

## Aperçu à l'échelle continentale de la diversité génomique et de la divergence chez les loups d'Asie


communications biology

Article

A Nature Portfolio journal

<https://doi.org/10.1038/s42003-025-09379-9>

### Continent-wide view of genomic diversity and divergence in the wolves of Asia

 Check for updates

Lauren M. Hennelly<sup>1,2,3,4</sup> ✉, Bárbara R. Parreira<sup>1</sup>, Ash Noble<sup>5</sup>, Camilla H. Scharff-Olsen<sup>1</sup>, M. Çisel Kemahlı Aytekin<sup>6</sup>, Çağan H. Şekercioğlu<sup>6,7,8</sup>, Pavel Kosintsev<sup>9,10</sup>, Ladislav Paule<sup>11</sup>, Pavel Hulva<sup>12,13</sup>, Hans K. Stenøien<sup>14</sup>, Bilal Habib<sup>15</sup>, Hira Fatima<sup>16</sup>, Ghulam Sarwar<sup>17</sup>, Samara P. El-Haddad<sup>18</sup>, Alexandra Youssef<sup>18</sup>, Frank Hailer<sup>5,19</sup>, Xin Sun<sup>1</sup>, Nuno Filipes Gomes Martins<sup>1</sup>, M. Thomas P. Gilbert<sup>1,14</sup>, Benjamin N. Sacks<sup>2</sup>, Mikkel-Holger S. Sinding<sup>20</sup> & Shyam Gopalakrishnan<sup>1</sup>

Communication Biology (2026) 9 : 330

#### Résumé

Les loups gris (*Canis lupus*) d'Asie abritent la majeure partie de la diversité génétique de l'espèce ainsi que de nombreuses populations menacées. **Cependant**, on manque d'une compréhension claire de **l'histoire évolutive** des loups en Asie, ce qui entrave leur conservation. Nous avons utilisé 98 **génomés complets** de loups provenant de toute l'Eurasie afin de mieux cerner leur histoire évolutive et leur statut de conservation. Les **barrières** les plus importantes au flux génétique coïncidaient avec les frontières séparant les **trois** principales lignées de loups : Indienne, Tibétaine et holarctique. **Les loups des chaînes de montagnes d'Asie centrale appartiennent à la lignée holarctique et partagent peu d'ancêtres communs avec la lignée tibétaine voisine.** **En revanche**, les loups d'Asie orientale partagent des ancêtres communs à l'échelle de la population avec la lignée Tibétaine, ce qui pourrait refléter l'existence d'une lignée non échantillonnée similaire à la lignée Tibétaine. Les loups d'Asie du Sud-Ouest partagent des ancêtres communs à l'échelle de la population avec la lignée Indienne, probablement en raison d'événements de métissage anciens (>6 000 ans). **Le déclin à long terme et la consanguinité récente ont laissé les loups Indiens et Tibétains avec des niveaux de diversité génétique parmi les plus bas et des charges génétiques réalisées parmi les plus élevées.** **En revanche**, les populations adjacentes présentent une diversité génétique parmi les plus élevées, en partie grâce au métissage le long des zones de contact. Notre étude met en évidence les régions du sud de l'Asie comme des points chauds de la diversité des loups et souligne la nécessité de conserver ces populations restantes.

#### INTRODUCTION

Une compréhension approfondie de l'histoire évolutive d'une espèce est essentielle à sa conservation. Les espèces se composent souvent de populations distinctes dont la variation génétique est répartie de manière inégale sur l'ensemble de leur aire de répartition. Comprendre comment les changements historiques et ceux induits par l'homme ont façonné les schémas actuels de variation génétique est l'un des principaux objectifs de la biologie

évolutive. Ces connaissances sont particulièrement importantes pour hiérarchiser les populations à surveiller et orienter la gestion des espèces menacées.

Les loups gris (*Canis lupus*) comptent parmi les mammifères les plus largement répartis, ce qui en fait un système idéal pour étudier comment les facteurs historiques et d'origine humaine influencent la variation génétique actuelle. Il est particulièrement important de comprendre ces influences car de nombreuses populations de loups sont en danger ou menacées. Par exemple, certaines populations de loups en Europe et en Amérique du Nord présentent une faible diversité génétique en raison du déclin des populations et de la consanguinité, comme les loups Mexicains et Italiens. La plupart des études sur l'état des populations et la diversité génétique des loups gris se sont concentrées sur les parties nord-Américaines et Européennes de leur aire de répartition. Peu d'études ont porté sur les loups d'Asie, bien que cette région abrite la majeure partie de la diversité phylogénétique de l'espèce et de nombreuses populations menacées. Le manque d'études en Asie entrave les efforts de conservation, et une meilleure compréhension de la façon dont les populations distinctes sur le plan évolutif et la diversité génétique varient à travers l'Asie peut bénéficier à la gestion et aux décisions en matière de conservation.

Des travaux récents ont décrit trois lignées de loups distinctes : les lignées **Indienne, Tibétaine et holarctique**, toutes présentes en Asie<sup>11-12</sup> (Fig. S1). Ces lignées se sont séparées il y a plus de 100 000 ans, après quoi les lignées Indienne et Tibétaine (également appelée Himalayenne) se sont isolées au sein de refuges glaciaires distincts<sup>13</sup>. **Les loups de la lignée holarctique, qui s'étendent de l'Europe du Nord à la Sibérie, ainsi qu'en Amérique du Nord**, ont été étroitement connectés au cours des 100 000 dernières années, une structure de population notable émergeant à une époque plus récente. Les analyses de **génomés** anciens de loups suggèrent que les loups de l'Eurasie septentrionale ressemblaient largement à une population panmictique au cours des 100 000 dernières années. Cette **connectivité** génétique étendue a été principalement favorisée par l'expansion vers l'ouest de l'ascendance Sibérienne tout au long du Pléistocène supérieur jusqu'à il y a 10 000 ans<sup>13</sup>. Bien que ces travaux récents aient fourni une vue d'ensemble de l'histoire évolutive du loup en Eurasie, peu d'études ont examiné comment les schémas d'ascendance et la diversité génomique sont répartis à travers le continent, en particulier dans les régions plus méridionales de l'Asie, où les trois lignées principales coexistent à proximité immédiate.

Par exemple, sur la base d'un nombre limité de génomes, des travaux antérieurs ont montré que les loups d'Asie du Sud-Ouest (définie comme la région s'étendant de l'Iran à la péninsule Arabique et à la Turquie) reflétaient une **ascendance holarctique** avec une ascendance mineure provenant de taxons plus divergents, tels que le loup Indien et une autre espèce de canidé, le loup africain (*Canis lupaster*)<sup>11,14,15</sup>. **Des analyses génomiques ont confirmé l'existence d'un hybride contenant des ancêtres du loup Africain, du loup gris et du chien domestique provenant de la péninsule du Sinaï en Égypte**<sup>14</sup>. **De plus**, des hybrides entre les loups Africains et les chiens ont été confirmés génétiquement au Sénégal et en Éthiopie, ce qui suggère que ces deux espèces différentes peuvent se croiser<sup>16</sup>. **Cependant**, une compréhension plus complète des loups d'Asie du Sud-Ouest a été entravée par un manque d'échantillons géographiquement représentatifs provenant de l'ensemble de cette région. En ce qui concerne les loups de l'est de la Chine et les loups éteints du Japon, des travaux antérieurs ont montré qu'ils possèdent une ascendance mineure attribuable à d'anciens loups

du Pléistocène datant d'environ 35 000 à 50 000 ans (kya)<sup>17-19</sup>. **De plus**, ces deux populations conservent un patrimoine génétique plus divergent que celui des loups anciens du nord de l'Eurasie datant de 100 kya<sup>13</sup>. **Ensemble**, ces résultats suggèrent que diverses populations de loups des régions méridionales de l'Asie pourraient conserver un patrimoine génétique distinct de celui des loups du nord de l'Eurasie.

Nous avons cherché à combler **quatre** lacunes dans nos connaissances sur les loups en Asie en constituant un ensemble de données génomiques comprenant 20 loups nouvellement séquencés prélevés dans des régions clés et 81 génomes de loups précédemment publiés provenant d'Eurasie et d'Amérique du Nord. Nos objectifs étaient (1) de caractériser la structure des populations à l'échelle continentale et les **schémas de flux génétique** des populations de loups modernes à travers l'Eurasie, (2) clarifier l'histoire évolutive des populations de loups dans les chaînes de montagnes d'Asie centrale et les régions orientales de l'Asie, (3) clarifier l'histoire évolutive des loups en Asie du Sud-Ouest, et (4) caractériser la diversité génétique, les niveaux de consanguinité et la charge génétique des loups à travers l'Eurasie afin de comprendre les impacts à long terme et récents sur la diversité génétique.

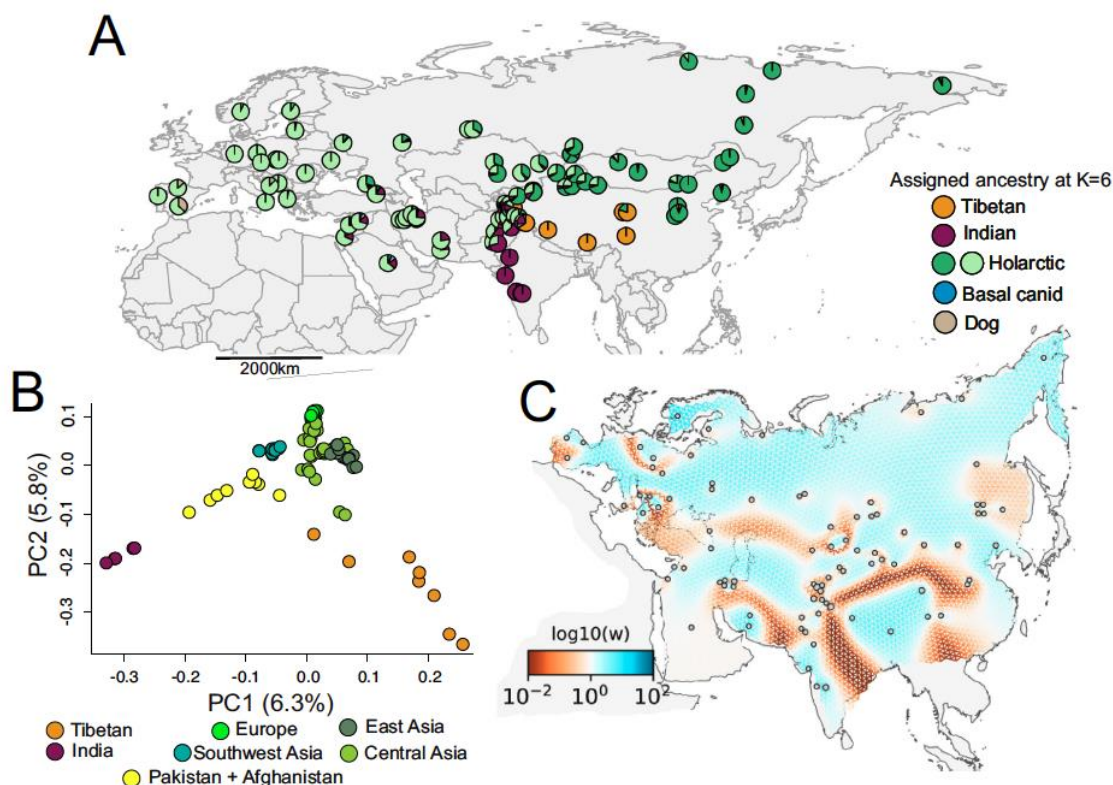
## RESULTATS

Dans le cadre de cette étude, nous avons reséquéncé les **génomés complets de 20 loups provenant de diverses régions d'Eurasie**. Ces régions comprenaient l'Asie du Sud-Ouest (Liban,  $n = 1$  ; Israël,  $n = 1$  ; Turquie,  $n = 1$ ), les plaines de l'Indus au Pakistan ( $n = 2$ ), les chaînes de montagnes d'Asie centrale (Suleiman,  $n = 2$  ; Karakoram,  $n = 2$  ; Hindu Kush,  $n = 3$ ), la steppe Eurasiennne (Kazakhstan,  $n = 3$  ; Russie,  $n = 3$ ) et l'Europe (Slovaquie,  $n = 1$  ; Ukraine,  $n = 1$ ). **Nous avons également procédé à un séquençage supplémentaire (c'est-à-dire plus approfondi) d'un loup Indien provenant du centre de l'Inde et déjà séquencé auparavant**. Nous avons compilé un ensemble de données comprenant ces génomes nouvellement séquencés et 95 loups **précédemment** séquencés **d'Amérique du Nord** ( $n = 3$ ) et d'Eurasie ( $n = 78$ ), ainsi que des chiens ( $n = 4$ ) et 10 individus issus de six autres espèces de canidés : le dhole, *Cuon alpinus* ( $n = 1$ ) ; le loup d'Éthiopie, *Canis simensis* ( $n = 1$ ) ; le chacal doré, *Canis aureus* ( $n = 1$ ) ; le loup d'Afrique, *Canis lupaster* ( $n = 4$ ) ; le coyote, *Canis latrans* ( $n = 2$ ) ; et le renard des Andes, *Lycalopex culpaeus* ( $n = 1$ ). **Au total, 115 échantillons ont ainsi été inclus dans l'étude, que nous avons alignés sur l'assemblage du génome du chien domestique** (canFam3.1) (Données supplémentaires 1).

### Structure de population et schémas de flux génétique des loups en Eurasie

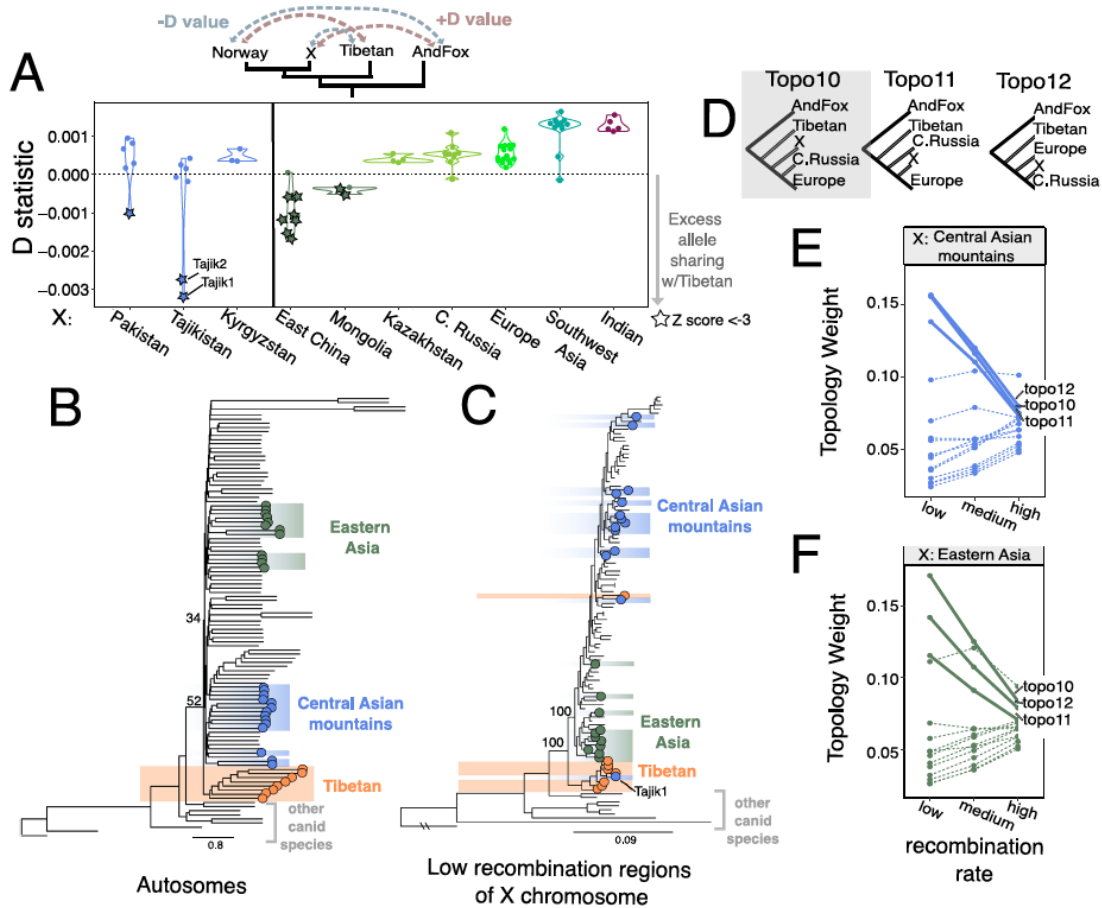
L'analyse en composantes principales (ACP) et les proportions de métissage individuelles déduites pour 98 loups Eurasiens ont confirmé la présence de **trois groupes principaux** correspondant aux trois principales lignées de loups existantes en Eurasie : les loups Indiens, Tibétains et holarctiques (Fig. 1a, b, Fig. supplémentaires 2 et 3). Certains loups se situaient entre ces groupes principaux, formant des **clines** entre les groupes Tibétain et holarctique ainsi qu'entre les groupes Indien et holarctique. Dans les deux cas, ces **individus intermédiaires** provenaient de zones proches des zones de contact correspondantes entre les lignées. Les individus intermédiaires sur le cline Tibétain-holarctique comprenaient deux loups du Tadjikistan (~24% d'ascendance Tibétaine à  $K = 6$ ) et deux loups du Ladakh, une région située à l'extrémité sud-ouest du plateau Tibétain (Figure supplémentaire 2). Les individus intermédiaires sur le cline Indien-holarctique comprenaient uniquement des loups

du Pakistan (Figure supplémentaire 4). **En revanche**, les 13 loups d'Asie du Sud-Ouest formaient un groupe très compact, proche des autres loups holarctiques, et présentaient environ 15 à 20% d'ascendance Indienne à  $K = 6$ . Quelques loups, dont la plupart avaient été prélevés près de l'Afrique, présentaient une ascendance qui ne se regroupait pas avec celle des loups gris et des chiens, ce qui reflète peut-être un métissage avec le loup Africain.



**Fig. 1. Structure génétique des populations et connectivité génétique des loups à travers l'Eurasie.** **A** Localisation des échantillons et proportions de métissage individuelles pour  $K = 6$  chez 98 loups à travers l'Eurasie. Les proportions de métissage ont été estimées à partir de 98 loups gris d'Eurasie, 3 loups d'Amérique du Nord, 4 chiens et 10 individus issus de six autres espèces de canidés. **B** Analyse en composantes principales utilisant les probabilités génotypiques pour 98 loups à travers l'Eurasie. Les couleurs indiquent la région géographique à laquelle appartient chaque loup. **C** Surface de migration effective estimée (EEMS) pour 97 loups à travers l'Eurasie. Les couleurs de l'EEMS correspondent à une migration effective inférieure à la moyenne (rouge) et supérieure à la moyenne (bleu), exprimée sous la forme de  $\log_{10}(w)$ . Un lambda de 100 a été utilisé après avoir effectué des analyses de validation croisée

Afin de mieux caractériser les schémas géographiques du flux génétique, nous avons déduit la **surface de migration effective** estimée (EEMS), qui indique les régions de flux génétique faible ou élevé par rapport à un modèle d'isolement par la distance. Reflétant les résultats de l'ACP et du métissage, les plus grandes barrières EEMS au flux génétique en Eurasie correspondaient aux divisions entre les trois lignées principales (Fig. 1c). **La barrière la plus forte se situait le long de la chaîne de l'Himalaya, qui sépare les lignées Indienne et Tibétaine.** Une **deuxième barrière** importante entoure le plateau Tibétain, ce qui concorde avec nos résultats d'ACP et d'analyse de métissage montrant un flux génétique **réduit** entre la lignée Tibétaine et les loups d'Asie centrale et orientale. Nous avons détecté une **autre barrière** au flux génétique située à l'ouest du Pakistan ; **cependant**, la position exacte de cette barrière est moins claire en raison d'un manque d'échantillonnage dans la steppe Eurasienne, notamment au Turkménistan et en Ouzbékistan. **Par ailleurs**, la structure de population des loups holarctiques à travers l'Eurasie septentrionale peut être modélisée comme une isolation par la distance (Fig. 1b, c).



**Fig. 2. Histoire évolutive des loups d'Asie centrale et d'Asie orientale.** **A** La statistique  $D$  permet d'estimer le partage d'allèles dérivés entre les individus de la population Eurasiennne et la lignée Tibétaine. Les seules populations présentant un partage significatif d'allèles avec les loups Tibétains sont certaines populations du Pakistan, du Tadjikistan, de Mongolie et de l'est de la Chine. **B** Phylogénie autosomique utilisant 97 loups d'Eurasie, 3 loups gris d'Amérique du Nord et 9 individus issus de cinq autres espèces de canidés. L'arbre basé sur la coalescence a été estimé à partir de 1 000 régions de 20 kb de longueur choisies au hasard dans le génome de référence du chien. Le score de quartet normalisé des nœuds sélectionnés est indiqué. Les cercles colorés et les zones ombrées dans l'arbre phylogénétique indiquent les individus attribués à la lignée tibétaine (orange), aux montagnes d'Asie centrale (hautes altitudes du Pakistan, du Tadjikistan et du Kirghizistan ; bleu) et à l'Asie orientale (est de la Chine, Mongolie, est de la Russie ; vert). **C** Arbre de maximum de vraisemblance déduit à partir des seules régions à faible recombinaison ( $<0,2$  cM/Mb) du chromosome X, en utilisant le même ensemble d'échantillons que dans (B). La probabilité a posteriori locale est indiquée au niveau de nœuds sélectionnés. **D** Les trois topologies présentant les pondérations topologiques moyennes les plus élevées sur l'ensemble du chromosome X lorsque l'on considère les loups des montagnes d'Asie centrale ou d'Asie orientale comme population focale X. La topologie ombrée en gris représente un scénario dans lequel la population focale de loups est l'ancêtre des loups d'Europe et de Russie centrale. Prévalence de 15 topologies possibles dans les régions à recombinaison élevée, moyenne et faible sur le chromosome X, lorsque la population focale provient des montagnes d'Asie centrale (**E**) et d'Asie orientale (**F**). Pour les loups d'Asie centrale comme pour ceux d'Asie orientale, trois topologies (lignes pleines) montrent une relation négative entre le taux de recombinaison et la pondération topologique, contrairement aux 12 autres topologies (lignes pointillées)

### Histoire évolutive des loups dans les montagnes d'Asie centrale et en Asie orientale

Pour explorer l'histoire évolutive des loups dans les chaînes de montagnes d'Asie centrale et en Asie orientale, nous avons d'abord utilisé des statistiques  $D$  pour tester le partage excessif d'allèles dérivés avec diverses populations de loups en Asie<sup>21</sup>. Nous avons observé que les loups des deux régions présentaient un excès significatif (score  $Z < -3$ ) d'allèles dérivés partagés avec la lignée Tibétaine, et non avec d'autres taxons (loup Indien, loup Africain, chacal doré) (Figures supplémentaires 5-8). **Cependant**, pour les loups des montagnes d'Asie centrale, l'ampleur du partage d'allèles avec la lignée Tibétaine variait considérablement d'un individu à l'autre (Fig. 2a). Seuls trois loups sur seize présentaient un partage significatif d'allèles avec la lignée Tibétaine, tous les loups du Kirghizistan et la plupart des loups du Pakistan et du Tadjikistan ne présentant aucun partage d'allèles détectable avec cette lignée

(Fig. 2a ; Fig. supplémentaire 5). Cette forte variance interindividuelle des allèles dérivés Tibétains suggère que le flux génétique avec les loups Tibétains est limité, sporadique et/ou peut-être récent. **Contrairement** aux loups des montagnes d'Asie centrale, nous observons un excès constant et significatif de partage d'allèles avec la lignée Tibétaine chez presque tous les loups trouvés en Chine orientale et en Mongolie (Fig. 2a, fig. suppl. 5, 9).

Il peut être difficile d'identifier la source réelle d'ascendance à l'aide des statistiques  $D$ , car toute ascendance aussi divergente que celle du loup Tibétain donnera lieu à une statistique  $D$  négative. Afin de mieux comprendre **l'origine ancestrale** des loups d'Asie orientale, nous avons déduit un ensemble d'arbres phylogénétiques à partir de différentes régions du génome. Nous avons d'abord déduit un arbre coalescent multispécifique dans ASTRAL en utilisant 1 000 régions d'une longueur de 20 kb sur les autosomes de 107 individus<sup>22</sup>. Nous avons constaté que les loups Tibétains formaient la lignée ayant divergé le plus tôt parmi les loups gris (Fig. 2b). Les autres loups d'Eurasie et d'Amérique du Nord se sont regroupés, y compris les loups Indiens, qui sont regroupés avec les loups du Pakistan et apparentés à ceux du sud-ouest de l'Asie (pour un arbre détaillé avec les noms des échantillons, voir la Figure supplémentaire 10).

Comme les phylogénies pangénomiques peuvent être influencées par des processus tels que le flux génétique et le tri incomplet des lignées (ILS), nous avons exploité la manière dont l'architecture du génome est liée au signal phylogénétique<sup>23</sup>. En bref, le chromosome X et les régions à faible recombinaison sont plus susceptibles de conserver la relation historique en raison de différences dans l'hérédité, la taille effective de la population ( $N_e$ ) et la sélection<sup>24-26</sup>. Le chromosome X a une  $N_e$  plus faible puisque les mâles n'en portent qu'une copie, ce qui entraîne un tri des lignées plus rapide et, dans le cas d'un flux génétique véhiculé par les mâles, peut mieux conserver la relation historique<sup>27-30</sup>. Les régions à faible recombinaison subissent une sélection plus forte contre l'ascendance introgressée en raison d'un liaisonement plus élevé et d'un  $N_e$  plus faible<sup>24-31</sup>. **Par conséquent**, nous avons déduit des arbres phylogénétiques à partir du chromosome X et des régions à faible recombinaison afin de tirer parti de leur association avec la relation phylogénétique historique, comme démontré chez de nombreux taxons, y compris les loups<sup>11,32,33-36</sup>.

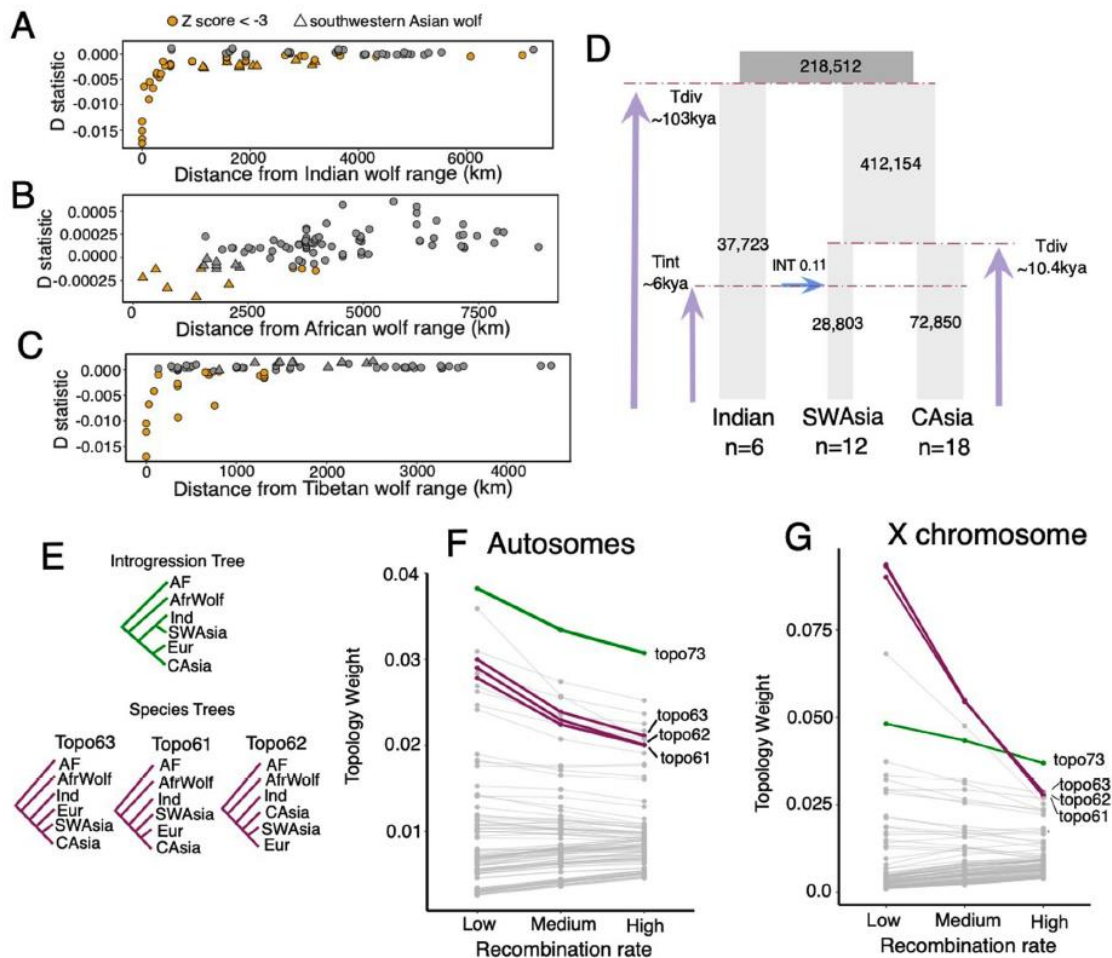
Nos arbres phylogénétiques basés sur les régions à faible recombinaison ( $<0,2$  cM/Mb) du chromosome X et des autosomes ont démontré que les loups du plateau Tibétain forment la branche ayant divergé **le plus tôt** au sein des loups gris. **En revanche**, les loups Indiens se sont regroupés avec les loups du Pakistan et d'Asie du Sud-Ouest, un résultat qui pourrait s'expliquer par un métissage entre ces populations (Fig. 2c, Fig. supplémentaire 11). Il est intéressant de noter que l'un des deux loups du Tadjikistan présentant le plus grand nombre d'allèles communs avec les loups Tibétains s'est regroupé au sein de la lignée Tibétaine, tandis que tous les autres loups du Tadjikistan et du Kirghizistan se sont regroupés au sein de la lignée holarctique (Fig. 2c ; pour un arbre détaillé, voir la Figure supplémentaire 12). Les loups d'Asie orientale ont formé un **clade** bien étayé qui s'est ramifié à la base du reste de la lignée holarctique pour la phylogénie du chromosome X et les phylogénies utilisant des régions à faible recombinaison (Fig. 2c, Fig. suppl. 11, 13). **De plus**, les analyses de pondération topologique ont révélé que les topologies dans lesquelles les loups d'Asie orientale forment la branche ayant divergé le plus tôt au sein de la lignée holarctique sont plus fréquentes dans les régions à faible recombinaison du chromosome X (Fig. 2d-f, Fig.

supplémentaire 14). **Ainsi**, alors que les loups du Tadjikistan, du Pakistan et d'Asie orientale présentent des valeurs  $D$  similaires indiquant un partage significatif d'allèles dérivés avec les loups Tibétains, leurs schémas topologiques sont contrastés. **Cela concorde avec le fait que les loups du Tadjikistan et du Pakistan ont connu un flux génétique récent et/ou périodique provenant des loups Tibétains près de la zone de contact secondaire ; cependant**, cette ascendance Tibétaine ne s'est pas largement répandue au sein de la population. **En revanche**, les loups de l'est de la Chine et de la Mongolie pourraient avoir conservé une ascendance à l'échelle de la population qui est plus divergente que celle des loups d'Eurasie du Nord et similaire à celle des loups Tibétains actuels.

### **Histoire complexe de métissage chez les loups d'Asie du Sud-Ouest**

Nos estimations des proportions de métissage et les statistiques  $D$  suggèrent que les loups d'Asie du Sud-Ouest partagent une ascendance avec la lignée Indienne et une autre espèce de canidé, le loup d'Afrique (Figures supplémentaires 2, 6 et 7). **Nous avons détecté neuf loups présentant un partage d'allèles significatif avec le loup Africain** ; ces loups étaient principalement confinés dans les zones géographiquement les plus proches de l'aire de répartition du loup Africain, dans la péninsule du Sinaï en Égypte (Fig. 3b). Nous avons également détecté un loup de Syrie présentant un partage significatif d'allèles dérivés avec le chacal doré, ainsi qu'avec le loup Africain et le loup Indien (Fig. 8 supplémentaire). Dans l'ensemble, nos résultats de la statistique  $D$  suggèrent que l'ascendance divergente présente chez ces neuf individus est la plus proche de celle du loup Africain, comme l'ont montré des études antérieures<sup>14</sup>.

**Il est intéressant de noter que nous avons constaté que l'ascendance partagée avec la lignée Indienne était presque identique chez tous les loups d'Asie du Sud-Ouest (Fig. 3a, fig. suppl. 6, 9, 15). Il ne semblait y avoir aucune diminution des proportions de métissage de l'ascendance Indienne attribuée à  $K = 6$  depuis la zone de contact au Pakistan jusqu'à la chaîne du Caucase et depuis la Turquie vers l'Europe (Fig. suppl. 2). On a également observé un signal plus faible, mais significatif (score  $Z < -3$ ), d'ascendance partagée avec la lignée Indienne dans certaines parties de la steppe Eurasiennne en Asie centrale, comme au Kazakhstan (Figures supplémentaires 6, 9). Ce signal géographiquement étendu contraste avec ce que nous avons observé pour l'ascendance des loups Tibétains et Africains, qui diminue rapidement à mesure que la distance augmente par rapport à leurs aires de répartition respectives (Fig. 3b, c).**



**Fig. 3. Histoire complexe des mélanges génétiques chez les loups d'Asie du Sud-Ouest.** Valeurs de la statistique  $D$  représentées en fonction de la distance géographique par rapport aux aires de répartition du loup indien (A), du loup Africain (B) et du loup Tibétain (C), telles que définies dans la figure S1. Une statistique  $D$  négative indique un partage accru d'allèles dérivés avec le loup indien A, le loup Africain B et le loup Tibétain C (A) en tant que X sur la base de la topologie ((loup de Norvège, Y), X), renard des Andes). D Le modèle présentant la plus grande vraisemblance, déduit à l'aide de *fastsimcoal2*, correspond à un événement d'introgression entre la lignée indienne et les loups d'Asie du Sud-Ouest. Le temps est exprimé en années et a été obtenu en supposant une durée de génération de 4,4 ans. E Les topologies représentant le scénario d'introgression (vert), la relation historique (violet) et d'autres processus tels que l'ILS (gris) qui ont été utilisés pour déduire les poids topologiques lors de l'utilisation d'un groupe externe (renard andin, AF), du loup Africain (AfrWolf) et des populations de loups gris d'Inde (Ind), d'Asie du Sud-Ouest (SWAsia), d'Asie centrale (CAsia) et d'Europe (Eur). Poids topologiques moyens pour chacune des 105 topologies possibles trouvées dans les régions à faible (<0,2 cM/Mb), moyen (0,2-2 cM/Mb) et élevé (>2 cM/Mb) taux de recombinaison pour l'ensemble des 105 topologies possibles sur les autosomes F et le chromosome X de G

« L'ancêtre Indien équilibré à travers l'Asie du Sud-Ouest pourrait correspondre à un événement historique de métissage entre les lignées Indiennes et holarctiques. Pour étudier l'origine de l'ascendance Indienne, nous avons utilisé *FASTSIMCOAL2*<sup>37</sup> afin de tester trois scénarios démographiques : (A) aucune introgression entre les loups Indiens et les loups d'Asie du Sud-Ouest, (B) les loups d'Asie du Sud-Ouest ont connu un événement d'introgression avec les loups Indiens, et (C) les loups d'Asie du Sud-Ouest se sont formés en tant que lignée hybride entre les loups indiens et ceux d'Asie centrale (Figure supplémentaire 16). Nous avons obtenu des scores de vraisemblance similaires pour les trois modèles, ce qui suggère qu'aucun modèle n'était nettement privilégié par rapport aux autres (Tableau supplémentaire 1). **Cependant**, les topologies incluant une bifurcation (modèles A et B) présentaient les vraisemblances les plus élevées. Le modèle incluant une introgression des loups Indiens vers les loups d'Asie du Sud-Ouest (B) a été privilégié, avec une vraisemblance relative de 62% (tableau supplémentaire 1). Les estimations suggèrent une proportion d'introgression relativement élevée (0,11) de l'Inde vers l'Asie du Sud-Ouest, ce

qui concorde avec nos résultats de la statistique  $D$  (Fig. 2d). Nous avons estimé que l'introggression s'est produite il y a environ 6 000 ans, ce qui est relativement proche de la date de divergence entre les populations d'Asie du Sud-Ouest et d'Asie centrale, il y a environ 10 300 ans. Par conséquent, si une introggression s'est effectivement produite, elle a probablement eu lieu à une époque proche de la séparation entre les populations d'Asie du Sud-Ouest et d'Asie centrale, ce qui explique la probabilité similaire entre les modèles de divergence (A) et d'introggression (B). Il est important de noter que les deux modèles estiment des dates similaires pour la séparation entre les populations d'Asie du Sud-Ouest et d'Asie centrale, et que tous les modèles datent la divergence des loups indiens par rapport aux loups eurasiens à environ 100 000 ans avant le présent, ce qui confère une robustesse aux estimations temporelles. De plus, les modèles d'introggression et de divergence ont produit des estimations similaires pour la taille des populations, suggérant une petite taille de population effective ( $N_e$ ) pour les populations de loups en Inde et en Asie du Sud-Ouest, tandis que les populations d'Asie centrale et la population holarctique ancestrale en Asie avaient une  $N_e$  plus importante (Fig. 16). Nos résultats indiquent que l'ascendance Indienne chez les loups d'Asie du Sud-Ouest reflète un métissage plus ancien ( $> 6$  kya) et/ou une histoire démographique commune plutôt qu'un flux génétique récent au cours des derniers millénaires.

Enfin, nous avons déduit un ensemble d'arbres phylogénétiques afin d'étudier plus en détail l'histoire évolutive des loups d'Asie du Sud-Ouest. Tant dans l'arbre autosomique que dans l'arbre du chromosome X, nous observons que la lignée Indienne et les loups du Pakistan et d'Asie du Sud-Ouest se regroupent en clades frères, tous nichés au sein du clade holarctique (Figures supplémentaires 10 et 13). Cependant, lorsque l'on exclut les loups du Pakistan et d'Asie du Sud-Ouest, les loups Indiens forment la branche ayant divergé le plus tôt dans la phylogénie du loup gris (Figure supplémentaire 16). Ce schéma est cohérent avec une ascendance mineure des loups Indiens au sein des génomes des loups d'Asie du Sud-Ouest, ce qui entraîne une affinité phylogénétique et se traduit par une relation de clades sœurs apparente entre les deux taxons lorsqu'ils sont placés de force dans un arbre bifurqué (Figure supplémentaire 17).

Afin de mieux étudier la répartition du signal phylogénétique à travers le génome, nous avons quantifié la fréquence de 105 topologies possibles en utilisant des fenêtres de 100 SN comprenant des loups d'Inde, d'Asie du Sud-Ouest, d'Europe et d'Asie centrale, le loup d'Afrique et le renard des Andes comme groupe externe (Fig. 3e). La topologie la plus fréquente parmi les autosomes reflétait une introggression dans laquelle les loups d'Asie du Sud-Ouest étaient apparentés aux loups Indiens, y compris dans les régions à faible recombinaison ( $< 0,2$  cM/Mb) (Fig. 3g). La relation historique, dans laquelle la lignée Indienne est celle qui a divergé le plus tôt, figurait parmi les topologies les plus pondérées et, lorsque l'on considère les trois topologies ensemble, constitue le signal phylogénétique le plus répandu dans les autosomes. Pour le chromosome X, toutes les topologies représentant la relation historique étaient les plus fréquentes, y compris dans les régions à faible recombinaison (Fig. 3g). Contrairement aux loups d'Asie de l'Est, qui formaient systématiquement un clade ayant divergé plus tôt au sein des loups holarctiques, nos résultats indiquent que les loups d'Asie du Sud-Ouest présentent deux schémas topologiques principaux : apparentés à la lignée Indienne et regroupés au sein du clade holarctique. Cela pourrait suggérer que les loups d'Asie du Sud-Ouest partagent une grande partie de leur

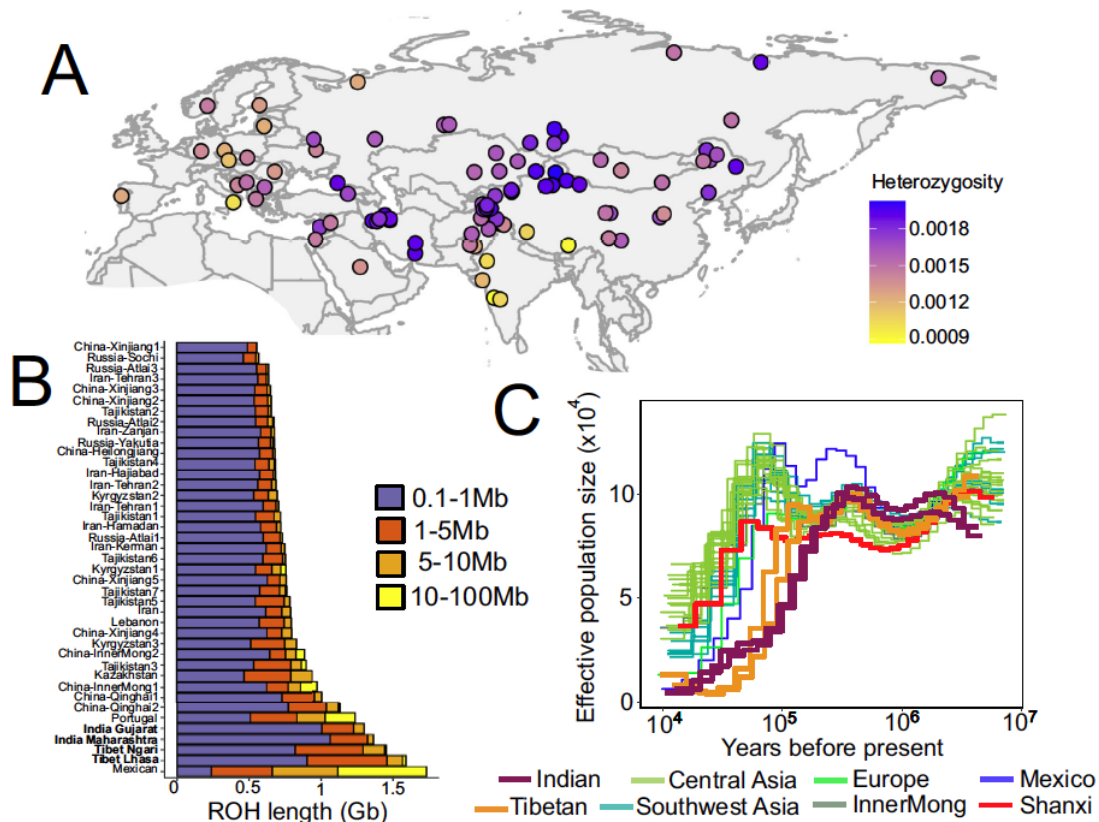
histoire évolutive avec les loups d'Eurasie du Nord et tirent une partie de leur ascendance d'un flux génétique avec une population de loups Indiens similaire à celles que l'on trouve aujourd'hui.

### Impacts historiques et actuels sur la diversité génétique

Notre ensemble de données sur le génome complet nous a permis d'évaluer les schémas de diversité génomique des loups à travers l'Eurasie et l'Amérique du Nord. Nous avons estimé l'hétérozygotie autosomique à l'aide de probabilités de génotypes pour 97 loups d'Eurasie ( $n = 94$ ) et d'Amérique du Nord ( $n = 3$ ), et avons constaté que les loups d'Asie présentent certains des niveaux de diversité génétique les plus bas et les plus élevés de notre ensemble de données (Fig. 4a). Outre l'hétérozygotie bien connue des loups Mexicains et Ibériques, nous avons constaté une hétérozygotie **exceptionnellement faible** chez les loups d'Inde et du plateau Tibétain. Comme l'a montré notre analyse par coalescence markovienne séquentielle par paires (PSMC), cette faible hétérozygotie est en partie due à des déclin de population à long terme et/ou à un manque de connectivité génétique au cours des >100 000 dernières années<sup>38,39</sup>. Nous observons également que le loup du Shanxi, en Chine, avait une taille de population plus faible tout au long du Pléistocène par rapport aux autres loups holarctiques (Fig. 4c). Cela pourrait suggérer que le loup du Shanxi et d'autres loups du sud de la Chine étaient moins connectés aux populations de loups du nord ; **toutefois**, un plus grand nombre de génomes à couverture plus élevée est nécessaire pour exclure les effets d'une faible couverture et d'un échantillonnage limité. Par ailleurs, on observe une augmentation de l'hétérozygotie coïncidant avec les zones de **contact secondaires** entre la lignée holarctique et les lignées indienne et tibétaine, respectivement. Par exemple, les loups métissés des plaines du Pakistan présentaient une hétérozygotie génomique plus élevée que les loups du centre de l'Inde, bien que ces deux populations soient menacées et en déclin de manière similaire. Nous avons constaté que l'hétérozygotie la plus élevée chez les loups d'Asie est géographiquement concentrée en Iran et au Xinjiang en Chine (Fig. 4a). Ces résultats concordent avec nos coefficients de consanguinité estimés à l'aide des probabilités génotypiques<sup>40</sup> (Fig. supplémentaire, 18).

Afin de mieux démêler les processus historiques et actuels qui façonnent la diversité génétique chez les loups, nous avons déduit des segments d'homozygotie (ROH) pour les génomes présentant une couverture supérieure à  $15\times$  à l'aide de BCFtools/RoH<sup>41</sup>. La longueur des ROH a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur le moment où la consanguinité s'est produite. En combinant ces données avec notre connaissance de la durée de génération et en supposant un taux de recombinaison constant à travers le génome, nous avons estimé le moment de la consanguinité ; ainsi, par exemple, une longueur de ROH de 5 Mb suggère que la consanguinité a eu lieu il y a environ 7 générations. Nous constatons que les loups Indiens et Tibétains présentent la consanguinité la plus importante il y a environ 800 à 1 020 ans par rapport à tous les autres loups de notre ensemble de données (Figure supplémentaire 19). Outre le nombre le plus élevé de ROH courts (0,1-1 Mb), les loups Indiens et Tibétains présentent également des ROH plus grands (5-10 Mb), ce qui suggère que leur faible hétérozygotie résulte à la fois d'un isolement à long terme au cours des >100 000 dernières années et de déclin plus récents au cours des derniers siècles (Fig. 4b, Fig. supplémentaire 19). Nous constatons que les déclin de population spectaculaires et bien documentés des loups Mexicains et Ibériques se sont produits plus récemment, au cours du siècle dernier, ce qui concorde avec des travaux antérieurs<sup>7,43</sup> (Figure supplémentaire 19).

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'une grande partie de la variation de la diversité génétique en Asie peut s'expliquer par des processus historiques, notamment l'isolement à long terme, les changements de connectivité coïncidant avec les refuges glaciaires et les zones de contact secondaires.

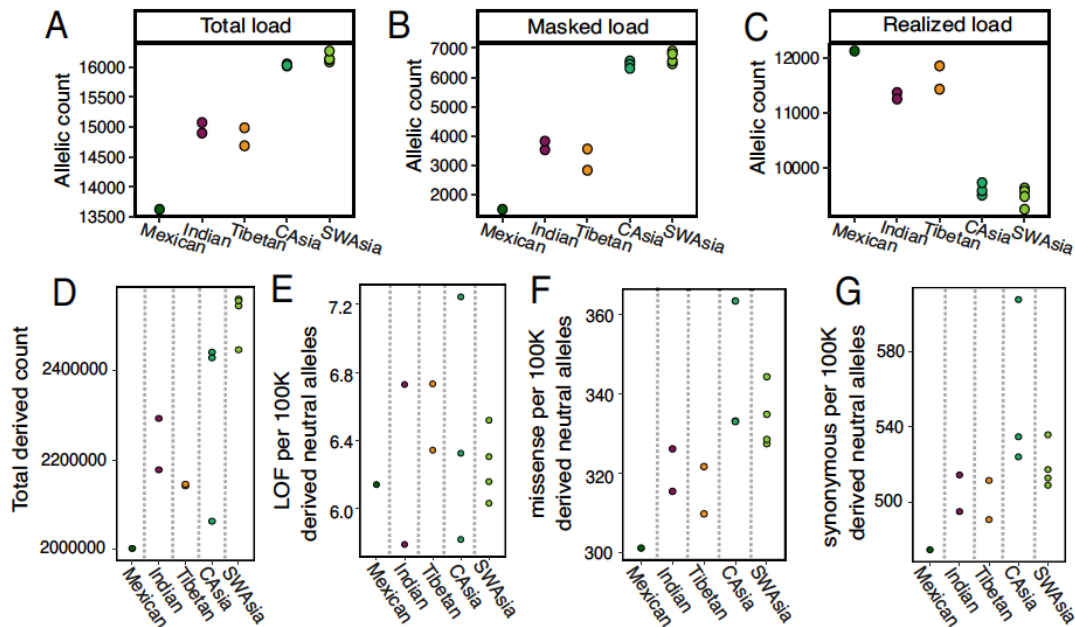


**Fig. 4. Évolution démographique récente et à long terme des loups en Eurasie.** **A** Estimations de l'hétérozygotie à l'échelle du génome pour 96 loups d'Eurasie. **B** Segments d'homozygote (ROH) pour 41 loups, indiquant la somme des longueurs des ROH dans quatre fourchettes de taille : 0,1-1 Mb (ROH courts), 1-5 Mb (ROH courts à moyens), 5-10 Mb (ROH moyens à longs) et 10-100 Mb (ROH longs). Les individus sont classés de haut en bas selon la longueur totale des ROH, les loups représentant les lignées indiennes et tibétaines étant indiqués en gras. **C** Analyse par coalescence markovienne séquentielle par paires (PSMC) de l'histoire démographique de 32 loups d'Eurasie et d'Amérique du Nord

### Charge génétique des populations de loups à travers l'Asie

Les loups Indiens et Tibétains présentant une faible diversité génétique, nous avons examiné comment une autre composante de la diversité génétique – la diversité génétique fonctionnelle – se compare à celle des autres loups d'Asie. **Plus précisément**, nous avons quantifié les schémas de variation présumée délétère, qui devrait avoir un impact négatif sur la valeur sélective. À l'aide de SnpEff pour estimer l'impact **fonctionnel** des mutations, nous avons quantifié la charge génétique totale (nombre total d'allèles dérivés classés comme ayant un impact élevé ou modéré), la charge **réalisée** (état homozygote des allèles dérivés ayant un impact élevé ou modéré) et la charge **masquée** (état hétérozygote des allèles dérivés ayant un impact élevé ou modéré) pour cinq populations de loups sélectionnées, en supposant que les allèles dérivés étaient délétères<sup>44-45</sup>. Les loups issus de populations historiquement plus importantes – d'Asie centrale et du sud-ouest – présentaient une charge génétique masquée et totale plus élevée que les loups issus de populations historiquement plus petites (loups Indiens, Tibétains et Mexicains)<sup>46</sup> (Fig. 5a, b, Fig. supplémentaires 20, 21). Cela concorde avec les prédictions théoriques selon lesquelles des populations plus importantes, présentant une plus grande diversité génétique, devraient également posséder davantage d'allèles

délétères à l'état hétérozygote<sup>47</sup>. **En revanche**, nous avons constaté que les loups Indiens, Tibétains et Mexicains présentent une **charge réalisée** plus élevée et une charge génétique totale plus faible (Fig. 5c) que les populations d'Asie centrale et du sud-ouest de l'Asie. Une **charge réalisée** plus élevée dans ces petites populations est prévisible, car la dérive génétique et la consanguinité entraînent une proportion accrue de génotypes homozygotes, y compris des génotypes délétères.



**Fig. 5. Charge génétique chez certains loups d'Asie et d'Amérique du Nord.** **A** Charge génétique totale, **B** charge masquée et **C** charge réalisée pour 13 loups issus de cinq populations. Les loups issus de populations historiquement plus petites (Mexicains, Indiens et Tibétains) présentent une charge totale plus faible, une charge masquée plus faible et une charge réalisée plus élevée. Le nombre total d'allèles dérivés de chaque loup au sein des cinq populations, les loups Mexicains, Indiens et Tibétains présentant généralement moins d'allèles dérivés. Le nombre d'allèles dérivés **D** comprend tous les allèles dérivés, **E** les mutations avec perte de fonction (LOF) classées comme ayant un impact élevé, **F** les mutations faux-sens classées comme ayant un impact modéré, et **G** les mutations synonymes classées comme ayant un faible impact pour 100 000 allèles dérivés trouvés dans des régions non codantes, supposées neutres. Lorsque l'on tient compte des différences dans le nombre total d'allèles dérivés, les loups Mexicains, indiens et tibétains présentent un nombre réduit de mutations faux-sens et synonymes, mais pas de mutations de perte de fonction, par rapport aux loups d'Asie centrale et d'Asie du Sud-Ouest

Nous avons ensuite mené des analyses supplémentaires afin de déterminer si la charge génétique totale plus faible chez les loups Indiens et Tibétains pouvait être attribuée à une perte de variants dérivés due à la dérive génétique dans une population historiquement petite et/ou à un **processus** de **purge**, par lequel la sélection purificatrice élimine les allèles délétères récessifs à l'état homozygote<sup>48</sup>. Pour rechercher des preuves de **dérive génétique** par **opposition** à la **purge**, nous avons cherché à savoir si les allèles délétères sont perdus à une fréquence plus élevée que les allèles neutres de fond (mutations dans les régions non codantes) pour chaque loup individuel. **En d'autres termes**, le fait que les allèles dérivés soient classés comme délétères entraîne-t-il une perte plus fréquente par rapport aux allèles dérivés neutres chez un individu, comme on pourrait s'y attendre dans le cas d'une purge ? Ou bien les allèles dérivés délétères sont-ils perdus à la même fréquence que les allèles dérivés neutres, ce qui suggérerait que la perte d'allèles dérivés délétères observée dans nos résultats sur la charge génétique totale pourrait être due à la dérive génétique ? Nous avons évalué la prévalence des sites associés à quatre catégories d'impact : impact élevé (perte de fonction, LOF), impact modéré (missense), impact faible (synonyme) et modificateur (non-codant ; supposé ici être sélectivement neutre). Afin de tenir compte des différences dans le nombre

total d'allèles dérivés observées chez les loups, nous avons divisé le nombre total de mutations dérivées LOF, missense et synonymes par le nombre total d'allèles dérivés neutres supposés être soumis à des processus neutres (mutations dans les régions non codantes) pour chaque individu.

Nous avons trouvé des indices suggérant qu'une charge génétique totale plus faible chez les loups Indiens, Mexicains et Tibétains pourrait être due à la **dérive génétique** plutôt qu'à une **purge par sélection purificatrice** ; **toutefois**, nous invitons à la prudence dans l'interprétation de nos résultats sur la charge génétique. Nous n'observons pas que les loups Indiens, Tibétains et Mexicains possèdent proportionnellement moins de mutations à fort impact que les loups d'Asie centrale et du sud-ouest (Figure supplémentaire 5e). Cette observation suggère que la dérive génétique, plutôt que la purge, pourrait avoir éliminé des allèles putativement très délétères à des fréquences comparables à celles des allèles dérivés neutres. Une autre raison pouvant expliquer ces résultats serait que les mutations LOF ont été incorrectement annotées dans la référence canine assemblée à partir de lectures courtes, comme le suggèrent Smeds et al. (2023)<sup>49</sup>. **De plus**, parmi les mutations LOF qui pourraient être correctes, il y a si peu de sites LOF dans le génome ( $n = 145$  en moyenne dans notre ensemble de données) que, compte tenu de ce nombre très faible, leur fréquence pourrait être plus fortement influencée par la dérive génétique que par la sélection purificatrice.

Pour les mutations à impact modéré et faible, nous avons trouvé des éléments suggérant que la purge via la sélection purificatrice pourrait avoir éliminé de manière différentielle les mutations à impact modéré et faible. **Plus précisément**, nous avons constaté que les loups Indiens, Tibétains et Mexicains présentent proportionnellement moins de mutations faux-sens et synonymes pour 100 000 mutations neutres dérivées que les loups d'Asie centrale et du sud-ouest (Figures supplémentaires 5f, g). **Cependant**, nous soulignons qu'il est difficile de différencier les preuves de dérive génétique et de purge, et que des travaux supplémentaires sont nécessaires pour vérifier les impacts fonctionnels de nos mutations faux-sens et synonymes. **Dans l'ensemble**, nous recommandons la prudence lors de l'interprétation de nos résultats sur la charge génétique. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la précision des annotations issues d'un génome assemblé à partir de lectures courtes, les impacts fonctionnels des mutations, et pour augmenter le nombre d'individus inclus dans chaque population.

## DISCUSSION

Nous présentons une analyse complète du génome entier portant sur la structure des populations, les schémas de divergence et la diversité génomique des loups en Asie. Nous constatons que les barrières les plus importantes au flux génétique en Eurasie coïncident avec les zones de contact entre les aires de répartition des lignées Indienne, Tibétaine et holarctique. **Nous montrons que les populations de loups présentes dans les régions méridionales de l'Asie conservent des ancêtres que l'on ne retrouve pas en Eurasie septentrionale, y compris des composantes dont certains ancêtres sont similaires au loup Africain, ainsi qu'aux lignées Indiennes et Tibétaines.** **Contrairement** au flux génétique récurrent à travers l'Eurasie septentrionale au cours du Pléistocène supérieur, nos travaux suggèrent que cette forte connectivité **n'a pas** complètement remplacé l'ascendance existante des loups dans les régions méridionales de l'Asie<sup>13</sup>. **Enfin**, nous constatons que les schémas à grande échelle de la diversité génétique des loups en Asie s'expliquent en grande partie par

des **processus historiques**, tels que l'isolement à long terme au sein de **refuges glaciaires** et de **zones de contact**.

**L'Eurasie** est le **berceau** biogéographique de l'évolution du loup gris ; il n'est donc pas surprenant que les régions méridionales de l'Asie présentent une plus grande diversité évolutive<sup>13,50,51</sup>. Des travaux antérieurs ont également montré que les régions méridionales de l'Asie abritent des ancêtres plus divergents que les loups modernes et ceux du Pléistocène supérieur d'Eurasie septentrionale<sup>13,18,19,52</sup>. **Par exemple**, les loups actuels du sud-ouest de l'Asie et de l'est de la Chine, ainsi que les loups éteints du Japon, possèdent des ancêtres plus divergents qu'un génome de loup ancien datant de 100 000 ans provenant de Sibérie<sup>13</sup>. Pour les loups d'Asie orientale, nous avons détecté un **partage** significatif d'allèles dérivés avec la lignée Tibétaine en tant que P3, mais pas avec la lignée Indienne, le loup Africain ou le chacal doré en tant que P3 (Figures supplémentaires 5-8). Bien que cela suggère que l'origine de cet ancêtre chez les loups d'Asie orientale soit similaire à celle de la lignée Tibétaine moderne, le degré de similitude de cet ancêtre reste incertain. Nos arbres phylogénétiques apportent quelques éclaircissements. Ni l'arbre phylogénétique du chromosome X, ni les topologies les plus fréquentes obtenues à l'aide de Twist n'ont montré que les loups d'Asie orientale se situaient au sein de la lignée Tibétaine ou en étaient apparentés (Fig. 2f, Fig. supplémentaire 14), comme on pourrait s'y attendre si un flux génétique entre les loups d'Asie orientale et les loups Tibétains s'était produit récemment<sup>53</sup>. **Au contraire, nos résultats ont montré que les loups d'Asie orientale formaient une lignée indépendante qui a divergé avant le reste des loups holarctiques, mais après la lignée Tibétaine.** Leur position de divergence précoce est particulièrement évidente dans les phylogénies basées sur le chromosome X et à faible recombinaison, un schéma qui pourrait refléter la structure historique des populations à la fin du Pléistocène<sup>30</sup>. Nous émettons donc **l'hypothèse** que les loups de l'est de l'Asie pourraient avoir une ascendance partielle étroitement liée, mais distincte, des loups Tibétains actuels, et qu'ils n'ont pas été entièrement remplacés par un flux génétique important avec les loups holarctiques du nord à la fin du Pléistocène.

En accord avec cela, des travaux antérieurs ont montré que les génomes historiques des loups du sud de la Chine et des loups Tibétains occupent les extrémités opposées de l'axe PC2, ce qui suggère que les loups du sud de la Chine pourraient posséder une ascendance distincte de la lignée tibétaine<sup>54</sup>. **De plus, un génome mitochondrial datant d'environ 100 000 ans, provenant d'un loup d'Asie orientale, représentait une lignée maternelle jusqu'alors non identifiée qui a divergé avant les autres loups holarctiques, mais après la lignée Tibétaine.** Des fossiles de loups ont été retrouvés dans la plupart des régions de Chine au cours des 100 000 dernières années, y compris des restes vieux de 12 000 ans provenant de la province méridionale du Jiangxi<sup>56</sup>. À cette époque, une grande partie du sud de la Chine était plus aride, avec des forêts mixtes de feuillus occupant les zones où se trouvent aujourd'hui les forêts pluviales de mousson<sup>57</sup>. Il est donc plausible qu'une ascendance distincte de la lignée Tibétaine moderne ait pu exister au sein d'un refuge glaciaire dans le sud de la Chine et n'ait pas été complètement homogénéisée par les vagues d'expansion des loups d'Eurasie du Nord. Il serait nécessaire d'intégrer dans de futures analyses des génomes anciens provenant de l'est de la Chine et le génome du loup Japonais datant de 35 000 ans, récemment séquencé, afin de replacer cette ascendance distincte dans un contexte spatio-temporel au cours du Pléistocène<sup>19</sup>.

Un résultat inattendu de notre étude est que l'ascendance de la lignée Indienne est présente chez les loups de toute l'Asie du Sud-Ouest. La date et la manière dont la structure de population actuelle s'est formée en Asie du Sud-Ouest restent floues, mais nos résultats apportent quelques éclaircissements. Contrairement aux loups d'Asie orientale, qui forment systématiquement une lignée ayant divergé précocement au sein des loups holarctiques, les loups d'Asie du Sud-Ouest présentent des liens phylogénétiques variables à travers leur génome, les regroupant principalement au sein de la lignée holarctique ou en tant que lignée sœur du loup Indien. **Cependant**, le chromosome X était dominé par des topologies reflétant la relation historique avec les loups Indiens en tant que lignée ayant divergé le plus tôt, en particulier dans les régions à faible recombinaison (<0,2 cM/Mb). Le fait que cette relation historique soit la plus répandue sur le chromosome X concorde avec le fait que les loups d'Asie du Sud-Ouest font remonter leur principal patrimoine génomique à la lignée holarctique. Ensemble, ces résultats suggèrent qu'un **métissage ancien** avec le loup Indien a contribué de manière significative à la composition génétique des loups d'Asie du Sud-Ouest. Des restes anciens de loups ont été documentés en Asie du Sud-Ouest tout au long du Pléistocène supérieur, suggérant une continuité à long terme de la présence des loups<sup>56,58-60</sup>. Les génomes issus de ces restes de loups anciens en Asie du Sud-Ouest permettent de vérifier directement si l'ascendance Indienne était déjà présente il y a des milliers d'années, et s'il y a eu des changements dans l'ascendance Indienne par rapport à l'ascendance holarctique au cours du Pléistocène supérieur.

**Dans l'ensemble**, nos travaux combinent différentes approches méthodologiques pour mieux cerner l'histoire évolutive d'une espèce à large répartition. Pour de nombreuses espèces au cours du Pléistocène supérieur, leurs populations ont suivi des trajectoires évolutives distinctes d'isolement et d'expansion en réponse aux changements climatiques. Le processus par lequel les populations se mélangent ou non, et à quelle fréquence, est un facteur clé de la spéciation et de l'évolution. Les **résultats** de notre étude concernant des populations de loups distinctes sur le plan évolutif dans les régions méridionales pourraient représenter un schéma courant chez les espèces à large répartition, comme cela a été documenté de manière similaire chez les renards roux (*Vulpes vulpes*), les loutres Eurasiennes (*Lutra lutra*) et les ours bruns (*Ursus arctos*)<sup>29,61,62</sup>. Bien que notre étude comble certaines lacunes dans nos connaissances sur les loups, de nombreuses questions restent sans réponse. Par exemple, pourquoi certaines populations de loups semblent avoir été mieux connectées aux populations nordiques (Asie du Sud-Ouest, Asie de l'Est) au cours du Pléistocène supérieur, tandis que d'autres présentent un faible flux génétique et des zones de contact marquées (Inde et Tibet) ? Grâce aux nombreux génomes anciens et modernes désormais disponibles, les loups sont en passe de servir de modèle précieux pour étudier comment le flux génétique intra-populationnel, l'hybridation inter-espèces et l'isolement au cours du Pléistocène supérieur ont contribué à la diversité des espèces actuelles.

### Implications pour la conservation

Notre étude a plusieurs implications pour la conservation de diverses populations de loups en Asie. Sur le plan taxonomique, notre étude corrobore les appels précédents en faveur d'une révision taxonomique nécessaire pour les loups d'Asie<sup>9,63,64</sup>. Alors que les loups de l'Inde à la Turquie sont collectivement décrits comme *Canis lupus pallipes*, notre étude soutient des travaux antérieurs indiquant que la lignée Indienne est confinée à l'Inde et à certaines parties du Pakista<sup>11,15,65</sup>. En particulier, nos travaux utilisant des séquences du **génom**

viennent étayer la répartition proposée des loups Indiens et Tibétains, basée sur des données génétiques mitochondriales ou nucléaires limitées<sup>11,66,67</sup>. Ces résultats appuient la **description formelle** du loup Indien comme un **taxon distinct** des loups d'Asie du Sud-Ouest. Une telle reconnaissance souligne également que les loups Indiens sont bien plus menacés qu'on ne le reconnaît actuellement.

Récemment, on a estimé qu'environ 2 800 individus vivaient en Inde et probablement moins de 300 au Pakistan<sup>68-70</sup>. Cette estimation de la population et son déclin continu ont classé le loup Indien comme « vulnérable » sur la Liste rouge de l'UICN, indiquant qu'il est fortement menacé d'extinction à l'état sauvage<sup>70</sup>. Pour les loups d'Asie du Sud-Ouest actuellement considérés comme « *Canis lupus pallipes* », nous constatons que cette population distincte pourrait être géographiquement limitée par le détroit du Bosphore en Turquie et la chaîne du Caucase (Fig. 1a, b et 2a). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la structure génétique des populations dans les zones arides du sud de l'Asie centrale, telles que le désert du Karakoum au Turkménistan et le désert du Kyzylkoum en Ouzbékistan. Nous suggérons que la spécificité morphologique et génomique des loups d'Asie du Sud-Ouest justifie le statut de **sous-espèce**, conformément aux recommandations récentes.

**De plus**, notre étude clarifie la répartition et fournit des informations sur le statut de conservation de la lignée Tibétaine. Nous avons constaté que l'ascendance Tibétaine est fortement restreinte au plateau Tibétain, les populations immédiatement adjacentes (Pakistan, Tadjikistan et plaines de l'Inde) ne présentant qu'une faible ascendance Tibétaine. Grâce à des déductions supplémentaires basées sur les données du génome complet de cette étude, nous proposons que l'étendue de distribution la plus occidentale de la lignée Tibétaine se situe dans la région orientale du Ladakh, en Inde<sup>15,66,67</sup>. La clarification de leur répartition à l'aide de la génétique a déjà eu un impact significatif sur le statut de conservation du loup Tibétain, qui a récemment été classé comme « Vulnérable » sur la Liste rouge de l'UICN<sup>71</sup>. Nos estimations de la diversité génétique des loups Indiens et Tibétains soulignent également leur statut précaire, car ils présentent l'une des diversités génétiques les plus faibles parmi les loups inclus dans notre étude. Bien que la petite taille de leur population à long terme ait pu les protéger contre l'acquisition de variations délétères, comme le suggèrent nos analyses de la charge génétique, ils restent confrontés à un potentiel adaptatif réduit qui pourrait entraver leur capacité à s'adapter aux futurs changements environnementaux.

Notre étude souligne l'importance de décrire de manière rigoureuse les loups dans certaines régions de Chine. La présence de loups a été documentée aussi loin au sud que le Guangxi en Chine, une province limitrophe du Vietnam<sup>56</sup> (Figure supplémentaire 1). En 1936, on signalait la présence de loups dans certaines parties du centre et du sud de la Chine, mais ils étaient déjà moins courants que dans le nord de la Chine<sup>73</sup>. Un rapport de 2003 concluait que les loups avaient été largement éradiqués des régions du Guangxi où ils étaient encore présents dans les années 1990, mais qu'ils étaient peut-être encore présents dans la réserve naturelle nationale de Nanling<sup>74</sup>. En réponse à leur déclin dans le pays, le loup a récemment été ajouté en 2021 à la liste des espèces protégées de classe II de la Liste des espèces sauvages sous protection spéciale de l'État chinois. À la connaissance des auteurs, nous n'avons pas connaissance d'estimations publiées concernant la taille et l'état de la population, ni de description morphologique, des loups dans les régions du sud de la Chine. Compte tenu de leur spécificité évolutive, nos travaux soulignent la nécessité de mener davantage de

recherches sur leur répartition, leur génétique, leur morphologie et l'état de leur population afin de préserver les populations restantes.

**Dans l'ensemble**, notre étude souligne que les régions du sud de l'Asie abritent la plupart des populations distinctes sur le plan évolutif parmi les loups gris, et qu'elles sont également les plus menacées. La lignée Indienne compte environ 2 800 individus en Inde et la lignée Tibétaine environ 3 000 individus<sup>68,71</sup>. Il reste moins de 750 loups sur la péninsule Arabique, une population unique sur le plan évolutif mais peu étudiée, dont un seul génome a été séquencé. Il est possible que les loups du sud de la Chine aient déjà disparu. Les loups de ces régions du sud de l'Asie sont affectés par de nombreuses menaces d'origine humaine, en particulier les populations restantes du sud de la Chine et de l'Inde. Notre étude souligne la nécessité de donner la priorité à la conservation de ces populations afin de préserver toute la diversité des loups existants.

## METHODES

### Informations sur les échantillons et leur traitement

Cette étude porte sur 20 nouveaux génomes complets provenant de loups du Pakistan ( $n = 8$ ), d'Israël ( $n = 1$ ), du Liban ( $n = 1$ ), d'Afghanistan ( $n = 1$ ), de Turquie ( $n = 1$ ), d'Ukraine ( $n = 1$ ), de Slovaquie ( $n = 1$ ), du Kazakhstan ( $n = 3$ ) et de Russie ( $n = 3$ ). Les loups du Pakistan étant inscrits à l'Annexe 1 de la CITES, les échantillons provenant de ce pays ont été exportés vers les États-Unis pour être séquencés sous le numéro de permis CITES P-50/2020. Des permis régionaux et l'autorisation de séquencer les échantillons provenant des collections de musées (Musée d'histoire naturelle Steinhardt, Musée d'histoire naturelle du Danemark, Musée d'Ekaterinbourg) ont été obtenus pour le reste des échantillons de loups. Pour tous les échantillons de loups provenant du Pakistan et d'Israël, nous avons extrait l'ADN de ces échantillons à l'aide du kit DNAeasy Blood and Tissue (Qiagen) en suivant le protocole du fabricant. Des bibliothèques indexées ont été construites à l'aide du kit NEBNext Ultra DNA Library Prep pour Illumina, conformément aux instructions du fabricant, puis nettoyées et sélectionnées par taille à l'aide de billes Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Les bibliothèques ont ensuite été séquencées sur une cellule de flux Illumina NovaSeq 6000 S4 en paire de fins de 150 pb (Illumina) au UC Davis Genome Center. Pour le reste des nouveaux échantillons de loup, l'ADN a été extrait à l'aide du système de purification KingFisher Duo Prime (Thermo-Fisher). Les bibliothèques ont été construites à l'aide des protocoles du Beijing Genomics Institute (BGI), préalablement optimisés<sup>76-77</sup> avec des adaptateurs de 10  $\mu$ M. Ces échantillons ont été envoyés au BGI de Copenhague pour la construction des bibliothèques et séquencés sur 1/8 de piste chacun sur DNBSEQ en paire de 150 pb. Le loup Indien du Maharashtra provenait d'une étude précédente et a été reséquencé avec une profondeur de séquençage plus importante selon les protocoles de Hennelly et al. 2021<sup>11</sup>. **Enfin**, nous avons séquencé un loup d'Afghanistan provenant d'un spécimen conservé au Musée d'histoire naturelle du Danemark (référence du musée : 4499). Ce spécimen a été prélevé en 1949, et nous avons prélevé un échantillon de son cartilage. Conformément à Gilbert et al. 2007<sup>78</sup>, le tissu cartilagineux cutané a été digéré dans un tampon à base de DDI et de protéinase K. Le digestat a été purifié selon Dabney et al. 2013<sup>79</sup> à l'aide d'un tampon de liaison modifié<sup>80</sup>. L'échantillon a été intégré dans une bibliothèque à l'aide d'un protocole modifié à tube unique<sup>76-77</sup>. L'échantillon a ensuite été séquencé sur un BGI DNBSEQ. Nous avons constitué un ensemble de données comprenant 95 génomes de

canidés supplémentaires déjà publiés, ce qui porte à 115 le nombre total de génomes de canidés inclus dans l'étude (Données supplémentaires 1).

**Alignement, identification des variants et filtrage...**

**Analyse en composantes principales et proportions de mélange individuel...**

**Évaluation des barrières au flux génétique chez les loups à travers l'Eurasie...**

**Relations phylogénomiques...**

**Évaluation du mélange génétique à l'échelle du génome...**

**Modélisation démographique avec fastsimcoal2...**

**Histoire démographique à long terme avec PSMC...**

**Diversité génétique et segments d'homozygotie...**

**Coefficient de consanguinité...**

### **Charge génétique**

Nous avons sélectionné 14 individus présentant une couverture de séquençage  $>20\times$  provenant d'Inde ( $n = 2$ ), du plateau Tibétain ( $n = 2$ ), du sud-ouest de l'Asie ( $n = 4$ ), d'Asie centrale ( $n = 4$ ) et du loup du Mexique ( $n = 1$ ). Nous avons sélectionné ces loups pour évaluer la **charge génétique** des loups Indiens et Tibétains, en comparant la charge génétique des loups Indiens et Tibétains à celle de deux populations adjacentes génétiquement diverses, ainsi qu'à celle d'un individu de loup Mexicain dont la très faible diversité génétique avait déjà été documentée. Nous avons utilisé SpEff pour annoter un fichier VCF, en incluant uniquement les sites bialléliques sans indels et sans données manquantes, avec une profondeur minimale de 10, une profondeur maximale de 60, un nombre minimal d'allèles de 2 et une qualité minimale de séquence ( $--minQ$ ) de 30.

Pour polariser notre ensemble de données, nous avons suivi la méthode de Smeds et al. (2022)<sup>49</sup> afin de mapper deux groupes externes au génome de référence du chien uniquement sur les sites présentant une profondeur minimale de 4, tant au niveau des groupes externes que des sites non variants inclus. Nous avons utilisé le dhole (*Cuon alpinus*) et le renard des Andes (*Lycalopex culpaeus*) comme groupes externes. Nous avons ensuite procédé à une pseudo-haploïdisation des génomes des groupes externes et n'avons conservé que les sites pour lesquels l'allèle était identique dans les deux groupes externes (Smeds et al. 2022). Nous avons utilisé cette méthode pour ajouter les informations sur l'allèle ancestral à notre fichier VCF annoté, et avons supposé que l'allèle dérivé était l'allèle délétère<sup>49</sup>.

Nous avons compté le nombre d'allèles dérivés et déterminé s'ils se trouvaient à l'état homozygote ou hétérozygote pour les variants prédits par SpEff comme ayant un impact élevé, modéré ou faible sur la fonction protéique. Un impact élevé est prédit comme causant une perte de fonction ou une troncature de la protéine (gain de codon stop, mutation par décalage du cadre de lecture) ; un impact modéré est prédit comme modifiant l'efficacité de la protéine (variant missense), et un impact faible est supposé inoffensif, comme un variant synonyme. Nous avons également calculé les mesures suivantes : la **charge totale** (nombre total d'allèles dérivés classés comme ayant un impact élevé ou modéré), la **charge réalisée** (état homozygote des allèles dérivés ayant un impact élevé ou modéré) et la **charge masquée** (état hétérozygote des allèles dérivés ayant un impact élevé ou modéré).

Afin d'étudier les preuves d'une perte différentielle de variants dérivés pour différents types de mutations, nous avons évalué les proportions relatives des catégories de mutations fournies par SpEff. Ces catégories de mutations sont les suivantes : les mutations avec perte de fonction (LOF) qui impliquent un impact prédit élevé sur la structure protéique, les mutations faux-sens (impact modéré), les mutations synonymes (impact faible) et les mutations « modificatrices » présentes dans les régions non codantes (sans impact). Nous avons calculé le nombre d'allèles dérivés et le nombre d'allèles dérivés identifiés comme hétérozygotes et homozygotes dans chacune des quatre catégories de mutations pour chaque individu de la population de loups. Afin de tenir compte des différences dans le nombre total d'allèles dérivés entre les individus, nous avons calculé le nombre moyen d'allèles dérivés pour 100 000 allèles neutres dérivés pour la charge mutationnelle totale, les mutations LOF, les mutations faux-sens et les mutations synonymes. Nous avons considéré la catégorie des modificateurs comme des allèles dérivés neutres. **Plus précisément**, nous avons calculé la charge mutationnelle comme suit : (nombre total d'allèles dérivés dans les catégories LOF et missense / nombre total d'allèles dérivés dans la catégorie des modificateurs) multiplié par 100 000.

Received: 12 February 2025; Accepted: 4 December 2025;  
Published online: 24 December 2025

## References

- Hogg, C. J. Translating genomic advances into biodiversity conservation. *Nat. Rev. Genet.* **25**, 362–373 (2024).
- Fredrickson, R. J., Siminski, P., Woof, M. & Hedrick, P. W. Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *Proc. R. Soc.* **274**, 2365–2371 (2007).
- Battilani, D. et al. Beyond population size: whole-genome data reveal bottleneck legacies in the peninsular Italian wolf. *J. Hered.* **116**, 10–23 (2025).
- Schweizer, R. M. et al. Genetic subdivision and candidate genes under selection in North American gray wolves. *Mol. Ecol.* **25**, 380–402 (2015).
- Kardos, M. et al. Genomic consequences of intensive inbreeding in an isolated wolf population. *Nat. Ecol. Evol.* **2**, 124–131 (2018).
- Robinson, J. A. et al. Genomic signatures of extensive inbreeding in Isle Royale wolves, a population on the threshold of extinction. *Sci. Adv.* **5**, eaau0757 (2018).
- Taron, U. H. et al. A sliver of the past: the decimation of the genetic diversity of the Mexican wolf. *Mol. Ecol.* **30**, 6340–6354 (2021).
- Lobo, D., Lopez-Bao, J. V. & Godinho, R. The population bottleneck of the Iberian wolf impacted genetic diversity but not admixture with domestic dogs: a temporal genomic approach. *Mol. Ecol.* **32**, 5986–5999 (2023).
- Werhahn, G., Senn, H., Macdonald, D. W. & Sillero-Zubiri, C. The diversity of genus *Canis* challenges conservation biology: a review of available data on Asian wolves. *Front. Ecol. Evol.* **10**, 10.3389 (2022). 2022.
- Burbrink, F. T., DeBaun, D., Foley, N. M. & Murphy, W. J. Recombination-aware phylogenomics. *Trends Ecol. Evol.* **40**, 900–912 (2025).
- Pease, J. B. & Hahn, M. W. More accurate phylogenies inferred from low-recombination regions in the presence of incomplete lineage sorting. *Evolution* **67**, 2376–2384 (2013).
- Schumer, M. et al. Natural selection interacts with recombination to shape the evolution of hybrid genomes. *Science* **360**, 565–660 (2018).
- Martin, S., Davey, H., Salazar, C. & Jiggins, C. D. Recombination rate variation shapes barriers to introgression across butterfly genomes. *PLoS Biol.* **17**, e2006288 (2019).
- Schaffner, S. T. The X chromosome in population genetics. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 43–51 (2004).
- Webster, T. H. & Sayres, M. A. W. Genomic signatures of sex-biased demography: progress and prospects. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **31**, 62–71 (2016).
- de Jong, M. J. et al. Range-wide whole-genome resequencing of the brown bear reveals drivers of intraspecific divergence. *Commun. Biol.* **6**, 153 (2023).
- de Jong, M. J. et al. Red deer resequencing reveals the importance of sex chromosomes for reconstructing Late Quaternary events. *Mol. Biol. Evol.* **42**, 1–17 (2025).
- Nachman, M. W. & Payseur, B. A. Recombination rate variation and speciation: theoretical predictions and empirical results from rabbits and mice. *Philos. Trans. R. Soc. B* **367**, 409–421 (2012).
- Li, G., Figueiro, H. V., Eizirik, E. & Murphy, W. J. Recombination-aware phylogenomics reveals the structured genomic landscape of hybridizing cat species. *Mol. Biol. Evol.* **36**, 2111–2126 (2019).
- vonHoldt, B. M. et al. Persistence and expansion of cryptic endangered red wolf genomic ancestry along the American Gulf coast. *Mol. Ecol.* **31**, 5440–5454 (2021).

10. Wang, M. S. et al. Ancient hybridization with an unknown population facilitated high-altitude adaptation of canids. *Mol. Biol. Evol.* **37**, 2616–2629 (2020).
11. Hennelly, L. M. et al. Ancient divergence of Indian and Tibetan wolves revealed by recombination-aware phylogenomics. *Mol. Ecol.* **30**, 6687–6700 (2021).
12. Wang, M. S. et al. Genome sequencing of a gray wolf from Peninsular India provides new insights into the evolution and hybridization of gray wolves. *Genome Biol. Evol.* **2**, evac012 (2022).
13. Bergstrom, A. et al. Grey wolf genomic history reveals a dual ancestry of dogs. *Nature* **607**, 313–320 (2022).
14. Gopalakrishnan, S. et al. Interspecific gene flow shaped the evolution of the Genus *Canis*. *Curr. Biol.* **28**, P3441–P3449 (2018).
15. Hennelly, L. M. et al. Genomic analysis of wolves from Pakistan clarifies boundaries among three divergent wolf lineages. *J. Heredit.* **115**, 339–348 (2023).
16. Mallik, K. et al. Population genetics of the African wolf (*Canis lupaster*) across its range: first evidence of hybridization with domestic dogs in Africa. *Mamm. Biol.* **100**, 645–658 (2020).
17. Niemann, J. et al. Extended survival of Pleistocene Siberian wolves into the early 20th century on the island of Honshu. *iScience* **24**, 101904 (2020).
18. Ramos-Madrugal, J. et al. Genomes of Pleistocene Siberian wolves uncover multiple extinct wolf lineages. *Curr. Biol.* **31**, 198–206 (2021).
19. Segawa, T. et al. Paleogenomics reveals independent and hybrid origins of two morphologically distinct wolf lineages endemic to Japan. *Curr. Biol.* **32**, 2494–2504 (2022).
20. Marcus, J., Ha, W., Barber, R. F. & Novembre, J. Fast and flexible estimation of effective migration surfaces. *eLife* **10**, e61927 (2021).
21. Green, R. E. et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* **328**, 710–722 (2010).
22. Zhang, C., Rabiee, M., Sayari, E. & Mirarab, S. ASTRAL-III: polynomial time species tree reconstruction from partially resolved gene trees. *BMC Bioinform.* **19**, 153 (2018).
23. Heffelfinger, J. R., Nowak, R. M. & Paetkau, D. Clarifying historical range to aid recovery of the Mexican wolf. *J. Wildl. Manag.* **81**, 766–777 (2017).
24. Mathur, S. & DeWoody, J. A. Genetic load has potential in large populations but is realized in small inbred populations. *Evol. Appl.* **14**, 1540–1557 (2021).
25. Dussex, N., Morales, H. E., Grossen, C., Dalen, L. & Oosterhout, C. Purging and accumulation of genetic load in conservation. *Trends Ecol. Evol.* **38**, P961–P969 (2023).
26. Smeds, L. & Ellegren, H. From high masked to high realized genetic load in inbred Scandinavian wolves. *Mol. Ecol.* **32**, 1567–1580 (2022).
27. Lurino, D. A. et al. A Middle Pleistocene wolf from central Italy provides insights on the first occurrence of *Canis lupus* in Europe. *Sci. Rep.* **12**, 2882 (2022).
28. Sotnikova, M. & Rook, L. Dispersal of the Canini (Mammalia, Canidae: Caninae) across Eurasia during the Late Miocene to Early Pleistocene. *Q. Int.* **212**, 86–97 (2010).
29. Gelabert, P. et al. Genome-scale sequencing and analysis of human, wolf, and bison DNA from 25,000-year-old sediment. *Curr. Biol.* **31**, 3564–3574 (2021).
30. Hibbins, M. S. & Hahn, M. W. Phylogenomic approaches to detecting and characterizing introgression. *Genetics* **220**, iyab173 (2021).
31. Wang, G. D. et al. Genomic approaches reveal an endemic subpopulation of gray wolves in Southern China. *iScience* **20**, 110–118 (2019).
32. Zhang, M. et al. Ancient mitogenomes reveal the maternal genetic history of East Asian gray wolves (*Canis lupus*). *Integr. Zool.* **1–11** (2025).
33. Wang, L. et al. The geographical distribution of grey wolves (*Canis lupus*) in China: a systematic review. *Zool. Res.* **37**, 315–326 (2016).
34. Pinxian, W. & Xiangjun, S. Last glacial maximum in China: comparison between land and sea. *Catena* **23**, 341–353 (1994).
35. Dayan, T., Simberloff, D., Tchermov, E. & Yom-Tov, Y. Canine carnassial: character displacement in the wolves, jackals, and foxes of Israel. *Biol. J. Linn. Soc.* **45**, 313–331 (1992).
36. Kurten, B. The carnivora of the Palestine caves. *Acta Zool. Fenn.* **107**, 74 (1965).
37. Feng, C., Wang, J., Liston, A. & Kang, M. Recombination variation shapes phylogeny and introgression in wild diploid strawberries. *Mol. Biol. Evol.* **40**, msad049 (2023).
38. Jiang, Z. et al. Gene flow and an anomaly zone complicate phylogenomic inference in a rapidly radiated avian family (Prunellidae). *BMC Biol.* **22**, 49 (2024).
39. Monthey, J. D. & Spellman, G. M. Recombination rate variation shapes genomic variability of phylogeographic structure in a widespread North American songbird (Aves: *Certhia americana*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **196**, 108088 (2024).
40. Excoffier, L., Dupanloup, I., Huerta-Sánchez, E., Sousa, V. C. & Foll, M. fastsimcoal2: Demographic inference under complex evolutionary scenarios. *Bioinformatics* **37**, 4842–4849 (2021).
41. Li, H. & Durbin, R. Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature* **475**, 493–496 (2011).
42. Mazet, O., Rodriguez, W., Grusea, S., Boitard, S. & Chikhi, L. On the importance of being structured: instantaneous coalescence rates and human evolution—lessons from ancestral population size inference?. *Heredity* **116**, 362–371 (2015).
43. Hanghoj, K., Molke, I., Andersen, P. A., Manica, A. & Korneliussen, T. S. Fast and accurate relatedness estimation from high-throughput sequencing data in the presence of inbreeding. *GigaScience* **8**, 1–9 (2019).
44. Narasimhan, V. et al. BCFtools/ROH: a hidden Markov model approach for detecting autozygosity from next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **32**, 1749–2751 (2016).
45. Thompson, E. A. Variation in meiosis, across genomes, and in populations. *Genetics* **194**, 301–326 (2013).
46. Gomez-Sanchez, D. et al. On the path to extinction: inbreeding and admixture in a declining grey wolf population. *Mol. Ecol.* **27**, 3599–3612 (2018).
47. Bertorelle, G. et al. Genetic load: genomic estimates and applications in non-model animals. *Nat. Rev. Genet.* **23**, 492–503 (2022).
48. Cingolani, P. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly* **6**, 80–92 (2012).
49. Sheikh, K. M. & Molur, S. *Status and Red List of Pakistan's Mammals. Based on the Conservation Assessment and Management Plan* 312 (IUCN Pakistan, 2003).
50. Hennelly, L. M. et al. *Canis lupus ssp. pallipes* (The IUCN Red List of Threatened Species, 2025).
51. Werhahn, G. et al. *Himalayan Wolf: Canis lupus ssp. chanco* (The IUCN Red List of Threatened Species, 2023).
52. Kardos, M. et al. The crucial role of genome-wide genetic variation in conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**, e2104642118 (2021).
53. Sowerby, A. C. *China's Natural History: A Guide to the Shanghai Museum* (Royal Asiatic Society of Great Britain and Ireland, North China Branch, 1936).
54. Fellowes, J. R., Chan, B. P. L., Lau, C. M. N., Sai-Chit, N. & Siu, G. L. P. 2003. *Report of Rapid Biodiversity Assessment at Shiwandashan National Nature Reserve and National Forest Park, Southwest Guangxi, China, 2000–2001* (Kadoorie Farm and Botanic Garden in collaboration with Guangxi Forestry Department, Guangxi Institute of Botany, South China Normal University, 2003).
55. Bensen, G. T. et al. Navigating complex geopolitical landscapes: challenges in conserving the endangered Arabian wolf. *Biol. Conserv.* **296**, 110655 (2024).
56. Caroe, C. et al. Single-tube library preparation for degraded DNA. *Methods Ecol. Evol.* **9**, 410–419 (2017).
57. Mak, S. S. T. et al. Comparative performance of the BGISEQ-500 vs Illumina HiSeq2500 sequencing platform for paleogenomic sequencing. *GigaScience* **6**, 1013 (2017).
58. Gilbert, M. T. P. et al. Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science* **317**, 1927–1930 (2007).
59. Dabney, J. et al. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 15758–15763 (2013).
60. Allentoft, M. E. et al. Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature* **522**, 167–172 (2015).
61. Schubert, M. et al. Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nat. Protoc.* **9**, 1056–1082 (2014).
62. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with

60. Mashkour, M. et al. Carnivores and their prey in the Wezmeh Cave (Kermanshah, Iran): a Late Pleistocene refuge in the Zagros. *Int. J. Osteoarchaeol.* **19**, 678–694 (2008).
61. Plessis, S. J., Blaxter, M., Koepfli, K. P., Chadwick, E. A. & Hailer, F. Genomics reveals complex population history and unexpected diversity of Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Britain relative to genetic methods. *Mol. Biol. Evol.* **40**, msad207 (2023).
62. Statham, M. J. et al. Range-wide multilocus phylogeography of the red fox reveals ancient continental divergence, minimal genomic exchange, and distinct demographic histories. *Mol. Ecol.* **23**, 4813–4830 (2014).
63. Alvares, F. et al. Old World *Canis* spp. with taxonomic ambiguity: workshop conclusions and recommendations. *Canid News* **21** <http://hdl.handle.net/10138/327703> (2019).
64. Krofel, M., Hattlauf, J., Bogdanowicz, W., Cambell, L. A. D. & Godinho, R. Towards resolving taxonomic lineages in wolf, dog, and jackal of Africa, Eurasia, and Australasia. *J. Zool.* **316**, 155–168 (2022).
65. Sillero-Zubiri, C. Family Canidae. In D.E. Wilson and R.A. Mittermeier (Eds.), *The Handbook of the Mammals of the World* (Lynx Edicions in association with Conservation International and IUCN, 2009).
66. Sharma, D. K., Maldonado, J. E., Jhala, Y. V. & Fleischer, R. C. Ancient wolf lineages in India. *Proc. R. Soc. B* **271**, S1–S4 (2004).
67. Werhahn, G. et al. Himalayan wolf distribution and admixture based on multiple genetic markers. *J. Biogeogr.* **47**, 1272–1285 (2020).
68. Jhala, Y. V., Saini, S., Kumar, S. & Qureshi, Q. Distribution, status, and conservation of the Indian Peninsula wolf. *Front. Ecol. Evol.* **10**, 814966 (2022).
93. Patterson, N. et al. Ancient admixture in human history. *Genetics* **192**, 1065–1093 (2012).
94. Martin, S. H. & Belleghem, S. M. V. Exploring evolutionary relationships across the genome using topology weighting. *Genetics* **1**, 429–438 (2017).
95. Delaneau, O., Howie, B., Cox, A. J., Zagury, J. F. & Marchini, J. Haplotype estimation using sequencing reads. *AJGH* **93**, P687–P696 (2013).
96. Danecek, P. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* **10**, giab008 (2021).
97. Hilgers, L. et al. Avoidable false PSMC population size peaks occur across numerous studies. *Curr. Biol.* **35**, 927–930 (2025).
98. Koch, E. M. et al. De novo mutation rate estimation in wolves of known pedigree. *Mol. Biol. Evol.* **36**, 2536–2547 (2019).
99. Mech, D. L. & Barber-Meyer, S. Use of erroneous wolf generation time in assessments of domestic dog and human evolution. *Sci. Lett.* <http://science.sciencemag.org/content/352/6290/1228/tab-e-letters> (2017).
- Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
83. McKenna, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
84. Meisner, J. & Albrechtsen, A. Inferring population structure and admixture proportions in low-depth NGS data. *Genetics* **210**, 719–731 (2018).
85. Skotte, L., Korneliussen, T. S. & Albrechtsen, A. Estimating individual admixture proportions from Next Generation sequencing data. *Genetics* **3**, 693–702 (2013).
86. Korneliussen, T. S., Albrechtsen, A. & Nielsen, R. ANGSD: analysis of next generation sequencing data. *BMC Bioinform.* **15**, 356 (2014).
87. Danecek, P. et al. The variant call format and VCFtool. *Bioinformatics* **27**, 2156–2158 (2011).
88. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841–842 (2010).
89. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Haeseler, A. & Jermiin, L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **14**, 587–589 (2017).
90. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274 (2014).
91. Auton, A. et al. Genetic recombination is targeted towards gene promoter regions in dogs. *PLoS Genet.* **9**, e1003984 (2013).
92. Smeds, L. et al. Whole-genome analysis provide no evidence for dog introgression in Fennoscandian wolf populations. *Evol. Appl.* **14**, 721–734 (2021).

## Acknowledgements

L.M.H. thanks the National Science Foundation Postdoctoral Research Fellowship (award number 2208950) for funding and support. The Norwegian Environment Agency (project 18088069) provided funding and support for sequencing efforts on newly sequenced wolf genomes. Ç.H.Ş. thanks to Fondation Segré and the Sigrid Rausing Trust for providing the majority of the funding for this project, H. Batubay Özkan and Barbara Watkins for their support of the Biodiversity and Conservation Ecology Lab at the University of Utah, and Bilge Bahar, Seha İşmen, Ömer Koç, Ömer Külahçioğlu, Burak Över, Emin Özgür, Suna Reyent, and Ceren Sağlam for supporting this project. Türkiye's Department of Nature Conservation and National Parks and the Ministry of Agriculture and Forestry granted the permit for Türkiye (No. 72784983-488.04-114100). P.H. thanks the Technology Agency of the Czech Republic (project SS07010447) for support. We thank the Museum of the Institute of Plant and Animal Ecology UB RAS for access to their collections. We thank Geraldine Werhahn for her input on the manuscript.