifiques pourront certainement répondre aux besoins physiques, économiques et culturels des populations humaines. Dans un pays en voie de développement comme le Maroc, la maîtrise sous les conditions de captivité, des techniques de reproduction artificielle des outardes Houbara a facilité dans un premier lieu l'élevage et la domestication de cette espèce. Une bonne gestion génétique et environnementale de la ressource pourra ensuite, assurer la réalisation des programmes de conservation et l'élaboration des stratégies d'exploitation durable, surtout dans les régions rurales au Sud et à l'Est du Maroc où les ressources animales considérées comme source de nourriture sont très limitées.

- Valeur culturelle (en relation avec la fauconnerie)

La chasse des outardes Houbara à l'aide de faucons est une tradition de longue date chez les Arabes (Meinertzhagen 1954 et Upton 1989). Ce patrimoine et héritage culturel a été pratiqué au Maroc même avant l'apparition de l'Islam (Tazi 1980). Les monarchies et les civilisations marocaines s'intéressaient aussi à la fauconnerie et la considéraient comme un sport noble et traditionnel (de Castries 1918-1935). De nos jours, la chasse au vol est encore pratiquée dans la région des Doukkala (El Jadida) par la tribu des Chorafa QUASSEMS. Afin de conserver la pratique de cet art ancestral, des autorisations de chasse sont délivrées par Le

Haut Commissariat des Eaux et Forêts et la Lutte Contre la Désertification aux associations des fauconniers comme l'Association Marocaine des Fauconniers Al Noubala (AMFN) dont le Président d'honneur est le Prince Moulay Rachid.

Malheureusement actuellement, l'un des principaux facteurs ayant mené au déclin rapide de l'outarde Houbara au Maroc est la chasse excessive, non-rationnelle et illégale. En effet, loin des principes nobles de la tradition séculaire de fauconnerie, certains fauconniers des pays du Golfe emploient en plus des faucons, des équipages sophistiqués constitués de véhicules 4X4, de camions et de fusils pour l'abattage et la poursuite des outardes Houbara, proie préférée des rapaces et leurs maîtres (Voir annexe).

Il est nécessaire de signaler aussi que malgré le statut vulnérable de l'espèce marocaine, aucune mesure législative ou réglementaire particulière ne traite le cas de cette ressource cynégétique en péril. Plus d'efforts devraient être fournis dans ce sens et d'autres études devraient être menées pour rétablir l'équilibre entre cette ressource naturelle et la pratique de la fauconnerie puisque, seule une utilisation durable et une gestion raisonnable des outardes Houbara participera à la préservation, au développement et à la transmission de la fauconnerie au sein des populations humaines.

- Valeur environnementale (en relation avec la sensibilisation du public)

La préservation et la conservation de la faune est la responsabilité des gouvernements, des communautés scientifiques, des entreprises et des particuliers. La promotion du développement durable et le succès des politiques de conservation dépendent en partie de l'éducation et de la sensibilisation du public. Malgré l'absence de donnée spécifiques (officielles) et/ou de statistiques récentes et actualisées sur les outardes Houbara marocaines, ce genre de projets de recherche a permis d'améliorer nos connaissances scientifiques sur la biologie et l'évolution de cette espèce. Il pourra également contribuer à la sensibilisation du grand public en général et des communautés bédouines en particulier à l'environnement, à la biodiversité et à la vulnérabilité de l'espèce Houbara afin de les impliquer ainsi dans le processus de protection de la faune et des écosystèmes (Voir annexe).

## **PERSPECTIVES & RECOMMANDATIONS**

## A/ Perspectives

Les résultats de nos recherches se sont montrés prometteux pour une bonne et durable exploitation des outardes Houbara et les applications des différentes méthodologies devraient convaincre et conquérir les décideurs et les responsables dans le domaine scientifique, de l'environnement et de l'élevage conservatoire.

Parallèlement, il serait intéressant d'approfondir le travail sur les caractéristiques de croissance par une étude sur la dynamique de croissance relative chez les outardes élevées en captivité selon des régimes nutritionnels variés. Ceci permettrait de suivre et d'évaluer l'effet de la sélection artificielle sur les individus captifs.

Il serait aussi envisageable de poursuivre la recherche sur le lien entre la diversité génétique et la valeur sélective (fitness) pour certains traits génétiques d'intérêt comme : la fertilité, la qualité et la quantité des spermatozoïdes, la qualité et la quantité des œufs, la viabilité, la résistance aux maladies...etc.

Les résultats préliminaires sur le CMH sont très encourageants et méritent d'être publiés et partagés avec la communauté scientifique, une fois le projet serait achevé.

L'outarde Houbara présente une valeur ajoutée et des potentialités considérables au tourisme écologique, désertique et respectueux de l'environnement. Une telle initiative permettra l'élaboration de projets tels que :

- La mise en place d'espaces de comptage et d'observation d'oiseaux à l'état sauvage
- La création des parcs récréationnels offrant des tournées guidées sur les différentes techniques de conservation *ex-situ* et *in-situ* de l'espèce.

Ce genre de projets visant un tourisme vert et durable sera bénéfique pour les populations locales. En effet, il permettra un partage du savoir et des revenus et par conséquent, il favorisera l'engagement et l'adhésion aux responsabilités environnementales.

## B/ Recommandations

L'outarde Houbara est une ressource naturelle qui constitue une valeur effective pour l'humanité et pour les écosystèmes. Pour ce, il sera vivement conseillé de :

- Élaborer un programme national de recensement et de monitorage des populations sauvages
- Promouvoir les programmes de recherche scientifiques sur l'espèce et encourager les formations techniques ainsi que les publications scientifiques en relation avec sa gestion durable et sa conservation *in-situ* et *ex-situ*
- Encourager la coopération et le partage des expertises entre les centres de recherche, les universités, les institutions et les ONG se basant au Maroc, pays d'origine et fournisseur de la ressource naturelle
- Adopter des mesures pour les centres privés d'élevage et de production, en vue de résérer des troupeaux viables et de bonne qualité (quotas) pour la réhabilitation de l'espèce dans son milieu naturel.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**A**

Aggrey SE (2002) Comparison of three nonlinear and spline regression models for describing chicken growth curves. *Poultry Science* 81: 1782-1788.

Aharoni J (1912) *Orn. Jahrb.* 23: 1-15.

Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19(6): 716-723.

Alekseev A F (1985) The Houbara bustard in the northwest Kyzylkum. *Bustard Studies* 3: 87-92.

Anthony NB, Emmerson DA, Nestor KE, Bacon WL (1991) Comparaison of growth curves of weight selected populations of Turkey, Quails and Chickens. *Poultry Science* 70: 13-19.

Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.

Azafzaf H, Sande E, Evans SW, Smart M, Collar NJ (2005) Threatened Birds of Africa. International Action Plan for North African Houbara Bustard *Chlamydotis undulata undulata*.

**B**

Ballou JD & Lacy RC (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. In *population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small population management*. New York: Columbia University Press, 76-111.

Barbato GF (1991) Genetic architecture of growth curve parameters in chickens. *Theor. Appl. Genet.* 83: 24-32.

Beaumont MA & Bruce R (2004) The Bayesian revolution in genetics. *Nature* 5: 251-261.

Belkhir K, Borsig P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2003) GENETIX 4.04, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Adaptations, UMR5171, Université de Montpellier 2, Montpellier, France.

BirdLife International (2012) Species factsheet: *Chlamydotis undulata* [<http://www.birdlife.org/datazone/speciesfactsheet.php?id=2769>].

Birky-Jr CW, Fuerst P, Maruyama T (1989) Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* 121: 613-627.

Bohonak AJ & van der Linder K (2008) RMA for JAVA v.1.21. <http://www.bio.sdsu.edu/pub/andy/RMA.html> (Accessed October 10, 2011).

Boichard D, Maignel L, Verrier E (1997) The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet. Sel. Evol.* 29: 5-23.

Boichard D, Maignel L, Verrier E (1996) Analyse généalogique des races bovines laitières françaises. *INRA Prod. Anim.* 9(5): 323-335.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davies RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.

Bourass K, Léger JF, Zaime A, Qninba A, Rguibi H, El Aghbani MA, Benmoussa A, Hingrat Y (2012) Observations on the diet of the North African Houbara bustard during the non-breeding season. *Journal of Arid Environments* 82: 53-59.

Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.* 14: 2389-2402.

Broderick D, Idaghdour Y, **Korrida A**, Hellmich J (2003) Gene flow in great bustard populations across the Strait of Gibraltar as elucidated from excremental PCR and mtDNA sequencing. *Conservation Genetics* 4: 793-800.

Broderick D, **Korrida A**, Idaghdour Y (2001) Diversity in the Last Remaining Wild population of Bald Ibis (*Geronticus eremita*). Results inferred from Mitochondrial DNA sequence data: I.A.G.N.B.I (International Advisory Group of Northern Bald Ibis) Newsletter 1, September 2001.

Broders O, Osborne T, and Wink M (2003) A mtDNA phylogeny of bustards (family Otididae) based on nucleotide sequences of the cytochrome b-gene. *J. Ornithol.* 144: 176-185.

Brosset A (1961) Ecologie des oiseaux du Maroc Oriental. *Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien. Série Zoologique* 22: 1-150.

Brown JM, Lemmon AR (2007) The importance of data partitioning and the utility of Bayes factors in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* 56: 643-655.

Brown KM & Baltazar GA, Hamilton MB (2005) Reconciling nuclear and mitochondrial marker estimates of population structure: breeding population structure of Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Heredity* 94: 606-615.

Burnham KP & Anderson D (2002) Model selection and multi-model inference: a practical Information-Theoretic Approach, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.

## C

Caballero A & Toro MA (2000) Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genet. Res.* 75: 331-343.

Caballero A & Toro MA (2002) Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Genet.* 3: 289-299.

Caballero A, Rodríguez-Ramilo ST (2010) A new method for the partition of allelic differentiation within and between subpopulations and its application in conservation. *Conserv. Genet* 11: 2219-2229.

CDB. Convention sur la diversité biologique [[www.cbd.int](http://www.cbd.int)].

Cervantes I, Goyache F, Molina A, Valera M, Gutiérrez JP (2011) Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 128: 56-63.

Chakraborty R & Jin L (1992) Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. *Hum. Genet.* 88: 267-272.

Chammem M, Khorchani T, Boukhris M, Combreau O, Chniti L, Hammadi M (2003) L'Outarde houbara *Chlamydotis undulata undulata* en Tunisie : statut actuel et distribution géographique. *Alauda* 71 : 41-47.

Chappell DE, Van den Bussche RA, Krizan J, Patterson B (2004) Contrasting levels of genetic differentiation among populations of wolverines (*Gulo gulo*) from northern Canada revealed by nuclear and mitochondrial loci. *Conserv. Genet.* 5: 759-767.

Chbel F, Broderick D, Idaghdour Y, **Korrida A**, McCormick P (2002) Characterization of 22 microsatellites loci from the endangered Houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*). *Molecular Ecology Notes* 2: 484-487.

Chesser RK (1991) Gene diversity and female philopatry. *Genetics* 127: 437-447.

Chesser RK & Baker RJ (1996) Effective sizes and dynamics of uniparentally inherited genes. *Genetics* 144: 1225-1235.

CITES (2012) Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction. [[www.cites.org](http://www.cites.org)].

Clarke A, Sæther BE, Roskaft E (1997) Sex biases in avian dispersal: a reappraisal. *Oikos* 79: 429-438.

Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.

Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichols JD (2001) Dispersal. Oxford University Press.

CLD. Convention des Nations unies sur la lutte contre la désertification. [<http://www.unccd.int/en/about-the-convention/Pages/Text-overview.aspx>].

CMS. Convention de Bonn sur les Espèces Migratrices appartenant à la faune sauvage [[http://www.cms.int/documents/convtxt/cms\\_convtxt\\_fr.htm](http://www.cms.int/documents/convtxt/cms_convtxt_fr.htm)].

Cockerham CC (1969) Variance of gene frequencies. Evolution 23: 72-84.

Collar NJ (1980) The world status of the Houbara: a preliminary review. Symposium papers on Houbara Bustard. Fordingbridge: Game Conservancy.

Collins D (1984) A study of the Canarian Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata fuertaventurae*) with special reference to its behaviour and ecology. M.S. thesis, University of London.

Collinson M (2004) Are there really two species of Houbara? A response from the TSC. British Birds 97.

Convention de Berne relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe  
[\[http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/ChercheSig.asp?NT=104&CM=7&DF=&CL=FR E\]](http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/ChercheSig.asp?NT=104&CM=7&DF=&CL=FR E).

Convention de Ramsar relative aux zones humides d'importance internationale, particulièrement comme habitats des oiseaux d'eau [www.ramsar.org].

Convention de Vienne sur la protection de la couche d'ozone. [http://montreal-protocol.org/new\_site/en/Treaties/treaty\_text.php?treatyID=1].

Cornuet JM & Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.

Cramp S & Simmons KEL (1980) The birds of the Western Palearctic. Vol 2. Hawks to Bustards, Oxford: Oxford University Press.

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends in Ecology & Evolution 15: 290-295.

Cronin MA (2006) A proposal to eliminate redundant terminology for intra species groups. Wildlife Society Bulletin 34(1): 237-241.

Crow JF & Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Harper & Row, New York.

## D

D'Aloia MA (2001) Studies on the population structure of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* in the Middle East with DNA analysis techniques. Zoology in the Middle East 22: 25-35.

de Castries H (1918-1935) Les sources inédites de l'histoire du Maroc. Dynastie Saadienne. Volume 3. Page 330. Archives et bibliothèques d'Angleterre. Paris.

Desjardins P & Morais R (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. Journal of Molecular Biology 212: 599-634.

DiRienzo A, Peterson AC, Garca JC, Valdes AM, Slatkin M (1994) Mutational processes of simple sequence repeats in human populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 91: 3168-3170.

Dobson F (1982) Competition for mates and predominant juvenile dispersal in mammals. *Animal Behavior* 30: 1183-1192.

Donnelly P & Tavaré S (1995) Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Ann. Rev. Genet.* 29: 401-421.

Drummond AJ & Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7.

## E

Eberhard WG (1996) Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton (NJ): Princeton University Press.

Eding H, Crooijmans PMA, Groenne MAM, Meuwissen THE (2002) Assessing the contribution of breeds to genetic diversity in conservation schemes. *Genet. Sel. Evol.* 34: 613-633.

Edwards SV (1997) Relevance of microevolutionary processes to higher level molecular systematics. In *Avian Molecular Evolution and Systematics* (ed. Mindell DP). Academic Press, San Diego, California.

Efron B (1979) Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *The Annals of Statistics* 7: 1-26.

El Mousadik A & Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: 832-839.

Excoffier L & Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

## F

Fabuel E, Barragán C, Silió L, Rodríguez MC, Toro MA (2004) Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellite markers. *Heredity* 93: 104-113.

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.

FAO (1998) Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of Small Populations at Risk. FAO, Rome, Italy.

FAO (2006) Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006 report of the World's Animal Genetic Resources). Rome.

Fernández J & Toro MA (1999) The use of mathematical programming to control inbreeding in selection schemes. *J. Anim. Breed. Genet.* 116: 447-466.

Fernández J, Toro MA, Caballero A (2003) Fixed contributions designs versus minimization of global coancestry to control inbreeding in small populations. *Genetics* 165: 885–894.

Fernández J, Toro MA, Caballero A (2008) Management of subdivided populations in conservation programs: Development of a novel dynamic system. *Genetics* 179: 683-692.

Ferriere R, Belthoff J, Olivieri I, Krackow S (2000) Evolving dispersal: where to go next? *Trends Ecol. Evol.* 15: 5-7.

Filatov DA (2002) PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes* 2: 621-624.

Fisher RA (1918) The correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 52: 399-433.

Foulley JL & Ollivier L (2006) Estimating allelic richness and its diversity. *Livest. Sci.* 101: 150-158.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.

Fraser DJ & Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741-2752.

Friesen VL, Monteverchi WA, Gaston AJ (1996) Molecular evidence for kin groups on the absence of large-scale genetic differentiation in a migratory bird. *Evolution* 50: 924-930.

## G

Garcia JT, Alda F, Terraube J, Mogeot F, Sternalski A, Bretagnolle V, Arroyo B (2011 a) Demographic history, genetic structure and gene flow in a steppe-associated raptor species. *BMC Evolutionary Biology* 11: 11.

Garcia JT, Manosa S, Morales MB, Ponjoan A, de la Morena ELG, Bota G, Bretagnolle V, Davila JA (2011 b) Genetic consequences of interglacial isolation in a steppe bird. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 671-676.

Gaucher P, Paillat P, Chappuis C, Saint Jalme M, Lotfikhah F, Wink M (1996) Taxonomy of the Houbara bustard *Chlamydotis undulata* subspecies considered on the basis of sexual display and genetic divergence. *Ibis* 138: 273-282.

Goldstein DB & Schlötterer C (1999) Microsatellites : Evolution and applications. Oxford University Press, Inc., New York.

Gompertz B (1925) On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new method of determining the value of life contingencies. Phil. Trans. Royal. Soc. 115: 513-585.

Gongora J, Swan AB, Chong AY, Ho SYW, Damayanti CS, Kolomyjec S, Grant T, Miller E, Blair D, Furlan E, Gust N (2011) Genetic structure and phylogeography of platypuses revealed by mitochondrial DNA. Journal of Zoology 286: 110-119.

Goriup PD (1997) The world status of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata*. Bird Conservation International 7: 373-397.

Green DM (2005) Designatable Units for Status Assessment of Endangered Species. Conservation Biology 19: 1813-1820.

Greenwood PJ (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. Anim. Behav. 28: 1140-1162.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB (2007) An introduction to genetic analysis. (9<sup>th</sup> Edition). W.H Freeman & Co, New York and Basingstoke.

Grobler, P.J., J.W. Jones, N.A. Johnson, R.J. Neves, E.M. Hallermen (2011) Homogeneity at nuclear microsatellite loci masks mitochondrial haplotype diversity in the endangered. Journal of Heredity 102(2): 196-206.

Grossman M & Bohren BB (1982) Comparison of proposed growth curve functions in chickens. Growth 46: 259-274.

Guicking D, Fiala B, Blattner FR, Slik F, Mohamed M, Weising K (2011) Comparative chloroplast DNA phylogeography of two tropical pioneer trees, *Macaranga gigantea* and *Macaranga pearsonii* (*Euphorbiaceae*). Tree Genetics & Genomes 7(3): 573-585.

Gutiérrez JP, Cervantes I, Goyache F (2009) Improving the estimation of realized effective population sizes in farm animals. Journal of Animal Breeding and Genetics 126:327-332.

Gutiérrez, JP, Royo LJ, Álvarez I, Goyache F (2005) MolKin v.2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. Journal of Heredity 96: 718-721.

## H

Haartmann L von (1949) Der Trauerfliegenschnäpper I Ortstreue und Rassenbildung. Acta Zool. Fenn. 56: 1-104.

Haddane B (1985) The Houbara bustard in Morocco: a brief review. Bustard studies 3: 109-111.

- Halfmann DA (2002) Natal dispersal of greater prairie-chickens in Wisconsin. MSc Thesis. University of Wisconsin–Stevens Point, WI.
- Hall SJG & Bradley DG (1995) Conserving livestock breed diversity. TREE 10: 267-270.
- Hamilton WD & Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science 218(4570): 384-387.
- Hardy GH (1908) Mendelian proportions in a mixed population. Science 28: 49-50.
- Harpending HC (1994) Signature of ancient population-growth in a low-resolution mitochondrial-DNA mismatch distribution. Human Biology 66: 591-600.
- Hartley PS, Dawson B, Lindsay C, McCormick P, Wishart GJ (1999) Cryopreservation of Houbara Semen: A pilot study. Zoo Biology 18 (2): 147-152.
- Hedrick PW (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution 53: 313-318.
- Herman JS & Searle JB (2011) Post-glacial partitioning of mitochondrial genetic variation in the field vole. Proc. Biol. Sci. 278(1724): 3601-3607.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF, Yoder AD (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. Molecular Phylogenetics & Evolution 54: 291-301.
- Hill WG (1979) A note on effective population size with overlapping generations. Genetics 92: 317-322.
- Hingrat Y (2005) Sélection de l'habitat et structure sociale chez l'outarde houbara. Apports à la conservation d'une population menacée au Maroc. Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris.
- Hingrat Y & Saint Jalme M (2005) Mating system of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata undulata* in eastern Morocco. Ardeola 52(1): 91-102.
- Hingrat Y, Saint Jalme M, Ysnel F, Le Nuz E & Lacroix F (2007) Habitat use and mating system of the houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in a semi-desertic area of North Africa: implications for conservation. Journal of Ornithology 148: 39-52.
- Hollom PAD, Porter RF, Christensen S, Willis I (1988) Birds of the Middle East and North Africa. Town Head House, Calton, England.
- Hooke R & Jeeves TA (1963) "Direct search" solution of numerical and statistical problems. Journal of the Association for Computing Machinery (ACM) 8 (2): 212-229.
- Huxley JS (1932) Systematics of lizard family Pygopodidae with implications for the diversification of Australian temperate biotas. Syst. Biol. 52: 757-780.

**I**

Idaghdour Y, Broderick D, **Korrida A** (2003) Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conservation Genetics* 4: 789-792.

Idaghdour Y, Broderick D, **Korrida A**, Chbel F (2004) Mitochondrial control region diversity of the Houbara bustard *Chlamydotis undulata* complex and genetic structure along the Atlantic seaboard of North Africa. *Molecular Ecology* 13: 43-54.

Idllalène S (2010) La Charte marocaine de l'Environnement et du Développement Durable sera-t-elle une loi fondamentale ? VertigO- la revue électronique en sciences de l'environnement. Débats et Perspectives

**J**

James JW (1970) The founder effect and response to artificial selection. *Genet. Res.* 16: 241-250.

James JW (1977) A note on selection differentials and generation length when generations overlap. *Anim. Prod.* 24: 109-112.

Johnsgard PA (1991) Bustards, Hemipodes and Sandgrouse. Birds of Dry Places. Oxford University Press.

Johnson JB, Omland KS (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 101-108.

Johnson JA, Toepfer JE, Dunn PO (2003) Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie-chickens. *Molecular Ecology* 12: 3335-3347.

Johnson KP & Weckstein JD (2011) The Central American landbridge as an engine of diversification in New World doves. *J. Biogeography* 38(6): 1069-1076.

**K**

Kass RE & Raftery AE (1995) Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association* 90: 773-795.

Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the north western Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 14: 1911-1923.

Kerth G, Mayer F, Petit E (2002) Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* 11: 1491-1498.

Kimura M (1953) "Stepping-stone" model of population. *Annual Report of the National Institute of Genetics* 3: 62-63.

- Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol* 16: 111-120.
- Kimura M & Weis GH (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 4(49): 561-576.
- Kingman JFC (1982) The coalescent. *Stoch. Process. Appl.* 13: 235-248.
- Kirkpatrick S, Gelatt CD Jr, Vecchi MP (1983) Optimization by simulated annealing. *Science* 220: 671-680.
- Knox AG, Collinson M, Helbig AJ, Parkin DT, Sangster G (2002) Taxonomic recommendations for British birds. *Ibis* 144: 707-710.
- Koncagul S & Cadirci S (2010) Analysis of growth broilers with restricting and unrestricing initial body weight in Gompertz-Laird model in different environments. *Italian Journal of Animal Science* 9:e5.
- Korrida A**, Jadallah SJ, Izaabel H, Benhissoune S (2010) Genetic diversity analysis of the natural populations of Mediterranean mussels [*Mytilus galloprovincialis* (Lmk.)] in Agadir bay: assessment of the molecular polymorphism and environmental impact. *KBM Journal of Biology* 1(2): 18-25.
- L**
- Lacy RC (1989) Analysis of Founder Representation in Pedigrees: Founder Equivalent and Founder Genome Equivalents. *Zoo. Biol.* 8: 111-123.
- Laird AK, Tyler SA, and Barton AD (1965) Dynamics of normal growth. *Growth* 29: 233-248.
- LC72. Convention de Londres sur la prévention de la pollution des mers résultant de l'immersion de déchets  
[\[http://fr.wikipedia.org/wiki/Convention\\_sur\\_la\\_pr%C3%A9vention\\_de\\_la\\_pollution\\_des\\_mers\\_r%C3%A9sultant\\_de\\_l%27immersion\\_de\\_d%C3%A9chets\]](http://fr.wikipedia.org/wiki/Convention_sur_la_pr%C3%A9vention_de_la_pollution_des_mers_r%C3%A9sultant_de_l%27immersion_de_d%C3%A9chets).
- Leberg PL (2002) Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Mol. Ecol.* 11: 2445-2449.
- Lesobre L, Lacroix F, Caizergues A, Hingrat Y, Chalah T, Saint Jalme M (2010) Conservation genetics of Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata undulata*): population structure and its implications for the reinforcement of wild populations. *Conservation Genetics* 11: 1489-1497.
- Lewis PO & Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0.

Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Ligon JD (1999) The evolution of avian breeding systems. Oxford University Press. Oxford.

Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) Ecological genetics: design, analysis, and application. Blackwell Science Ltd, Australia.

Luikart G, Allendorf F, Cornuet JM, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89: 238-247.

Luikart G & Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.

Lush JL (1945) Animal Breeding Plans, Ames, Iowa State College Press.

## M

MacCluer J, Boyce B, Dyke L, Weitzkamp D, Pfenning A, Parsons C (1983) Inbreeding and pedigree structure in standard bred horses. *J. Hered.* 74: 394-399.

Maignel L, Boichard D, Verrier E (1996) Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull. Bull.* 14: 49-54.

Malécot G (1948) Les mathématiques de l'hérédité, Masson et Cie, Paris.

Mardulyn P, Othmezouri N, Mikhailov YE, Pasteels JM (2011) Conflicting mitochondrial and nuclear phylogeographic signals and evolution of host-plant shifts in the boreo-montane leaf beetle *Chrysomela lapponica*. *Mol. Phylogenetic Evol.* 61(3): 686-696.

Marshall DC, Hill KB, Cooley JR, Simon C (2011) Hybridization, mitochondrial DNA phylogeography, and prediction of the early stages of reproductive isolation: lessons from New Zealand cicadas (genus *Kikihia*). *Syst. Biol.* 60(4): 482-502.

Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB and Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Mathews NE & Porter WF (1993) Effect of social structure on genetic structure of free ranging white-tailed deer in the Adirondack mountains. *Journal of Mammalogy* 74: 33-43.

McEachern MB, VanVuren DH, Floyd CH, May B, Eadie JM (2011) Bottlenecks and rescue effects in a fluctuating population of golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Conserv. Genet.* 12: 285-296.

Meinertzhagen R (1954) Birds of Arabia: Falconry in Arabia.

Meuwissen TI & Luo Z (1992) Computing inbreeding coefficients in large populations. *Genet Sel. Evol.* 24: 305-313.

Mignon-Gratseau S, Piles M, Varona L, de Rochambeau H, Poivey JP, Blasco A, Beaumont C (2000) genetic analysis of growth curve parameters for male and female chickens resulting from selection on shape of growth curve. *Journal of Animal Science* 78: 2515-2524.

Miller TEX, Shaw KA, Inouye BD, Neubert MG (2011) Sex-biased dispersal and the speed of two-sex invasions. *American Naturalist* 177 (5): 549-561.

Mindell DP (1997) Avian Molecular Evolution and Systematics. (ed.) Academic Press, New York.

Montgomery ME, Ballou JD, Nurthen RK, England PR, Briscoe DA, Frankham R (1997) Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biology* 16: 377-389.

Morales MB, Jiguet F, Arroyo B (2001) Exploded leks: what Bustards can teach us. *Ardeola* 48(1): 85-98.

Moritz C (1994) Defining "evolutionarily significant units" for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 373-375.

## N

Nagy M, Heckel G, Voigt CC, Mayer F (2007) Female-biased dispersal and patrilocal kin groups in a mammal with resource-defence polygyny. *Proc. R. Soc. B.* 274: 3019-3050.

Nahashon SN, Aggrey SE, Adefope NA, Amenyenu A, Wright D (2010) Gompertz-Laird model prediction of optimum utilization of crude protein and metabolizable energy by French guinea fowl broilers. *Poultry Science* 89(1): 52-57.

NCBI. National Center for Biotechnology Information [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)].

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A* 70:3321-3323.

Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

Nei M & Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nei M, Kumar S, Takahashi (1998) The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)* 95: 12390-12397.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 302: 205-217.

Notter DR (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J. Anim. Sci.* 77: 61-69.

Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Uppsala University Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre.

**O**

Osborne T & Osborne L (2000) Ecology of the kori bustard in Namibia. Annual report for the Ministry of Environment and Tourism Permit Office, Windhoek.

**P**

Paetkau D, Shields GF, Strobeck C (1998) Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Molecular Ecology* 7: 1283-1292.

Pasternak H & Shalev BA (1994) The effect of a feature of regression disturbance on the efficiency of fitting growth curves. *Growth. Dev. Aging* 58: 33-39.

Peakall R & Smouse PE (2006) GENALEX v.6.3: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 288-295.

Pérez-Figueroa A, Saura M, Fernández J, Toro MA, Caballero A (2009) METAPOP – A software for the management and analysis of subdivided populations in conservation programs. *Conserv. Genet.* 10: 1097-1099.

Peške L (1997) Progress report from the release site at Errachidia. Pp. 44-49, In RJG Dawson and C Lindsay (Eds) IFCDW Annual Report 1997.

Peške L (1999) Satellite tracking of wild Houbara Bustard in Eastern Morocco. IFCDW Annual report 1998-1999.

Petit E, Balloux F, Goudet J (2001) Sex biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution* 55: 635-640.

Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv. Biol.* 12: 844-855.

Piertney SB, MacColl ADC, Bacon PJ, Racey PA, Lambin X, Dallas JF (2000) Matrilineal genetic structure and female-mediated gene flow in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): An analysis using mitochondrial DNA. *Evol.* 54(1): 279-289.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502–503.

Pitra C, D'Aloia MA, Lieckfeldt D, Combret O (2004) Genetic variation across the current range of the Asian Houbara bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). *Conservation Genetics* 5: 205-215.

Poslawski AN (1965) Zur Biologie der Kragentrappe. *Falke* 12: 242-243.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages [<http://www.cbd.int/abs/>].

Prout T (1981) A note on the island model with sex dependent migration. *Theor. Appl. Genet.* 59: 327-332.

## R

Rambaut A (2008) FigTree 1.2, publié par l'auteur.

Rambaut A & Drummond AJ (2007) Tracer v.1.5 [<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>].

Raymond M & Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.

Riou S, Combreaud O, Judas J, Lawrence M, Al Baidani MS, Pitra C (2011) Genetic differentiation among migrant and mesident populations of the threatened Asian Houbara bustard. *Journal of Heredity* 103: 64-70.

Rodríguez F, Pérez T, Hammer SE, Albornoz J, Domínguez A (2010) Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (genus *Rupicapra*). *BMC Evolutionary Biology* 10: 222.

Rogers AR & Harpending H (1992) population-growth makes waves in the distribution of pairwise genetic-differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.

Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* 1: 9-10.

## S

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sangster G (1996) Taxonomy of Houbara and Macquee's Bustards and neglect of intraspecific diversity. *Dutch Birding* 18: 248-256.

Sangster G, Collinson M, Helbig AJ, Knox AG, Parkin DT (2004) The taxonomic status of Macqueen's Bustard. *British Birds* 97: 60-67.

SAS Institute (2002) SAS/STAT User's Guide. Version 6. 5<sup>th</sup> Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Saura M, Pérez-Figuerola A, Fernández J, Toro MA, CaballeroA (2008) Preserving population allele frequencies in ex situ conservation programs. *Conserv. Bio.* 122: 1277-1287.

Schneider S & Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nat. Biotechnol.* 18: 233-234.

Schweizer M, Seehausen O, Hertwig ST (2011) Macroevolutionary patterns in the diversification of parrots: effects of climate change, geological events and key innovations. *J. Biogeography* 38(11): 2176-2194.

Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379–423 and 623-656, July and October.

Simianer H (2005) Using expected allele number as objective function to design between and within breed conservation of farm animal biodiversity. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 177-187.

Sokal RR & Rohlf FJ (1995) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: W. H. Freeman.

Suárez NM, Betancor E, Klasert TE, Almeida T, Hernández M (2009) Phylogeography and genetic structure of the Canarian common chaffinch (*Fringilla coelebs*) inferred with mtDNA and microsatellite loci. *Mol. Phylogenetic Evol.* 53: 556-564.

Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1001-1013.

## T

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Tazi A (1980) La chasse aux faucons entre le Mashriq et le Maghrib.  
القصص بالصقور بين المشرق والمغارب

Teacher AGF, Shikano T, Karjalainen ME, Merilä J (2011) Phylogeography and genetic structuring of European nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*)-mitochondrial DNA Evidence. *PloS ONE* 6(5): e19476.

Thaon d'Arnoldi C, Foulley JL, Ollivier L (1998) An overview of the Weitzman approach to diversity. *Genet. Sel. Evol.* 30: 149-161.

Thornhill R (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *Am. Nat.* 122: 765-788.

**U**

IUCN (2011) Union Internationale Union pour la Conservation de la Nature. [www.iucn.org/fr/].

Upton R (1989) The Houbara bustard and the Arab falconer. Bustard Studies 4: 174-176.

**V**

Vachon N & Freeland JR (2011) Phylogeographic inferences from chloroplast DNA: quantifying the effects of mutations in repetitive and non-repetitive sequences. Molecular Ecology Resources 11(2): 279-285.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4(3): 535-538.

**W**

Wahlund S (1928) Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. Hereditas 11: 65-106.

Wallin IE (1922) A note on the morphology of bacteria symbiotic in the tissues of higher organisms. Journal of Bacteriology 7(5): 471.

Wang JF, Pan YZ, Gong X, Kuroda C (2011) Chloroplast DNA variation and phylogeography of *Ligularia tongolensis* (Asteraceae), a species endemic to the Hengduan Mountains region of China. Journal of Semantics and Evolution 49(2): 108-119.

Waples RS (1995) Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. American Fisheries Society Symposium 17: 8-27.

Weksler M, Lanier HC, Olsen LE (2010) Eastern Beringian biogeography: historical and spatial genetic structure of singing voles in Alaska. J. Biogeography 37(8): 1414-1431.

Weinberg W (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. Württemb. 64: 369-382.

Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38(6): 1358-1370.

Weitzman ML (1992) On diversity. Quart. J. Econ. 107: 363-405.

Whitlock MC & McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: FST not equal  $1/(4Nm + 1)$ . Heredity 82: 117-125.

Wikipédia [www.wikipedia.org].

Wilson AB & Orr JW (2011) The evolutionary origins of *Syngnathidae*: pipe fishes and seahorses. Journal of Fish Biology 78(6): 1603-1623.

Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski K, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26(4): 375-400.

Witt JDS, Zemlak RJ, Taylor EB (2011) Phylogeography and the origins of range disjunctions in a north temperate fish, the pygmy whitefish (*Prosopium coulterii*), inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence analysis. *Journal of Biogeography* 38(8): 1557-1569.

Wolff JO & Plissner JH (1998) Sex biases in avian natal dispersal: an extension of the mammalian model. *Oikos* 83: 327-330.

Wright S (1920) The relative importance of heredity and environment in determining the piebald pattern of guinea pigs. *Proceedings of the National Academy of Science* 6: 320-332.

Wright S (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

Wright S (1943) "Isolation by Distance". *Genetics* 28 (2): 114-38.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15:323-354.

## AUTRES RÉFÉRENCES

Conservation de la Grande Outarde (*Otis tarda*) au Maroc. ARHZAF ZA, SEEPOM.

Étude Nationale sur la Biodiversité (2001) Rapport de synthèse effectué par Jacques FRANCHIMONT et El Mostafa SAADAOUI.

Fondation Mohamed VI pour la Protection de l'Environnement [[www.fm6e.org](http://www.fm6e.org)].

Fonds de partenariat pour les écosystèmes critiques (2010) Rapport : Profil d'écosystème hotspot de la biodiversité du bassin méditerranéen.

Perspectives Maroc 2030. Gestion durable des ressources naturelles et de la biodiversité au Maroc. Rapport préparé par LAOUINA A pour le compte du Haut Commissariat au Plan.

Projet de Conservation de la Biodiversité par la Transhumance dans le Versant Sud du Haut Atlas (2000)(MOR/99/G33/A/1G/99). Projet initié par le PNUD au Maroc.

SEO/Birdlife (2007) Conservation of the Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata fuertaventurae*) in the Canary Islands (Spain). Projet LIFE03NAT/E/000046.

Stratégie nationale d'éducation et de sensibilisation de l'environnement et au développement durable (2008) Document élaboré dans le cadre du projet de "Renforcement des capacités nationales en matière d'éducation et de sensibilisation à l'environnement dans les domaines de la biodiversité, des changements climatiques et de la désertification" (Projet ENV/2004/081-284) soutenu financièrement par l'Union Européenne.

Stratégie Nationale pour la Conservation et l'Utilisation Durable de la Diversité Biologique (2004). Document élaboré par le Sscrétariat d'Etat chargé de l'Environnement [<http://www.cbd.int/doc/world/ma/ma-nbsap-v2-p01-fr.pdf>].

## GLOSSAIRE

**Adaptation :** Évolution d'une ou de plusieurs caractéristiques héréditaires phénotypiques particulières en réponse à une pression sélective spécifique.

**Ancêtre :** Un des deux premiers parents non apparentés à la génération 0.

**ADN (acide désoxyribonucléique) :** Macromolécule composée d'une double chaîne de nucléotides liés entre eux et dont le sucre est le désoxyribose. C'est le support de toute l'information héréditaire.

**Allèle :** Forme d'un gène donné.

**Allèle nul :** Allèle non exprimé et donc ne présentant aucune bande sur un gel durant l'électrophorèse.

**ARN (acide ribonucléique) :** Acide nucléique simple brin composé d'un sucre ribose et d'une base azotée Uracile.

**Bootstrapping (Efron 1979) :** Approche statistique évaluant les paramètres de variance en rééchantillonnant d'une façon aléatoire (avec ou sans remplacement) les différents constituants de la base de données considérée.

**Chromosome :** Arrangement linéaire de gènes et d'ADN associés à de l'ARN et des protéines histones.

**Coalescence :** Théorie développée pour répondre aux questions en relation avec la génétique des populations. C'est un concept purement rétrospectif qui vise à retracer et reconstruire l'histoire évolutive et généalogique des gènes, selon des modèles mutationnels particuliers et ce, jusqu'à leur ancêtre commun le plus récent (MRCA : Most Recent Common Ancestor).

**Cohorte :** Groupe d'individus sélectionnés et nés durant la même année.

**Couple reproducteur :** Paire d'animaux composée d'une femelle et d'un mâle qui coopèrent pour procréer.

**Différenciation génétique :** Mesure de l'allocation de la variation génétique à l'intérieur d'une espèce ou entre ses populations et ses groupes. Les espèces exhibant un niveau considérable de différenciation génétique montrent une grande variation entre les populations et les groupes.

**Dispersion :** Mouvement d'un animal depuis son site de naissance ou de nidification (dispersion natale) à un ou plusieurs sites de reproduction (dispersion de reproduction).

**Diversité ou richesse allélique :** Nombre d'allèles par locus.

**Effet fondateur:** Événement qui se produit lorsqu'une population restreinte d'individus issue d'une population infinie, migre pour former une nouvelle population. Cette population nouvelle et finie ne contient qu'une partie de la variété génétique totale de la population d'origine. L'effet fondateur conduit souvent à une perte de la diversité génétique, l'extinction des allèles, la dérive génétique et l'augmentation de la consanguinité.

**Effet Wahlund (Wahlund 1928):** Échantillonnage d'une seule population qui est en fait structurée et composée de plusieurs sous-populations aux flux géniques limités entre elles. Ce genre d'échantillonnage conduit à l'apparition du déficit en hétérozygotes ( $F_{IS} > 0$ ) par rapport à l'équilibre de HW.

**Facteur stochastique :** Facteur aléatoire (par chance) et non-déterministe (non lié aux activités humaines).

**Fondateur :** Ancêtre aux parents inconnus.

**Fréquence allélique ou génique :** Nombre d'un allèle donné sur le nombre total d'allèles existant dans la population à un locus étudié.

**Fréquence génotypique :** Nombre d'individus d'un génotype par rapport au nombre total d'individus de la population.

**Gène :** Séquence nucléotidique spécifique d'ADN codant pour une protéine, ou un ARNt ou un ARNr particulier.

**Génome :** Matériel génétique complet d'une espèce ou d'un organisme (tous les loci, ADN, chromosomes et gènes).

**Génotype :** Combinaison d'allèles présents à un locus donné chez un individu donné.

**Haploïdie :** État de cellules ou d'organismes ne possédant qu'un seul jeu de chaque chromosome.

**Haplotype :** Composition de gènes ou de séquences d'ADN héritée et située sur le même chromosome.

**Hétérozygote :** Individu avec deux allèles différents à un locus donné. Le pourcentage des hétérozygotes dans une population est appelé hétérozygotie.

**Holarctique :** Zone biogéographique du globe terrestre incluant le Paléarctique (l'Afrique du Nord, le Moyen Orient et le Nord de l'Asie) et le Néarctique (Amérique du Nord et le Groenland).

**Homozygote :** Individu avec deux copies du même allèle à un locus donné. Le pourcentage des homozygotes dans une population est appelé homozygotie.

**Homoplasie :** Ensemble identique de caractères ou de copies d'un locus qui ont évolués dans des lignées évolutives séparées (donc qui n'ont pas le même ancêtre commun).

**IAM (Infinite Allele Model) :** Modèle de mutation où un allèle donné peut muter à un autre allèle avec n'importe quelle taille ou nombre de répétitions en tandem au niveau d'un marqueur microsatellite. Selon ce modèle, toutes les mutations sont nouvelles et n'étaient jamais présentées dans la population auparavant.

**Isolation par distance (Wright 1943):** Réduction de la valeur du flux génique (migration) dans les espèces aux faibles pouvoirs de dispersion à cause de la séparation spatiale entre leurs populations soit en présence ou en absence de barrières géographiques.

**Locus :** Position d'une région d'ADN sur le chromosome ou sur le gène.

**Métapopulation :** Groupe de populations de la même espèce partialement ou temporellement séparées qui réagissent réciproquement entre elles.

**Méthode Monte Carlo par Chaîne Markov (MCMC pour Markov Chain Monte Carlo) :** Modèle mathématique de simulation appliqué sur des systèmes stochastiques en cas d'échantillonnages à partir de distributions de probabilité. Les méthodes d'échantillonnage se basent sur les chaînes de Markov qui ont pour lois stationnaires et invariables les distributions à échantillonner. La propriété Markovienne est fondée sur une position spatio-temporelle à telle sorte que l'état présent de la chaîne Markovienne ne doit dépendre que des états passés les plus récents : La chaîne de Markov de premier ordre.

**Mitotype :** Haplotype mitochondrial.

**Modèle en île de Wright (1931) :** Modèle de structuration populationnelle remplissant les conditions suivantes : nombre infini de populations échangeant par chaque génération des migrants entre elles avec un même taux de migration, il n'y a pas de sélection, ni de mutation et les populations sont en équilibre (dérive génétique-migration).

**Modèle mutationnel à nombre infini de sites (Kimura 1968) :** Modèle étudiant l'histoire évolutive de très longues et infinies séquences d'ADN. Chaque séquence possède d'infinis sites nucléotidiques pouvant connaître des mutations aux mêmes infinitésimales et très faibles probabilités. D'après ce modèle mutationnel, toute nouvelle mutation se produit à un nouveau site qui n'a encore jamais été touché par une mutation. Ceci augmentera le nombre de sites polymorphes S (segregating sites) à telle sorte qu'au niveau de chaque site, seulement deux états sont possibles : l'état ancestral ou l'état muté. Il importe de signaler aussi que les séquences sujettes de ce modèle de mutation ne connaissent pas d'événement d'homoplasie.

**Modélisation :** Description d'un système utilisant des théories, concepts et langages mathématiques. Les modèles mathématiques sont créés pour prédire et anticiper un certain événement ou une certaine situation.

**Nucléotide :** Composé organique constituant le monomère d'ADN ou d'ARN et contenant un groupement de phosphates, un sucre pentose et soit une base azotée pyrimidique (Cytosine, Thymine ou Uracile), soit une base azotée purique (Adénine ou Guanine).

**Panmixie :** Croisement au hasard entre individus d'une population donnée.

**Phénotype :** Caractères ou traits observables d'un organisme suite à l'interaction entre l'environnement et le génotype.

**Pléistocène :** Époque géologique s'étendant de 2 588 000 à 11 700 années (Wikipédia).

**Polyandrie :** un système de reproduction où une femelle s'accouple avec plusieurs mâles (polygamie).

**Polygynie :** Système de reproduction où un mâle s'accouple avec plusieurs femelles (polygamie).

**SMM (Stepwise Mutation Model) :** Mutation qui cause la perte ou le gain d'une seule répétition en tandem au niveau d'un marqueur microsatellite.

**"Stepping-stone" model ou modèle de pierres japonaises de progression (Kimura 1953 et Kimura & Weiss 1964) :** Un des modèles justifiant le phénomène stochastique de migration. Dans les populations naturelles, les individus sont souvent distribués d'une façon plus ou moins discontinue et forment des dèmes ou des colonies adjacentes qui peuvent montrer des différenciations et des structurations génétiques entre elles. Il existe des modèles stepping-stone unidirectionnels et bidirectionnels. Par exemple selon le dernier modèle, à chaque génération un individu peut migrer entre les différentes colonies en un ou plusieurs étapes et ce, dans les deux directions : ... ← m-2 ← m-1 ← Individu → m+1 → m+2 → ...

**Unités désignables (DU pour Designatable Units, Green (2005)) :** Toute unité biologique replissant les quatre conditions suivantes : i) classée taxonomiquement comme sous-espèce ou variété, ii) considérée comme unité génétiquement distincte soit par des marqueurs microsatellites, allozymes, séquences d'ADN...etc., soit par son histoire de vie, soit par sa morphologie, soit par son comportement, iii) séparée dans son aire de répartition par un obstacle géographique et iv) occupant des écozones ou des zones biogéographiques particulières et donc considérée comme une unité biogéographiquement distincte.

**Vicariance :** Séparation par des événements environnementaux (*e.g* : barrières géographiques telles que : un fleuve, une mer ou une montagne) des taxons ou des populations apparentées qui précédemment occupaient des zones plus ou moins continues. Cette division conduit à la différenciation populationnelle.

(*N.B : La majorité de ces définitions est générique, le reste ce sont des reformulations d'après : Wahlund 1928, Wright 1931 et 1943, Kimura 1953, Frankham et al. 2002, Lowe et al. 2004, Green 2005, Griffiths et al. 2007 et/ou d'après l'encyclopédie virtuelle Wikipédia*).

## **ANNEXES & PHOTOS**

## L'outarde Houbara marocaine



1



2



3



4



5



6



7

Photo 1 : Une femelle avec ses poussins, 2 : Un mâle en pleine parade nuptiale, 3 : Un individu portant un radio émetteur sur son dos, 4 : Une outarde Houbara après son relâcher au désert, 5 : Un nid d'outarde Houbara avec trois œufs, 6 : Deux poussins sauvages, 7 : Un troupeau d'outardes Houbara élevé en captivité. (Les photos 2 et 7 : © IFCDW et 1, 3, 4, 5 et 6 : © DERS/ au désert).

## **Les forces affectant la variation génétique des populations finies et infinies**

### **Mutation**

C'est le processus qui crée la variation héréditaire dans un gène ou un ensemble de chromosomes différents du type sauvage. Les mutations sont généralement créées par des erreurs durant la réPLICATION de l'ADN ou par des agents environnementaux. Cependant, la quasi-totalité des mutations est silencieuse ou neutre et donc sans effet néfaste. La mutation est une faible force évolutive en raison de son taux qui est souvent très petit.

### **Flux génique (migration ou dispersion efficace)**

C'est la proportion des gènes nouvellement migrés dans une population. Ce processus évolutif (lié également à l'effet fondateur) favorise le brassage et l'homogénéité génétique des populations et donc, freine leur structuration et différenciation causée par la sélection naturelle et par la chance. Quand la migration interagit avec la sélection et la dérive génétique, elle affecte aussi le potentiel d'adaptation et la viabilité des populations.

### **Taille efficace de population et goulets d'étranglement**

La taille efficace d'une population  $N_e$  réfère au nombre d'individus qui se reproduisent et contribuent par leurs allèles et génotypes à la génération suivante. Les populations naturelles peuvent connaître des réductions sévères et instantanées dans leurs  $N_e$ . Cet événement démographique est appelé goulet d'étranglement (ou bottleneck). Même si la taille de la population peut rapidement être récupérée, la variation génétique reste faible jusqu'à un nouveau rétablissement par des événements tels que le flux génique et/ou la mutation.

### **Dérive génétique**

C'est le changement ou les fluctuations des fréquences alléliques au sein d'une population au cours du temps comme conséquence des échantillonnages aléatoires des gamètes à chaque

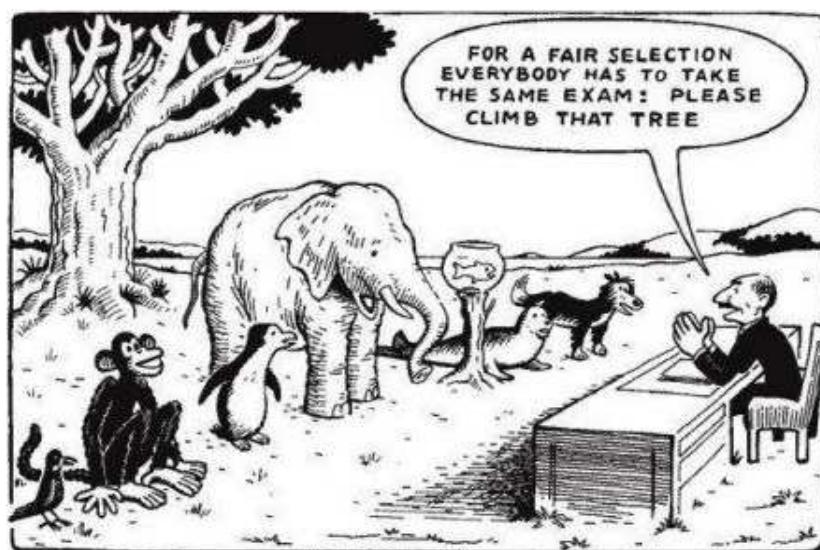
génération. La variation génétique (l'hétérozygotie en particulier) est perdue par dérive génétique de  $\frac{1}{2N_e}$  par chaque génération.

### Dépression d'endogamie et d'exogamie

La dépression d'endogamie (ou de consanguinité) est la réduction des performances sexuelles et de survie à cause de la réduction rapide de la taille d'une population par dérive génétique et/ou à cause de l'expression des allèles délétères défavorables en état d'homозиготie suite aux croisements entre individus apparentés. La réduction de la valeur sélective ou de fitness peut être aussi observée dans le cas des accouplements entre des individus éloignés géographiquement et génétiquement, c'est la dépression d'exogamie.

### Sélection naturelle

La sélection est considérée comme le moteur de l'évolution qui décrit l'influence de certaines conditions environnementales permettant et favorisant la survie d'un type particulier de phénotypes ou de génotypes chez la descendance.



## Éducation environnementale

Parallèlement à cette formation doctorale, plusieurs activités ont été faites, incluant :

- Un stage de formation en génétique et biologie moléculaire pour un étudiant universitaire (niveau : Masters) en vue de son insertion à la faculté de Laval au Canada en 2010.
- Un stage de fin d'études en génétique des populations en tant qu'outil de gestion des stocks d'élevage de l'ouïarde Houbara en faveur de deux étudiants universitaires de la faculté des Sciences Semlalia en 2011 (niveau : Licence professionnelle, Pr. encadrant : Mohamed Znari).
- Un stage de fin d'études en génétique pour un étudiant universitaire de la Faculté des Sciences d'Agadir en 2011 (niveau : Masters, Pr. encadrant : Mohamed El Hafa).
- En plus de plusieurs séances éducatives et scolaires pour des groupes d'étudiants et de professionnels de différents lycées et institutions (Institut Agricole et Vétérinaire, Qalam, Staff de l'IFCDW...etc.).



## La fauconnerie : hier et aujourd’hui



(Photos du Web)

### **Autres informations en relation avec cette thèse**

- Candidature au Grand Prix Hassan II pour l’Invention et la Recherche dans le domaine agricole en 2010 (Dossier No. : 3935).
- Obtention de la Bourse de Mérite de la Banque Islamique de Développement en 2009 dans le domaine de Biotech/GenEng./Environment (Dossier No. : 50/MOR/P30). Pourtant, pour des raisons professionnelles, la doctorante n’a pas pu en bénéficier.
- Stages de formation dans le cadre du "Projet du taux de croissance et allométrie" à l’unité d’élevage et de production de l’IFCDW à Agadir et à la station écologique DERS à Errachidia de Février à Mai 2011.
- Participation au "Scientific Advisory Board Meeting" en Décembre 2010 avec une communication orale intitulée: *Patterns of genetic diversity and population structure of the threatened Houbara subspecies as revealed by microsatellite markers.*

#### **Durant le stage au DERS à Errachidia**



(Photo courtoisie: K.S)

## ملخص

لقد تم قياس و إختبار التنوع البيولوجي ضمن عدة مستويات تسلسلية (نوع، تحت نوع، مورثة وأعداد سكانية) عند طيور الحباري والماكينز التي تتنمي إلى المنطقة الإيكولوجية القطبية الشمالية القديمة وذلك من أجل صيانتها خارج مواطنها الطبيعية.

الدراسات الوراثية المرتكزة على الساكنات المتواحشة التي استخدمت فيها تقنية التموضعات النبوية (ميكروساتلاتيلات) بالإضافة إلى جزء من المورثة الميتوكوندرية سينوكروم ب طوله 1042 نيكليوتيد مكنت من تقييم التنوع الوراثي، الإنساب الوراثي، سيناريوهات الاستعمار، العلاقات الوراثية العرقية، وحدات الصيانة البيولوجية والعلاقات التاريخية والديموغرافية التي قد تفسر التوزيع الجغرافي الحيوي الحالي للمكونات الثلاثة لجنس كلاميدوتوس. خلافاً لأنواع المنتمية إلى المناطق المعتدلة وغابات نصف الكرة الأرضية الشمالي، يعتقد أن الفترات الزمنية الجلدية لعصر الإلبيوستوسين هي مسؤولة عن سلسلة الانتشارات الديموغرافية عند أنواع الحباري والماكينز الصحراوية. توظيف التقنيتين الجزيئيتين في الاختبارات الإجمالية للتمييز الجيني أسفر عن نتائج متضاربة ولكن مكملة لبعضها البعض و مناقشة مختلف العوامل الوراثية المسئولة أدت إلى تأييد أو نقض التباين الجزيئي الملاحظ.

ثلاث دراسات أخرى أجريت على قطعان الحباري المغربية المرباة في الأسر. ساهم وضع نماذج رياضية حول خصائص النمو عند الحباري تحت ظروف خاصة في الأسر من تحديد معدل النمو بالإضافة إلى أربعة أنواع من النمو التقاربي والنمو المتعلق بقياس النامي. النتائج بينت أن النمو التقاربي السريع للمنقار والرسغ المشطي يفسر الاستعمال المبكر لهذه الأعضاء في عملية التفقيب والتنقل بينما نمو الأجنحة الكبيرة يمكن الطيور من الهروب وتقادري الاقتراس المحتمل.

دراسة قطبي طيور تتنمي إلى عدة أجيال مختلفة كشف عن شجرة نسب حديثة وضعيفة التجذر. في نفس الوقت، هذه الدراسة مكنت من توصيف عدة معطيات عائلية ومرتبطة بالنسبة. عند طيور الحباري المغربية حدد الفاصل بين جيل وآخر في 4.6 سنة، معامل التوالد الداخلي ب 1.6% والزيادة الثانية في معامل صلة القرابة ب 1.3% في حين عدم ظهور عنق الزجاجة السكاني جاء نتيجة لتقارب وتكافؤ قيمة المؤسسين الفعالين والأسلاف الفعالين داخل القطبيع. هذا البحث بين أيضاً الاستراتيجية الجيدة التي كانت متبعة في عملية التوالد في الفترة المتراوحة بين 1993 و 2002 والتي كانت ترتكز على رفع التدفق الجيني داخل المجموعة وكبح ظاهرة انخفاض قدرات التوالد. إلا أنه ثم الكشف عن عدة اختلالات وعن غياب التخطيط لعمليات التزاوج خصوصاً ابتداء من 2004 حيث سجلت أعلى معدلات التوالد الداخلي وصلة القرابة.

أخيراً، رصد التنوع الجيني عن طريق عدة تقنيات داخل مجموعات داخل الساكنات مكنا من مقارنة ومناقشة مختلف الاستراتيجيات والسياسات المنتهجة في صيانة النوع المغربي (كلاميدوتوس أوندولاتا أوندولاتا) خارج موطنه الطبيعي.

النتائج والمعلومات الوراثية المستخلصة من مختلف هذه الدراسات ستتمكن من تثمين جيد وصيانة مستدامة للتنوع الجيني والبيولوجي لهذه الموارد الطبيعية المهددة بالانقراض.

**كلمات رئيسية:** كلاميدوتوس أوندولاتا، صيانة خارج الموطن الطبيعي، التنوع الوراثي، تدبير الموارد، شجرة النسب، خاصية گومپيرتز- ليرد، الجغرافية الحيوية، زمن الانفصال، التوسيع، ميكروساتلاتيلات، التفرق، التوالد الداخلي، سينوكروم ب، نموذج الأحجار اليابانية، طيور الماكينز، موارد طبيعية مغربية.