



Doctoral Thesis

Evolutionary genomics of carnivorous *Nepenthes* pitcher plants

Author(s):

Scharmann, Mathias

Publication Date:

2017

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000213059> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 24464

EVOLUTIONARY GENOMICS OF CARNIVOROUS
NEPENTHES PITCHER PLANTS

A dissertation submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MATHIAS SCHARMANN
Diplom-Biologe, Universität Würzburg
born 9 March 1986
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Alex Widmer, examiner
Prof. Dr. Christian Lexer, co-examiner
Prof. Dr. John Pannell, co-examiner

2017

Abstract

Nepenthes is a species-rich genus of dioecious, carnivorous plants, that has evolved a fascinating diversity of pitcher traps that vary in size, shape and structure and attract different types of prey. At many sites in the natural distribution range of the genus, multiple species can be found together. Although hybrids can be formed experimentally and sometimes arise in nature, species apparently coexist in sympatry and display species-specific traits primarily in their pitcher traps. This may suggest that the trap differences represent adaptations that are maintained by natural selection in the face of gene flow. To address this question, I surveyed population genomic patterns in seven *Nepenthes* species with disparate traits that co-occur at two sites. I tested the hypothesis that interspecific gene flow occurs in these communities, which may indicate a role for divergent selection in the maintenance of separate species. On the basis of thousands of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) sampled throughout the genomes, I found that these sympatric species are genetically distinct but that reproductive isolation is not complete under natural conditions. A phylogenomic approach revealed that these species populations share genetic variation to an extent that cannot be explained by retained ancestral variation alone. Coalescent modelling suggested that gene flow is not (only) ancient but more probably ongoing between multiple species pairs. The selective agents enforcing partial genomic isolation against gene flow appear to be linked to the pitcher traps, as the morphological differentiation of this organ in a young species pair was higher than expected from neutral genetic differentiation. I conclude this chapter by presenting the hypothesis that speciation in *Nepenthes* is promoted by physiological cost-benefit trade-offs in the carnivorous syndrome.

The mechanism of sex determination in *Nepenthes* is currently unknown. The analysis of chromosome morphology does not provide insights because all chromosomes are similar in the hitherto examined *Nepenthes* species. Further, like many other perennial plants, *Nepenthes* is not amenable to standard crossing and segregation analysis because of a long juvenile phase and challenging cultivation. An alternative approach to reveal genetic sex determination is to scan natural populations for molecular markers that are either associated with sex or are specific to one sex. I developed a statistical method to distinguish between stochastic noise and true sex-specificity in population genomic data, which overcomes existing problems that have so far hindered a wider application of this approach. I found shared male-specific DNA sequence markers but an absence of female-specific markers in three distantly related *Nepenthes* taxa, suggesting the existence of Y-chromosomes and a common origin of dioecy. Sex-linked markers matched several expressed transcripts from a male inflorescence, among them candidate

ABSTRACT

genes for pollen development and floral organ identity. This relatively old, yet homomorphic XY-system with a Y-specific region that ranges among the smallest known in plants contributes to our understanding of the diversity of plant sex chromosomes.

Based on my findings that *Nepenthes* pitcher traps may be under divergent selection, I focussed on the evolution of genes underlying prey digestion. Through the combination of proteomics with transcriptomics for 12 species, I identified secreted digestive enzymes and other proteins in pitcher fluids, unveiling unexpectedly high diversity within and between species. Analysis of differential gene expression between fed pitchers, control pitchers, and non-carnivorous leaves point towards a major physiological shift induced by feeding. During the *Nepenthes* radiation, thousands of genes experienced positive selection on amino acid substitutions and shifted in their expression. Among both of these groups, secreted pitcher fluid proteins were over-represented, in contrast to other genes that are upregulated upon feeding. However, these feeding-related genes were enriched among the differentially expressed genes in a young species pair. My results show that positive selection at the structural gene level, together with regulatory divergence occurred extensively during the *Nepenthes* radiation, and are consistent with the hypothesis of adaptive evolution of carnivory.

Zusammenfassung

Nepenthes ist eine artenreiche Gattung diözischer, fleischfressender Pflanzen, die eine faszinierende Vielfalt von Kannenfallen entwickelt hat, welche sich in Grösse, Form und Struktur unterscheiden und verschiedene Beutetypen anlocken. An vielen Standorten innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Gattung kommen mehrere Arten zusammen vor. Obwohl Hybriden künstlich erzeugt werden können und manchmal in der Natur entstehen, bestehen die Arten offensichtlich in Sympatrie nebeneinander und zeigen artspezifische Eigenschaften vor Allem in ihren Kannenfallen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Unterschiede in den Fallen Anpassungen darstellen, die durch natürliche Selektion trotz Genfluss aufrechterhalten werden. Um diese Frage zu beantworten, erfasste ich populationsgenomische Muster in sieben *Nepenthes* Arten mit ungleichen Eigenschaften, die an zwei Standorten zusammen vorkommen. Ich prüfte die Hypothese, dass zwischenartlicher Genfluss in diesen Artgemeinschaften auftritt. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass divergente Selektion in der Aufrechterhaltung getrennter Arten eine Rolle spielt. Anhand tausender über das Genom verteilter Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) fand ich heraus, dass diese sympatrischen Arten zwar genetisch verschieden, jedoch unter natürlichen Bedingungen nicht vollständig durch Fortpflanzungsbarrieren getrennt sind. Ein phylogenomischer Ansatz zeigte, dass die zwischen Artenpopulationen geteilte genetische Variation ein Ausmass hat, das nicht allein durch Beibehalten von genetischer Variation des gemeinsamen Vorfahren erklärbar ist. Koaleszenzmodellierung liess den Schluss zu, dass dieser Genfluss nicht (nur) alt ist, sondern mit höherer Wahrscheinlichkeit zwischen mehreren Artenpaaren gegenwärtig andauert. Die Selektionskräfte, die eine teilweise genomische Trennung trotz Genfluss erzwingen, scheinen mit den Kannenfallen in Verbindung zu stehen, weil die morphologischen Unterschiede dieser Organe in einem jungen Artenpaar höher ausfielen als durch neutrale genetische Unterschiede zu erwarten. Ich beschliesse dieses Kapitel mit der Darstellung der Hypothese, dass die Artbildung in *Nepenthes* durch gegenläufige Abhängigkeiten zwischen physiologischen Kosten und Nutzen der Karnivorie vorangetrieben wird.

Der Geschlechtsbestimmungsmechanismus von *Nepenthes* ist aktuell unbekannt. Die Untersuchung von Chromosomenmorphologie ergibt keine Anhaltspunkte, weil bei den bisher untersuchten *Nepenthes* Arten alle Chromosomen ähnlich sind. Zudem ist *Nepenthes* wegen des langen Juvenilstadiums und hoher Kulturansprüche nicht einfach zugänglich für die Standardmethoden Kreuzung und Vererbungsanalyse, wie auch viele andere mehrjährige Pflanzen. Alternativ dazu kann eine genetische Grundlage der Geschlechtsbestimmung gefunden werden indem man in natürlichen Populationen nach molekularen Markern sucht, die

ZUSAMMENFASSUNG

Allelfrequenzunterschiede zwischen den Geschlechtern zeigen oder in nur einem der Geschlechter vorkommen (Geschlechts-Spezifität). Ich entwickelte eine statistische Methode um in populationsgenomischen Daten zwischen Zufallsrauschen und tatsächlicher Geschlechts-Spezifität zu unterscheiden, was bestehende Probleme löst die eine verbreitete Anwendung dieses Ansatzes bisher verhindert haben. Ich fand gemeinsame, männchen-spezifische DNA Sequenzmarker jedoch keine weibchen-spezifischen Marker in drei entfernt verwandten *Nepenthes* Arten. Dies legt die Existenz von Y-Chromosomen und einen gemeinsamen Ursprung der Diözie nahe. Geschlechtsabhängige Marker passten zu einigen exprimierten Genen eines männlichen Blütenstandes, darunter Kandidatengene für die Pollenentwicklung und die Identität von Blütenorganen. Dieses relativ alte aber homomorphe XY-System, mit einer Y-spezifischen Region die unter den kleinsten der von Pflanzen bekannten ist, trägt zum Verständnis der Vielfalt pflanzlicher Geschlechtschromosomen bei.

Ausgehend von meinen Erkenntnissen, dass die Kannenfallen von *Nepenthes* unter divergenter Selektion sein könnten, betrachtete ich die Evolution von Genen, die dem Beuteverdau zugrunde liegen. Ich bestimmte mithilfe der Kombination von Proteomik und Transkriptomik die sekretorischen Verdauungsenzyme und weitere Proteine in Kannenflüssigkeiten von 12 Arten, wobei eine unerwartet hohe Vielfalt innerhalb und zwischen Arten enthüllt wurde. Die Untersuchung von Genexpressionsunterschieden zwischen gefütterten Kannen, Kontroll-Kannen sowie nicht-fleischfressenden Blättern weist darauf hin, dass während des Fressens bedeutende physiologische Veränderungen ausgelöst werden. Innerhalb der Radiation der Gattung *Nepenthes* waren tausende von Genen unter positiver Selektion für Aminosäuresubstitutionen und veränderten ihre Expression. In diesen beiden Kategorien sind sekretorische Proteine der Kannenflüssigkeit überproportional vertreten, im Gegensatz zu anderen Genen die während des Fressens heraufreguliert werden. Jedoch sind diese am Fressen beteiligten Gene angereichert unter denjenigen Genen, welche ebenfalls in einem jungen Artenpaar unterschiedlich exprimiert werden. Meine Ergebnisse zeigen, dass positive Selektion auf der Ebene der Genstruktur sowie auf der regulatorischen Ebene innerhalb der *Nepenthes*-Radiation verbreitet auftrat, und stimmen mit der Hypothese von adaptiver Evolution der Karnivorie überein.