

**Unravelling the sensory and genomic
underpinnings of circalunar versus
circasemilunar clocks in *Clunio marinus***

Dissertation

in fulfilment of the requirements for the degree of

Doctor rerum naturalium

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

at the Christian Albrechts University of Kiel

Submitted by

Carolina M. Peralta

Max Planck Institute for Evolutionary Biology

Plön, August 2024

First examiner: **Dr. Tobias S. Kaiser**

Second examiner: **Prof. Dr. Eva H. Stukenbrock**

Date of the oral examination: **6th of November 2024**

Summary

Over the last two decades, advances in sequencing technologies have brought insights into the genomic architecture of adaptive traits. Structural variants (SVs) are large genetic variants including deletions, insertions, duplications and inversions, that can shape variation in complex traits. Although their role in adaptive evolution is becoming evident, it is still poorly understood. In-depth exploration of genomes from different species with intriguing traits can shed light on the role of SVs in local adaptation and speciation. *Clunio marinus* is a marine midge that inhabits intertidal regions of the Atlantic coast, with populations showing local adaptations in their emergence timing to coincide with the respective local times of low tides. Moreover, these strain-specific circadian and circalunar emergence patterns are genetically determined. Thus, natural variation in the timing of emergence of *C. marinus* populations is a remarkable resource to explore questions in both chronobiology (circadian and non-circadian rhythms) and evolutionary biology (e.g. genetic basis of local adaptation of complex traits). In my thesis, I have studied the sensory and genomic underpinnings of the circalunar versus circasemilunar clocks of *C. marinus*. In **Chapter I**, I explored the mechanisms that mediate entrainment by moonlight. This project shed light on the crucial aspects that set the phase of the circalunar and circasemilunar clocks. Importantly, by providing the first natural moonlight laboratory set up to precisely entrain *C. marinus*, it lays the foundation for the dissection of the genetic basis of semilunar vs. lunar rhythms. In **Chapter II** I focus on the genomic architecture of emergence phenotypes by characterizing the SV landscape in *C. marinus* and performing an association analysis using the period of the circalunar rhythm and the phase of the circadian rhythm as covariates. I show that many of the candidate alleles – both single nucleotide polymorphisms and SVs – fall within known circadian clock genes. In **Chapter III** I further explore the genomic architecture of emergence phenotypes by characterizing chromosomal inversions segregating in wild populations of *C. marinus*. The chapter provides insights into the putative direct effect of inversion breakpoints in gene disruption and indirect effects by showing an association between inversion frequencies and latitude.

This thesis provides 1) an in-depth characterization of the mechanisms of moonlight entrainment, 2) the first characterization of the genomic architecture of circalunar vs circasemilunar rhythms, 3) additional insights into the role of circadian clock genes in the circalunar timing in *C. marinus* and 4) candidate genes, genomic regions and chromosomal inversions that can be further tested for their role in circalunar timing and local adaptation.

Zusammenfassung

In den letzten zwei Jahrzehnten haben Fortschritte in der Sequenzieretechnologie Einblicke in die genomische Architektur adaptiver Merkmale ermöglicht. Strukturvarianten (SVs) sind große genetische Varianten, darunter Deletionen, Insertionen, Duplikationen und Inversionen, die die Variation komplexer Merkmale beeinflussen können. Obwohl ihre Rolle in der adaptiven Evolution immer deutlicher wird, ist diese Rolle noch immer kaum verstanden. Die eingehende Untersuchung von Genomen verschiedener Arten mit interessanten Merkmalen kann Aufschluss geben über die Rolle von SVs bei der lokalen Anpassung und der Artbildung. *Clunio marinus* ist eine marine Mücke, die in der Gezeitenzone der Atlantikküste lebt, wobei die Populationen eine lokale Anpassung in Bezug auf ihre Schlupfzeit zeigen, welche mit den jeweiligen lokalen Zeiten der Ebbe zusammenfällt. Außerdem sind diese stammspezifischen zirkadianen und zirkalunaren Schlupfzeiten genetisch festgelegt. Somit ist die natürliche Variation in der Schlupfzeit von *C. marinus*-Populationen eine bemerkenswerte Ressource zur Erforschung von Fragen der Chronobiologie (zirkadiane und nicht-zirkadiane Rhythmen) und der Evolutionsbiologie (z. B. genetische Grundlagen der lokalen Anpassung durch komplexe Merkmale). In meiner Dissertation habe ich die sensorischen und genomischen Grundlagen der zirkalunaren und zirkasemilunaren Uhren von *C. marinus* untersucht. In Kapitel I habe ich die Mechanismen erforscht, die das Entrainment durch Mondlicht vermitteln. Dieses Projekt brachte Licht in die entscheidenden Faktoren, die die Phase der zirkalunaren und zirkasemilunaren Uhren bestimmen. Durch die Bereitstellung der ersten Laborsimulation von natürlichem Mondlicht für das präzise Entrainment von *C. marinus* wurde die Basis für die Untersuchung der genetischen Grundlagen von semilunaren und lunaren Rhythmen geschaffen. In Kapitel II konzentriere ich mich auf die genomische Architektur der Schlupf-Phänotypen, wobei ich die SVs im Genom von *C. marinus* charakterisiere und eine Assoziationsanalyse durchführe, bei der die Periode des zirkalunaren Rhythmus und die Phase des zirkadianen Rhythmus als Kovarianten verwendet werden. Ich zeige, dass viele der Kandidatenallele - sowohl Einzelnukleotidpolymorphismen als auch SVs - in bekannte zirkadiane Uhr Gene fallen. In Kapitel III erforsche ich die genomische Architektur von der Schlupf-Phänotypen eingehender, indem ich chromosomale Inversionen charakterisiere, die in Wildpopulationen von *C. marinus* segregieren. Das Kapitel bietet Einblicke in die mutmaßliche direkte Auswirkung der Inversions-Bruchstellen auf die betroffenen Gene und in indirekte Auswirkungen, insofern als es einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit bestimmter Inversionen und dem Breitengrad aufzeigt.

Diese Arbeit liefert 1) eine eingehende Charakterisierung der Mechanismen des Mondlicht-Entrainments, 2) die erste Charakterisierung der genomischen Architektur zirkalunarer und zirkasemilunarer Rhythmen, 3) weitere Erkenntnisse über die Rolle der zirkadianen Uhr Gene bei der zirkalunaren Zeitmes-

sung in *C. marinus* und 4) Kandidatengene, genomische Regionen und chromosomale Inversionen, die in Zukunft auf ihre Rolle bei der zirkalunaren Zeitmessung und lokalen Anpassung getestet werden können.

Translated with DeepL, edited by Dr. Tobias Kaiser