

Analyse génétique du loup gris de Turquie (*Canis lupus*) basée sur des séquences partielles d'ADN mitochondrial

VERTEBRATE ZOOLOGY

© Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, 2016.

66 (3): 427–435

21.12.2016

SENCKENBERG

Genetic analysis of the Turkish gray wolf (*Canis lupus*) based on partial mitochondrial DNA sequences

OSMAN İBIŞ^{1,2}, EREN AKSÖYEK³, SERVET ÖZCAN^{2,4}, AKİF KETEN⁵,
TARKAN YORULMAZ⁶ & COŞKUN TEZ^{4,*}

¹ Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Erciyes University, Kayseri, Turkey — ² Genome and Stem Cell Center, GENKOK, Erciyes University, Kayseri, Turkey — ³ Graduate School of Natural and Applied Sciences, Erciyes University, Kayseri, Turkey — ⁴ Department of Biology, Faculty of Sciences, Erciyes University, Kayseri, Turkey — ⁵ Department of Wildlife Ecology and Management, Faculty of Forestry, Düzce University, Düzce, Turkey — ⁶ Department of Biology, Faculty of Sciences, Çankırı Karatekin University, Çankırı, Turkey — * Corresponding author: tezc@erciyes.edu.tr

Résumé

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la détermination de la variabilité génétique des loups gris Turcs et également sur la révélation des relations phylogénétiques des populations de loups Eurasiens en utilisant les séquences d'ADN mitochondrial. Des séquences partielles d'ADN mitochondrial (440 pb) ont été obtenues de 12 loups gris Turcs, y compris la région de la boucle D (332 pb). **Nous avons trouvé sept haplotypes D-loop** (332 pb) parmi les 12 loups gris Turcs. Les séquences de la boucle D du loup gris Turc ont été comparées aux séquences enregistrées dans la GenBank d'Eurasie sous le nom de *Canis lupus*. **Cinq haplotypes Turcs** étaient partagés avec des séquences conspécifiques d'autres régions d'Eurasie dans l'aire de répartition de l'espèce. **Deux haplotypes** étaient uniques pour les loups Turcs. L'existence d'haplotypes partagés suggère que les loups gris de Turquie et d'autres régions pourraient être issus du même pool génétique. La présente étude rapporte des données significatives pour déterminer la variabilité génétique et révéler les relations phylogénétiques des loups gris Turcs ; **il est suggéré que la variabilité génétique des loups gris Turcs est relativement élevée.**

INTRODUCTION

Le loup gris (*Canis lupus* L., 1758) est un membre de la famille des Canidés et l'un des plus importants prédateurs de l'hémisphère nord (Sillero-Zubiri et al. 2004). Il est largement distribué dans une grande partie de la région holoarctique (Wilson & Reeder 1993, 2005, Mech & Boitani 2010). Le loup gris est également présent en Turquie et dans ses environs (Salvatori & Linnell 2005, Wilson & Reeder 1993, 2005, Kryštufek & Vohralik 2009).

Le loup gris a été considéré comme la première espèce de mammifère domestiquée par l'homme (Clutton-Brock 1995), avec des origines multiples (Pang et al. 2009, von Holdt et

al. 2010). Il est également connu pour être l'espèce sauvage la plus importante (Sillero-Zubiri et al. 2004).

Afin de gérer et de conserver les espèces sauvages, les conservateurs de la nature et les chercheurs s'efforcent de dresser un tableau complet de la variabilité génétique des populations dans différentes régions. Il existe de nombreuses études sur les populations de loups gris existantes et sur les relations phylogénétiques dans toute l'aire de répartition de l'espèce, basées sur l'ADN mitochondrial (Wayne et al. 1992, Ellegren et al. 1996, Vilá et al. 1999, Randi et al. 2000, Flagstad et al. 2003, Jędrzejewski et al. 2005, Pilot et al. 2006, 2010, 2014, Pang et al. 2009, Fain et al. 2010, Gomerčič et al. 2010, Rutledge et al. 2010, Weckworth et al. 2010, 2011, Asadi-Aghbolaghi et al. 2014, Bray et al. 2014, Djan et al. 2014, Fabri et al. 2014, Jansson et al. 2014, Matsumura et al. 2014, Ishiguro et al. 2016, etc.)

La présente étude se concentre sur le loup gris de Turquie (*Canis lupus*). Ce carnivore de grande taille est largement distribué en Turquie, où il forme un pont zoogéographique entre l'Afrique, l'Asie, l'Europe et la péninsule Arabique (Johnson 2002, Kryštufek & Vohralik 2001, 2009). Le loup gris est un des grands carnivores bien connus comme le renard roux (*Vulpes vulpes*), le chacal doré (*Canis aureus*) et l'ours brun (*Ursus arctos*) en Turquie (Johnson 2002, Can 2004, Can & Togan 2004, Albayrak 2011, Aşan-Baydemir et al. 2011, İlemin 2014, Aksöyek et al. 2016, Ambarlı et al. 2016).

Les loups Turcs habitent tous les biomes, ce qui inclut les proies. La taille de la population de loups gris Turcs a été estimée à environ 5000-7000 individus (Can 2004, Salvatori & Linnell 2005). En raison de la diminution des animaux proies tels que les moutons, les gazelles, les cerfs rouges, les chevreuils, les sangliers et les lièvres bruns, de la fragmentation de l'habitat et de la chasse illégale, etc., les loups gris Turcs ont connu un déclin au cours du siècle dernier ; ils sont présents dans de petites sous-populations (Can & Togan 2004, Salvatori & Linnell 2005, Şekercioğlu et al. 2011). Par conséquent, des mesures de gestion de la conservation ont été prises par le ministère des Forêts et des Eaux en Turquie (voir www.ormansu.gov.tr).

L'ADN mitochondrial, indicateur de l'hérédité maternelle, est l'un des outils importants, qui ont été utilisés dans les analyses génétiques des carnivores turcs (İbiş & Tez 2014, İbiş et al. 2014, 2015a,b, Aksöyek et al. 2016, Demirbaş et al. 2016). Alors que l'ADN mitochondrial du loup gris a été analysé pour diverses populations à travers l'aire de répartition de l'espèce (Ellegren et al. 1996, Vilá et al. 1999, Randi et al. 2000 ; Flagstad et al. 2003 ; Jędrzejewski et al. 2005, Pilot et al. 2006, 2010, 2014, Pang et al. 2009, Fain et al. 2010, Gomerčič et al. 2010, Rutledge et al. 2010, Weckworth et al. 2010, 2011, Asadi-Aghbolaghi et al. 2014, Bray et al. 2014, Djan et al. 2014, Fabri et al. 2014, Jansson et al. 2014, Matsumura et al. 2014, Ishiguro et al. 2016, etc.), aucune analyse large et détaillée de l'ADN mitochondrial des loups gris Turcs n'a été réalisée jusqu'à présent. Seuls quelques échantillons de loups gris de Turquie ont été utilisés dans des analyses génétiques (Vilá et al. 1997, 1999, Randi et al. 2000, Pilot et al. 2006, 2010, 2014).

En présentant les résultats préliminaires d'une analyse de séquences mitochondriales partielles, nous souhaitons contribuer à la connaissance de la variabilité génétique des loups gris de Turquie et des relations avec d'autres populations conspécifiques à travers l'Eurasie.

MATERIAUX ET METHODES

Échantillonnage

Les échantillons de tissus (oreille, peau, queue, etc.) ont été prélevés sur les 12 loups gris tués sur la route dans la partie asiatique de la Turquie (Tableau 1, Figure 1).



Fig. 1. Localités des échantillons de loups gris Turcs (voir Tableau 1 pour les numéros)

Extraction de l'ADN et conditions de la PCR

Les échantillons de tissus conservés dans de l'alcool éthylique à 99% ont été utilisés pour obtenir l'ADN génomique, qui a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction commercial (The DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Un court fragment d'ADN mitochondrial incluant la boucle D (région de contrôle) a été amplifié en utilisant les amorces DLH (Forward : 5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3') et LF15926F (Reverse : 5'-ATATAAAATACTTTGGTCTT GTAAACC-3') (Kirschning et al. 2007).

Un total de 50 μ l de mélange réactionnel a été utilisé pour les amplifications par PCR (réactions en chaîne par polymérase) ; 10 \times tampon Taq avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 5 μ l, mélange de dNTP 10 mM : 1 μ l, 5u/ul ADN polymérase Taq (Thermo Scientific) : 0,3 μ l, 25 mM MgCl_2 : 3 μ l, 10mg/ml BSA : 3 μ l, 10uM chaque amorce : 5 μ l, extrait d'ADN génomique : 1 μ l, dH_2O : 26,7 μ l). Le programme PCR comprenait une procédure de pré-dénaturation consistant en 5 min à 95°C par 1 cycle, une étape de dénaturation de 40 sec à 95°C, une étape d'annexion de 1 min à 54°C, une étape d'extension de 90 sec à 72°C par 30 cycles et une étape de fin de 10 min à 72°C par 1 cycle. La qualité de l'ADN génomique et des produits PCR a été vérifiée par passage dans un gel d'agarose à 1% et par coloration au bromure d'éthidium.

Séquençage, alignement et analyse

Le gel Macherey-Nagel Nucleospin et le kit de nettoyage PCR ont été utilisés pour purifier les produits PCR, dont le séquençage a été effectué dans les directions avant et arrière avec les amorces PCR DLH et LF15926F (Kirschning et al. 2007), en utilisant un séquenceur (ABI 3100 Genetic Analyzer).

Tableau 1. Liste des échantillons de loups gris (Séquences/haplotypes) utilisés dans cette étude

Map no. (Fig. 1)	Nr. of Turkish samples	Code of Turkish haplotypes	Accession number	Locality	Reference	Conspecific sequences	Reference
1	1437	Tr.Cl.D1	KY039989	Sarıkaya, Yozgat, Turkey	This Study	AY570178-AY570181	Ardalan <i>et al.</i> 2004
2	1516	Tr.Cl.D1	KY039989	Kars, Turkey	This Study	AF008136-AF008142	Vila <i>et al.</i> 1997
3	1518	Tr.Cl.D1	KY039989	Nebiöglü, Köyü, Ardahan, Turkey	This Study	KJ195895-KJ195898, KJ490942-KJ490944	Pilot <i>et al.</i> 2014
4	1543	Tr.Cl.D1	KY039989	Suveren Köyü, Iğdır, Turkey	This Study	AF115687-AF115703, AF115707, AF115714	Randi <i>et al.</i> 2000
5	1446	Tr.Cl.D2	KY039990	Sarıkaş, Kars, Turkey	This Study	AY916804-AY916822	Luo <i>et al.</i> 2005
6	1336	Tr.Cl.D3	KY039991	Sorgun, Yozgat, Turkey	This Study	AF338803-AF338811, AF487754	Valiere <i>et al.</i> 2003
7	1542	Tr.Cl.D3	KY039991	Tüney Köyü, Çankırı, Turkey	This Study	KF723519-KF723526	Jansson <i>et al.</i> 2014
8	1448	Tr.Cl.D4	KY039992	Kıbrısık, Bolu, Turkey	This Study	FJ978005-FJ978035	Pilot <i>et al.</i> 2010
9	1334	Tr.Cl.D5	KY039993	Tekman, Erzurum, Turkey	This Study	DQ480503-DQ480507	Björnerfeldt <i>et al.</i> 2006
10	1559	Tr.Cl.D5	KY039993	Sarıkaş, Kars, Turkey	This Study	JN182019-JN182092	Hindrikson <i>et al.</i> 2011
11	1460	Tr.Cl.D6	KY039994	Abant Gölü, Bolu, Turkey	This Study	AB007372-AB007373	Tsuda <i>et al.</i> 1997
12	1441	Tr.Cl.D7	KY039995	Karakurt, Kars, Turkey	This Study	AY172676-AY172677	Yang <i>et al.</i> 2002
						KF857179	Deng and He 2016
						KF661038-KF661055, KF661078-KF661082	Thalmann <i>et al.</i> 2013
						KF661087, KF661091, KF661095	Thalmann <i>et al.</i> 2013
						AB499818-AB499825	Matsumura <i>et al.</i> 2014
						AM711902	Arnason <i>et al.</i> 2007
						KC540917- KC540929	Asadi-Aghbolaghi <i>et al.</i> 2014

Haplotype codes in Figures 2–3; **lu.1:** AF338807, AF115689; **lu.2:** KF723519, FJ978017; **lu.3:** FJ978027, AF115688, AF115687, FJ978028; **lu.4:** AF115687, FJ978028; **lu.5:** Tr.Cl.D3; **lu.6:** Tr.Cl.D4; **lu.7:** Tr.Cl.D6, AF115696, KJ490942, KC540923, KC540924; **lu.8:** AF338806, KF723523, AF115694, AF115695, FJ978020, FJ978019; **lu.9:** FJ978034; **lu.10:** AY916808, AY916807, FJ978016, KJ195895, FJ978015, AF008142; **lu.11:** AF115697; **lu.12:** AY916810; **lu.13:** Tr.Cl.D7, KJ195897; **lu.14:** AY916805, AY916814, **lu.15:** AY916819; **lu.16:** AY916815; **lu.17:** FJ978006, AF487754, KF723521, KF723520, AF115693, AF115692, FJ978005, DQ480504, JN182058, JN182032, JN182074, JN182060, JN182036, JN182033, JN182030, JN182075, JN182085, JN182084, JN182049, JN182050, JN182020, JN182026, JN182023, JN182022, JN182080, JN182086, JN182087, JN182041, JN182043, JN182038, JN182091, JN182090, JN182028, JN182078, JN182067, JN182066, JN182064, JN182047, JN182056, JN182045, JN182046, JN182088, JN182061, JN182051, JN182052, JN182042, JN182039, JN182092, JN182027, JN182025, JN182024, JN182021, JN182031, JN182076, JN182069, JN182057, JN182048, JN182053, JN182073, JN182072, JN182071, JN182062, JN182059, JN182054, JN182055, JN182040, JN182019, JN182029, JN182037, JN182044, JN182035, JN182034; **lu.18:** KF723526, FJ978022; **lu.19:** KF723525; **lu.20:** AF338809, AF115702; **lu.21:** AF338808, AF115703, AF008137, DQ480505; **lu.22:** AF338810, KF723524, FJ978025; **lu.23:** KF723522, AF115698, FJ978012, FJ978011, DQ480503; **lu.24:** FJ978032, FJ978031, KF857179, KC540917; **lu.25:** AY916816, AY916817, AY916804; **lu.26:** FJ978026; **lu.27:** FJ978021, KC540925; **lu.28:** FJ978018; **lu.29:** AY570181, KC540928; **lu.30:** AY916811, AY916812; **lu.31:** AF338805, AY172677; **lu.32:** AY570179, KJ490943, KC540919; **lu.33:** Tr.Cl.D5, AF115690, AY916813, FJ978010, AF008136, KC540918, AM711902, KC540926, KC540922; **lu.34:** JN182089, JN182063, JN182068, JN182082, JN182081, JN182079, JN182077, JN182070, JN182065, JN182083; **lu.35:** AF115691, AB007373, FJ978024, FJ978023; **lu.36:** FJ978007, FJ978008; **lu.37:** AF008140, DQ480506; **lu.38:** AY916818; **lu.39:** AY916809; **lu.40:** FJ978033; **lu.41:** Tr.Cl.D1, AY570178, AY570180, AF008141, DQ480507, KC540920, KC540927, KC540929, KC540921; **lu.42:** Tr.Cl.D2, KJ195896, KJ490944; **lu.43:** AY916806; **lu.44:** AY172676; **lu.45:** KF661095; **lu.46:** KF661087; **lu.47:** FJ978030; **lu.48:** AF338804, FJ978014, FJ978013, AF115701, KF661045; **lu.49:** AF338803, FJ978035, AF115699, KF661048, AF008138; **lu.50:** FJ978029; **lu.51:** AF115700, AB007372; **lu.52:** KF661078; **lu.53:** KF661091; **lu.54:** KF661085; **lu.55:** KF661039, KF661038; **lu.56:** KF661081; **lu.57:** KF661049, KF661044, KF661052, KF661040; **lu.58:** AB499819, AB499820; **lu.59:** KF661053, KF661041; **lu.60:** KF661042; **lu.61:** KF661055; **lu.62:** KF661054; **lu.63:** KF661043; **lu.64:** KF661046; **lu.65:** KF661047; **lu.66:** KF661050; **lu.67:** AB480739, LC064093, AB499823; **lu.68:** LC064091, AB480737, AB480742, AB499825, AB499822; **lu.69:** AB480736, AB480741, AB499824, AB499818; **lu.70:** AB480740; **lu.71:** KF661051; **lu.72:** KF661080; **lu.73:** LC064094, LC064095, AB480738, LC064096, AB499821; **lu.74:** AY916822; **lu.75:** AY916820; **lu.76:** AY916821.

Nous avons utilisé Geneious v.R6.1.6 (<http://www.geneious.com>), dans lequel MAFFT v7.0.17 a été utilisé pour l'alignement de séquences multiples avec des paramètres par défaut (Kato et al. 2002), pour aligner les séquences d'ADN mitochondrial, et DnaSP v.5.10.01 (Librado & Rozas 2009) pour déterminer les haplotypes mitochondriaux et estimer les diversités haplotype et nucléotide du loup gris. MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) a été utilisé pour calculer les distances génétiques entre les haplotypes turcs du loup gris, sur la base du modèle K2P (Kimura 2-paramètres) de substitution de l'ADN (Kimura 1980).

Des analyses phylogénétiques et de réseau ont été réalisées avec des séquences mitochondriales de boucle D de 317 pb provenant de loups gris Turcs et de GenBank (NCBI : The National Center for Biotechnology Information), y compris des séquences de boucle D enregistrées sous le nom de *Canis lupus* d'Eurasie (Tableau 1). Le chacal doré (*Canis aureus*) (AY289997 : Aggarwal et al. 2007) a été utilisé comme out-group dans l'analyse phylogénétique.

Le modèle HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) + I (Invariant) + G (Gamma) était le modèle de substitution nucléotidique le plus approprié selon le critère d'information d'Akaike corrigé (AICc) et le critère d'information bayésien (BIC) en utilisant jModeltest2 (Darriba et al. 2012), et ce modèle a été utilisé dans l'analyse phylogénétique pour reconstruire l'arbre bayésien (Inférence Bayésienne) au moyen de MrBayes v.3 .2 (Ronquist et al. 2012). Dans l'analyse bayésienne (Ronquist et al. 2012), la technique MCMC (Markov Chain Monte Carlo) a été utilisée pour calculer les probabilités bayésiennes postérieures pour 2,6 millions de générations, l'arbre étant échantillonné toutes les 100 générations, et pour écarter les premiers 25% des échantillons en tant que burn-in (écart-type moyen des fréquences de

fractionnement < 0,01 : 0,009400). Les échantillons restants, après avoir écarté le burn-in, ont été retenus pour estimer la probabilité postérieure et l'intervalle de crédibilité bayésien de 95%, et pour créer l'arbre de consensus (règle de la majorité de 50%). Le logiciel FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009) a été utilisé pour représenter l'arbre phylogénétique bayésien.

Un réseau d'haplotypes a été dessiné en utilisant la méthode de jonction médiane à l'aide du logiciel Network v.4.6.1.1 (Bandelt et al. 1999, <http://www.fluxus-engineering.com>).

RESULTATS

Un fragment de 440 pb d'ADNmt (tRNA^{Thr} + tRNA^{Pro} + boucle D) a été amplifié avec succès pour les 12 loups gris Turcs, dont 332 pb pour la boucle D (région de contrôle). Une comparaison des fragments de 440 pb a révélé la présence de **sept haplotypes** (Tr.Cl.D1-Tr.Cl.D7) avec 12 sites de ségrégation et 10 sites informatifs de parcimonie. L'haplotype Tr.Cl.D1 était le plus commun, et il a été trouvé dans quatre des 12 échantillons. La distribution des haplotypes Turcs est présentée dans le Tableau 1 et la Figure 1. Sept haplotypes du loup gris Turc (Tr.Cl.D1-Tr.Cl.D7) sont déposés dans la database GenBank (numéros d'accès : KY039989 - KY039995). Les diversités haplotype (H_d) et nucléotide (π) étaient respectivement de 0,8788 et 0,01088. **Les loups Turcs étaient polymorphes**. La divergence de séquence moyenne des sept haplotypes de loups Turcs était de 0,012, allant de 0,002 à 0,021, sur la base du K2P. Lorsque les séquences comprenant la région de la boucle D (332 pb) des échantillons Turcs ont été analysées, sept haplotypes de la boucle D ont été trouvés (Tableau 1). Les diversités haplotype (H_d) et nucléotide (P_i) pour la région D-loop du loup Turc étaient respectivement de 0,8788 et 0,01392.

Sur la base des 12 séquences de cette étude et des 244 séquences de différentes longueurs disponibles dans la base de données GenBank sous le nom de *Canis lupus* d'Eurasie (Tableau 1), un total de 76 haplotypes (317 pb) a été trouvé. Les séquences sous les autres noms de *C. lupus*, tels que *C. lupus chanco* et *C. lupus pallipes*, n'ont pas été incluses dans les analyses génétiques. Cinq haplotypes Turcs étaient partagés avec des séquences enregistrées dans GenBank ; Tr.Cl.D1 : AY570178 (Iran), AY570180 (Iran), AF008141 (Arabie Saoudite), DQ480507 (Arabie Saoudite), KC540920, KC540921, KC540927 et KC540929 (Iran) ; Tr.Cl.D2 : KJ195896 et KJ490944 (Caucase) ; Tr.Cl.D5 : AF115690 (Grèce), AY916813 (Chine), FJ978010 (Belarus, Bulgarie, Grèce, Roumanie, Russie, Suède, Ukraine), AF008136 (Roumanie, Russie), KC540918 (Iran), AM711902 (Suède), KC540926 et KC540922 (Iran) ; Tr.Cl.D6 : AF115696 (Israël), KJ490942 (Caucase), KC540923 et KC540924 (Iran) ; Tr.Cl.D7 : KJ195897 (Géorgie) (Tableau 1, Figs. 2 - 3).

Les relations phylogénétiques des haplotypes mitochondriaux de la boucle D (317 pb) sont présentées dans l'arbre bayésien (Fig. 2). Les nœuds des branches de l'arbre bayésien (Fig. 2) étaient soutenus par des probabilités postérieures relativement élevées (0,5-1). Dans l'arbre bayésien (Fig. 2), Tr.Cl.D1 et Tr.Cl.D2 ont été regroupés avec les haplotypes de Turquie (Trakia), d'Iran et d'Oman, tandis que Tr.Cl.D3 et Tr.Cl.D4 ont été regroupés ensemble. **Tr.Cl.D5 a été groupé avec des haplotypes de Biélorussie, Bulgarie, Caucase, Chine, Croatie, France, Iran, Lettonie, Lituanie, Pologne, Portugal, Russie, Corée du Sud, Espagne, Ukraine et Yougoslavie**. En outre, Tr.Cl.D6 a été regroupé avec l'haplotype d'Israël, tandis que Tr.Cl.D7 a été ramifié seul dans l'arbre bayésien.

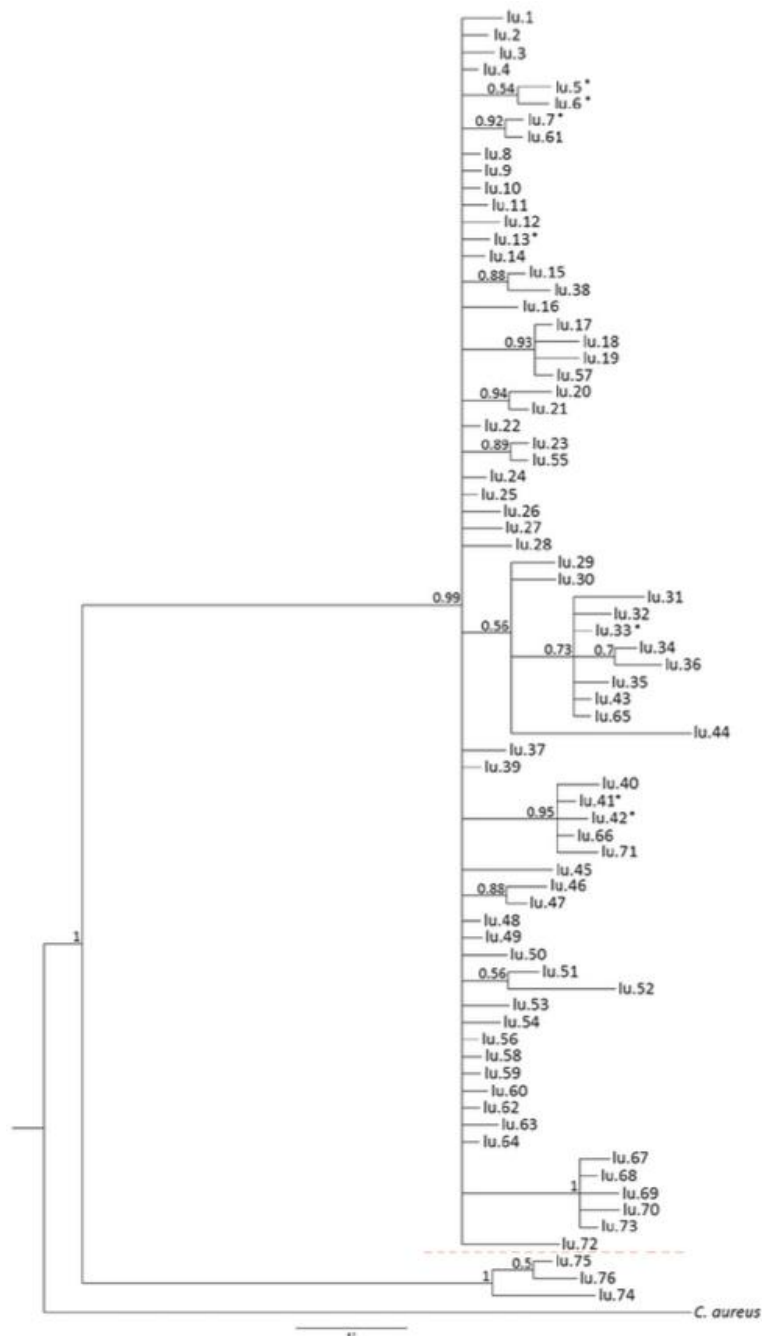


Fig. 2. Arbre bayésien construit à partir des haplotypes mitochondriaux de la boucle D (317 pb) des loups gris, enraciné avec *Canis. aureus*. Les astérisques indiquent les haplotypes de loups gris turcs (voir le Tableau 1 pour les codes des haplotypes)

Dans le réseau d'haplotypes de jonction médian (Fig. 3), les haplotypes Turcs de cette étude se sont regroupés avec des haplotypes conspécifiques dans les parties internes ; ce regroupement n'était pas entièrement compatible avec l'arbre bayésien (Fig. 2).

DISCUSSION

Le loup gris, *Canis lupus*, est une espèce de canidé très répandue en Turquie (Kryštufek & Vohralik 2009, Ambarli et al. 2016). Bien qu'il existe plusieurs études génétiques incluant des loups gris Turcs, la caractérisation génétique des loups gris Turcs est encore rare. A ce jour, les échantillons de loups gris Turcs n'ont été inclus que dans six études ayant utilisé des séquences d'ADN mitochondrial (Vilá et al. 1997, 1999, Randi et al. 2000, Pilot et al. 2010, 2014, Aksöyek et al. 2016).

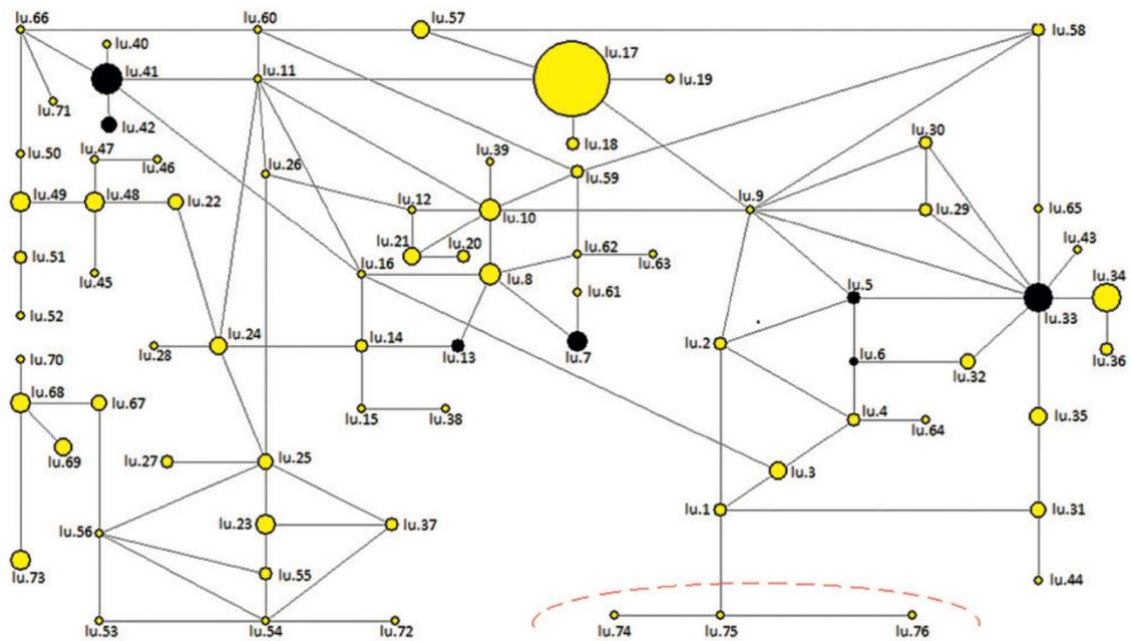


Fig. 3. Réseau de jonction médian construit à partir des haplotypes mitochondriaux de la boucle D (317 pb) des loups gris. Les cercles en gras indiquent les haplotypes de loups gris Turcs (voir Tableau 1 pour les codes d'haplotypes)

Dans la présente étude, la variabilité génétique et les relations phylogénétiques des loups gris Turcs ont été recherchées en utilisant des séquences partielles d'ADN mitochondrial (tRNAThr + tRNAPro + boucle D : 440 pb). L'analyse a révélé **sept haplotypes**, dont deux (Tr.Cl.D3 et Tr.Cl.D4) étaient **uniques et nouveaux** pour la partie Anatolienne de la Turquie, par rapport aux autres régions géographiques d'Eurasie. On postule que cela peut être une indication d'une diversité génétique relativement élevée du loup gris Turc.

Le taux de mutation dans la région mitochondriale de la boucle D des loups est relativement élevé (Savolainen et al. 2000), ce qui pourrait expliquer une grande variabilité génétique, comme cela avait été précédemment rapporté chez deux autres canidés Turcs, *Canis aureus* (İbiş et al. 2015a) et *Vulpes vulpes* (İbiş et al. 2014). De même, une grande diversité génétique chez les loups gris a également été rapportée dans certaines études (Jędrzejewski et al. 2005, Pilot et al. 2010, Asadi-Aghbolaghi et al. 2014, Bray et al. 2014, Djan et al. 2014, Pilot et al. 2014), y compris dans les meutes de la forêt vierge de Białowieża à la frontière entre la Pologne et la Biélorussie, et dans les populations Européennes modernes, Iraniennes, Saoudiennes Dinaric-Balkan et du Caucase.

Dans le jeu de données comprenant des fragments de 317 pb composés des séquences de la présente étude et de celles disponibles dans la GenBank d'Eurasie sous le nom de *Canis lupus* (Tableau 1), nous avons trouvé deux nouveaux haplotypes (Tr.Cl.D3 et Tr.Cl.D4) chez les 12 loups gris Turcs (Tableau 1). Les cinq haplotypes restants (Tr.Cl.D1, Tr.Cl.D2, Tr.Cl.D5, Tr.Cl.D6 et Tr.Cl.D7) étaient partagés avec des séquences dérivées de la GenBank (Tableau 1). Quatre séquences de boucle D de loups gris Turcs analysées dans des études précédentes (Vilá et al. 1997, 1999, Randi et al. 2000, Pilot et al. 2006, 2010, 2014) sont de longueurs différentes (257 bp, 542 bp, 658 bp et 659 bp). Parmi ces séquences, trois séquences (AF115693 : Randi et al. 2000, FJ978020 et FJ978033 : Pilot et al. 2010, 2014) ont été incluses dans les analyses de la présente étude. Par contre, la séquence AF005296 (257 bp) (Vilá et al.

1997, 1999, Pilot et al. 2006) n'a pas été utilisée dans les analyses actuelles en raison du manque de la séquence mentionnée.

Nos analyses indiquent que les haplotypes Turcs de cette étude étaient relativement éloignés les uns des autres et regroupés en sous-lignages distincts dans l'arbre bayésien (Figure 2). Dans la Figure 2, la séquence Turque précédente, FJ978033 (Pilot et al. 2010, 2014), a été regroupée avec les haplotypes Tr.Cl.D1 et Tr.Cl.D2 de cette étude, tandis que les autres séquences Turques précédentes, AF115693 (Randi et al. 2000) et FJ978020 (Pilot et al. 2010, 2014), ont été regroupées relativement loin des haplotypes de cette étude. La résolution phylogénétique de l'arbre bayésien (Fig. 2) était relativement faible, ce qui pourrait être dû au taux de mutation élevé dans la région mitochondriale de la boucle D des loups. De même, une faible résolution phylogénétique a également été rapportée par Lebarbenchon et al. (2010) et Rodrigues et al. (2016) pour les petites belettes (*Mustela nivalis*), sur la base des séquences de la boucle D (région de contrôle).

Les haplotypes du loup Turc ont été regroupés avec les haplotypes conspécifiques en sous-groupes distincts dans les parties internes du réseau d'haplotypes (Fig. 3), qui est considéré comme montrant les relations phylogénétiques intraspécifiques mieux que les arbres phylogénétiques (Crandall et al. 2000). L'arbre bayésien (Fig. 2.) et le réseau d'haplotypes (Fig. 3) étaient en partie en accord l'un avec l'autre, et tous deux (Figs. 2, 3) ont montré que les haplotypes du loup gris étaient divisés en deux groupes haplo-principaux. Cependant, aucun schéma géographique clair n'a été observé pour la distribution des haplotypes du loup gris dans l'arbre bayésien (Fig. 2) et le réseau d'haplotypes (Fig. 3). Dans ce contexte, le résultat de la présente étude était compatible avec celui de Pilot et al. (2006). L'existence d'haplotypes partagés de la boucle D trouvés dans cette étude a suggéré un flux génétique continu et/ou passé au sein des loups gris en Turquie et dans d'autres régions d'Eurasie et qu'ils provenaient du même pool génétique. Par conséquent, cette étude soutient le point de vue de Pilot et al. (2014) suggérant le flux génétique en cours et/ou passé entre les populations de loups du Caucase et d'Europe de l'Est.

Pour confirmer la grande diversité génétique et élucider la phylogéographie des loups gris Turcs, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour obtenir plus de données sur les loups gris Turcs dans une étude multilocus réalisée en utilisant deux marqueurs moléculaires, l'ADN mitochondrial et nucléaire.