

**The role of the X chromosome on reticulate
evolution of hares (*Lepus* spp.)**

Liliana Maria da Silva Farelo

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos

2011

The role of the X chromosome on reticulate evolution of hares (*Lepus* spp.)

*Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto para obtenção do grau de mestre em
Biodiversidade, Genética e Evolução*

Liliana Maria da Silva Farelo

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos

2011

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem o apoio e a colaboração de várias pessoas a quem quero expressar o meu agradecimento.

Ao meu orientador, Dr. José Melo-Ferreira, obrigada por tudo: pela motivação, pelo apoio, pela disponibilidade, pelo acompanhamento constante do trabalho, pela atenção ao pormenor, pela confiança, pela paciência, pela compreensão... Zef, este trabalho nunca poderia ter sido realizado sem a tua ajuda.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Célio Alves, obrigada por me ter dado a oportunidade de participar neste projecto, por me ter acolhido no grupo de investigação das lebres e pelo apoio e entusiasmo sempre demonstrados ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Nuno Ferrand, agradeço as sugestões e comentários no início deste trabalho.

To Dr. Pierre Boursot, I would like to thank for the valuable suggestions during the early stages of this work.

Ao Dr. Miguel Carneiro, obrigada pelos valiosos comentários e sugestões nas revisões finais deste trabalho.

À Joana Vilela, minha colega de grupo, de laboratório e de secretária, obrigada pela amizade, pela boa disposição constante, pela paciência para me aturar nos piores dias, pela partilha de frustrações, e pelo encorajamento e carinho sempre que necessários.

Aos colegas de biblioteca e de laboratório do CIBIO e do CTM, obrigada pela boa disposição, pela motivação, pelas ideias e sugestões quando as coisas não funcionavam, pelas inúmeras boleias e pelos jantares para desanuviar.

A todo o pessoal do CIBIO, obrigada por promoverem um ambiente de trabalho agradável e de discussão científica estimulante.

Finalmente, à minha família e amigos, obrigada por demonstrarem uma infinita capacidade para me aturar, pelo apoio constante, pelas horas de sono perdidas e pela disponibilidade para ajudar.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelos projectos PTDC/BIA-BDE/72277/2006 e PTDC/BIA-EVF/111931/2009, financiados por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC) e co-financiados pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade (POFC). Durante parte do mestrado, beneficiei de uma Bolsa de Investigação no âmbito do segundo projecto.

Resumo

Estudos teóricos e empíricos sugerem que o cromossoma X exerce um efeito desproporcional no estabelecimento de isolamento reprodutivo entre espécies. Os múltiplos contactos e situações de evolução reticulada que têm sido descritos entre diferentes espécies de lebre (*Lepus* spp.) tornam este género um modelo ideal para abordar questões relacionadas com o papel do cromossoma X na especiação. Na Península Ibérica, por exemplo, várias situações de fluxo génico entre espécies têm sido descritas através: i) da existência de uma zona híbrida recente entre a lebre ibérica, *Lepus granatensis*, e a lebre europeia, *L. europaeus*, no norte, e ii) da introgressão mitocondrial da lebre variável, *L. timidus*, uma espécie que se extinguiu da região no final do último período glacial, nas três espécies de lebres actualmente existentes, *L. granatensis*, *L. europaeus* e *L. castroviejoii*. Um estudo anterior detectou padrões contrastantes de introgressão de três marcadores no cromossoma X entre *L. timidus* e *L. granatensis*, que questionam um papel estrito deste cromossoma sexual na prevenção do fluxo génico entre as espécies. Este trabalho teve como objectivo principal investigar a contribuição do cromossoma X na especiação das lebres. Para tal, determinou-se os níveis e padrões de polimorfismo, diferenciação genética e possível fluxo génico em vários *loci* do cromossoma X em duas situações de hibridação interespecífica na Península Ibérica, nomeadamente: i) em indivíduos provenientes da zona híbrida entre *Lepus granatensis* e *L. europaeus*, através da análise de dados de sequenciação em quatro *loci*, dois localizados perto do centrómero e dois localizados perto dos telómeros do cromossoma, e ii) em indivíduos provenientes de um transecto sul-norte, desde a região norte com introgressão mitocondrial de *L. timidus* em *L. granatensis* até ao sul sem introgressão, isto é, ao longo da presumível área de contacto e hibridação ancestral entre estas espécies, através da análise de sequências de oito marcadores distribuídos ao longo do cromossoma X. Por fim, comparamos níveis de diferenciação e fluxo génico no cromossoma X com dados de sequenciação de autossomas obtidos num estudo prévio e questionamos se os *loci* do cromossoma X se encontravam mais diferenciados entre espécies, o que seria a favor do *large X-effect* no isolamento reprodutivo. Os resultados evidenciam uma maior diferenciação entre *L. granatensis* e *L. europaeus* nos *loci* perto do centrómero do que nos *loci* situados perto dos telómeros, situação que está de acordo com a supressão da recombinação perto do centrómero do X. No geral, a diferenciação entre *L. granatensis* e *L. europaeus* nos diferentes *loci* estudados no cromossoma X foi superior à inferida nos

autossomas, e nenhuma evidência de fluxo génico foi detectada nos quatro marcadores, o que está de acordo com um *large X-effect* na especiação. No caso de *L. granatensis* e *L. timidus*, encontramos diferenciação interespecífica ligeiramente superior no cromossoma X relativamente aos autossomas, no entanto tal diferença não foi significativa. Embora a maior parte dos marcadores não exibam evidência clara de introgressão, foi detectado um padrão heterogéneo de diferenciação que não está necessariamente relacionado com a posição dos marcadores no cromossoma X e que pode reflectir introgressão nalguns *loci*. Estes resultados não excluem a hipótese de que a maior parte dos *loci* do cromossoma X possam desempenhar um papel importante no isolamento genético de *L. timidus* e *L. granatensis*, mas outras forças evolutivas podem estar a induzir fluxo génico, o qual é muito extenso num *locus* em particular, PHKA2.

Abstract

Both theoretical and empirical studies suggest that the X chromosome has a disproportionate effect on the establishment of reproductive isolation between species. The multiple contacts and situations of reticulate evolution that have been described among different species of hares (*Lepus* spp.) render this genus an ideal model to tackle questions related with the role of the X chromosome in speciation. In the Iberian Peninsula, for example, several situations of gene flow between species have been described: i) the occurrence of a hybrid zone between the Iberian hare, *Lepus granatensis*, and the brown hare, *L. europaeus*, in the north, and ii) the mitochondrial introgression from the mountain hare, *L. timidus*, a species that went extinct from the region by the end of the last glacial period, into the three extant hare species, *L. granatensis*, *L. europaeus* and *L. castroviejoii*. A previous study detected contrasting patterns of introgression of three markers on the X chromosome between *L. timidus* and *L. granatensis*, which questioned a strict role of this sex chromosome in preventing gene flow between the species. Here, we aimed to investigate the contribution of the X chromosome on speciation of hares. To address this question, we assessed levels and patterns of polymorphism, genetic differentiation and possibly of gene flow at several X-linked loci in two situations of interspecific hybridization in the Iberian Peninsula: i) using individuals sampled across the recent hybrid zone between *Lepus granatensis* and *L. europaeus*, by analysing sequence data in four X-linked loci, two located near the centromere and two located near the telomeres of the chromosome, and ii) using individuals from a south-north transect of mitochondrial introgression from *L. timidus* into *L. granatensis* covering the presumable area of ancient contact and hybridization between these species, by analysing sequences at eight markers distributed along the X chromosome. Finally, we compared levels of differentiation and gene flow on the X chromosome with autosomal sequence data obtained in a previous study and asked whether the X-linked loci were found to be more differentiated between the species, which would be in favour of a large X-effect in reproductive isolation. We found stronger differentiation between *L. granatensis* and *L. europaeus* close to the centromere than on the telomeres, consistent with suppressed recombination near the centromere of the X. Overall, differentiation between *L. granatensis* and *L. europaeus* on the X was higher than that inferred for the autosomes, and no evidence of gene flow was found in the four X markers, which accords with a large X-effect on speciation. In the case of *L. granatensis* and *L. timidus*, we found slightly higher

interspecific differentiation on the X chromosome relative to the autosomes but such difference was not significant. Although most markers of the X show no clear evidence of introgression, a heterogeneous pattern of differentiation, not necessarily related with the position of the markers on the X chromosome, was found and may reflect introgression at some loci. These results do not exclude that most of the X chromosome may play an important role in the genetic isolation of *L. timidus* and *L. granatensis*, but other evolutionary forces may have been at play inducing gene flow, which at one particular locus, PHKA2, is extensive.

INDEX

Resumo	i
Abstract	iii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Speciation and hybridization	1
1.1.1. The origin of species and the evolution of hybrid incompatibilities	1
1.1.2. The genetic basis of postzygotic isolation: Haldane's rule and the large X-effect	3
1.1.3. Hybrid zones as windows to the evolutionary process	4
1.2. Hares (genus <i>Lepus</i>)	7
1.2.1. Taxonomy of lagomorphs	7
1.2.2. Hybridization among hares in Europe	9
1.2.3. Introgressive hybridization between hare species in the Iberian Peninsula ...	10
1.3. Objectives	12
2. MATERIALS AND METHODS	14
2.1. Samples, DNA extraction, PCR amplification and Sequencing	14
2.2. Data analysis	16
3. RESULTS	19
3.1. Hybrid zone between <i>Lepus granatensis</i> and <i>L. europaeus</i>	19
3.2. Ancient hybridization between <i>Lepus granatensis</i> and <i>L. timidus</i>	24
4. DISCUSSION	30
4.1. Evidence for a large X-effect in the speciation history of <i>L. granatensis</i> and <i>L. europaeus</i> ?	30
4.2. Reticulate evolution between <i>L. granatensis</i> and <i>L. timidus</i> on the X?	32
4.3. Comparison with the patterns of differentiation observed on the rabbit X chromosome	39
5. CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS	41
6. REFERENCES	43
APPENDIX	53