

Diss. ETH No. 16190

**Genetic architecture of traits associated with serpentine
adaptation of *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae)**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Martin G. Bratteler

Dipl. Natw. ETH
born February 4, 1973
citizen of Winterthur (ZH) and Liestal (BL)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Alex Widmer, examiner
Prof. Dr. Matthias Baltisberger, co-examiner
Dr. Christian Lexer, co-examiner
Prof. Dr. Loren H. Rieseberg, co-examiner

2005

Summary

To study adaptation of plant populations to extreme habitats, including heavy-metal rich sites, serpentine soils (ultramaphic rocks) and their special flora represent an ideal study system. Serpentine soils have several highly disadvantageous properties for most plants: they have high contents of heavy metals (particularly nickel, Ni), an abnormally low ratio of calcium to magnesium, are very dry, and have low soil fertility. Amongst others, Ni tolerance is regarded as a crucial factor for plant survival on serpentine and differs between serpentine and non-serpentine populations. The existence of so-called serpentine endemics indicates that adaptations to serpentine soil can ultimately lead to plant speciation.

Empirical evidence suggests that directional selection is an important driver of speciation, and traits involved in habitat adaptation are likely targets for ecological selection. Habitat adaptation is thought to be important in models of speciation with gene flow, in which ecological divergence leads to differentiation of populations.

The most powerful approach currently available for studying the genetics of habitat adaptation and population divergence, which are thought to reflect evolution at many loci, employs molecular markers to identify the number of loci contributing to these traits, to examine their relative effect sizes, their chromosomal location and interactions. This approach is known as quantitative trait locus (QTL) mapping. QTL case studies have established that many traits contributing to adaptation are controlled by one or few loci with large effects, although genetic architecture may vary greatly between taxa.

As a first step in this thesis, a genetic linkage map of an intraspecific cross between a serpentine and a non-serpentine ecotype of *Silene vulgaris* s.l. was constructed (Chapter I). Four-hundred and one amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers from two different restriction enzyme combinations were used to genotype an F2 mapping population. The two parental pure-coupling phase maps consist of 186 and 114 markers on 13 and 12 linkage groups, respectively. Total map lengths of the paternal and maternal maps are 547 cM and 446 cM, respectively. Nearly half of the markers (49%) exhibited significant transmission ratio distortion. Genome coverage and potential causes of the observed segregation ratio distortions are discussed.

With the linkage map at hand, data for 18 quantitatively varying traits were recorded from all 263 mapped individuals and used for QTL analyses (Chapters II and III).

Using an F₂ mapping population, the genetic architecture of 7 morphological, physiological and life-history traits was explored. This subset of traits was chosen to focus on the genetic background of serpentine adaptation. The QTL analysis identified 23 QTLs, 15 of which were classified as major QTLs. This genetic architecture with its bias towards major QTLs indicates that adaptation to serpentine can evolve rapidly. Five linkage groups harboured overlapping QTLs for different traits, suggesting either pleiotropy or linkage. The extensive overlap of QTLs for different traits and the combinations of QTL directions imply that genetic constraints exist. This may hinder further divergence among ecotypes and prevent ecological speciation. Ultimately, traits potentially involved in habitat adaptation are shown to have diverged as a consequence of directional selection.

In the final chapter the focus was shifted to the analysis of 14 morphological traits in order to unravel the genetic architecture of *S. vulgaris* ecotype differences. In total, 53 QTLs with 28 major and 25 minor QTLs, were detected. These numbers of QTLs were found to correspond well with numbers reported in the literature for similar crosses. Clustering of most traits was strong, either due to linkage or pleiotropy. In contrast to leaf and shoot characters, no evidence was found that floral traits diverged as a consequence of directional selection. The results presented confirm that the genetic background of ecotype differentiation shows a similar pattern as the genetics of interspecific differences. The study gives an example of a slightly clustered but randomly distributed architecture of intraspecific ecotype trait differences.

Overall, the genetic architecture of adaptation to serpentine habitat reported in this thesis incorporates the following main findings: 1) The oligogenic model is generally supported as all traits are controlled by at least one major QTL and a small total number of QTLs. 2) For Ni tolerance, a simple genetic architecture was found with two major and two minor QTLs involved, supporting earlier studies with other heavy-metals in *S. vulgaris*. As selection is likely to act on Ni tolerant genotypes, the relatively small number of major Ni tolerance QTLs should rapidly spread to fixation across the subpopulation. 3) The majority of traits is mapping to the same few genomic segments, which suggests either linkage or pleiotropy. The combinations of QTL directions in these clusters create genetic constraints that may hinder further divergence among the investigated ecotypes. Ultimately, this study shows that non-model species, such as *S. vulgaris*, can give valuable insights into the genetics of plant habitat adaptations.

Zusammenfassung

Serpentinit-Böden eignen sich ausgezeichnet, um Anpassungen von Pflanzenpopulationen an spezielle Standorte zu untersuchen. Diese bilden sich über sogenannten ultramaphischen Gesteinen und vereinen eine Vielzahl von Eigenschaften, welche für das Pflanzenwachstum hinderlich sind: Sie haben einen natürlicherweise hohen Schwermetallgehalt (vor allem Nickel, Ni), weisen ein tiefes (d.h. ein für Pflanzen ungünstiges) Kalzium/Magnesium Verhältnis sowie eine geringe Nährstoffverfügbarkeit auf und sind ausserdem sehr trocken. Neben weiteren Faktoren wird daher eine gewisse Ni-Toleranz als überlebenswichtig für Pflanzen auf diesen Böden angesehen. Pflanzenpopulationen von Serpentinit-Gebieten unterscheiden sich denn auch stark in der Reaktion gegenüber hohen Ni-Konzentrationen. Ausserdem weist die Existenz von Serpentinit-Endemiten darauf hin, dass Anpassungen an Serpentinit-Böden zu Artbildung führen können.

Empirische Studien an Pflanzen haben wiederholt gezeigt, dass gerichtete Selektion eine wichtige Rolle bei der Artbildung spielen kann. Zudem sind Eigenschaften resp. Merkmale, welche bei Habitat-Anpassungen wichtig sind, mögliche Angriffsflächen für ökologische Selektion. Anpassungen an Habitate sind in jenen Modellen von Bedeutung, in denen von sympatrischer Artbildung ausgegangen wird und ökologische Unterschiede zu Differenzierungen innerhalb von Populationen führen.

Einer der besten Ansätze, um die Genetik von Habitat-Anpassungen und divergierenden Pflanzenpopulationen zu untersuchen, beinhaltet die genetische Analyse von quantitativen Merkmalen. Mit Hilfe von molekularen Markern werden Anzahl, Effektgrössen und Interaktionen von Loci untersucht, welche die Merkmale bestimmen. Diese Analyse wird QTL-Analyse genannt und leitet sich aus dem englischen 'Quantitative Trait Locus' ab. Mit Hilfe von QTL-Experimenten konnte gezeigt werden, dass viele adaptive Merkmale von wenigen, aber bedeutenden Loci gesteuert werden, aber auch, dass die genetische Architektur solcher Merkmale bei verschiedenen Arten sehr unterschiedlich sein kann.

In der vorliegenden Dissertation wurde in einem ersten Schritt eine Genkarte ('linkage map') von einer Kreuzung zwischen einem Serpentinit-Ökotypen und einem 'normalen' Ökotypen von *Silene vulgaris* s.l. erstellt (Kapitel I). Für die Genotypisierung der F2-

Population wurden 401 AFLP-Marker (engl. Amplified Fragment Length Polymorphism) aus zwei verschiedenen Enzymsystemen verwendet. Die rein väterlichen und rein mütterlichen Genkarten wurden mit Hilfe von 186 resp. 114 AFLP-Markern berechnet und bestehen aus 13 resp. 12 Kopplungsgruppen. Die Gesamtlänge der väterlichen Karte beträgt 547 cM, während die mütterliche Karte 446 cM abdeckt. Fast die Hälfte der Marker wichen signifikant von einem normalen Vererbungsschema ab. Etwaige Gründe für diese Abweichungen sowie die Plausibilität der Kartenlänge werden diskutiert.

In einem zweiten Schritt wurden sieben morphologische, physiologische und entwicklungsrelevante Merkmale untersucht, um die Genetik der Anpassungen von Pflanzen an Serpentin-Standorte zu beleuchten (Kapitel II). Die QTL-Analyse ergab im Gesamten 23 QTLs, wovon 15 als 'grosse' QTLs klassiert wurden. Eine solche genetische Architektur mit vielen grossen QTLs deutet darauf hin, dass eine Anpassung an Serpentin relativ schnell stattfinden kann. Auf fünf Kopplungsgruppen wurden überlappende QTLs gefunden. Diese Überlappungen können entweder aufgrund von pleiotropen Effekten oder wegen Kopplung entstehen und führen möglicherweise zu genetischen Einschränkungen. Dies wird durch teilweise ungünstige Kombinationen der QTL-Richtungen bedingt und kann eine weitere Aufspaltung der Ökotypen erschweren und somit eine ökologische Artbildung verhindern. Schliesslich finden sich Hinweise, dass die Unterschiede der untersuchten Merkmale die Folge von gerichteter Selektion und nicht durch Zufall entstanden sind.

Im letzten Schritt (Kapitel III) wurden 14 morphologische Merkmale analysiert, um die genetische Architektur der Ökotypen-Differenzierung zu untersuchen. Insgesamt wurden 53 QTLs detektiert, wovon 28 als 'grosse' und 25 als 'kleine' QTLs klassiert wurden. Die Anzahl der gefundenen QTLs stimmt gut mit Zahlen aus der Literatur von ähnlichen Ausgangslagen überein. Starke Häufungen von QTLs auf verschiedenen Kopplungsgruppen deuten wiederum auf Pleiotropie oder Kopplung hin. Es finden sich Hinweise darauf, dass im Gegensatz zu den Blatt- und Sprossmerkmalen die Unterschiede der Blütenmerkmale eher zufällig entstanden sind und nicht aufgrund von gerichteter Selektion. Die Resultate zeigen ausserdem, dass die genetische Grundlage von Ökotypendifferenzierung von intraspezifischen Kreuzungen ein vergleichbares Muster wie jene von interspezifischen Paaren aufweist. Die genetische Grundlage der intraspezifischen

Differenzierung verschiedener Ökotypen ist gehäuft auf einzelnen Kopplungsgruppen, aber dennoch über das gesamte Genom verteilt.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Dissertation über die genetische Architektur der Anpassungen von Pflanzen an Serpentin-Standorten sind folgende: 1) Da alle Merkmale von mindestens einem grossen QTL kontrolliert werden und ausserdem ein klarer Überhang von grösseren QTLs besteht, wird das oligogene Modell unterstützt. 2) Für die Ni-Toleranz wird eine relativ einfache genetische Architektur beschrieben. Diese wird von Studien mit *Silene vulgaris* mit anderen Schwermetallen bestätigt. Da Selektion auf die Ni-toleranten Genotypen wirkt, wird eine schnelle Ausbreitung der wenigen grösseren Ni-Toleranz-QTLs in der Subpopulation erwartet. 3) Viele der Merkmale häufen sich auf den gleichen genomischen Abschnitten, entweder wegen Kopplung oder wegen Pleiotropie. Die teilweise ungünstigen Kombinationen der QTL-Richtungen in diesen Anhäufungen erschweren eine weitere Aufspaltung der Ökotypen und verhindern somit eine zusätzliche Differenzierung der untersuchten Ökotypen. Letztlich ist die Studie ein gutes Beispiel dafür, dass QTL-Analysen mit Wildpflanzen wertvolle Erkenntnisse zur Genetik der Habitats-Anpassungen von Pflanzen liefern können.