

**Absence de flux génique mitochondrial entre les Pouillots
« véloces » médio-européen et ibérique (Aves : *Phylloscopus
collybita collybita*, *P. (c.) brehmii*); implications
taxinomiques. Résultats tirés de la PCR et du séquençage
d'ADN**

Andreas J. HELBIG, Marc SALOMON, Michael WINK et Joël BRIED

Résumé – Les études précédentes sur les pouillots « véloces » ouest-pyrénéens (*collybita* et *brehmii*), fondées essentiellement sur la biogéographie et l'écoéthologie, nous rendaient très probable l'existence d'un isolement reproductif partiel entre les deux taxons. La PCR, et le séquençage de la portion d'ADN correspondant au gène mitochondrial du cytochrome *b*, ont confirmé cette hypothèse : il a été mis en évidence une absence de flux génique entre les deux taxons, qui ne peut s'expliquer que par la stérilité des hybrides femelles. Les deux taxons constituent donc au moins un tandem de quasi-species.

**Absence of mitochondrial gene flow between European and Iberian “chiffchaffs”
(*Phylloscopus collybita collybita*, *P. (c.) brehmii*). The taxonomic consequences.
Results drawn from PCR and DNA sequencing**

Abstract – Previous studies of the biogeography and behavioural ecology of the warbler taxa *Phylloscopus c. collybita* and *P. (c.) brehmii* made the existence of partial reproductive isolation between the two forms very likely. Using the polymerase chain reaction (PCR) and the DNA sequencing of the mitochondrial cytochrome *b* gene, we confirmed this hypothesis and found no evidence of mitochondrial gene flow between these taxa, which can be explained if the hybrid females are sterile; thus, the two forms should be considered at least as two quasi-species.

Abridged English Version – Until now, the nominate and Iberian forms have been considered as members of the species *Phylloscopus collybita*. On the basis of their very similar morphologies, *brehmii* warblers have long been included in the nominate race [1]. More recently, the Iberian Chiffchaff has been classified at least as a distinct subspecies ([2], [3]). These two vicariant groups breed allopatrically, separated by a narrow hybrid belt [4], and have very distinct songs ([5]-[9]) and calls [4]. The Iberian chiffchaffs occur at the southwestern periphery, and the European in the center of the Palearctic range of the species [3]. There is no intergradation in the hybrid belt, where the birds singing “pure” are far more numerous than those singing “mixed” – the so-called “mixed-singers” [7], which may or may not be hybrids. Mixed pairs of these birds do, however, occur in the zone of overlap in SW France and N Spain, and produce viable hybrid offspring [4].

In a sample of 116 pairs, mating was proved to be positively assortative between song types: 64% of pairs were among members of the same song types, 18% between male *brehmii* and female *collybita*, but only 2% between male *collybita* and female *brehmii*, and less than 16% involving one or two mixed-singers [4]. This is the consequence of a differential response to male song: female *collybita* respond strongly to male *brehmii* song, but female *brehmii* react very weakly to male *collybita* song [10]. Further ecological [8] and morphological [11] differences still confirm that *collybita* and *brehmii* are two taxa far advanced on their way to speciation.

Note présentée par Jean DORST.

We here report the first molecular genetic results which confirm the behavioural data and provide no evidence for mitochondrial gene flow between the two forms. Acoustic differences, therefore, appear to reflect fundamental genetical differences and indicate at least partial reproductive isolation.

MATERIAL AND METHOD. — In June 1991 and 1992, a total of 20 nominate Chiffchaffs and 19 *brehmii*, identified in the field by their vocalizations, were mist-netted in the contact zone between the two forms, in SW France and N Spain. A blood sample (100 µl) was taken from the ulnar vein of each bird, which was released thereafter. For comparison, four European Chiffchaffs from southern Germany were treated likewise. From the blood samples, total DNA was isolated and a 300 base pair portion of the cytochrome *b* gene was amplified using primer sequences given by Kocher *et al.* [12]. PCR products were purified by agarose gel electrophoresis, reamplified asymmetrically and sequenced according to Sanger *et al.* [13]. Sequences of 44 individuals were available for comparison.

RESULTS. — Among the extracted genotypes in which 300 bp were sequenced, three distinct haplotypes were identified (table 1): type I occurred solely in *P. c. collybita* from SW France and N Spain, and Germany; type II only in *P. (c.) brehmii*; type III in one bird of each form from SW France. All three sequences also differed from that of the Scandinavian *P. c. abietinus* published by Richman and Price [14]. The amount of sequence divergence (table II) between type I and type II (4%) was typical of closely related species. Type III, however, differed from all other types by surprisingly large amounts (at least 10-11%). Among types I and II, there were several subtypes differing from each other by one or two nucleotides — typical of intraspecific variation.

DISCUSSION. — Among the 39 birds from the contact zone that we investigated, the mitochondrial haplotypes I and II were restricted to one song type each: type I occurred only in *collybita*, II only in *brehmii*. This is clear evidence that mitochondrial gene flow between the two forms does not occur today and has probably been interrupted since the two types diverged. *P. (c.) brehmii* probably evolved during — possibly repeated — periods of glacial isolation on the Iberian Peninsula; its relatively small population size may have led to rapid divergence of song and mitochondrial DNA sequences from the remaining European populations. When secondary contact was established during the present postglacial period, hybridization still took place [4] but without mixing of mitochondrial genotypes. This indicates that the female hybrids must be sterile. Since mitochondria are only inherited via the female sex and no male marker have yet been studied, nothing is known of the fertility of male hybrids. Mt-haplotype III, possessed by only one Iberian chiffchaff, may have arisen prior to types I and II during a very early period of isolation on the Iberian Peninsula and persisted at low frequency.

The two Chiffchaff forms conform to Haldane's rule, which asserts that it is the heterogametic sex (female in birds) that will be sterile in interspecific hybrids. The situation is thus similar to that of Collared and Pied Flycatcher (*Ficedula albicollis*, *F. hypoleuca*) in northern Europe, in which male hybrids are fertile, but female ones are not ([16], [17]). Our results show that the two "Chiffchaffs" have at least attained the status of quasispecies [18] (*i.e.* partially intersterile taxonomic entities), if not full biological species. Their true status can only be revealed by studying male hybrid fertility.

Les formes médio-européenne (*collybita*) et ibérique (*brehmii*) sont jusqu'à présent incluses dans l'espèce « Pouillot véloce » (*Phylloscopus collybita*). Du fait de leurs morphologies apparemment indistinctes [1], on a pendant longtemps inclus *brehmii* dans la race nominale. A la lumière des derniers travaux, *brehmii* est considérée comme une bonne sous-espèce [2], voire une quasispécies [3].

Ces deux groupes vicariants nichent respectivement dans des aires d'allopatric séparées par une ceinture hybride étroite [4] et se distinguent si fortement par leur chant ([5]-[9]) et leurs cris [4] qu'on croirait entendre d'emblée deux espèces distinctes. Les « ibériques » se distribuent dans la zone périphérique sud-occidentale et les « médio-européens » dans la zone centrale de l'aire de répartition de l'espèce [3]. La ceinture hybride n'est pas une zone d'intergradation, mais une région où les deux formes au chant pur sont très majoritaires en sympatrie et où on note la présence d'une petite minorité d'oiseaux aux chants intermédiaires, les *Mischsänger* au sens de Thielcke et Linsenmair [7], peut-être des hybrides. La présence de jeunes hybrides réels, apparemment aussi vivaces que les jeunes « purs », y est attestée [4]. Mais s'agit-il réellement de *Mischsängers* ?

Sur un échantillon de 116 couples, on a observé un choix sexuel entre les formes : les oiseaux se croisaient préférentiellement à l'intérieur de leur groupe (64 %); les croisements *brehmii* mâle \times *collybita* femelle étaient assez fréquents (18 %); en revanche, les croisements *collybita* mâle \times *brehmii* femelle (2 %) et les couples avec un ou deux *Mischsänger* (ensemble 16 %) étaient rares [4]. Cette sélection est la conséquence d'une sensibilité acoustique différentielle : *collybita* femelle répond bien au chant de *brehmii* mâle, alors que *brehmii* femelle réagit mal au chant de *collybita* mâle [10]. Ce fait traduit la mise en place d'un mécanisme d'isolement précopulatoire probable plus ou moins avancé selon la forme et le sexe.

Tous ces arguments, ainsi que des différences touchant leur écologie [8] et leur morphologie [11], nous confortent que *collybita* et *brehmii*, constitue deux taxons déjà engagés loin dans la spéciation.

La séparation diagnostique de ces deux groupes de populations repose actuellement sur le seul critère acoustique, le chant chez le mâle et les cris chez les deux sexes. Or, chez de nombreuses espèces d'Oscines, les vocalisations – et surtout les chants – sont soumis à apprentissage. Dans cette Note, nous présentons de manière succincte nos premiers résultats de génétique moléculaire qui montrent d'une part que la différence acoustique entre *collybita* et *brehmii* n'est pas une simple variation acquise (situation de la plupart des « dialectes »), mais repose sur une divergence génétique profonde, et d'autre part que l'isolement reproductif partiel est bien réel.

MATÉRIEL ET MÉTHODE. – 39 pouillots véloce, identifiés par les chants et les cris, ont été capturés dans la zone d'étude en juin 1991 et 1992 au moyen de filets japonais : 20 étaient de la forme *collybita* et 19 de la forme *brehmii*. Nous leur avons prélevé 100 μ l de sang à la veine ulnaire, puis les avons relâchés. La même opération a été effectuée sur quatre pouillots véloce médio-européens témoins du sud de l'Allemagne. De chaque échantillon individuel de sang a été isolée la totalité de l'ADN : une portion de 300 paires de base de l'ADN mitochondrial correspondant au gène responsable du cytochrome *b* a été amplifiée par l'emploi d'amorces synthétisées avec la méthode de Kocher *et al.* [12]. Les produits de la PCR ainsi obtenus ont été purifiés sur gel d'agarose par électrophorèse, puis réamplifiés asymétriquement et séquencés selon la méthode de Sanger *et al.* [13]. Les séquences homologues de 43 individus ont pu être ainsi obtenus puis comparés.

RÉSULTATS. — Trois différentes catégories d’haplotypes de 300 paires de bases ont été identifiées (tableau I) : le type I trouvé seulement chez *P. c. collybita*, le type II uniquement

TABLEAU I

Séquence partielle de nucléotides du gène du cytochrome *b* de *Phylloscopus collybita*. Pcab=*P. c. abietinus* (tiré de Richman et Price [14]); Pcol=haplotype I, *P. c. collybita* (Pyrénées-Atlantiques); Pbre=haplotype II, *P. (c.) brehmii* (Pyrénées-Atlantique), TIII=haplotype III trouvé seulement chez un seul *brehmii* (Pyrénées-Atlantiques). La portion présentée est homologue à la partie 14846-15145 de la séquence d’ADN mt de l’Homme [15]. Les points indiquent l’identité des séquences avec la première ligne. —= positions de bases inconnues.

Partial nucleotide sequence of cytochrome *b* gene of *Phylloscopus collybita abietinus*. Pcb=*P. c. abietinus* [14], Pcol=haplotype I, *P. c. collybita* (France, Pyrénées-Atlantiques), Pbre=haplotype II, *P. (c.) brehmii* (France, Pyrénées-Atlantiques), TIII=haplotype III found in one *brehmii* only (Pyrénées-Atlantiques). This portion corresponds to positions 14846-15145 of the human mt DNA [15]. Dots indicate sequence identity with first line. —= positions not known.

Pcab	GGATCCCTAT	TAGGAATCTG	CTTAATCACA	CAAATTGTCA	CAGGACTACT	ATTAGCCATA
Pcol C. T. C.....
Pbre C T T C.....
T III A. CC T..... C..... T. C C..... TC.....
Pcab	CACTACACAG	CAGACACATC	CCTAGCATTG	ACTTCTGTG	CCCACACATG	CCGAAACGTC
Pcol T
Pbre
T III C. C..... C. C. A. T. C.
Pcab	CAATTCGGCT	GACTAATTCG	AAACCTCCAC	GCAAATGGAG	CCTCCTTTTT	CTTTATCTGC
Pcol C.....
Pbre T. T..... C..... T..... C.....
T III T. C. C..... C..... C..... C. T.....
Pcab	ATCTACTTCC	ATATCGGCCG	AGGATTCTAC	TACGGATCGT	ATCTAAACAA	AGAAACCTGA
Pcol
Pbre A. T.....
T III C..... A..... C. A C. G..... N.
Pcab	AACATCGGAG	TTATCCTACT	ATTAACNCTC	ATAGCCACTG	CCTTAGTCGG	GTACGTATTA
Pcol A C..... A. T.....
Pbre A A. N..... A. N. G.....
T III T..... CG..... G

chez *P. (c.) brehmii*, le type III observé uniquement chez un individu *brehmii* de la zone de contact. Ces trois séquences diffèrent de celle d’un pouillot-véloce scandinave (*P. c. abietinus*) publiée par Richman et Price [14].

Le type II diffère du type I par 4 % de ses bases (situation typique d’une divergence entre deux espèces parentes); le type III se distingue aussi bien du type I que du type II par 10 à 11 % de ses bases, ce qui montre une divergence incroyable! (cf. tableau II)

TABLEAU II

Divergence en pourcentage (valeurs minimales pour le type III) entre les séquences des quatre haplotypes présentés en tableau I.
Percent sequence divergence (minimum values for type III) between four mitochondrial haplotypes shown in table I.

	0	I	II	III
<i>P. c. abietinus</i> (type 0)	-			
<i>P. c. collybita</i> (type I)	3.0	-		
<i>P. c. brehmii</i> (type II)	5.0	4.0	-	
<i>P. c. brehmii</i> (type III)	11.3	11.7	10.3	-

Parmi les types I et II, on observe différentes variantes ne différant que sur un ou deux nucléotides – situation caractéristique de la variation intraspécifique.

DISCUSSION. – Parmi les 39 oiseaux étudiés de la zone de contact, les types I et II, de très loin les plus fréquents, ne se répartissent pas au hasard entre les deux formes. Le type I n'est possédé que par *collybita*, et le II que par *brehmii*. Cette situation exclut l'existence d'un flux génique mitochondrial entre les deux types de chanteurs – l'existence d'un tel flux génique aurait conduit à une représentation des deux types de chanteurs dans chacun des deux haplotypes, ce qui n'est absolument pas le cas. Il est très probable que ce flux génique n'existe pratiquement plus depuis que les deux formes ont divergé, probablement à la suite de périodes (répétées?) d'isolement entre la Péninsule ibérique (où étaient bloqués les « proto-ibériques ») et le reste de l'Europe, lors des dernières glaciations du pléistocène. Les ancêtres des *brehmii* formant une assez petite population ont dû rapidement diverger. Lorsqu'une aire de contact secondaire s'est constituée bien après la dernière glaciation, l'hybridation était encore possible, mais les génotypes mitochondriaux ne pouvaient plus se croiser; cette situation plaide pour la stérilité des femelles hybrides établie de longue date. Étant donné que les mitochondries sont héritées de la mère et que les marqueurs paternels n'ont pas encore été étudiés, on ignore encore tout de la fertilité des hybrides mâles. L'haplotype III, possédé seulement par un « ibérique », pourrait constituer un type primitif antérieur à l'apparition des types I et II, et serait le reliquat d'un stade très précoce datant d'avant la mise en place de l'isolement reproductif partiel actuel. Ce stade archaïque serait décelable chez une très petite minorité d'individus, peut-être uniquement par des « ibériques », mais ceci reste à démontrer. Il ne remet pas du tout en question ce qui a été écrit au paragraphe précédent.

Nos résultats sont conformes à la loi de Haldane selon laquelle le sexe hétérogamétique (chez les oiseaux, les femelles) est celui qui est stérile parmi les couples d'hybrides issus d'espèces distinctes. Cette situation s'observe en Europe septentrionale entre le Gobemouches noir et le Gobemouches à collier (*Ficedula hypoleuca*, *F. albicollis*) ([16], [17]) chez qui les hybrides mâles sont fertiles et les hybrides femelles stériles. Nous mettons en évidence que les formes *brehmii* et *collybita* ne peuvent plus être considérées comme un tandem de sous-espèces de *Phylloscopus collybita*, mais au moins comme un complexe de quasi-species [18] (= entités taxinomiques partiellement interfécondes dans toute leur zone de sympatrie). Il est fort possible que ces deux taxons aient déjà atteint l'hétérospecificité, mais seule une étude sur la fertilité des mâles, et le suivi de celle-ci sur un grand nombre de générations permettront de trancher à l'avenir.

Note remise le 7 décembre 1992, acceptée le 18 janvier 1993.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. VAURIE, *The Birds of Palearctic Fauna*, Witerby, Londres, 1959.
- [2] J. MARTENS et S. HANEL, *J. Ornithol.*, 122, 1981, p. 403-427.
- [3] M. SALOMON, *C. R. Soc. Biogéogr.*, 66, 1990, p. 75-84.
- [4] M. SALOMON, *Rev. Ecol. Terre Vie*, 42, 1987, p. 377-420.
- [5] E. F. von HOMEYER, *Erinnerungsschr. Vers. d. Ornithol. Görlitz 1870*, 1871, p. 46-48.
- [6] H. LYNES, *Ibis*, Ser. X, 2, 1914, p. 304-314.
- [7] G. THIELCKE et K. E. LINSENMAIR, *J. Ornithol.*, 104, 1963, p. 372-401.
- [8] M. SALOMON, Recherches sur la spéciation allopatrique : le cas des pouillots véloces ..., *Thèse de doctorat*, Univ. Paris-VII, 1989.
- [9] M. SALOMON et Y. HEMIN, *Ethology*, 92, 1992, p. 265-282.

- [10] M. SALOMON, *Behaviour*, 111, 1989, p. 270-290.
[11] C. ERARD et M. SALOMON, *L'Oiseau et RFO*, 59, 1989, p. 26-44.
[12] T. D. KOCHER, W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F. X. VILLABLANCA et A. C. WILSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1989, p. 6196-6200.
[13] F. SANGER, S. NICKLEN et A. R. COULSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1977, p. 5463-5467.
[14] A. D. RICHMAN et T. PRICE, *Nature*, 355, 1992, p. 817-821.
[15] S. ANDERSON *et al.*, *Nature*, 290, 1981, p. 457-465.
[16] H. TEGELSTRÖM et H. P. GELTER, *Évolution*, 44, 1990, p. 2012-2021.
[17] H. P. GELTER, H. TEGELSTRÖM et L. GUSTAFSSON, *Ibis*, 134, 1992, p. 62-68.
[18] F. A. SCHILDER, *XI^e Intern. Kongress für Entomologie*, 3, 1962, p. 329-333.

A. J. H. et M. W. : *Universität Heidelberg, Institut für Pharmazeutische Biologie,
Im Neuenheimerfeld 364, W-6900 Heidelberg, Allemagne;*

M. S. : *Université Rennes-I, CNRS-URA n° 696, Station biologique de Paimpont,
35380 Plélan-le-Grand, France;*

J. B. : *Université Joseph-Fourier, Génétique et Écologie des Populations,
621, avenue centrale, BP n° 53 X, Saint-Martin-d'Hères,
38041 Grenoble Cedex, France.*