

Joana Maria de Almeida Pereira Vilela

**Decoding the mechanisms underlying mitogenomic
evolution in hares (*Lepus* spp.)**

Universidade do Porto

Faculdade de Ciências

Setembro de 2011



FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



CIBIO
Centro de Investigação
em Biodiversidade
e Recursos Genéticos

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade, Genética e Evolução apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Orientadores: Doutor José Melo-Ferreira e Professor Doutor Paulo Célio Alves

À minha mãe

“Estou aqui construindo o novo dia com uma expressão tão branda e descuidada que dir-se-ia não estar fazendo nada. E, contudo, estou aqui construindo o novo dia!”

António Gedeão

AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGMENTS

Após os quase dois anos decorridos desde o início deste trabalho de mestrado, tenho a sensação de este ter sido um período da minha vida durante o qual acumulei uma mão cheia de conhecimentos valiosos sob diversos aspectos, não só a nível científico e biológico, como também a nível interpessoal. Toda esta aprendizagem não teria sido tão entusiasta e segura, tão recheada de estímulos e de recompensas a cada instante se eu não tivesse estado acompanhada pelas pessoas absolutamente maravilhosas que têm feito parte do meu quotidiano. Um quotidiano que tem sido sem dúvida para mim, muito feliz e proveitoso! Deixo aqui um profundo agradecimento a essas pessoas:

Ao meu orientador, Doutor José Melo-Ferreira, nem sei por onde começar a agradecer... Talvez o melhor a agradecer seja o facto de eu ter tido a grande sorte de ter como orientador uma pessoa ímpar! Agradecer-lhe por gostar muito de Evolução e por transmitir esse seu entusiasmo durante qualquer conversa. Agradecer-lhe por me explicar as mesmas coisas vezes sem conta até eu entender, como se me estivesse a falar nelas pela primeira vez. Agradecer por ter confiado em mim e no meu trabalho, por me ter dado autonomia e liberdade para construir um pensamento crítico em relação ao meu trabalho. Agradecer acima de tudo por ter estado sempre disponível para esclarecer, reflectir, ensinar, orientar, questionar, recomençar, insistir e acreditar. Obrigada por me ajudar a ser exigente e a não desistir! E sobretudo, obrigada por me ter mostrado que existe um caminho a ser construído com perguntas fantásticas sobre alguns dos mais belos e interessantes mecanismos da Vida.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Paulo Célio Alves, tenho de agradecer tudo, desde o início! Sem si não estava certamente aqui a fazer o que faço e que faz tanto sentido para mim! Obrigada por me ter recebido no grupo das lebres de braços abertos, com essa sua enorme generosidade que tanto o caracteriza. Agradeço-lhe profundamente por me ter feito sempre sentir que estava no lugar certo, por ter confiado nas minhas capacidades e pela sua constante preocupação com o meu trabalho. Agradeço-lhe também por todo o apoio que sempre me prestou e por ter disponibilizado rapidamente todos os processos e meios para a execução do meu trabalho, principalmente nas alturas em que o trabalho laboratorial se tornou mais difícil e infrutífero. Obrigada por me motivar a dar sempre o meu melhor e por tudo aquilo que me tem ensinado, não só através de conversas mas, acima de tudo, com o seu exemplo. Obrigada

por ser um exemplo para mim de optimismo em relação à Vida e de amor pela Biologia e pela natureza (e sobretudo pelas lebres!).

Deixo aqui também um profundo agradecimento à minha colega de Biologia e de lebres, Liliana Farelo, por estar sempre presente. Foste a figura simpática que me apareceu pela frente e me ensinou os procedimentos laboratoriais numa área que era para mim inteiramente nova. Tornaste a minha tarefa mais fácil com toda a tua paciência e disponibilidade. Obrigada! Ah, e obrigada por todos os artigos que me tens enviado com temas que te parecem ser importantes para o meu trabalho, obrigada pela tua constante preocupação! E obrigada por também gostares muito de lebres! É bom poder falar contigo sobre isso sem que pareça que estamos a conversar sobre trabalho!

I also want to deeply thank to Dr. Pierre Boursot (Université Montpellier 2) for all the suggestions given for the development of this work.

I deeply thank Dr. Nicolas Galtier (Université Montpellier 2) for gently yielding the data of the transcriptome from *Lepus americanus* mitochondrial DNA sequence used in this work, which was retrieved from a high throughput sequencing project (PopPhyl project, funded by the European Research Council).

Agradeço à PopGen e às reuniões com as pessoas fantásticas que se juntam nesse grupo e que de forma generosa ajudam os mais “verdes” a perceber as teorias evolutivas e a aprender a ter dúvidas e questões sobre o assunto. Sem estas reuniões, durante as quais se pode ficar constantemente a par de tudo o que de mais recente se faz na área, certamente o meu percurso de mestrado teria sido muito mais pobre e menos estimulante.

Ao Miguel Fonseca, deixo aqui também um agradecimento por todo o apoio prestado praticamente desde o início do meu trabalho e especialmente pela análise dos dados do transcriptoma da espécie *Lepus americanus*, que permitiu a sua inclusão nas análises. Obrigada também por todas as conversas que tivemos, por toda a paciência que tiveste para responder a todas as minhas dúvidas e por todas as sugestões pertinentes que fizeste para melhorar o meu trabalho!

Agradeço profundamente ao Miguel Carneiro o apoio prestado durante a revisão da minha tese e todas as sugestões que fizeste para melhorar o meu trabalho ao longo de todo este tempo. Obrigada!

Ao Rui Faria, agradeço também todas as sugestões e opiniões dadas para melhorar o meu trabalho, particularmente na parte das análises informáticas. És uma das pessoas que mais me tem ensinado (a mim e aos outros alunos que vão às reuniões da PopGen), e aproveito aqui para agradecer a forma generosa e paciente com que sempre me tiraste todas as dúvidas que te coloquei.

À Vânia Costa, agradeço todas as sugestões dadas para a resolução de problemas com que me fui deparando ao longo do trabalho laboratorial. Obrigada pela paciência e pela escuta atenta!

À Sara Rocha, obrigada pelas sugestões que me deste para algumas das análises.

À Ana Margarida Lopes, agradeço profundamente o apoio moral fundamental que me deste durante a recta final da escrita desta tese. Obrigada pelas tuas palavras amigas e pelo teu eterno sorriso!

Agradeço também à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo suporte financeiro ao desenvolvimento desde trabalho através do financiamento dos projectos de referência PTDC/BIA-EVF/111931/2009 e PTDC/BIA-EVF/115069/2009, 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 meu trabalho recebi uma bolsa de investigação suportada pelo projecto PTDC/BIA-EVF/115069/2009.

Agradeço em especial ao Félix por me ter apoiado incondicionalmente quando decidi voltar a estudar e licenciar-me em Biologia. Sem o teu apoio talvez não estivesse hoje a apresentar esta tese de mestrado. Obrigada por teres acreditado em mim mais do que qualquer outra pessoa! Espero que também tenhas encontrado o teu caminho!

Agradeço também todo o apoio prestado pela minha família e amigos.

E por fim, agradeço profundamente todo o apoio incondicional prestado pela minha mãe, principalmente durante a fase de escrita desta tese. Agradeço-te a forma como sempre me ouviste, como sempre tentaste perceber o que é que afinal de contas eu andava para aqui a fazer e a forma doce e querida como te tentaste sempre manter a par das minhas dificuldades durante este trabalho, por muito que algumas coisas fossem difíceis de perceber! Obrigada por me

aconselhares sempre da melhor forma com toda a tua sabedoria. O teu apoio foi para mim, sem dúvida, o mais fundamental! Por isso esta tese é dedicada a ti!

CONTENTS:

Resumo	15
Abstract	17
1. Introduction	19
1.1. Population Divergence	19
1.2. Natural hybridization and introgression	20
1.3. Mitochondrial DNA	21
1.3.1. Mitochondrial DNA evolution	22
1.3.2. Mitochondrial DNA origins, structure and function	23
1.4. Mitochondrial DNA introgression among hares	25
1.5. Objectives	28
2. Materials and methods	30
2.1. Sampled species and laboratory methods	30
2.2. Data analyses	34
3. Results	38
3.1. Phylogenetic Inference	40
3.2. Codon analyses	41
4. Discussion	47
4.1. Complete mitochondrial DNA sequencing	48
4.2. Evidence of widespread purifying selection on mtDNA evolution	49
4.3. Evidence of positive selection on the ATP synthase complex: adaptation to cold?	50
4.4. The role of natural selection in the extensive mtDNA reticulation among hares	51
4.5. Conclusion and Future prospects	52
5. References	54
Supplementary Material	64

RESUMO

O estudo das bases genéticas da divergência entre populações permite estabelecer a separação entre a contribuição da dinâmica populacional estocástica e o contributo da selecção natural no desenvolvimento de processos evolutivos. A resposta a ambientes novos ou em mudança tem sido estudada para avaliar a influência da adaptação na evolução das populações naturais. Estes estudos têm sido desenvolvidos com o recurso a marcadores genéticos, no entanto, só muito recentemente o DNA mitocondrial começou a ser aplicado ao estudo de processos adaptativos.

A importância do DNA mitocondrial na adaptação a climas frios tem sido actualmente considerada, principalmente devido ao seu papel na codificação de proteínas fundamentais na coordenação dos mecanismos de produção de calor e ATP que ocorrem durante a fosforilação oxidativa na membrana interna das mitocôndrias. Estudos recentes têm associado estas funções mitocondriais a casos de introgressão de DNA mitocondrial detectados nas populações naturais, tendo sido assim sugerido que a introgressão de DNA mitocondrial pode constituir uma resposta adaptativa às condições ambientais.

Vários casos de introgressão de DNA mitocondrial têm sido descritos entre espécies de lebre (género *Lepus*). *Lepus timidus* (lebre-variável) é uma espécie ártica/boreal com uma distribuição ampla ao longo do hemisfério Norte. Esta espécie é frequentemente a dadora de DNA mitocondrial nos casos de introgressão reportados. A introgressão de DNA mitocondrial de *L. timidus* é geográfica e taxonomicamente extensa, tendo possivelmente afectado mais de dez espécies de lebre distribuídas ao longo do hemisfério Norte. Como *L. timidus* é uma espécie bem adaptada a climas frios e os casos de introgressão de DNA mitocondrial em que está envolvida têm sido detectados nas zonas mais a Norte da distribuição das espécies afectadas, levantou-se a hipótese de que a introgressão de *L. timidus* possa ser adaptativa. Porém, se a introgressão de DNA mitocondrial de *L. timidus* tiver sido mediada pela selecção natural, então a sua linhagem mitocondrial poderá ter um valor adaptativo.

Neste estudo, pretendemos testar a hipótese de a linhagem mitocondrial de *L. timidus* ter divergido sob a influência de selecção positiva e identificar as forças que regulam a evolução do mitogenoma nas espécies de lebre. Assim, examinámos o mitogenoma completo de nove espécies de lebre (sete dos quais foram amplificados e sequenciados na sua quase totalidade durante este trabalho) e analisámos os padrões de evolução dos codões dos 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas. Estas análises, baseadas em cálculos de Máxima Verosimilhança, permitiram estimar valores de ω (dN/dS) para

identificar possíveis regiões genómicas e/ou linhagens que sigam um padrão de evolução não-neutral. Os resultados obtidos sugerem que a selecção purificadora é a principal força evolutiva a condicionar a evolução do DNA mitocondrial nas espécies de lebre. Além disso, foram detectados sinais de selecção positiva em codões específicos do Complexo 5 (ATP sintase) da cadeia respiratória, possivelmente no gene ATP8 da linhagem mitocondrial de *L. timidus*. O gene ATP8 codifica uma proteína do complexo mitocondrial ATP sintase, envolvida no metabolismo energético e directamente relacionada com a síntese de ATP. Os resultados obtidos sugerem que a linhagem mitocondrial de *L. timidus* poderá ter evoluído sob a influência de forças selectivas, presumivelmente de adaptação a climas frios. É importante realçar que este resultado fortalece a hipótese de que os casos de evolução reticulada detectados entre as espécies de lebre podem ter por base a influência de selecção positiva.

ABSTRACT

The study of the genetic bases of population divergence offers the opportunity to disentangle the contribution of stochastic population dynamics from natural selection in the course of evolution. The response to novel or changing environments has been studied to evaluate the influence of adaptation in the evolution of wild populations. Genetic markers have been used in the last decades to address this question, although mitochondrial DNA (mtDNA) was just recently started to be applied for study adaptation processes.

The importance of mtDNA in the adaptation to cold environments is being currently considered mainly due to its role in coding proteins, which are central in the coordination of the mechanisms of heat and ATP production during the oxidative phosphorylation processes that occur in the inner mitochondrial membranes. Additionally, the extent to which mtDNA introgression can occur between wild populations as an adaptive response to environmental conditions has also started to be considered in recent studies.

Several cases of mtDNA introgression have been reported among hare species (genus *Lepus*). *Lepus timidus* (mountain hare) is an arctic/boreal species widely distributed across the North hemisphere and has been frequently the mtDNA donor in the cases of mtDNA introgression detected among hare species. *L. timidus* mtDNA introgression is geographically and taxonomic widespread as has potentially affected over ten other hare species distributed across the North hemisphere. Since *L. timidus* is well adapted to cold environments, introgression is pervasive and affects species in their northernmost ranges, the hypothesis that introgression from *L. timidus* was adaptive has been put forward to explain this introgression. However, that introgression was mediated by natural selection implies that the mtDNA of *L. timidus* has adaptive value.

Here, we hypothesize that the mtDNA of *L. timidus* diverged under positive selection and aimed at identifying the evolutionary forces that underlie the mitogenomic evolution in hare species. For that purpose we examined the complete mitogenome of nine hare species (seven of these mitogenomes were nearly completely amplified and sequenced in this work) and analyzed the patterns of codon evolution of the thirteen mtDNA protein-coding genes. These analyses were performed using tests based on Maximum Likelihood estimations of ω (dN/dS), which were used to identify eventual genomic regions and/or lineages more strongly affected by non-neutral patterns of evolution.

The results suggested that purifying selection is the main evolutionary force shaping mtDNA evolution among hare species. Additionally, we found

that positive selection may have acted on specific codons of the mtDNA-encoded proteins of Complex 5 (ATP synthase) of the oxidative-phosphorylation chain, and possibly on the ATP8 gene of the *L. timidus* mitochondrial DNA lineage. The ATP8 gene codes for a protein of the ATP synthase mitochondrial complex, which is involved in the energetic metabolism and directly implicated in the synthesis of ATP. This finding suggests that the mtDNA of *L. timidus* may have evolved under selective forces, presumably of adaptation to cold. Importantly, this result also strengthens the hypothesis that positive selection may have driven mtDNA reticulation among hares.