Tree top climbing
Towards an evolutionary tree of *Hydrangea* section *Cornidia*

Thesis proposed for the Doctor of Science degree

Carolina Granados Mendoza

Dedico esta tesis a

Antonio Granados Salinas y

María Gilda Mendoza Guzmán

Supervisors:

Prof. Dr. Paul Goetghebeur (Ghent University, Belgium)

Dr. Marie-Stéphanie Samain (Ghent University, Belgium and Instituto de Ecología, A.C., Mexico)

Prof. Dr. Paul De Vos (Ghent University, Belgium)

Other members of the jury:

Prof. Dr. Koen Sabbe (Ghent University, Belgium)

Prof. Dr. Annemieke Verbeken (Ghent University, Belgium)

Dr. Stefan Wanke (Dresden University of Technology, Germany)

Prof. Dr. Tom Beeckman (Ghent University and VIB, Belgium)

Prof. Dr. Olivier De Clerck (Ghent University, Belgium)

Prof. Dr. Joris Van Acker (Ghent University, Belgium)

This PhD project was performed at the Research Group Spermatophytes, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium.

Homepage Research Group: www.spermatophytes.ugent.be

Correct citation:

Granados Mendoza C., 2013. Tree top climbing. Towards an evolutionary tree of *Hydrangea* section *Cornidia*. PhD thesis. Ghent University, Belgium: XVIII + 203.

Cover

Front: *Hydrangea* sp. (Soteapan, Veracruz, Mexico). Back: *H. seemannii* (Pueblo Nuevo, Durango, Mexico). Design and pictures: The author.

ISBN: 978-94-6197-171-5

Tree top climbing

Towards an evolutionary tree of *Hydrangea* section *Cornidia*

Thesis proposed for the Doctor of Science degree

Carolina Granados Mendoza

2013

Acknowledgements—*Agradecimientos*

To my supervisors Prof. Paul Goetghebeur and Dr. Marie-Stéphanie Samain. Dear Paul, thank you for giving me the opportunity to join the Research Group Spermatophytes of the Ghent University. Through my stay at your research group I have not only gained professional knowledge, but also grown in my personal life. I am very grateful for your unconditional and continuous support right from the start of my stay in Belgium. *Querida Marie, gracias por la oportunidad de ser parte de este proyecto en* Hydrangea*. De ti aprendí valiosas enseñanzas que serán una importante referencia en mi futura vida académica. Tu constante apoyo fue decisivo para finalizar este proyecto de doctorado. Finalmente te agradezco por tu amistad y todas las buenas experiencias durante estos cuatro años.*

I am deeply thankful to Dr. Stefan Wanke who provided advice, lab space and funding for the molecular work. Dear Stefan, thank you for "adopting" me among your students, your advice was essential for completing my PhD studies. Moreover, thank you for the opportunity to be a recurrent visitor of your team work.

I would like to acknowledge to other members of my reading and examination committee Prof. Annemieke Verbeken, Prof. Tom Beeckman, Prof. Paul De Vos, Prof. Joris Van Acker, Prof. Olivier De Clerck and Prof. Koen Sabbe for their valuable comments and suggestions improving this PhD thesis.

Con mucho cariño agradezco a las doctoras Helga Ochoterena Booth y María Hilda Flores Olvera por apoyarnos en nuestras expediciones en México y por facilitar nuestro trabajo en el Instituto de Biología y el herbario MEXU de la UNAM. Queridas Helga e Hilda, su apoyo, consejo y amistad me acompañaron durante todo mi doctorado. Gracias por traerme un pedacito de México en cada una de sus visitas a Bélgica.

Special thanks to Chantal Dugardin. Dear Chantal, thank you for providing all the facilities at the Botanical Garden of the Ghent University and for your support in diverse aspects of my PhD project and life in Ghent. Thanks also to all our gardeners who were always happy and ready to help. Dear gardeners, thank you for the tree climbing lessons, picking me up at Brussels Airport after the expeditions and growing *Loasa*… several times!

Dear Marc, thank you for keeping alive our collections, for sharing your knowledge on *Hydrangea* s.l. cultivation and for your green humor.

I am very grateful to Koen Camelbeke (Arboretum Wespelaar, Haacht, Belgium) and Georges Piens (Hydrangeum vzw, satellite garden of Ghent University Botanic Garden, Belgium) for providing Hydrangeaceae plant material that complemented our sampling.

I am deeply in debt to my colleagues Isabel Larridon, Yannick De Smet, Kenneth Bauters, Olivier Leroux, Kobeke Van de Putte, Eske De Crop, Jorinde Nuytinck, Sharon Eeckhout, Sofie Vranken, Viki Vandomme, Silas Sluijs, Felix Hampe, Komsit Wisitrassameewong, Bram D'hondt, Dirk Stubbe, Eduardo Cires Rodríguez, Marc Reynders and Wim Huygh who were there to help me in all sort of academic and personal issues. I like to specially thank Pieter Asselman for his support in the laboratory work, always getting everything to work! Thank you Master! Thanks also to Rosette Heynderickx, Marleen Vlaeminck and Kristof de Vos for their help in many administrative and logistic tasks.

My deepest gratefulness to the voluntary work of Oana Otilia Saracutu, Emile Redant and Elena Valdés Correcher without your valuable help this work would have been certainly more challenging and less fun.

I sincerely thank Prof. Christoph Neinhuis for providing the research environment at the Dresden University of Technology and supporting our collaborative *Hydrangea* s.l. research initiative.

I am especially grateful to Sarah Wagner, Julia Naumann, Lena Frenzke, Karsten Salomo, Birgit Oelschlägel, Lars Symmank, Juliane Kammerich, Claudia Pätzold, Katja Buchwalder, Sebastian Müller and Sylvi Malcher of the Plant Phylogenetics and Phylogenomics Group of the Dresden University of Technology for their support during my research stays in Dresden. Dear Julia and Sarah, thank you for training me in the molecular lab work. Dear Sarah, thank you for answering all my questions on biomechanics and wood anatomy. Dear Jule, thanks for your excellent work at the lab. Dear DD team, thanks for all the unforgettable moments. I like to thank to Markus Günther for his admirable SEM pictures and to Andreas Kempe for his comments on wood eccentricity calculation.

I would also like to thank to Prof. Hong Ma for provinding Cornales sequences of the genes *SMC1*, *SMC2*, *MSH1*, *MLH1* and *MCM5* used in chapter 6 and Dr. Francesc López-Giráldez for his guidance using the PhyDesign online application.

To Dr. Sandrine Isnard. Dear Sandrine, thank you for your advice on plant biomechanics and architecture, for working so hard during our field trip in Mexico and for welcome me at the UMR—AMAP, Montpellier. I would also like to thank to Tristan Charles-Dominique for his advice on plant architecture and Jan Van den Bulcke for performing the wood density scans. Thanks to both for the enriching discussions and comments to our manuscript in *H. seemannii*. I am also very grateful to Prof. Nick Rowe for the working space, the great discussions at the UMR, AMAP and his valuable input in our *H. seemannii* manuscript. I like to thank Brigitte Meyer-Berthaud, Michaël Gueroult, Santiago Trueba, Piet Dekeyser and Olivier Leroux for their support on wood anatomy lab work.

Nuestros viajes de campo no hubieran sido posibles sin la ayuda de muchos botánicos, guías locales y nuestros queridos choferes latinoamericanos, trataré de mencionar algunos de ellos… de norte a sur. Con mucho cariño agradezco a los botánicos Esteban M. Martínez Salas, Álvaro Campos Villanueva, Rosamond I. Coates Lutes, Gerardo A. Salazar Chávez, Socorro González Elizondo, Abel García Arévalo, Carlos Gómez Hinostrosa, Gabriel Flores Franco (México), Diana Fernández, Efraín Freire, Juan Carlos Cerón Factos, David Omar Lasso Meza, Edison Jiménez López, Zhofre Aguirre Mendoza, Fani Tinitana Imaicela (Ecuador), Rigoberto R. Rivera Camaña, Joaquina Albán Castillo, Asunción A. Cano Echevarría, Rocío Rojas (Perú), Mauricio Cisternas Baez, Alexandra Stoll y Alicia Marticorena (Chile). A Carlos Bambarén (Perú), Marco Vinicio Álvarez Gamboa (Ecuador) y Christian Cisternas (Chile) por los kilómetros recorridos, las buenas charlas y por su amistad. Un especial agradecimiento lo debo a todos nuestros guías locales y guardaparques, su ayuda fue esencial para el éxito de nuestras expediciones.

I am very grateful to the staff and curators of all the herbaria mentioned in Table 2.1 that kindly provided the material for our revision. *Agradezco a los gobiernos de México, Costa Rica, Ecuador y Perú por otorgarme a mí y a mi asesora la Dra. Marie-Stéphanie Samain los correspondientes permisos de colecta e investigación científica: (México: SGPA/DGGFS/712/2486/09, SGPA/DGGFS/712/0424/10, SGPA/DGGFS/712/3801/10; Costa*

Rica: 020-2012-SINAC, 041-2012-SINAC; Ecuador: 001-12-IC-FLO-DNB/MA; Perú: 003-2012-SERNANP-JEF, 0271-2011-AG-DGFFS-DGEFFS).

To my Belgian mother Kathleen Steel and her family. Dear Kathleen, thank you for taking care of me during these four years, you made me feel always at home, among family and supported.

A mi papá Antonio Granados Salinas, mi mamá María Gilda Mendoza Guzmán, mis hermanos María Gilda Granados Mendoza, Arved Marín Toledo, Paola Granados Mendoza y Miran Milosevic, mi sobrina Valeria Marín-Granados, mis abuelitas Flora Guzmán Santos y Ninfa Salinas Mondragón y mi tía Flora Mendoza Guzmán por resistir la distancia, por su amor y constante apoyo… por ser mi inspiración.

This research has received statistical advice from Ghent University FIRE (Fostering Innovative Research based on Evidence). Financial support for this PhD project came from the Special Research Fund of the Ghent University (Bijzonder Onderzoeksfonds project 01J03309, Belgium). I gratefully acknowledge to King Leopold III Fund for Nature Exploration and Conservation (Belgium) for granting one of our field trips to Mexico. I am very grateful to the Biology Department of Dresden University of Technology for the grants provided during my research stays. *Agradezco al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (México) por la beca de movilidad a Bélgica.*

Aquellos que olvidé mencionar, gracias! To those I forgot to mention, thank you!

y esto deja de ser un simple monólogo, para convertirse en un… biólogo

Les Luthiers

Abstract

As traditionally recognized, the tribe Hydrangeeae (*Hydrangea* s.l.) of the Cornales family Hydrangeaceae includes the warm temperate and tropical genera *Hydrangea* s.s. plus *Broussaisia*, *Cardiandra*, *Decumaria*, *Deinanthe*, *Dichroa*, *Pileostegia*, *Platycrater* and *Schizophragma*. A number of species of this tribe are popular woody ornamentals for their conspicuous inflorescences with attractive marginal flowers. The most recent revision of *Hydrangea* s.s. by McClintock (1957) subdivides this genus in the sections *Hydrangea* and *Cornidia*, each further divided in subsections. The *H.* sect. *Cornidia* comprises a yet undefined number of evergreen root-climbing species of nearly exclusive American distribution, with the exception of one species from Taiwan and the Philippines. The present study focuses on the tribe Hydrangeeae (*Hydrangea* s.l.) and *H.* sect. *Cornidia*.

Knowledge of the phylogenetic relationships within the tribe has progressively improved in a series of molecular and morphological studies consistently recovering *Hydrangea* s.s. as paraphyletic with respect to the other genera in the tribe. A recent study by our research group included a number of Hydrangeeae representatives, recognizing two highly supported main clades within the tribe. However, due to heterogeneous distributions of rates of evolution and limited plastid variability, relationships among the different "genera" remained poorly understood. Despite the long record of phylogenetic studies in the tribe Hydrangeeae, a limited number of species from *H.* sect. *Cornidia* could be included in previous phylogenetic studies preventing a robust test of the monophyly of this section and its subsections, as well as a better knowledge of the evolutionary history of this group.

The present PhD research project was divided in four subprojects. The aims of the first two were to gain insight in the phylogenetic relationships within *Hydrangea* s.l. and *H.* sect. *Cornidia*, respectively. In order to achieve these, we evaluated the performance of a number of coding and non-coding regions from the chloroplast and nuclear genomes for resolving and supporting phylogenetic relationships in these groups. The third subproject connects our fundamental phylogenetic research of *Hydrangea* s.l. to an applied study on hortensia breeding. Although hortensias are already more than two centuries important for

horticultural trade, crosses between distantly related species have been problematic in this group hindering exploitation of economic value. The aim of this subproject was to inform the selection of potentially successful hortensia hybrid crosses, based on our recently improved phylogenetic knowledge in the group and genetic distances calculated from our extensive chloroplast nucleotide database. The fourth subproject focused on the characterization of the root climbing growth form in *H.* sect. *Cornidia,* using a multidisciplinary approach integrating plant biomechanics, architecture and anatomy.

Our results represent a concrete progress in the reconstruction of a solid phylogenetic framework for *Hydrangea* s.l. and *H.* sect. *Cornidia* facilitating the application of the evidently needed taxonomical changes in these groups. Additionally, our results highlight the importance of "phylogenetic thinking" and its value in plant breeding. Furthermore, we present a contribution to the knowledge of the biology of the previously barely studied *H.* sect. *Cornidia*.

Outline of the thesis

The introductory **Chapter 1** first sheds light on the previous knowledge (before the start of this PhD research) on the systematics of the family Hydrangeaceae, the tribe Hydrangeeae and *H.* sect. *Cornidia*. Then we introduce the background for the four main subprojects within this doctoral research: 1) reconstruction of a solid phylogenetic framework for the tribe Hydrangeeae, 2) improvement of our knowledge on the phylogenetic relationships within *H.* sect. *Cornidia,* 3) guidance of hortensia breeding based on phylogenetic information, and 4) characterization of growth forms in *H.* sect. *Cornidia*.

Chapter 2 frames this PhD project within the general research on *Hydrangea* s.l. by the Research Group Spermatophytes of the Ghent University. The general aims of this PhD are presented as well as the research strategies to achieve them. Here we discuss the importance of the *Hydrangea* s.l. collection in the Botanical Garden of the Ghent University and describe our field work coverage and collection strategies. Author's contribution to research chapters is here stated.

The thesis is then divided in two parts that reflect the two taxonomical levels of our research: **Part 1** corresponds to *Hydrangea* s.l. and **Part 2** to *H.* sect. *Cornidia*.

Part 1

Chapter 3 exposes the need of an efficient marker selection for tackling a case of resolution contrast in *Hydrangea* s.l., a group with a highly heterogeneous distribution of molecular rates of evolution. A fully resolved and highly supported phylogenetic framework of a lineage-representative sampling within *Hydrangea* s.l. is presented.

In **Chapter 4** the economic importance of representatives of *Hydrangea* s.l. as ornamentals is emphasized. Here a link between fundamental and applied plant science research is achieved by applying our knowledge on the phylogenetic relationships in the group to the selection of potentially successful breeding projects.

Part 2

Based on our field observations and plant material collected during our expeditions, as well as our herbarium study, **Chapter 5** presents a description of the morphological characters of *H.* sect. *Cornidia*. Two concise examples of sexual dimorphism in this clade are here described.

Chapter 6 expounds preliminary results that will lead to a manuscript dealing with the fundamental search of nuclear potential single-copy genes, allowing for the reconstruction of the evolutionary history of *H.* sect. *Cornidia*. Based on the obtained phylogenetic hypothesis, McClintock's (1957) circumscription of *H.* sect. *Cornidia* and its subsections *Monosegia* and *Polysegia* is discussed.

An interdisciplinary approach integrating plant biomechanics, architecture and anatomy for the study of growth form plasticity in root climbers of *H.* sect. *Cornidia* is treated in **Chapter 7**. Two root climbing strategies linked to different types of support are here described.

Finally, in **Chapter 8** the conclusions of the PhD thesis are presented along with our ongoing research and future perspectives in the study of *Hydrangea* s.l. and *H.* sect. *Cornidia*.

Samenvatting

De tribus Hydrangeeae (*Hydrangea* s.l.) van de Cornales familie Hydrangeaceae omvat, zoals traditioneel omschreven, de warm-gematigde en tropische genera *Hydrangea* s.s., *Broussaisia*, *Cardiandra*, *Decumaria*, *Deinanthe*, *Dichroa*, *Pileostegia*, *Platycrater* en *Schizophragma*. Een aantal soorten die tot deze tribus behoren zijn populaire houtachtige sierplanten omwille van hun opvallende bloemgestellen en aantrekkelijke randbloemen. De meest recente revisie van *Hydrangea* s.s. door McClintock (1957) verdeelt dit genus in de secties *Hydrangea* en *Cornidia*, op hun beurt verder onderverdeeld in subsecties. De *H.* sectie *Cornidia* bestaat uit een nog onbepaald aantal altijd-groene wortelklimmende soorten die bijna uitsluitend in Amerika voorkomen, met uitzondering van één soort uit Taiwan en de Filippijnen. De huidige studie focust op de tribus Hydrangeeae (*Hydrangea* s.l.) en *H.* sectie *Cornidia*.

De kennis van de fylogenetische verwantschapsrelaties in de tribus nam gestaag toe aan de hand van moleculair en morfologisch onderzoek dat op een consistente wijze de parafylie van *Hydrangea* s.s. in relatie tot de andere genera in de tribus aantoonde. Een recente door onze onderzoeksgroep op basis van een uitgebreid aantal Hydrangeeae vertegenwoordigers uitgevoerde studie resulteerde in de herkenning van twee goed ondersteunde clades in deze tribus. Omwille van de heterogeen verdeelde evolutiesnelheden en de beperkte choroplastmerker-variabiliteit bleven de verwantschappen tussen de verschillende “genera” echter nog steeds onvoldoende begrepen. Daarnaast waren vertegenwoordigers van de *H*. sectie *Cornidia* niet beschikbaar voor opname in eerdere fylogenetische studies, waardoor een robuuste test van de monofylie van deze sectie en haar subsecties niet kon worden uitgevoerd. Hierdoor bleef eveneens de evolutionaire geschiedenis van deze groep onbekend.

Dit doctoraatsproject werd onderverdeeld in vier deelprojecten. De doelstelling van de eerste twee was het verwerven van inzicht in de fylogenetische verwantschapsrelaties in respectievelijk *Hydrangea* s.l. en *H.* sectie *Cornidia.* Om dit te bereiken evalueerden we een aantal coderende en niet-coderende regio’s uit chloroplast- en kerngenoom aan de hand van

hun potentieel om verwantschapsrelaties op te lossen en te ondersteunen. Het derde deelproject linkt ons fundamenteel fylogenetisch onderzoek in *Hydrangea* s.l. met een toegepaste studie voor veredelingstechnieken in hortensia. Hoewel deze planten al meer dan twee eeuwen lang belangrijk zijn in de sierplantenhandel is het uitvoeren van kruisingen tussen minder nauw verwante soorten problematisch en dit belemmert de uitbating van het economisch belang van deze groep. Het doel van dit deelproject was het produceren van informatie die nuttig is voor de selectie van potentieel succesvolle interspecifieke kruisingen in hortensia. Dit was enerzijds gebaseerd op ons recent toegenomen inzicht in de fylogenetische verwantschapsrelaties in deze groep en anderzijds op de genetisch afstanden die we berekenden aan de hand van onze uitgebreide chloroplast nucleotide dataset. Het vierde deelproject focuste op de karakterizatie van de wortelklimmende groeivorm in *H.* sectie *Cornidia,* door een multidisciplinaire benadering en het integreren van plantenbiomechanica, architectuur en anatomie.

Onze resultaten betekenen een concrete vooruitgang in de reconstructie van een robuust fylogenetisch kader voor *Hydrangea* s.l. en *H*. sectie *Cornidia*, wat de toepassing van de vanzelfsprekende taxonomische veranderingen in deze groepen bevordert. Daarnaast benadrukken onze resultaten het belang van “fylogenetisch denken” en de waarde hiervan voor plantenveredelingstechnieken. Tenslotte leveren we ook een bijdrage tot de kennis van de biologie van de tot nu toe nauwelijks bestudeerde *H*. sectie *Cornidia*.

Overzicht van dit proefschrift

In het inleidend **Hoofdstuk 1** wordt eerst de kennis over de systematiek van de familie Hydrangeaceae, de tribus Hydrangeeae en *H.* sectie *Cornidia* die beschikbaar was voor de start van dit doctoraatsproject voorgesteld. Vervolgens introduceren we achtergrondinformatie voor de vier grote deelprojecten van deze doctoraatsstudie: 1) reconstructie van een robuust fylogenetisch kader voor de tribus Hydrangeeae, 2) een verbetering van onze kennis over de fylogenetische verwantschapsrelaties binnen *H.* sectie *Cornidia*, 3) sturen van hortensiakweek gebaseerd op fylogenetische informatie, en 4) karakterizatie van groeivormen in *H.* sectie *Cornidia*.

Hoofdstuk 2 kadert dit project in het algemene onderzoek op *Hydrangea* s.l. in de Onderzoeksgroep Zaadplanten van de Universiteit Gent. De algemene doelstellingen evenals de onderzoeksstrategieën van dit doctoraat worden verduidelijkt. Daarnaast wordt ook het belang van de *Hydrangea* s.l. collectie in de Plantentuin van de Universiteit Gent benadrukt en beschrijven we ons veldwerk en de gebruikte inzamelstrategieën.

De thesis is vervolgens onderverdeeld in twee delen die de twee taxonomische niveaus van ons onderzoek weerspiegelen: **Deel 1** handelt over *Hydrangea* s.l., in **Deel 2** bespreken we *H.* sectie *Cornidia*.

Deel 1

In **Hoofdstuk 3** wordt het belang van efficiënte merkerselectie belicht, met als doel het oplossen van resolutiecontrast in *Hydrangea* s.l., een groep met een zeer heterogene verdeling van moleculaire evolutiesnelheden. Een volledig opgelost en goed ondersteund fylogenetisch kader van *Hydrangea* s.l. wordt voorgesteld op basis van een staalname die representatief is voor alle evolutionaire lijnen binnen deze groep.

Hoofdstuk 4 bespreekt het economisch belang van vertegenwoordigers van *Hydrangea* s.l. als sierplanten. We streefden hier een link tussen fundamenteel en toegepast botanisch onderzoek na, door het toepassen van onze kennis over fylogenetische verwantschapsrelaties in deze groep op de selectie van potentieel succesvolle kweekprojecten.

Deel 2

Gebaseerd op observaties van planten in het veld, van materiaal verzameld gedurende onze expedities en van herbariumspecimens presenteren we in **Hoofdstuk 5** een beschrijving van de morfologische kenmerken in *H.* sectie *Cornidia.* Twee voorbeelden van sexueel dimorfisme in deze groep worden eveneens besproken.

Hoofdstuk 6 behandelt voorlopige resultaten die zullen leiden tot een manuscript over de fundamentele zoektocht naar nucleaire genen die in een beperkt aantal kopiën aanwezig zijn. Dit laat een reconstructie van de evolutionaire geschiedenis van *H.* sectie *Cornidia* toe. Op basis van deze fylogenetische hypothese wordt de omschrijving van *H*. sectie *Cornidia* en subsecties *Monosegia* en *Polysegia* door McClintock (1957) bediscussieerd.

Een interdisciplinaire benadering die plant biomechanica, architectuur en anatomie integreert voor de studie van groeivormplasticiteit in wortelklimmers van *H.* sectie *Cornidia* wordt voorgesteld in **Hoofdstuk 7**. Twee verschillende wortelklimmer-strategieën worden gelinkt aan de aard van de steun waarop deze klimmers groeien.

In **Hoofdstuk 8** worden tenslotte de conclusies van deze doctoraatsthesis besproken, evenals ons lopend onderzoek en toekomstperspectieven in de studie van *Hydrangea* s.l. en *H*. sectie *Cornidia.*

Table of contents