

**Adaptation to contrasting habitats and  
Heterozygosity-fitness correlations in  
Eelgrass (*Zostera marina*)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Keil

Kiel 2011

Referent: Prof. Dr. Thorsten Reusch  
Korreferent: Prof. Dr. Frank Melzner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07. 2011  
Zum Druck genehmigt: 01.07. 2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

## Summary

Seagrasses are ecosystem engineering species of outstanding importance for soft sediment coastal habitats. An ongoing decline of seagrass meadows in the last decades has caused rising interest in the ecology, genetics and evolution of these species. Eelgrass *Zostera marina* is distributed in the northern hemisphere in widely diverging habitats. In the Wadden Sea of the North Sea, contrasting habitat conditions have led to two differentiated forms of *Z. marina*. Plants situated on mudflats are exposed to higher environmental stress and show a reduced growth with narrower leaves and predominant sexual reproduction compared to the more robust subtidal form that also reproduces clonally via rhizomes. In order to detect habitat dependent selection and adaptation, I decided to conduct multilocus genome scans. Genome scans are a bottom-up approach using molecular markers, which make them suitable for non model organisms where no genomic information is available. In principle, genome scans apply statistical tests to detect outlier loci that fall outside a neutral distribution and are thus likely to be influenced by selection. As there is little congruence among the detected outliers when different models are compared, I used a combination of several models, a suitable approach for an explorative genome scan.

As a first step, I developed gene-linked microsatellite markers from an expressed sequence tags (EST) database and proved that they are easily identified by in silico search. Initial screening revealed that EST microsatellites proved to be almost as variable as anonymous markers. Information about the genes these markers are linked to make them a valuable tool for genome scanning as the putative functions of genes located close to outlier loci are known.

In a subsequent genome scan, I tested a first set of 25 microsatellites, 14 of which were EST- derived, for habitat dependent selection. I made use of a three times replicated habitat contrast that served to affirm the outliers detected by two different neutrality tests. Results showed that EST microsatellites were not more often detected as outliers than anonymous markers in our study. I found signs of divergent selection in three loci that were repeatedly detected in all three habitat contrasts. Two of them are EST

microsatellites, and one is linked to a putative nodulin gene building channels in cellular membranes suggesting a functional link with habitat differences.

In order to assess the validity of genome scans, I re-tested our three population pairs by adding single nucleotide polymorphisms (SNP), a novel marker type for *Z. marina*, adding a third neutrality test and by nearly doubling the number of markers assessed. Results were reassuringly consistent with the first scan as the three markers detected earlier were confirmed by the extended approach. Additionally, three other loci showed consistent signs of selection across habitat contrasts. Two newly detected loci are linked to an acid phosphatase gene (related to hyper-osmotic stress) and a seed maturation protein, respectively, both suggesting effects of habitat dependent selection in the Wadden Sea environment.

I also aimed to investigate how fitness and multilocus heterozygosity (MLH) are related in *Z. marina*. Using 37 microsatellites, I assessed the correlation of fitness measured as clone size and MLH in two *Z. marina* populations from the Baltic Sea. I showed for the first time that the intermediate heterozygosity principle, stating that offspring from parents with an intermediate level of relatedness will be have the highest fitness, applies in a clonal plant. In ecosystems that are structured and maintained by only one species, like seagrass beds, heterozygosity represents an important component of genetic variation that has rarely been assessed before.

Overall, the results of this work suggest that multilocus genome scans can be a useful tool to detect habitat dependent selection in exploratory studies. It has to be kept in mind, though, that inherent caveats of genome scans must be taken seriously and repeated population pairs represent the only way to handle this problem. Multilocus heterozygosity has rendered valuable insights into possible effects of inbreeding and outbreeding in natural populations, which is even more meaningful in ecosystems built by a single clonal species.

## Zusammenfassung

Seegräser sind 'Ökosystem-Ingenieure' mit herausragender Bedeutung für Flachwasser-Habitate auf Weichböden. Ein anhaltender Rückgang der Seegraswiesen in den letzten Jahrzehnten hat zu gesteigertem Interesse an der Ökologie, Genetik und Evolution dieser Arten geführt. Das große Seegras *Zostera marina* L. ist auf der gesamten nördlichen Hemisphäre und in sehr unterschiedlichen Habitaten verbreitet. Im Wattenmeer der Nordsee tritt *Z. marina* abhängig von kontrastierenden Habitaten in zwei verschiedenen Formen auf. Pflanzen auf Wattflächen sind größerem umweltbedingtem Stress ausgesetzt und weisen eine verringerte Wuchshöhe und schmalere Blätter, sowie vorherrschend sexuelle Reproduktion auf. Dahingegen zeigt die sublitorale, robuste Form auch verbreitet klonale Reproduktion durch verzweigte Rhizome. Um habitatabhängige Selektion und Adaptation nachzuweisen, verwendete ich 'Genome Scans' mit multiplen Loci. Genome Scans sind ein 'Bottom-up' Ansatz, der molekulare Marker verwendet und demnach für Nicht-Modellorganismen geeignet ist, für die wenig genomische Information vorhanden ist. Das Prinzip der Genome Scans beruht auf der Anwendung statistischer Tests, um Ausreißer zu entdecken, die nicht innerhalb der Grenzen einer neutralen Verteilung liegen und demnach wahrscheinlich durch Selektion beeinflusst sind. Als passenden Ansatz für einen explorativen Genome Scan verwendete ich eine Kombination mehrerer Test-Modelle, da die gefundenen Ausreißer zwischen verschiedenen Modellen wenig überlappen.

Als ersten Schritt entwickelte ich gekoppelte Mikrosatelliten-Marker aufgrund einer Datenbank von exprimierten Sequenzen (expressed sequence tags, EST) und zeigte, dass sie durch einen In-Silico Suchverfahren einfach identifiziert werden können. Erste Auswertungen zeigten dass EST-Mikrosatelliten in etwa genauso variabel wie herkömmliche anonyme Marker sind. Die Informationen über Gene, in deren naher Umgebung diese Marker lokalisiert sind, machen sie zu wertvollen Werkzeugen für Genome Scans, da mögliche Funktionen dieser Gene zum Teil bekannt sind.

In einem anschließenden Genome Scan untersuchte ich 25 Mikrosatelliten, von denen 14 gekoppelt (aus EST-Sequenzen) waren, auf habitatabhängige Selektion. Ich

verwendete drei Replikate eines Habitatkontrasts um Ausreißer, die aufgrund zweier Neutralitätstests entdeckt worden waren, zu bestätigen. Meine Resultate zeigten, dass in meiner Studie EST-Mikrosatelliten nicht öfter als Ausreißer erkannt wurden als anonyme Marker. Drei Marker zeigten Spuren divergierender Selektion in allen drei Habitatkontrasten. Zwei davon sind EST-Mikrosatelliten, einer darunter ist an ein Gen gekoppelt, das vermutlich für ein Nodulin-Protein kodiert, welches Wasserkanäle in Zellmembranen aufbaut. Dies legt einen funktionellen Zusammenhang mit Unterschieden in den Habitaten nahe.

Um die Validität von Genome Scans zu überprüfen, führte ich einen erneuten Test mit den drei Populationspaaren durch, wobei mit Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) ein neuer Markertyp eingeschlossen wurde, zusätzlich ein dritter Neutralitätstest verwendet wurde und die Anzahl der Marker fast verdoppelt wurde. Die Ergebnisse waren weitgehend konsistent zu den des vorherigen Scans, indem die drei bereits erkannten Ausreißer bestätigt wurden. Darüber hinaus zeigten drei weitere Loci Anzeichen von Selektion in mehreren Habitatkontrasten. Zwei der neu entdeckten Loci sind an ein Saure Phosphatase-Gen (steht in Zusammenhang zu hyperosmotischem Stress) bzw. an ein Gen für die Samenreifung gekoppelt, was in beiden Fällen auf einen Zusammenhang mit habitatabhängiger Selektion im Wattenmeer hinweist.

Eine weitere Untersuchung hatte zum Ziel, den Zusammenhang zwischen Fitness und Multi-Lokus Heterozygotie (MLH) bei *Z. marina* zu untersuchen. Ich verwendete 37 Mikrosatelliten und untersuchte die Korrelation der Fitness, gemessen als Klonegröße, mit der MLH in zwei *Z. marina*-Populationen aus der Ostsee. Ich konnte zum ersten Mal zeigen dass das Prinzip der Mittleren Heterozygotie, welches besagt, dass die Nachkommen von Eltern, die eine mittlere genetische Verwandtschaft aufweisen, die höchste Fitness besitzen, in einer klonalen Pflanze existiert. In Ökosystemen, die im Wesentlichen von einer einzigen Art aufgebaut und strukturiert werden, wie Seegraswiesen, ist Heterozygotie eine wichtige Komponente der genetischen Variation, die bisher noch unzureichend erforscht ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Multi-Lokus Genome Scans ein nützliches Werkzeug sein können, um habitatabhängige Selektion in explorativen Studien zu

entdecken. Die Nachteile von Genome Scans sollten jedoch nicht außer Acht gelassen werden, zu deren Umgehung nur die Verwendung wiederholter Populationspaare ermächtigt. Die Untersuchungen zur Multi-Lokus Heterozygotie haben wertvolle Einsicht in mögliche Effekte von Inzucht und Auszucht in natürlichen Populationen ermöglicht. Diese Aussage gewinnt umso mehr Bedeutung, wenn es sich um Ökosysteme handelt, die von einer einzigen klonalen Pflanzenart dominiert werden.