

Hybrideproblemen in het parasitaire wespengenus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae)

Tosca Koevoets

TREFWOORDEN

Evolutionaire genetica, geslachtsspecifieke patronen, soortsvorming

Entomologische Berichten 72 (6): 270-277

Sinds Darwin's boek *The Origin of Species* is verschenen, is er veel onderzoek gedaan naar de processen die een rol spelen bij soortsvorming. Wanneer populaties niet meer in contact staan met elkaar, zullen ze langzaam van elkaar gaan veranderen totdat er andere soorten zijn ontstaan. Uiteindelijk zullen deze soorten genetisch zo veranderd zijn, dat het combineren van DNA van de verschillende soorten niet meer mogelijk is, wat geuit wordt in allerlei problemen in de hybride nakomelingen. Deze problemen blijken in het beginstadium van soortsvorming anders te zijn in mannetjes dan in vrouwtjes. Om te onderzoeken waar dit door komt, is gebruik gemaakt van parasitaire wespesoorten uit het geslacht *Nasonia*. Wespen hebben geen geslachtschromosomen, maar vrouwtjes ontstaan uit bevruchte eitjes en mannetjes uit onbevruchte eitjes. Vrouwtjes hebben dus twee keer zoveel DNA als mannetjes. Ook bij wespen bleken mannetjes kwetsbaarder voor hybridisatie dan vrouwtjes. Deze kwetsbaarheid werd zelfs nog groter onder stressvolle omstandigheden. Dit werd veroorzaakt doordat mannetjes minder genetische variatie hebben, maar ook doordat ze minder DNA hebben. Via een speciale genetische techniek kon gezorgd worden dat bevruchte eitjes (dus eigenlijk bestemd om vrouwtjes te worden) zich tot mannetjes ontwikkelen. Daardoor kon onderzocht worden wat belangrijker is: mannetje zijn of de hoeveelheid DNA. Natuurlijk lag het antwoord in het midden: beide facetten bleken belangrijk. Dit onderzoek toonde aan dat genetische interacties, de hoeveelheid DNA en de genetische variatie belangrijke aspecten zijn bij het ontstaan van soorten.

Reproductieve isolatie

Wanneer we het hebben over verschillende soorten, dan lijkt het begrip 'soort' op het eerste oog heel intuïtief: een kat is een andere soort dan een hond. Het precies definiëren, volgens wetenschappelijke richtlijnen, van wat een soort is, blijkt toch lastig: is een chihuahua een andere soort dan een Deense dog (figuur 1)?

Wetenschappers hebben veel tijd geïnvesteerd in het bedenken van soortconcepten (de regels rond de definitie van wat een soort is) die voor alle disciplines binnen de biologie aanvaardbaar zijn. Hoewel de wetenschap het niet eens is over een overkoepelend concept, is er wel één definitie die populair is onder wetenschappers: het Biologische Soort Concept. Dit concept zegt dat individuen tot dezelfde soort behoren wanneer ze levensvatbare en vruchtbare nakomelingen kunnen voortbrengen, of wanneer ze dat theoretisch zouden kunnen (denk aan de Deense dog en de chihuahua). Met andere woorden: verschillende soorten zijn reproductief van elkaar geïsoleerd, omdat ze geen vruchtbare nakomelingen kunnen maken (Coyne 1992). Voor een kat en een hond is het dan ook duidelijk dat we over verschillende soorten spreken. Maar bijvoorbeeld een paard en een ezel kunnen onderling wel nakomelingen produceren;

muilieren of muilezels. Deze zogenaamde 'hybriden' zijn echter niet vruchtbaar, waardoor paarden en ezels dus niet tot dezelfde soort kunnen worden gerekend. De mechanismen die ten grondslag liggen aan de reproductieve isolatie worden verdeeld in twee groepen. Ten eerste barrières die voorkomen dat een eikel van de ene soort wordt bevrucht door een zaadcel van de andere soort. Een bevruchte eikel is een zygoot, dus wordt dit mechanisme prézygotische isolatie genoemd. Ten tweede, barrières die voorkomen dat een zygoot zich ontwikkelt tot een vruchtbare hybride (postzygotische isolatie) (Coyne & Orr 1998).

Postzygotische isolatie richt zich op de problemen die ontstaan in hybride nakomelingen doordat biologische informatie van twee verschillende soorten wordt gecombineerd. Deze postzygotische isolatie is echter vaak niet volledig: lijken de twee soorten nog veel op elkaar, dan zijn de hybrideproblemen (sterfte en steriliteit, ook wel incompatibiliteiten genoemd) in de nakomelingen vaak kleiner dan wanneer de twee hybridiserende soorten sterk van elkaar verschillen. Met andere woorden, hoe verder de soorten van elkaar geëvolueerd zijn, des te groter zijn de incompatibiliteiten in de nakomelingen na hybridisatie. Door technologische vooruitgang is het nu mogelijk om de beginstadia van het soortsvormingsproces te onderzoeken in



1. Een chihuahua (links) en een Deense dog (rechts). Zouden we deze twee hondenrassen tot dezelfde soort (hond, *Canis lupis*) moeten rekenen? Dat is volgens het Biologische Soort Concept nog maar de vraag. Foto: skynetblogs.be

1. A chihuahua (left) and a great Dane (right). Should we consider these different dog breeds as the same species (dog, *Canis lupis*)? According to the Biological Species Concept this is open to interpretation.

termen van welke mechanismen leiden tot incompatibiliteiten. Hopelijk kunnen we middels dit onderzoek bijdragen aan het vinden van antwoord op het raadsel dat Darwin in 1859 beschreef in zijn boek *The Origin of Species*: hoe ontstaan verschillende soorten?

Haldane's Regel

Zoals al gezegd, is de vordering van het soortsvormingsproces van belang voor de mate waarin eventuele hybride nakomelingen problemen ondervinden. Wanneer soortsvorming in het beginstadium is, dan zullen hybriden weinig incompatibiliteiten (sterfte en steriliteit) vertonen. Wanneer de soortsvorming gevorderd is, dan zullen de hybriden zeer sterke incompatibiliteiten vertonen (Coyne & Orr 1998). Echter, wanneer de soortsvorming nog niet gevorderd, maar wel substantieel is, dan is er een stadium waarin mannelijke en vrouwelijke hybriden verschillend reageren op hybridisatie. Haldane was de eerste die hierin een patroon ontdekte en hij beschreef dat wanneer slechts één geslacht problemen ondervindt van hybridisatie, dat dit altijd het geslacht is met twee verschillende geslachtschromosomen: het heterogametische geslacht. Dit betekent dat in organismen met XY-geslachtsbepaling (veel voorkomend onder zoogdieren, vissen en insecten) mannelijke hybriden zwakker zijn en bij ZW-geslachtsbepaling (voornamelijk vogels en vlinders) vrouwelijke hybriden zwakker zijn (Haldane 1922). Dit patroon bleek zeer wijdverspreid te zijn binnen de dierenwereld en wordt daarom met Haldane's Regel aangeduid (Schilt-huizen et al. 2011).

Wetenschappelijk onderzoek naar Haldane's Regel heeft aangetoond dat verschillen in incompatibiliteiten tussen hetero- en homogametische hybriden inderdaad optreedt in het beginstadium van soortsvorming. Dit heeft ervoor gezorgd dat

veel soortsvormingsonderzoek gericht is op de mechanische achtergrond van Haldane's Regel in de hoop dat dit meer licht kan werpen op de drijvende krachten achter soortsvorming.

Dobzhansky-Muller interacties

De interacties tussen genen zijn cruciaal voor het functioneren van onze cellen. Zo zijn er genen die voor eiwitten coderen die werkzaam zijn in het aan- of uitzetten van andere genen: transcriptiefactoren. Vaak vormen deze factoren grote eiwit-complexen die perfect moeten samenwerken voor de functies die ze uitvoeren. Interacties tussen genen worden epistatische interacties genoemd.

De oorzaak van hybride-incompatibiliteiten wordt onder andere toegeschreven aan het verstoren van epistatische interacties. Bijvoorbeeld: het eiwit gecodeerd door gen A moet samenwerken met een eiwit gecodeerd door gen B. Deze epistatische interacties verlopen prima, totdat de populatie van individuen gescheiden wordt, bijvoorbeeld door een overstroming. Nu zijn er plotseling twee populaties, die onderling geen nakomelingen meer produceren door geografische isolatie. Als de isolatie lang duurt, zullen er willekeurig veranderingen (mutaties) optreden in de nucleotidenvolgorde van zowel gen A als van gen B. Omdat mutaties willekeurig ontstaan, zullen dat nooit dezelfde veranderingen zijn. Alle mutaties die de samenwerking tussen gen A en gen B verstoren, zullen via natuurlijke selectie verdwijnen, maar uiteindelijk zullen er toch verschillen ontstaan in beide genen in de gescheiden populaties. Daardoor is het mogelijk dat normaal gesproken gen A_1 de functie van gen B_1 aanzet in populatie 1, en A_2 hetzelfde doet voor gen B_2 in populatie 2. Maar de combinatie van A_1 en B_2 is niet door het 'filter' van natuurlijke selectie gegaan, wat ervoor kan zorgen dat A_1 niet goed werkt in het activeren van B_2 . Deze hybride zal zich niet kunnen ontwikkelen doordat de interactie tussen twee genen is verstoord (figuur 2). Deze verstoorde interacties worden ook wel Dobzhansky-Muller (DM) interacties genoemd, naar de bedenkers van dit model (Orr 1997). Via dit proces kunnen de twee populaties uiteindelijk twee verschillende soorten worden.

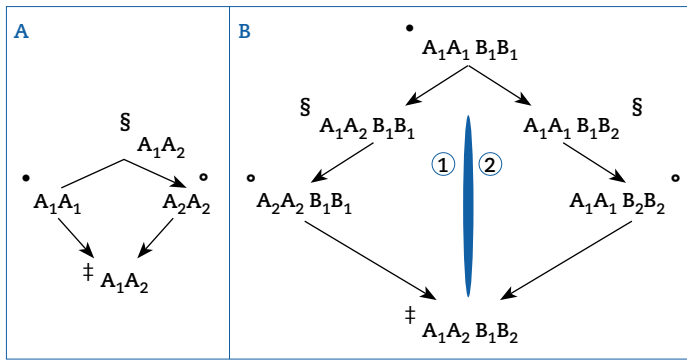
DM-interacties verklaren Haldane's Regel

Doordat DM-interacties verantwoordelijk worden gehouden voor de problemen die optreden in hybride nakomelingen, worden er op basis van deze DM-interacties verklaringen gezocht voor de constatering dat juist het heterogamete geslacht kwetsbaarder is voor hybridisaties (Haldane's Regel). De drie belangrijkste theorieën die hiervoor zijn voorgesteld, worden de dominantie, snelle-mannen en snelle-X theorieën genoemd (Orr 1997).

De dominantietheorie

Diploïde, seksueel voortplantende organismen krijgen één chromosoomset van elke ouder. Ze hebben dus elk gen in hun genoom twee keer. In het geval van hybride organismen betekent dit dat ze voor de meeste genen een variant hebben van soort 1 en een variant van soort 2. Dit geldt echter niet voor alle genen. Er zijn ook geslachtchromosomen die niet verschillen tussen mannen en vrouwen: autosomen. De autosomen zijn altijd in tweevoud aanwezig, maar de genen op de geslachtschromosomen zijn alleen in tweevoud aanwezig in het homogametische geslacht (dus in XX-vrouwen en ZZ-mannen). XY-mannen (of ZW-vrouwen) hebben slechts één kopie van de genen die alleen maar op het X (of Z)-chromosoom liggen (figuur 3).

De dominantietheorie verklaart dat de nadelige DM-interacties in hybriden vaak worden opgeheven doordat er twee



2. Het Dobzhansky-Muller two-locus model voor hybride-incompatibiliteiten. Paneel A bekijkt de evolutie van een nieuw allel voor een enkel locus. Het nieuw ontstane A_2A_2 genotype kan niet evolueren uit het voorouderlijke A_1A_1 zonder door het letale A_1A_2 stadium te gaan. Paneel B bekijkt twee interacterende loci die nieuwe allelen evolueren in aparte populaties. Het verschil tussen A en B is dat in A het letale hybride genotype gelijk is aan het intermediaire genotype, terwijl in B deze genotypen verschillen. \bullet = voorouderlijke genotype; \circ = nieuwe genotype; \S = intermediaire stadium; \ddagger = letale hybride.

2. The Dobzhansky-Muller two-locus model for hybrid incompatibility. Panel A considers the evolution of a derived allele at a single locus. The derived A_2A_2 genotype cannot evolve from the ancestral A_1A_1 without going through the lethal A_1A_2 genotype. Panel B considers two interacting loci that evolve derived alleles in separate populations. The difference between A and B is that in A the lethal hybrid genotype is equal to the intermediate state, whereas in B these differ. \bullet = ancestral genotype; \circ = derived genotype; \S = intermediate state; \ddagger = lethal hybrid.

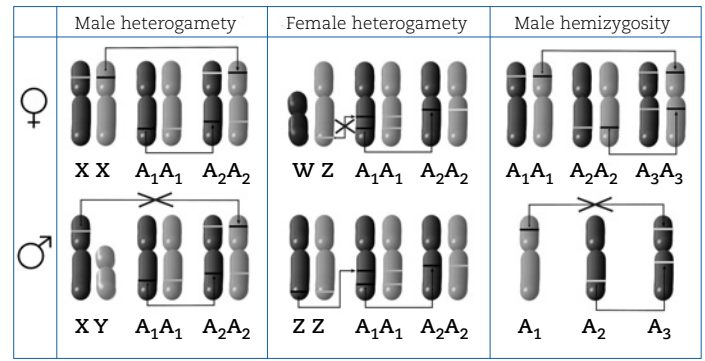
verschillende varianten van genen aanwezig zijn en de goede interacties de negatieve effecten van de slechte interacties kunnen compenseren: dominantie. De enige problemen die nu nog op kunnen treden zijn interacties met de genen die op het X-chromosoom liggen in mannen (of op de Z in vrouwen in geval van vrouwelijke heterogametie), omdat er dan slechts één variant is en er dus niet kan worden gered door een tweede, betere variant (zie figuur 3).

De snelle-mannentheorie

In de natuur kiezen vrouwen met welke man zij paren en moeten de mannen moeite doen om vrouwen ervan te overtuigen dat zij de beste kandidaat zijn. Hierdoor ontstaat er een grote druk op de mannen om zich steeds optimaal aan te passen aan de wensen van de vrouwen om beter te zijn dan de andere mannen in de omgeving en daardoor meer nakomelingen te kunnen produceren. Deze druk wordt seksuele selectie genoemd. Omdat deze mannen meer nakomelingen produceren, wordt deze optimale aanpassing ook vaker doorgegeven aan de volgende generatie. Hierdoor veranderen de genen die verantwoordelijk zijn voor mannelijke eigenschappen sneller. Als men de varianten tussen soorten vergelijkt, dan hebben genen die coderen voor 'mannelijke' eigenschappen meer verschillen dan de genen die verantwoordelijk zijn voor 'vrouwelijke' eigenschappen. Dit is de basis voor de snelle-mannentheorie.

De verwachting is dat interacties tussen genen sneller worden verstoord als dit interacties zijn tussen genen die extreem van elkaar verschillen dan wanneer dit interacties zijn tussen genen die minder van elkaar verschillen. Als extreme genvarianten vaker voorkomen in mannen, is de verwachting dat mannen meer problemen zullen hebben na hybridisatie dan vrouwen.

Een nadeel van deze theorie is dat ze goed opgaat onder mannelijke heterogametie (XX-vrouwen en XY-mannen), maar juist tegenovergesteld werkt onder vrouwelijke heterogametie (ZW-vrouwen en ZZ-mannen). Bij dit laatste mechanisme



3. Versimpeld model van epistatische interacties in hybriden onder verschillende vormen van seksdeterminatie. Verschillende gekleurde chromosomen komen van verschillende soorten. Dominante allelen zijn zwart en recessieve allelen zijn grijs. De optredende epistatische interacties zijn weergegeven door de zwarte pijlen. Negatieve epistatische interacties door een kruis door de pijl. A = autosoom; W = vrouwelijk specifieke sekschromosoom; X = algemeen sekschromosoom; Y = mannelijk specifiek sekschromosoom; Z = algemeen sekschromosoom. Bron: Koevoets & Beukeboom 2009

3. Simplified model of epistatic interactions in hybrids under different modes of sex-determination. Differently coloured chromosomes are from different species. Dominant alleles are black and recessive alleles are grey. The occurring epistatic interaction is given by the solid-black arrow. Negative epistatic interactions are indicated by a cross through the arrow. A=autosome; W = female specific sex chromosome; X = general sex chromosome; Y = male specific sex chromosome; Z = general sex chromosome. Source: Koevoets & Beukeboom 2009

voerspelt Haldane's Regel namelijk dat vrouwelijke hybriden extra problemen ondervinden bij hybridisatie, terwijl de snelle-mannentheorie voerspelt dat onder dit mechanisme ook hybride mannen alsnog extra problemen ondervinden. Toch is er bewijs te vinden dat de snelle-mannentheorie opgaat voor (sommige) soorten met mannelijke heterogametie (dus XY-mannen) (Schilthuizen et al. 2011).

De snelle-X-theorie

Naast seksuele selectie, vindt er ook natuurlijke selectie plaats op mannen en vrouwen. Deze natuurlijke selectie grijpt aan op alle eigenschappen die de overleving en voortplanting van individuen vergroot. Wanneer er een genvariant (allel) is ontstaan die voordelig is voor de overleving of voortplanting, dan zal de frequentie van dit allel in de populatie snel toenemen. Echter, het probleem is dat deze goede eigenschappen van een genvariant vaak slechts tot uitdrukking komen wanneer er geen andere variant in het genoom aanwezig is. Dus kan een dergelijke variant zich sneller verspreiden op plekken van het genoom waar maar één kopie van een gen beschikbaar is: op het X-chromosoom in mannen (of Z in vrouwen). Hierdoor zal het X-chromosoom meer extreme varianten van genen bevatten in de populatie dan de autosomen. Deze extreme varianten geven op hun beurt weer meer problemen in mannelijke hybriden, omdat er in mannen alleen het X-chromosoom aanwezig is waar het 'probleemgen' op ligt, terwijl in vrouwen ook nog een X-chromosoom aanwezig is met een correct gen.

Wanneer er geen verschillende geslachtschromosomen zijn

Er zijn echter ook soorten waar de geslachtsbepaling niet plaatsvindt op basis van twee verschillende geslachtschromosomen. Waar er onder heterogametie altijd een chromosoom is dat alleen in mannen of vrouwen voorkomt, hebben mannen en vrouwen onder haplodiploidie allemaal dezelfde chromosomen (autosomen). Echter, onder haplodiploidie hebben



4. De parasitaire wesp *Nasonia vitripennis*. (a) Een vrouwtje legt eitjes in een vliegenpop. (b) Mannetjes verdedigen agressief een plekje bij de uitsluitopening van de vliegenpop om met uitkomende vrouwtjes te paren. Foto's: Peter Koomen

4. The parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. (a) Female oviposits in a fly pupa. (b) Males aggressively defend a site near their emergence hole in order to mate with emerging females.

vrouwtjes twee kopieën van elk autosoom, terwijl mannen van elk autosoom maar één kopie hebben.

Haplodiploidie heeft grote gevolgen voor hybridisatie. Vrouwelijke hybriden krijgen van elke ouder één chromosoomset en hebben dus van elk gen twee varianten: één van de ene soort en één van de andere soort. Wanneer deze vrouwtjes nakomelingen krijgen, dan zullen de mannelijke nakomelingen van elk gen maar één kopie krijgen. Deze is oorspronkelijk ofwel van de ene soort, ofwel van de andere soort afkomstig (figuur 4). Maar omdat de genen bij de reproductie eerst 'door elkaar zijn geschud' (recombinatie), is de combinatie van kopieën wel veranderd. Aangezien genen in een genoom met elkaar moeten samenwerken en de mannen dan weer een kopie van de ene soort en dan weer een kopie van de andere soort hebben, zullen de geninteracties in de haploïde hybride mannen moeizaam verlopen.

Haplodiploïde soorten zijn oorspronkelijk nooit betrokken in onderzoek naar Haldane's Regel. De mechanismen die ten grondslag liggen aan Haldane's Regel (dominantie, snelle mannen en snelle-X) zijn echter zeer goed toepasbaar op de overerving van de chromosomen onder haplodiploidie. Het opstellen van hypothesen over de toepassing van haplodiploïden in onderzoek naar Haldane's Regel was dan ook de eerste fase van mijn promotieonderzoek (Koevoets 2012, Koevoets & Beukeboom 2009). Door het verschil tussen diploïde hybride vrouwtjes en haploïde hybride mannetjes is de verwachting dat diploïde vrouwtjes veel beter bestand zullen zijn tegen hybridisatie dan haploïde mannetjes. Deze hypothese en de onderliggende mechanismen vormen de basis van mijn onderzoek.

Vraagstellingen

De soorten waar ik me op heb gericht zijn haplodiploïde sluipwespen van het genus *Nasonia*. Dit genus bestaat uit vier soorten: *N. vitripennis* (Walker), *N. longicornis* (Darling & Werren), *N. giraulti* (Darling and Werren) en *N. oneida* (Raychoudhury et al.) (zie Darling & Werren 1994, Raychoudhury et al. 2010). De wespen zijn tussen de 1,5 en 2 mm groot en de soorten verschillen het duidelijkste in mannelijke vleugellengte (figuur 4).

Hybridisatie in de natuur tussen de soorten wordt voorkomen door een bacterie die de soorten bij zich dragen. Deze *Wolbachia*-bacterie voorkomt dat hybride nakomelingen zich

ontwikkelen door de chromosomen van de vader te laten samenklonteren in de bevruchte eicel. Door de wespen in het laboratorium antibiotica te voeren is het mogelijk om de bacteriën te verwijderen en hybridisaties tussen de soorten te bewerkstelligen. Echter, dit leidt tot verschillende maten van postzygotische isolatie afhankelijk van het specifieke soortspaar dat wordt onderzocht. Omdat er weinig bekend was over de hybridisatie van *N. vitripennis* en *N. longicornis*, heb ik me op deze soorten gericht. Eerst moest er een hypothese opgesteld worden omtrent de mechanismen die ten grondslag liggen aan Haldane's Regel in combinatie met haplodiploidie. Daarna werd er gekeken of er signalen te vinden waren van hybride incompatibiliteiten tussen deze soorten (iets dat al voor twee andere soortsparen was onderzocht). Nieuw binnen het *Nasonia*-onderzoek was de tweede vraag, namelijk of de genomische incompatibiliteiten heviger waren in mannetjes dan in vrouwtjes. Na het in kaart brengen van de incompatibiliteiten tussen *N. vitripennis* en *N. longicornis*, werden deze diepgaander onderzocht. Zo werd de vraag beantwoord hoe temperatuursfluctuaties de hevigheid van incompatibiliteiten beïnvloeden. Ook werd er ingegaan op het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de verschillen in hybride incompatibiliteiten tussen *Nasonia*-mannetjes en -vrouwtjes. Als laatste werd er over meerdere generaties gekeken of de incompatibiliteiten gevonden in de voorgaande experimenten teruggebracht konden worden tot de verantwoordelijke genen.

Incompatibiliteiten tussen *N. vitripennis* en *N. longicornis*

De soorten *N. vitripennis* en *N. longicornis* werden gekruist en de problemen in de eerste generatie vrouwtjes zijn gemeten (Koevoets et al. 2012a). Ondanks dat er wel enige sterfte en steriliteit werd gevonden in hybride vrouwtjes, was een groot deel van de vrouwtjes vruchtbaar. Deze vrouwtjes werden gebruikt om de hybrideproblemen te meten in hun mannelijke hybride nakomelingen. Het werd duidelijk dat hybride mannetjes voor een deel worden geveld door sterfte, maar belangrijker, dat de overgebleven (levensvatbare) mannelijke hybriden steriel waren. Hiermee werd aangetoond dat er genomische incompatibiliteiten optreden wanneer *N. vitripennis* en *N. longicornis* worden gekruist en dat de problemen groter zijn in mannetjes dan in

Kader 1

Moleculaire merkers

Aangezien het genoom (al het DNA bij elkaar) van een soort vaak uit miljoenen nucleotiden (A, T, G en C) bestaat, is het qua kosten en tijd momenteel onmogelijk om al het DNA van verschillende individuen te analyseren voor wetenschappelijke experimenten. Daardoor worden moleculaire merkers gebruikt die verspreid over het genoom voorkomen en daarmee het hele genoom vertegenwoordigen.

Een moleculaire merker is een 'mijlpaal' op het genoom die naar een specifieke plek op het DNA wijst (een locus; is Latijn voor plek). Dit locus kan van alles zijn maar moet verschillend zijn tussen de soorten die vergeleken worden. Voor een goede vertegenwoordiging van het genoom moeten meerdere loci per chromosoom bekeken worden in de analyse. Hoe meer loci, hoe beter, maar er is een evenwicht tussen het aantal te analyseren individuen en loci: wanneer slechts tientallen individuen geanalyseerd worden, dan heeft het geen toegevoegde waarde om duizenden loci te analyseren en vice versa.

Het type merker wordt genoemd naar wat er op het locus voorkomt of de manier waarop het bekeken wordt. De meest populaire technieken op dit moment zijn microsatellieten en SNP's. Microsatellieten zijn plekken op het DNA waar een bepaalde nucleotidencombinatie heel vaak voorkomt (bijvoorbeeld ATATATATATATATAT). Een dergelijke microsatelliet verandert heel snel in het aantal herhalingen over verschillende generaties en er zijn daardoor vaak veel verschillende lengtevarianten te vinden binnen en tussen soorten. De lengte van de kopieën kan vergeleken worden met behulp van een makkelijke

scheidingsmethode: kleine stukken DNA lopen makkelijker door een gelfilter dan grote stukken en kleine stukken hebben minder AT's dan grote stukken. In het geval van dit onderzoek zijn meerdere microsatellieten gebruikt. Deze zijn geselecteerd op basis van het verschil tussen *N. vitripennis* en *N. longicornis*. Voor elke microsatelliet is dus bekend welke lengte er voor *N. vitripennis* staat en welke voor *N. longicornis*. Zo zijn we in staat om over een chromosoom van een wesp te bepalen welk deel van het chromosoom van de grootouder van *N. vitripennis* komt en welke van de grootouder van *N. longicornis*. Deze genetische kaarten worden samengesteld uit de gegevens van alle wespen van een bepaalde kruising (zie bijvoorbeeld figuur 6).

SNP's (single nucleotide polymorphisms) zijn nucleotideverschillen tussen soorten op één heel specifieke locatie van het genoom. Een nadeel van dit type merker is dat er maar twee varianten per SNP bestaan (bijvoorbeeld op een bepaalde plek zien we altijd een A of een G, maar geen T of C), maar het grote voordeel is dat SNP's in grote aantallen in het genoom te vinden zijn en dat de huidige technieken steeds efficiënter worden in het analyseren van duizenden SNP's tegelijk. Dit komt doordat het maken van meerdere kopieën of het scheiden op basis van kopiegrootte zoals bij microsatellieten bij veel SNP-technieken niet meer nodig is. Echter, zoals boven vermeld, is het analyseren van duizenden merkers slechts informatief wanneer er ook honderden individuen kunnen worden gebruikt. Wanneer dit efficiënt gedaan kan worden (wat de laatste jaren voor steeds meer soorten gerealiseerd is), zullen SNP-merkers wetenschappelijke analyses gaan domineren.

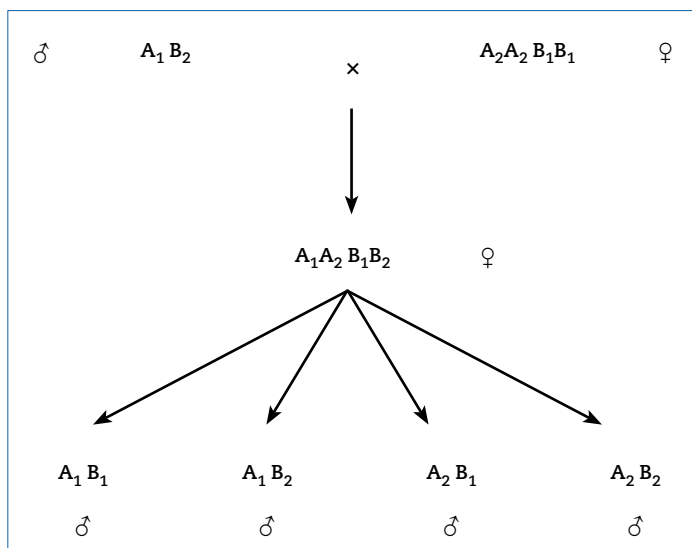
vrouwtjes. Doordat de vrouwelijke hybriden per kruising genetisch identiek zijn aan elkaar (één chromosoom van *N. vitripennis* en één van *N. longicornis*), was genetische analyse van deze vrouwtjes niet informatief (figuur 5).

De mannelijke hybriden zijn echter allemaal verschillend doordat zij telkens een andere mix van het genetisch materiaal van de moeder krijgen. De vraag was of mannelijke hybriden met specifieke DNA-combinaties beter overleven dan mannetjes met andere DNA-combinaties. Daartoe werd het DNA van de hybride mannetjes geanalyseerd voor specifieke stukken DNA die als merker kunnen dienen: microsatellieten (zie kader 1). Deze analyse biedt inzicht in het genetische mechanisme achter hybridesterfte (de steriliteit kon niet genetisch worden onderzocht, door het zeer kleine aantal fertiele mannetjes). De verwachting was dat de mannetjes voor elke DNA-merker 50% kans hadden om de *N. vitripennis* of *N. longicornis* variant van hun moeder te krijgen, want de moeder heeft beide varianten en geeft maar één van de twee door. Eerst werd dit bepaald voor de mannelijke hybride embryo's, omdat dit de verdeling van DNA-combinaties weergeeft voordat de mannelijke hybriden sterven. De overerving in de embryo's was voor elke DNA-merker inderdaad 50:50. In de volwassen mannelijke hybriden bleek dit ook voor de meeste plekken op het DNA te gelden, slechts enkele plekken weken hierin af (figuur 6). Deze verschillen bleken samen te hangen met de herkomst van de grootmoeder van de mannetjes (*N. vitripennis* of *N. longicornis*). Dit belang van de soort van de grootmoeder wees op effecten van niet zozeer het genoom in de celkern, maar van het genoom in de omgeving van de celkern: cytoplasmatische effecten. De inhoud van de cel, het cytoplasma, wordt alleen via de moeder doorgegeven.

Het cytoplasma bevat allerlei belangrijke componenten die samenwerken met het DNA in de celkern, zoals de mitochondriën. Mitochondriën hebben hun eigen genoom waarvan ze eiwitten produceren. Maar om energie voor de cellen te produceren importeren de mitochondriën eiwitten uit de celkern en maken grote eiwitcomplexen van hun eigen eiwitten en de eiwitten uit de celkern. Omdat de mitochondriën via de moeder overerven, heeft een hybride mannetje dus *N. vitripennis* mitochondriën als zijn grootmoeder *N. vitripennis* was, maar *N. longicornis* mitochondriën als zijn grootmoeder *N. longicornis* was. Wat opviel toen het DNA van de hybride mannetjes werd geanalyseerd, was dat wanneer een hybride *N. vitripennis* mitochondriën had, dat deze meer DNA van *N. vitripennis* had en wanneer een hybride *N. longicornis* mitochondriën had, dat deze vaker DNA van *N. longicornis* had. De plekken waar deze verstoring optrad in het DNA was niet hetzelfde tussen deze twee groepen hybriden (cytoplasma van *N. vitripennis* versus cytoplasma van *N. longicornis*). Deze resultaten tonen aan dat zowel de genen in de celkern als die van de mitochondriën van één en dezelfde soort moeten zijn voor het goed functioneren van een individu. Dit is het gevolg van adaptatie tussen genen binnen een soort (co-evolutie).

De effecten van temperatuur

Door tegenstrijdige resultaten van verschillende experimenten kwam de vraag naar voren hoe stabiel hybride incompatibiliteiten zijn tussen soorten, met andere woorden: als de omstandigheden waarin de hybriden opgroeien veranderen, leidt dit dan tot andere of grotere problemen? Om dit te testen werden



5. Overerving onder haplodiploidie. Twee specifieke plekken op het DNA (A en B) erven onafhankelijk van elkaar over. Van elke plek zijn twee varianten bekend (1 en 2), die verschillend zijn tussen de soorten. Als mannen haploïd zijn, hebben ze dus van beide plekken maar één kopie, waar vrouwen er twee hebben. Wanneer de twee soorten hybridiseren ontstaan er hybride vrouwen die van beide plekken twee varianten hebben. Wanneer ze haploïde eicellen maken, krijgen deze één variant van A (A_1 of A_2) en één variant van B (B_1 of B_2), en er zijn dus vier verschillende mogelijkheden in de hybride mannen. Wanneer we echter het hele genoom bekijken, zijn er zo goed als oneindig veel mannelijke combinaties mogelijk.

5. Genetic inheritance under haplodiploidy. Two specific locations on the DNA (A and B) inherit independently from each other. Each location has two variants (1 and 2), that are different between species. Due to the haploidy of males, they have only a single copy of the two locations, while females carry two copies. When two species hybridize, hybrid female offspring is created that have two variants for two locations. When these hybrid females now produce haploid eggs, these eggs inherit one variant from location A (A_1 and A_2) and one variant from location B (B_1 and B_2), and thus there are four possible combinations in the haploid hybrid males. However, when we consider the entire genome, there are indefinite male combinations possible.

de kruisingen tussen *N. vitripennis* en *N. longicornis* herhaald en de ontwikkelende mannetjes uit de tweede generatie (dus de unieke nakomelingen van hybride moeders, zie figuur 5) onder verschillende temperaturen opgegroeid. De verstoring van ontwikkeling werd bepaald in de vorm van vertraagde ontwikkeling of sterfte, evenals de steriliteit van de levensvatbare volwassen hybriden. Het werd duidelijk dat hybride mannetjes veel sterker reageren op temperatuurveranderingen dan normale mannetjes en dit uitte zich in alle parameters die getest werden: hybride mannetjes onder temperatuurstress vertoonden meer sterfte, meer verstoring van de ontwikkeling en meer steriliteit. Het DNA van de hybride mannetjes werd wederom geanalyseerd met microsatellieten om te testen of temperatuurstress tot meer verstoring zou leiden op dezelfde plekken op het DNA (dezelfde interacties tussen genen zijn verstoord) of juist op meer plekken, maar met een vergelijkbare verstoring (meer geninteracties geven problemen onder temperatuurstress). De uitslag van de analyse liet beide patronen zien. De verhoogde sterfte leidde tot meer verstoring op plekken die bij standaardtemperatuur al een verstoring lieten zien en het aantal plekken met een significante verstoring nam toe. In alle gevallen was de verstoring gekoppeld aan de oorsprong van het cytoplasma: meer DNA van *N. vitripennis* in combinatie met mitochondriën van *N. vitripennis* en vice versa. De resultaten laten duidelijk zien dat de incompatibiliteiten tussen de genen van verschillende soorten sterk afhankelijk zijn van omge-

vingsfactoren. Doordat in de natuur telkens andere selectiedruk optreedt, maakt dit het waarschijnlijk dat hybriden in de natuur sterker leiden onder incompatibiliteiten en het af zullen leggen tegen niet-hybriden.

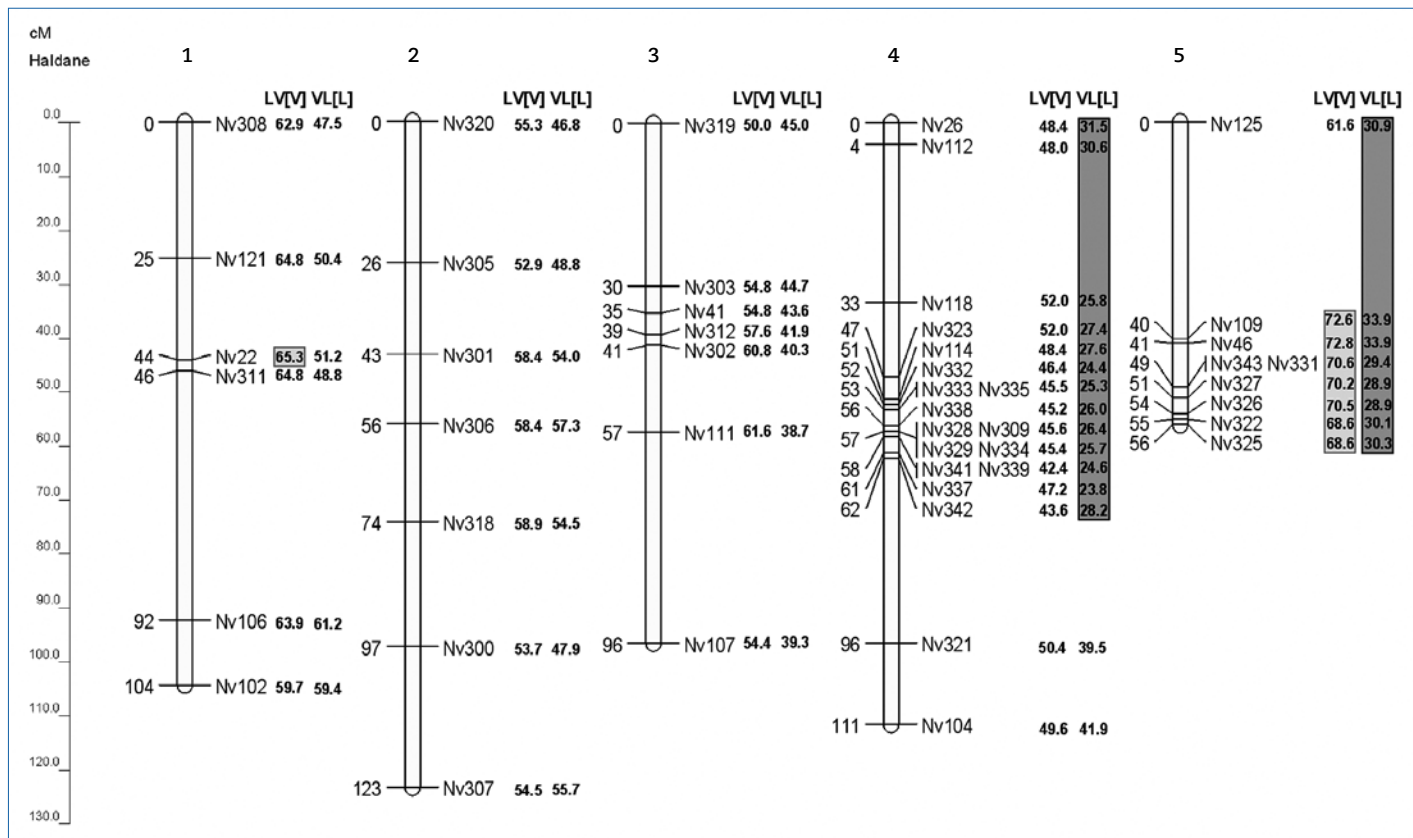
De effecten van ploïdiegraad

Zoals eerder werd beschreven ondervinden vrouwelijke hybriden minder problemen dan mannelijke hybriden. Dit was ook verwacht op basis van hypothesen die gesteld werden als verklaring voor Haldane's Regel (Koevoets & Beukeboom 2009). In haplodiploïde soorten zou de dominantietheorie leiden tot meer problemen in mannetjes doordat mannetjes van elk stuk DNA maar één variant hebben, terwijl vrouwen er twee hebben. De snelle-mannentheorie voorspelt dan ook dat hybride mannetjes meer problemen hebben doordat mannelijke genen sneller evolueren. De snelle-X-theorie voorspelt wederom dat mannetjes meer problemen ondervinden van hybridisatie, maar in dit geval doordat genen die belangrijk zijn voor mannetjes (en een deel van de algemene genen) haploïd zijn en dus sneller kunnen evolueren.

In eerder onderzoek kon echter geen onderscheid worden gemaakt tussen de mechanismen die ten grondslag liggen aan het patroon van mannelijke kwetsbaarheid (Koevoets et al. 2012a). Daarom richtte een volgend experiment zich specifiek op het onderscheiden van de dominantie en de snelle-mannentheorie: hebben mannetjes meer last van hybridisatie door hun 'man-zijn' (hun uiterlijk, of fenotype) of doordat ze maar een enkel genoomkopie hebben (hun ploïdiegraad, of genotype)?

Om dit te testen werd een speciale techniek gebruikt om embryo's die zich eigenlijk tot vrouw zouden moeten ontwikkelen, toch tot man te laten ontwikkelen. Deze speciale mannetjes hadden hierdoor het mannelijke uiterlijk, maar toch twee genoomsets (diploïd). Er konden dus directe vergelijkingen worden gemaakt tussen genetisch identieke mannetjes en vrouwetjes en fenotypisch identieke haploïde en diploïde mannetjes. Wanneer de snelle-mannentheorie zeer belangrijk zou zijn voor Haldane's Regel in *Nasonia*, dan zouden deze speciale diploïde mannetjes dezelfde problemen laten zien als haploïde mannetjes. Als daarentegen de dominantietheorie zou gelden dan zouden diploïde mannetjes minder problemen moeten laten zien dan haploïde mannetjes. De uitkomsten lieten inderdaad zien dat diploïde mannetjes veel minder problemen ondervonden van hybridisatie dan normale haploïde mannetjes (zowel gemeten als sterfte en steriliteit). Dit gaf duidelijk aan dat het mannelijk fenotype minder belangrijk is voor het ontstaan van hybrideproblemen.

Daarnaast liet het DNA van de hybride mannetjes en vrouwetjes verschillende patronen zien. Op sommige plekken van het DNA was het duidelijk een voordeel om twee verschillende varianten te hebben. Individuen met *N. longicornis* mitochondriën hadden bijvoorbeeld een hogere overlevingskans met een mix van DNA van *N. longicornis* en *N. vitripennis* dan alleen met DNA van *N. vitripennis*. Dit was volledig in lijn met de verwachtingen op basis van de dominantietheorie. Daarnaast lieten sommige plekken van het DNA zien dat het belangrijk is om meer DNA te hebben en dat meerdere varianten van het DNA niet per se nodig zijn: combinaties van *N. longicornis* mitochondriën en daarnaast één kopie van het DNA van *N. vitripennis* zijn slechter voor de overlevingskans dan *N. longicornis* mitochondriën in combinatie met twee kopieën van het DNA van *N. vitripennis*. Dit laatste patroon duidt erop dat dosering van het DNA erg belangrijk is voor het functioneren van de cellen en een hogere dosis van bepaalde genen kan zowel positief als negatief uitwerken.



6. *Nasonia vitripennis* en *N. longicornis* koppelingskaart met allelfrequenties in de hybriden. Het percentage *N. vitripennis* allelen over alle hybriden van één kruising zijn weergegeven naast de merkers. De merkers met significante verstoorde overerving zijn weergegeven in licht- en donkergrijs (cytoplasma van *N. vitripennis* en *N. longicornis* respectievelijk). Bron: Koevoets et al. 2012a

6. *Nasonia vitripennis* and *N. longicornis* linkage map with allelic recovery rates. The percentage of *N. vitripennis* alleles over all hybrids of one cross are indicated next to the markers. Markers with significant segregation distortion are indicated in light grey (*N. vitripennis* and *N. longicornis* cytoplasm respectively). Source: Koevoets et al. 2012a

Incompatibiliteiten over meerdere generaties

Problemen als gevolg van hybridisatie zijn niet onder alle omstandigheden hetzelfde. In het laboratorium was materiaal beschikbaar van wespen met mitochondriën van *N. vitripennis* met verschillende percentages van DNA van *N. vitripennis* and *N. longicornis*. Door opeenvolgende generaties hybridevrouwtjes terug te kruisen met mannetjes van *N. longicornis*, krijgen de nakomelingen telkens een hoger percentage DNA van *N. longicornis* in combinatie met de mitochondriën van *N. vitripennis* die via de moeder blijven overerven. Na enkele terugkruisingen met *N. longicornis* werden de lijnen gedurende meerdere generaties in stand gehouden. Op basis van de incompatibiliteiten tussen *N. vitripennis* en *N. longicornis* (Koevoets et al. 2012a, 2012b) was de vraag hoeveel DNA van *N. longicornis* geïntroduceerd kon worden in een lijn met mitochondriën van *N. vitripennis* en welke plekken op het DNA van *N. longicornis* weerstand zouden bieden tegen de samenwerking met mitochondriën van *N. vitripennis*.

De beschikbare wespen werden eerst geanalyseerd met microsatellieten, waarna een beperkte set werd geanalyseerd met een nog nauwkeurigere methode op nucleotidenniveau (Single Nucleotide Polymorphisms) om een zeer gedetailleerd beeld te krijgen van het DNA van de speciale hybridelijnen (zie kader 1). Het werd duidelijk dat in de eerste generaties na de hybridisatie het DNA van *N. vitripennis* op bepaalde plekken in het voordeel was in combinatie met mitochondriën van *N. vitripennis*. Echter, hoe meer generaties er werd ingeteeld of teruggekruist met *N. longicornis*, hoe meer DNA van *N. longicornis* er in de wespen bleek voor te komen. De plekken op het DNA die eerder problemen gaven wanneer ze *N. longicornis* waren in combinatie met mitochondriën van *N. vitripennis* (Koevoets et al. 2012a, 2012b),

konden uiteindelijk toch gecombineerd worden wanneer het genoom voornamelijk *N. longicornis* was.

Deze resultaten duiden wederom op het belang van de manier waarop een hybridisatie-experiment wordt uitgevoerd. Verschillende omstandigheden kunnen verschillende plekken op het DNA aantonen die belang zijn bij de scheiding van soorten. Naast dat het overgrote deel van het DNA van *N. longicornis* uiteindelijk bleek te functioneren in combinatie met mitochondriën van *N. vitripennis*, zijn er wel plekken op het genoom geïdentificeerd die niet geschikt zijn voor deze samenwerking. De genen die gecodeerd worden door deze plekken van het genoom vormen een uitgangspunt voor onderzoek naar welke precieze genen verantwoordelijk zijn voor de incompatibiliteiten tussen *N. vitripennis* en *N. longicornis*.

Conclusies

Ik heb de hypothese gesteld dat, in analogie met Haldane's Regel, hybride vrouwtjes van haplodiploïde soorten minder problemen ondervinden bij hybridisatie dan mannetjes. Deze hypothese is bevestigd met behulp van de hybridisatie van de parasitaire wespen *N. vitripennis* en *N. longicornis*. Genetische analyses hebben een verband aangetoond tussen specifieke plekken op het DNA die voordelig zijn wanneer ze van een bepaalde soort afkomstig zijn in combinatie met cytoplasma (waarschijnlijk de mitochondriën hierin) van diezelfde soort. Deze plekken op het DNA zijn echter sterk afhankelijk van omgevingsfactoren en stress kan de uitkomst van de hybridisatie experimenten beïnvloeden. Verder blijken mannelijke hybriden vooral kwetsbaar te zijn doordat zij een lagere ploïdiegraad hebben dan vrouwtjes, en niet zozeer doordat zij minder

genetische variatie hebben. Hoe belangrijk dit mechanisme in soorten is buiten haplodiploidie, staat open voor verder onderzoek, maar het is duidelijk dat de dosering van DM-interacties een belangrijkere rol in moeten gaan nemen binnen de theorieën die Haldane's Regel verklaren.

Dankwoord

Ik wil prof. Leo W. Beukeboom en Louis van de Zande bedanken voor hun begeleiding, advies en steun tijdens mijn

promotieonderzoek. Prof. Jürgen Gadau, dr. Oliver Niehuis en Joshua Jackson dank ik voor het delen van hun kennis over vergelijkbaar onderzoek in *N. vitripennis* en *N. giraulti*. Daarnaast dank ik de groep Evolutionaire Genetica van de Rijksuniversiteit Groningen voor hun rol tijdens vele aspecten van mijn onderzoek. Speciale dank gaat hierbij uit naar Eveline Verhulst, Anna Rensink, Hernán Morales Villegas en Steven Ferber. Naast Leo en Louis, dank ik ook Ton Ferber voor hun bijdrage aan dit artikel.

Literatuur

Coyne JA 1992. Genetics and Speciation. *Nature* 355: 511-515.

Coyne JA & Orr HA (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B Biological Sciences* 353: 287-305.

Darling DC & Werren JH 1990. Biosystematics of *Nasonia* (Hymenoptera: teromalidae): Two new species reared from birds' nests in North America. *Annales of the Entomological Society of America* 83: 352-370.

Haldane JBS 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12: 101-109.

Orr HA 1997. Haldane's rule. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 195-218.

Raychoudhury R, Desjardins CA, Buellesbach J, Loehlin DW, Grillenberger BK, Beukeboom LW, Schmitt T & Werren JH 2010. Behavioral and genetic characteristics of a new species of *Nasonia*. *Heredity* 104: 278-288.

Schilthuizen M, Giesbers MCWG & Beukeboom LW 2011. Haldane's rule in the 21st century. *Heredity* 107: 95-102.

Koevoets T 2012. Deadly combinations. Hybrid incompatibilities in the parasitic wasp genus *Nasonia*. Proefschrift Rijksuniversiteit Groningen.

Koevoets T & Beukeboom LW 2009. Genetics of

postzygotic isolation and Haldane's rule in haplodiploids. *Heredity* 102: 16-23.

Koevoets T, Niehuis O, Van de Zande L & Beukeboom LW 2012a. Hybrid incompatibilities in the parasitic wasp genus *Nasonia*: negative effects of hemizygoty and the identification of transmission ratio distortion loci. *Heredity* 108: 302-311.

Koevoets T, Van de Zande L & Beukeboom LW 2012b. Temperature stress increases hybrid incompatibilities in the parasitic wasp genus *Nasonia*. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 304-316.

Geaccepteerd: 1 oktober 2012

Summary

Hybrid incompatibilities in the parasitic wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae)

Since Darwin's publication *The Origin of Species*, much research into the processes that play a role in speciation has been performed. My PhD research focused on the early stages of speciation. When different populations are no longer in contact, they will slowly diverge from each other. Eventually these groups will have changed genetically so much, that combining the DNA of different species is no longer possible, leading to problems in the hybrid offspring. These problems in the early stages of speciation appear to be different in males compared to females. To find the reason for this difference, parasitic wasp species from the genus *Nasonia* were used. Wasps have no sex chromosomes. Females of these wasps develop from fertilized eggs and males from unfertilized eggs; females thus are diploid and have twice the amount of DNA of haploid males. Both males and females were monitored for genetic problems that arise upon crossing two *Nasonia* species. In wasps, males proved also more vulnerable to hybridization than females. This vulnerability even increases under stress. This is because males have less genetic variability, but also because they have less DNA. Through a special genetic technique we can force fertilized eggs (normally destined to be female) to develop as males. In this way it could be assessed whether being male or the amount of DNA was the most important factor. Of course the answer was in the middle: both facets are important. This research demonstrated that genetic interactions, the amount of DNA and the genetic variation are important aspects of speciation.



Tosca Koevoets

Rijksuniversiteit Groningen

Centre for Ecological and Evolutionary Studies (CEES)

Evolutionary Genetics Group

Postbus 11103

9700 CC Groningen

tkoevoets@yahoo.com