

Een kijkje in het brein van een lerende sluipwesp

Maartje A.K. Bleeker

TREFWOORDEN

Cotesia, gastheerzoekgedrag, geurverwerking, octopamine

Entomologische Berichten 70 (2): 45-51

De twee nauw verwante sluipwespen *Cotesia rubecula* en *C. glomerata* verschillen in hun leergedrag. *Cotesia rubecula* behoudt haar aangeboren voorkeur voor een bepaalde geur, terwijl *C. glomerata* na een associatieve leerervaring haar voorkeur naar een aangeleerde geur verlegt. De nauwe verwantschap tussen de soorten en het verschil in leren maakt deze twee soorten ideaal voor een vergelijkend onderzoek naar de fysiologische achtergronden van dit leerverschil. In het onderstaande artikel wordt aan de hand van bovenstaande soorten uitleg gegeven over het associatief leren van geuren bij insecten. Hierbij wordt besproken hoe de geurverwerking bij insecten verloopt en wat de onderliggende mechanismen van leren zijn.

Leren bij insecten

Veel insecten vertonen leergedrag. Zo kunnen sprinkhanen leren om giftig eten te vermijden (Bernays 1993). Honingbijen leren hoe ze met complexe bloemen om moeten gaan om bij de nectar te komen (Chittka *et al.* 1999), en ze leren de geur, kleur en vorm herkennen van bloemen die veel nectar bevatten (Gould 1993). Ook de plaats van het nest of van groepjes bloemen waar ze nectar verzamelen, slaan ze op in hun geheugen (Gould 1993). Sluipwespen gebruiken hun leervermogen om de insecten te vinden waar ze hun eitjes in leggen (Turlings *et al.* 1993). Dit leergedrag van insecten is een geliefd onderwerp van onderzoek.

Enerzijds wordt leergedrag bij insecten bestudeerd om de evolutionair ecologische achtergronden van leren te achterhalen (bijvoorbeeld Gould 1993, Roitberg *et al.* 1993, Stephens 1993, Turlings *et al.* 1993, Vet *et al.* 1995): wat is de adaptieve waarde van leren en onder welke omstandigheden is leren voordeliger dan aangeboren gedrag? Sluipwespen zijn voor dit onderzoek uitermate geschikt, aangezien het leren gebruikt wordt bij het zoeken naar gastheren. De efficiëntie van het zoekgedrag is direct gekoppeld aan kansen op voortplanting en staat dus onder sterke selectiedruk (Van Alphen & Vet 1986).

Anderzijds worden insecten gebruikt om de moleculaire en cellulaire mechanismen van leren te ontrafelen. De basale mechanismen van leren en geheugenvorming bij invertebraten en vertebraten lijken sterk op elkaar (Kandel 2001). Neurobiologische studies aan leren bij insecten zeggen dus niet alleen iets over insecten, maar ook over de mechanismen van leren in het algemeen (bijvoorbeeld Dubnau *et al.* 2003, Menzel 1999,

Waddell & Quinn 2001). Het voordeel van neurobiologisch onderzoek aan insecten is dat hun hersenen kleiner en minder complex zijn dan die van gewervelde dieren; dit vergemakkelijkt de studie ervan.

Een neuro-ecologische benadering

Tot nu toe zijn de ecologische en de neurobiologische benadering van leren bij insecten voornamelijk apart toegepast, doordat de ecologie en neurobiologie als vakgebieden historisch gezien sterk gescheiden zijn geweest (Dukas 1998). De laatste jaren is echter een stroming op gang gekomen die deze twee benaderingen combineert: de neuro-ecologische benadering. Hierdoor kunnen nieuwe inzichten verkregen worden (bijvoorbeeld Menzel 1999, Dukas 1998, 2004, Shettleworth 1998). Door twee nauw verwante soorten met elkaar te vergelijken, die door een verschillende ecologie variatie vertonen in hun leergedrag, kunnen subtiele verschillen in leren gekoppeld worden aan verschillen in neurobiologie. Zo kan meer inzicht worden verkregen in het mechanisme van leren.

Deze neuro-ecologische benadering is toegepast bij het promotieonderzoek dat ik heb uitgevoerd bij het Laboratorium voor Entomologie, Wageningen Universiteit. Daarbij is een verschil in leergedrag tussen twee sluipwespsoorten nader bestudeerd (Bleeker 2005).

Model *Cotesia*

De twee nauw verwante sluipwespsoorten *Cotesia glomerata* (Linnaeus) en *C. rubecula* (Marshall) komen beide in Nederland voor en gebruiken de rupsen van koolwitjes (*Pieris spec.*) om hun eitjes in te leggen (figuur 1). Om de rupsen te vinden, gaan de wespen op geuren af die planten afscheiden als ze door de rupsen worden aangevreten. De rupsen van koolwitjes komen voornamelijk op koolsoorten voor. De *Cotesia*-wespen hebben dan ook een aangeboren voorkeur voor de geur van aangevreten kool. Maar de rupsen zijn ook op andere plantensoorten te vinden, die de *Cotesia*-wespen niet direct interessant vinden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat *C. glomerata* de geuren van

Afkortingen

CS	Conditioned stimulus; leidt tot een aangeleerde reactie
US	Unconditioned stimulus; leidt tot een niet-aangeleerde, aangeboren reactie
AL	Antennal lobe; antennale lob
VUM neuron	Ventral unpaired median neuron



1. *Cotesia glomerata* terwijl ze haar eitjes in een rups van het groot koolwitje aan het leggen is. Foto: Hans Smid
1. A *Cotesia glomerata* female laying her eggs in a caterpillar of the large cabbage white.

deze nieuwe planten kan leren herkennen door een associatieve leerervaring (Geervliet et al. 1998). Hierbij vindt de sluipwesp toevallig een rups op een aangevreten plant van een nieuwe soort, en legt ze haar eitjes in deze rups. Na een dergelijke ervaring is *C. glomerata* meer geïnteresseerd in de geur van de nieuwe plant dan in de koolgeur. Na een soortgelijke ervaring vertoont de andere soort, *C. rubecula*, geen gedragsverandering: de koolgeur wordt nog steeds aantrekkelijker gevonden. Het verschil in leergedrag tussen deze twee nauw verwante soorten is ideaal om de neurobiologische verschillen te achterhalen die aan de variatie in leren ten grondslag liggen.

Associatief leren

Bij het leren bij *C. glomerata* wordt er een verband gelegd tussen de geur van de aangevreten plant en de aanwezigheid van de rupsen. De geur van de aangevreten plant (de 'conditioned stimulus', afkorting CS, zie kader 1) wordt dus geassocieerd met de aanwezigheid van rupsen (de 'unconditioned stimulus', US). De onderliggende cellulaire en moleculaire mechanismen van associatief leren zijn onder andere uitgebreid bestudeerd in de zeeslak *Aplysia californica* (Kandel 1991). Uit deze studies is gebleken dat de associatie gepaard gaat met een versterking van de synaptische verbindingen (zie kader 2) tussen de zenuwcellen die de CS waarnemen (bij de sluipwesp: de geur van de aangevreten plant) en de cellen die deze informatie verder

verwerken. Deze versterking vindt alleen plaats wanneer vlak na het waarnemen van de CS (bij de sluipwesp: de geur) de US wordt waargenomen (hier: de rups). De zenuwcellen die de geur van de plant verwerken, zijn door de plantengeur geactiveerd. Door de daaropvolgende prikkel van de US worden deze actieve cellen nogmaals geactiveerd. De synaptische verbindingen die op deze manier dubbel geactiveerd zijn, worden vervolgens versterkt (Kandel 1991). Op deze manier worden alleen de synaptische verbindingen versterkt die de geur verwerken van de aangevreten plant.

Bij het associatief leren van *Cotesia* zijn dus twee zenuwbanen betrokken, de neuronen die de CS, de plantengeur, verwerken, en de neuronen die de US, het waarnemen van de rups, verwerken. De US bij associatief leren wordt gevormd door een stimulus die zodanig belangrijk is voor het betreffende organisme, dat het van belang is hiermee verband houdende stimuli te onthouden. Dit kan een beloning zijn, bijvoorbeeld het vinden van eten of een gastheer, of een straf, bijvoorbeeld een pijnprikkel. De US is dus de stimulus die de associatie veroorzaakt. Het is dan ook waarschijnlijk dat het verschil in leren tussen de twee *Cotesia*-soorten te vinden is in een verschil in de zenuwbaan die de US doorgeeft, of in de manier waarop de zenuwbaan die de CS verwerkt op de US reageert. Om de neurologische oorzaak van het leerverschil tussen de twee soorten te kunnen achterhalen, is het dus van belang zowel de CS- als de US-verwerkende zenuwbaan in kaart te brengen.

Kader 1

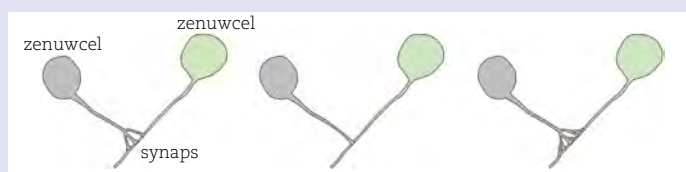
Associatief leren

De sluipwespen kunnen de nieuwe plantengeur leren door middel van associatie. Bij associatief leren wordt een relatie gelegd tussen verschillende prikkels uit de omgeving. Een bekend voorbeeld van associatief leren is de Pavlov-hond. Pavlov was een wetenschapper aan het begin van de 20^{ste} eeuw, die zijn hond elke keer vlak voordat hij te eten kreeg een bel liet horen. Na dit een aantal keer gedaan te hebben ging de hond al kwijlen bij het geluid van de bel. De hond had het geluid van de bel leren associëren met het eten. Deze vorm van associatief leren wordt klassieke conditionering genoemd. Bij deze vorm van associatief leren worden twee stimuli met elkaar gekoppeld, een initieel neutrale stimulus (het geluid van de bel) met een betekenisvolle stimulus (het eten). De reactie op het krijgen van eten, namelijk het kwijlen, hoeft niet aangeleerd of geconditioneerd te worden. Deze reactie is aangeboren. De stimulus wordt dan een 'unconditioned stimulus' (US) genoemd. De reactie op de bel moet wel geleerd worden: er moet geleerd worden dat het geluid van de bel eten betekent: deze reactie moet geconditioneerd worden. De stimulus wordt dan een 'conditioned stimulus' (CS) genoemd.

Kader 2

Synaptische plasticiteit

Zenuwen kunnen prikkels aan elkaar doorgeven doordat ze in contact met elkaar staan. De contactpunten worden de synapsen genoemd. Wanneer een zenuwcel geactiveerd is door een prikkel, komen er stoffen vrij in de contactpunten van die cel, waardoor het signaal doorgegeven kan worden aan de volgende cel. Of het signaal ook daadwerkelijk leidt tot activering van de tweede cel is afhankelijk van de sterkte van het signaal en van de verbinding. Een dergelijke verbinding tussen twee zenuwcellen is flexibel en kan sterker of zwakker worden onder invloed van ervaringen (zie figuur). Ook kunnen verbindingen verdwijnen en nieuwe verbindingen aangelegd worden. Een dergelijke verandering van de verbindingen tussen zenuwcellen wordt synaptische plasticiteit genoemd en vormt het cellulaire equivalent van het geheugen.



Verzwakking respectievelijk versterking van de synaptische verbinding tussen twee zenuwcellen (naar Kandell 1991).
Weakening and strengthening of the synaps between two nerve cells (after Kandell 1991).

Geurverwerking bij *Cotesia*: de antennale sensillen

Insecten nemen geuren vooral waar met hun antennes. De receptorcellen die de geuren waarnemen bevinden zich in structuren in de cuticula; deze worden sensillen genoemd. Behalve sensillen met geurreceptoren zijn er ook sensillen die smaak, luchtvochtigheid, druk of beweging waarnemen. Geursensillen kunnen herkend worden aan de aanwezigheid van poriën in hun wand (Keil 1999). In een sensil bevinden zich één of meer receptorcellen die op specifieke geuren reageren. Een receptorcel reageert op een range van op elkaar lijkende geurstoffen. Welke stoffen dat zijn, hangt af van welk geurreceptormolecuul in het celmembraan aanwezig is.

De sensillen op de antennes van beide *Cotesia*-soorten zijn in kaart gebracht door middel van scanning elektronenmicroscopie (Bleeker *et al.* 2004, Bleeker 2005). De antennes van beide soorten lijken sterk op elkaar: beide soorten beschikken over dezelfde zes soorten sensillen die in ongeveer dezelfde hoeveelheden en op overeenkomstige wijze op de antenne gepositioneerd zijn. Drie van de zes typen zijn waarschijnlijk betrokken bij de verwerking van geuren, waarvan de plaat-sensillen het meest prominent aanwezig zijn (figuur 2-3). Plaat-sensillen zijn zeer geschikt voor het verwerken van complexe geurmengsels (Akers & Getz 1993, Getz & Akers 1994). Deze sensillen zouden dus gebruikt kunnen worden voor het verwerken van plantengeuren.

De grote gelijkenis tussen de twee sluipwespsoorten betreffende de typen sensillen, de positionering en de globale aantallen, indiceert een gelijksoortige perceptie van geuren. Dit bevestigt de geschiktheid van deze twee soorten als model voor vergelijkend leeronderzoek. Er zijn echter toch een paar subtiële verschillen aanwezig in het aantal plaat-sensillen, zowel tussen de twee soorten als tussen mannetjes en vrouwtjes van dezelfde soort (figuur 4).

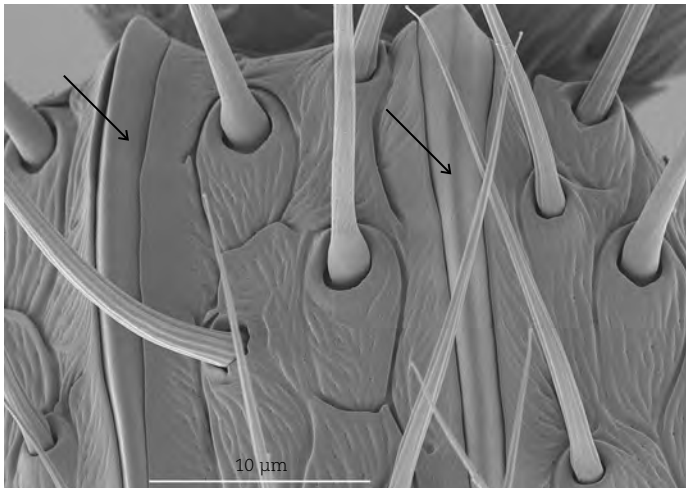
Het totaal aantal plaat-sensillen is groter bij *C. rubecula* dan

bij *C. glomerata*. Dit kan erop duiden dat *C. rubecula* gevoeliger voor geuren is. Dit zou een aanpassing kunnen zijn aan een verschil in gastheervoorkeur. *Cotesia glomerata* parasiteert namelijk vooral rupsen van het groot koolwitje *Pieris brassicae* (Linnaeus) (Geervliet *et al.* 2000). Deze rupsen zitten in grote clusters bij elkaar en veroorzaken veel vraatschade aan de plant. Er komen daarbij veel geurstoffen vrij die de wespen kunnen gebruiken voor het lokaliseren van gastheren. *Cotesia rubecula* is gespecialiseerd in rupsen van het klein koolwitje *Pieris rapae* (Linnaeus) (Geervliet *et al.* 2000). Deze komen solitair of in kleine aantallen op een plant voor en veroorzaken daardoor maar een geringe vraatschade. Bij deze soort rups is de uitstoot van plantengeurstoffen dan ook gering, waardoor een hogere sensitiviteit voor *C. rubecula* voordelig zou kunnen zijn. Het hogere aantal plaat-sensillen in *C. rubecula* zou echter ook verklaard kunnen worden doordat *C. rubecula* iets groter is dan *C. glomerata*. In angelloze bijen (Apidae: Meliponinae) blijkt het aantal plaat-sensillen namelijk positief gecorreleerd te zijn met de lichaamsgrootte (Johnson & Howard 1987).

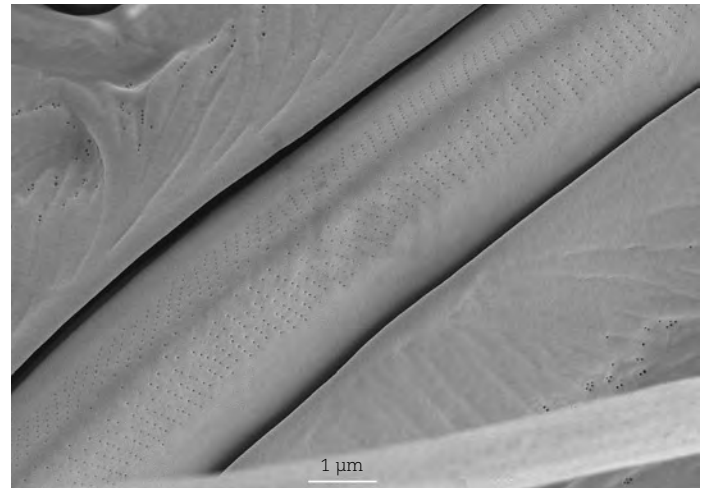
Daarnaast hebben mannetjes van beide soorten meer en dichter opeen geplaatste plaat-sensillen dan hun vrouwtjes. Beide *Cotesia*-soorten maken gebruik van seksferomonen (Field & Keller 1993, Tagawa 1977, Tagawa & Kitano 1981). Dit zou een aanwijzing kunnen zijn dat de mannetjes de plaat-sensillen gebruiken om seksferomonen afkomstig van vrouwtjes waar te nemen.

Geurverwerking bij *Cotesia*: de antennale lob

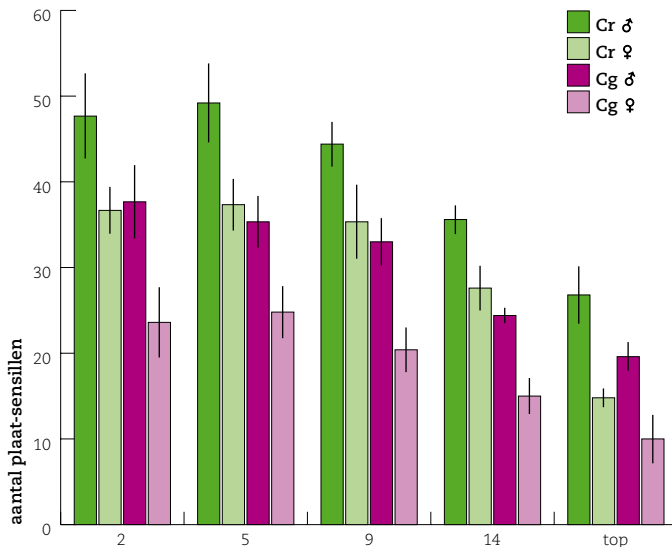
De geurreceptorcellen op de antennes geven hun signalen door aan de antennale lob (AL): het primaire geurverwerkingscentrum in de hersenen van insecten. De antennale lob is opgebouwd uit een groot aantal bolvormige structuren, de glomeruli (Rosparis 1988). De lob lijkt daarmee op het geurverwerkingscentrum in de hersenen van bijvoorbeeld mensen, dat ook uit



2. Scanning elektronenmicroscopische opname van een gedeelte van de antenne van *Cotesia*, met daarop de plaat-sensillen (*sensilla placodea*) (pijlen) en verschillende haarvormige sensillen (*sensilla trichodea*).
2. Scanning electron microscope image of a part of the antenna of *Cotesia*, showing multiporous plate sensilla (*sensilla placodea*) (arrows) and different types of hairlike sensilla (*sensilla trichodea*).



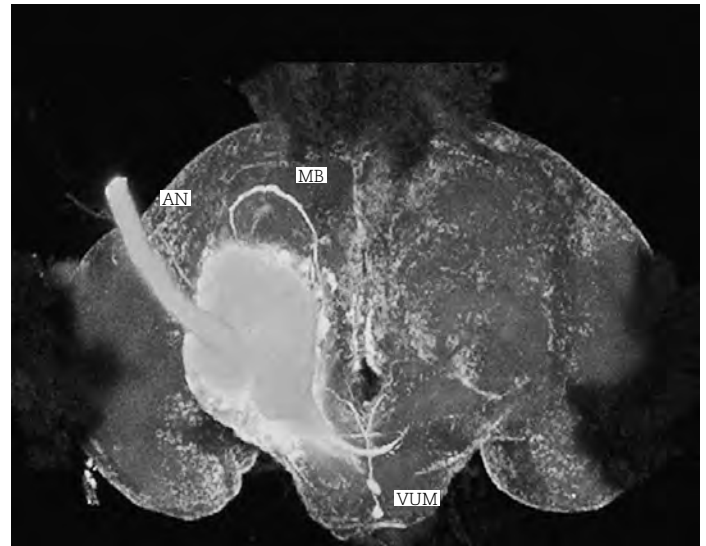
3. Detailopname van een plaat-sensil; de vele rijtjes poriën zijn duidelijk zichtbaar.
3. Detail of a plate sensillum showing multiple pores arranged in rows.



4. Aantal plaat-sensillen (*s. placodea*) op vijf verschillende segmenten (antennomeren) van de antenne. Elke antenne is opgebouwd uit 16 antennomeren. Het topsegment is nummer 16. Weergegeven zijn de gemiddelden met standaardafwijkingen ($n=5$). Cr = *C. rubecula*, Cg = *C. glomerata*.

4. Numbers of multiporous plate sensilla (*s. placodea*) specified for five different segments (antennomeres) of the antenna. Each antenna has 16 antennomeres. The top-antennomere is no 16. The graph depicts the averages and the standard deviation ($n=5$). Cr = *C. rubecula*, Cg = *C. glomerata*.

glomeruli is opgebouwd (Dodd & Castelluci 1991). Het aantal glomeruli varieert binnen de insecten tussen de 50 en 200 met uitschieters tot ongeveer duizend, zoals bij de treksprinkhaan *Locusta migratoria* (Linnaeus) en de hoornaar *Vespa crabro* Linnaeus (zie Rospars 1988). Bij mensen bedraagt het aantal glomeruli enkele duizenden (Meisami *et al.* 1998). Het aantal en de locatie van de glomeruli is binnen een soort constant (Rospars 1988). Alle geurreceptorcellen op de antennes die dezelfde geurstof kunnen waarnemen, geven hun signalen door naar dezelfde glomerulus in de antennale lob (Joerges *et al.* 1997, Gao *et al.* 2000, Hallem & Carlson 2004). De glomeruli die signalen verwerken over geurstoffen die erg op elkaar lijken, liggen bij elkaar in de buurt (Meijerink *et al.* 2003). De organisatie van de glomeruli in de antennale lob is dus functioneel en niet

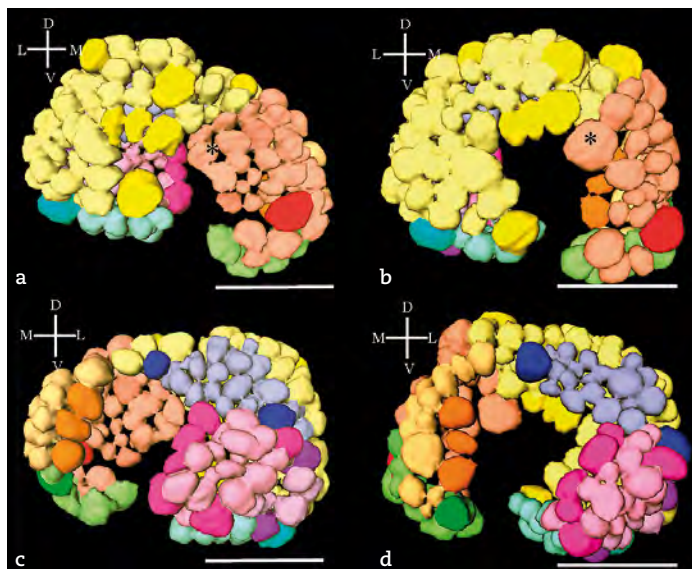


5. De hersenen van *Cotesia*, bovenaanzicht, waarbij de zenuw van de rechterantenne is aangekleurd waardoor de rechter antennale lob zichtbaar is gemaakt. Te zien zijn een gedeelte van de antennezenuw (AN), de zenuwbaan die vanuit de antennale lob naar het paddenstoelvormige lichaam (MB) loopt en twee VUM-neuronen (VUM).

5. Dorsal view of the brain of *Cotesia*. The nerve from the right antenna has absorbed a tracer that makes the right antennal lobe stand out. Visible are the antennal lobe, the antennal nerve (AN), the medial tract running from the antennal lobe to the mushroom bodies (MB) and two VUM neurons (VUM).

topografisch. De locatie van een geurreceptorcel op de antenne heeft geen relatie met de plaats van de glomerulus in de AL waarmee die receptorcel verbonden is.

Van de twee soorten *Cotesia* is de antennale lob van twee vrouwtjes geanalyseerd (Smid *et al.* 2003, Bleeker 2005). Door gebruik te maken van een kleurstof die door zenuwcellen wordt opgenomen, kan gekeken worden waar de zenuwcellen in de hersenen uitkomen. Met een dergelijke kleurstof zijn de zenuwen in de antenne gekleurd om de AL in kaart te brengen (figuur 5). De hersenen zijn vervolgens bekeken met een confocale laserscanningmicroscop. Met deze microscoop kan gebruik gemaakt worden van een preparaat waarbij de hersenen in hun geheel zijn ingebed. Het snijden van coupes is niet nodig aangezien de microscoop zelf optische coupes maakt.



6. 3D-kaarten van de antennale lob van *C. glomerata* (voorkant a en achterkant c) en *C. rubecula* (voorkant b en achterkant d). De kleuren geven verschillende gedeelten van de antennale lob weer. De donker gekleurde glomeruli konden bij beide soorten worden geïdentificeerd. Een asterisk geeft de locatie aan waarbij vier glomeruli bij *C. glomerata* lijken te zijn gefuseerd tot één glomerulus bij *C. rubecula*. Maatstreek = 50 μm . 3D-kaart: Hans Smid.

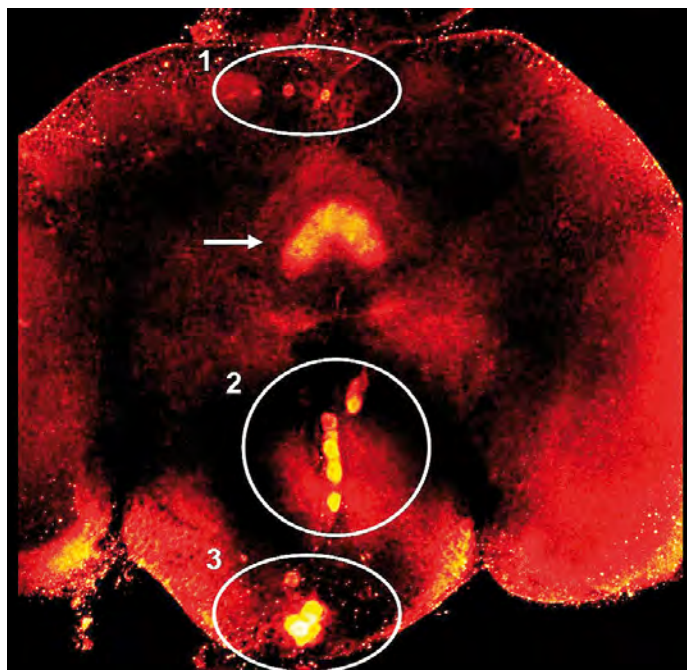
6. Surface reconstruction 3D models of the antennal lobe of *Cotesia glomerata*: anterior view (a), posterior view (c), and *C. rubecula*: anterior view (b) and posterior view (d). Colours indicate different parts of the antennal lobe. Deeply coloured glomeruli indicate landmark glomeruli; these glomeruli could be identified in both species. An asterisk marks the location where four glomeruli in *C. glomerata* seem to be fused into one glomerulus in *C. rubecula*. Bar = 50 μm .

Van de glomeruli zijn 3D-kaarten gemaakt. De hoeveelheid glomeruli bij *C. glomerata* betrof 186-189, bij *C. rubecula* 193-198. Hoewel er binnen elke soort nog een behoorlijke variatie was in locatie, vorm en grootte van glomeruli, kon met behulp van glomeruli die opvielen door hun vorm of grootte, van beide soorten een driedimensionale kaart worden gemaakt (figuur 6). De verschillen binnen een soort lijken te worden veroorzaakt doordat twee of meer glomeruli soms samensmelten. Het verschil in aantal glomeruli tussen de soorten wordt veroorzaakt door geringe variaties die over de gehele antennale lob verspreid zijn.

Ook op het niveau van de antennale lob lijkt de geurverwerking bij beide soorten dus sterk op elkaar. Dit bevestigt nogmaals hun geschiktheid als model voor het vergelijkende leeronderzoek. Vanuit de glomeruli wordt de informatie doorgestuurd naar de paddenstoelvormige lichamen, de hogere integratiecentra in de hersenen van insecten (figuur 5). Hier wordt de geurinformatie geïntegreerd met bijvoorbeeld visuele informatie.

Octopamine

Het in kaart brengen van de US-zenuwbaan is, in eerste instantie, niet gedaan door het aankleuren van zenuwuitlopers, zoals bij de CS-zenuwbaan. Het is namelijk minder duidelijk welke stimulus (of stimuli) precies als US fungeert en dus welke zenuwen aangekleurd moeten worden. Het waarnemen van de rups kan waarschijnlijk alleen de US vormen wanneer de rups wordt herkend als geschikte gastheer en dus een duidelijke beloning vormt. Gastheeracceptatie volgt echter op complex gedrag waarbij het betasten van de rups en zijn spinsel en faeces, en het aanpakken van de rups met de ovipositor een rol spelen. Het is daarom onduidelijk welke sensorische stimuli precies de US vormen. Daarnaast is het lastig om de zenuwen in de ovipositor aan



7. Hersenen van een vrouwtje *Cotesia rubecula*, met de octopamine bevattende celgroepen en hersendelen. De drie celgroepen zijn omcirkeld en geven de octopamine producerende cellen in de *pars intercerebralis* (1), mediaan van de antennale lobben (2) en in het suboesophageale ganglion (SOG) (3) weer. Daarnaast is ook het VBC (ventral body complex) gekleurd (pijl).

7. Brain of a female *Cotesia rubecula* with immunoreactivity of three octopaminergic cell groups: neurons in the *pars intercerebralis* (1), near the antennal lobes (2) and in the suboesophageal ganglion (SOG) (3). Immunoreactivity of the ventral body complex (VBC) also occurred (arrow).

te kleuren vanwege de moeilijke toegankelijkheid van de ovipositor, en de grote afstand tussen de ovipositor en de hersenen.

Er is echter al eerder onderzoek gedaan naar associatief leren van geuren bij een nauw verwant insect: de honingbij *Apis mellifera* Linnaeus (zie bijvoorbeeld Hammer & Menzel 1995). Honingbijen kunnen geuren leren associëren met de aanwezigheid van nectar, net zoals *Cotesia* geuren leert associëren met de aanwezigheid van een geschikte gastheerrups. Bij beide soorten wordt de US bij dit associatief leergedrag dus gevormd door een beloning. Bij de honingbij activeert het waarnemen van nectar een speciale zenuwcel in de hersenen (Hammer 1993), die de signalen doorgeeft naar de geurverwerkende zenuwbaan (de glomeruli en het paddenstoelvormig lichaam). Als tijdens de leerervaring geen nectar wordt aangeboden, maar de speciale zenuwcel kunstmatig wordt geactiveerd, wordt de associatie ook gevormd. Deze cel geeft dus blijkbaar de nectarbeloning door aan de geurverwerkende zenuwbaan en is de neurale representatie van de US. Deze 'beloningsgevoelige' zenuwcel geeft octopamine af als hij geactiveerd wordt. Deze stof zorgt ervoor dat zenuwcellen gevoeliger worden voor een volgende stimulatie. In *Cotesia* zou een gelijksoortige octopamineproducerende cel actief kunnen worden bij het waarnemen van de rups en daarmee de US kunnen representeren.

De octopamineproducerende cellen in de hersenen van *Cotesia* zijn in kaart gebracht door gebruik te maken van een antilichaam dat zich bindt aan octopamine, en door vervolgens aan dit complex een kleurstof te koppelen. De hersenen zijn vervolgens bekeken met een confocale laserscanning-microscop (Bleeker et al. 2006b, Bleeker 2005). Bij beide *Cotesia*-soorten werden drie groepen octopaminebevattende cellen gevonden (figuur 7). Deze celgroepen komen ook voor bij andere insecten zoals de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* Meigen (zie Monastirioti et al. 1995) en de honingbij (Kreisl et al.

1994). Bovendien komt één groep overeen met de groep cellen in de honingbij waarin zich de zenuwcel bevindt die geactiveerd wordt door een nectarbeloning (groep 3 in figuur 7). In deze groep bevinden zich de zogenaamde VUM-neuronen (ventral unpaired median neurons). De beloningsgevoelige cel in de honingbij is ook een VUM-neuron. Twee VUM-neuronen zijn ook zichtbaar na het aankleuren van de zenuwen in de antenne (figuur 5). De hypothese is nu dat één van deze twee VUM-neuronen geactiveerd wordt bij het waarnemen van de rups en de US representeert. Verder onderzoek is nodig om de juiste cel te lokaliseren. Hierbij kan gedacht worden aan het aankleuren van de zenuwen in de ovipositor.

Conclusies

De geurverwerkingsbanen van de twee soorten sluipwespen lijken sterk op elkaar en kunnen goed met elkaar vergeleken worden. Hierdoor is het mogelijk eventuele verschillen tussen beide soorten in het effect van een ervaring op de geurverwerkingsbaan in kaart te brengen. De twee soorten vormen dus inderdaad een goed model voor neurobiologisch onderzoek naar verschil in leergedrag.

Daarnaast is een aantal cellen in kaart gebracht die mogelijk de US representeren. Wanneer bekend is welke

beloningsgevoelige cel geactiveerd wordt door de aanwezigheid van een geschikte gastheerrups, kan onderzocht worden in hoeverre deze cel variatie vertoont in beide soorten.

Behalve het doen van puur morfologisch onderzoek is het ook belangrijk om het gedrag van de twee soorten na een leerervaring verder te bestuderen. Op deze manier kunnen de verschillen in de opbouw van het geheugen in beide soorten in kaart gebracht worden, waarbij duidelijk wordt of er sprake is van korte of lange termijn geheugen (bijvoorbeeld Bleeker et al. 2006a, Bleeker 2005, Smid et al. 2007). Hierdoor kan een nauwkeurige koppeling ontstaan tussen eventuele morfologische verschillen en de verschillen in structuur van het geheugen.

Door naast morfologische en fysiologische verschillen naar de ecologie van beide soorten te kijken, kan ook een idee gevormd worden over de evolutionair-ecologische factoren die hebben geleid tot het verschil in leergedrag bij beide soorten (Bleeker et al. 2006b, Bleeker 2005). Op een dergelijke manier ontstaat een compleet beeld van de verschillen in leren tussen twee nauw verwante soorten sluipwespen.

Dankwoord

Met dank aan mijn promotor prof. dr. Louise E. M. Vet en mijn copromotoren dr. Hans M. Smid en dr. Joop J. A. van Loon.

Literatuur

- Akers RP & Getz WM 1993. Response of olfactory receptor neurons in honeybees to odorants and their binary mixtures. *Journal of Comparative Physiology A* 173: 169-183.
- Bernays EA 1993. Aversion learning and feeding. In: *Insect learning: Ecological and evolutionary perspectives* (Papaj DR & Lewis AC eds): 1-17. Chapman & Hall.
- Bleeker MAK 2005. Associative learning in two-closely related parasitoid wasps: a neuroecological approach. PhD thesis, Wageningen University.
- Bleeker MAK, Kruidhof M, Smid HM, Van Loon JJA & Vet LEM 2006a. Differences in memory dynamics in two closely related parasitoid wasp species. *Animal Behaviour* 71: 1343-1350.
- Bleeker MAK, Smid HM, Van Aelst AC, Van Loon JJA & Vet LEM 2004. Antennal sensilla of two parasitoid wasps: a comparative scanning electron microscopy study. *Microscopy Research and Technique* 63: 266-273.
- Bleeker MAK, Van der Zee B & Smid HM 2006b. Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of two parasitic wasps, *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. *Animal Biology* 56: 247-257.
- Chittka L, Thomson JD & Waser NM 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* 86: 361-377.
- Dodd J & Castellucci VF 1991. Smell and Taste: The Chemical senses. In: *Principles of Neural Science – Third international edition* (Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM eds): 512-529. Appleton & Lange, Prentice Hall.
- Dubnau J, Chiang AS & Tully T 2003. Neural substrates of memory: From synapse to system. *Journal of Neurobiology* 54: 238-253.
- Dukas R 1998. Cognitive ecology: The evolutionary ecology of information processing and decision making. The University of Chicago Press.
- Dukas R 2004. Evolutionary biology of animal cognition. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 347-374.
- Field SA & Keller MA 1993. Courtship and intersexual signaling in the parasitic wasp *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behavior* 6: 737-750.
- Gao Q, Yuan B & Chess A 2000. Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nature Neuroscience* 3: 780-785.
- Geervliet JBF, Verdel MSW, Snellen H, Schaub J, Dicke M & Vet LEM 2000. Coexistence and niche segregation by field populations of the parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula* in the Netherlands: predicting field performance from laboratory data. *Oecologia* 124: 55-63.
- Geervliet JBF, Vreugdenhil AI, Dicke M & Vet LEM 1998. Learning to discriminate between infochemicals from different plant-host complexes by the parasitoids *Cotesia glomerata* and *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 241-252.
- Getz WM & Akers RP 1994. Honeybee olfactory sensilla behave as integrated processing units. *Behavioral and Neural Biology* 61: 191-195.
- Gould JL 1993. Ethological and comparative perspectives on honey bee learning. In: *Insect learning: Ecological and evolutionary perspectives* (Papaj DR & Lewis AC eds): 18-50. Chapman & Hall.
- Hallem EA & Carlson JR 2004. The odor coding system of *Drosophila*. *TRENDS in Genetics* 20: 453-459.
- Hammer M 1993. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59-63.
- Hammer M & Menzel R 1995. Learning and memory in the honeybee. *Journal of Neuroscience* 15: 1617-1630.
- Joerges J, Küttner A, Galizia CG & Menzel R 1997. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387: 285-288.
- Johnson LK & Howard JJ 1987. Olfactory disc number in bees of different sizes and ways of life (Apidae: Meliponinae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 60: 380-388.
- Kandel ER 1991. Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. In: *Principles of Neural Science – Third international edition* (Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM eds): 1009-1031. Appleton & Lange, Prentice Hall.
- Kandel ER 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* 294: 1030-1038.
- Keil TA 1999. Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In: *Insect Olfaction* (Hansson BS ed): 5-47. Springer-Verlag.
- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J & Eckert M 1994. Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology* 348: 583-595.
- Meijerink J, Carlsson MA & Hansson BS 2003. Spatial representation of odorant structure in the moth antennal lobe: A study of structure-response relationships at low doses. *Journal of Comparative Neurology* 467: 11-21.
- Meisami E, Mikhail L, Baim D & Bhatnagar KP 1998. Human olfactory bulb: Aging of glomeruli and mitral cells and a search for the accessory olfactory bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855: 708-715.
- Menzel R 1999. Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* 185: 323-340.
- Monastirioti M, Gorczyca M, Rapus J, Eckert M, White K & Budnik V 1995. Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology* 356: 275-87.
- Roitberg BD, Reid ML & Chao L 1993. Choosing hosts and mates: The value of learning. In: *Insect learning: Ecological and evolutionary perspectives* (Papaj DR & Lewis AC eds): 174-194. Chapman & Hall.
- Rospars JP 1988. Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 17: 243-294.

- Shettleworth SJ 1998. Cognition, evolution, and behaviour. Oxford University Press.
- Smid HM, Bleeker MAK, Loon JJA & Vet LEM 2003. Three-dimensional organization of the glomeruli in the antennal lobe of the parasitoid wasps *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. Cell and Tissue Research 312: 237-248.
- Smid HM, Wang G, Bukovinszky T, Steidle JLM, Bleeker MAK, Van Loon JJA & Vet LEM 2007. Species-specific acquisition and consolidation of long-term memory in parasitic wasps. Proceedings of the Royal Society B 274: 1539-1546.
- Stephens DW 1993. Learning and behavioural ecology: Incomplete information and environmental predictability. In: Insect learning: Ecological and evolutionary perspectives (Papaj DR & Lewis AC eds): 195-218. Chapman & Hall.
- Tagawa J 1977. Localization and histology of the female sex pheromone-producing gland in the parasitic wasp *Apanteles glomeratus*. Journal of Insect Physiology 23: 49-56.
- Tagawa J & Kitano H 1981. Mating behaviour of the braconid wasp, *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera: Braconidae) in the field. Applied Entomology and Zoology 16: 345-350.
- Turlings TCJ, Wäckers FL, Vet LEM, Lewis WJ & Tumlinson JH 1993. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: Insect learning: Ecological and evolutionary perspectives (Papaj DR & Lewis AC eds): 51-78. Chapman & Hall.
- Van Alphen JJM & Vet LEM 1986. An evolutionary approach to host finding and selection. In: Insect Parasitoids (Waage JK & Greathead DJ eds): 23-61. Blackwell Scientific.
- Vet LEM, Lewis WJ & Cardé RT 1995. Parasitoid foraging and learning. In: Chemical Ecology of Insects – second edition (Cardé RT & Bell WJ eds): 65-101. Chapman & Hall.
- Waddell S & Quinn WG 2001. What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? TRENDS in Genetics 17: 719-726.

Geaccepteerd: 1 februari 2010

Summary

Studying olfactory learning in parasitoids

Insects are useful model organisms to study learning and memory. They are both used for neurobiological research and to study the ultimate factors that have driven its evolution. In my thesis I combine both approaches to study a difference in learning in two closely related parasitoid wasps: *Cotesia rubecula* and *C. glomerata*. Parasitoid wasps use plant odours to locate their host caterpillars. Many of these wasps can learn to associate the presence of hosts with new odours. The cellular mechanisms behind this associative learning are likely to include the strengthening of synapses between the nerve cells that process the learned odour and the nerve cells that process the presence of the caterpillars. Insects perceive odours with olfactory sensilla located on the antennae. These olfactory sensilla have multiple pores, which allows us to distinguish them from other types of sensilla (e.g., thermo- or hygrosensilla). The sensilla of both wasp species have been studied with the use of scanning electron microscopy (SEM). Both species have the same six types of sensilla and in similar quantities. The plate sensilla are likely candidates for the perception of plant odours. The number of plate sensilla differs between both species: *C. rubecula* has a higher number of plate sensilla compared to *C. glomerata*, which might indicate that *C. rubecula* has a higher sensitivity to plant odours compared to *C. glomerata*. Between males and females a difference in the number of the plate sensilla also exists, which might indicate that males use the plate sensilla for the perception of sex pheromones. The olfactory sensilla project to the antennal lobe, the primary olfactory neuropil, that consists of spherical structures called glomeruli. Sensilla that perceive the same odour project to the same glomerulus and glomeruli that process similar odours are located in close proximity. The number of glomeruli is species-specific and varies usually between 50 and 200 in insects. The glomeruli of both wasp species have been mapped with the use of confocal laser scanning microscopy (CLSM). The number of glomeruli varied from 186-189 in *C. glomerata* and 193-198 in *C. rubecula*. Differences between the species were small. This indicates, together with the observed similarity in shape, number and position of olfactory sensilla, a similarity in olfactory signal processing between the two species. Furthermore the neurons that could mediate the reward stimulus in the two wasp species were identified. In honeybees the neuron that mediates olfactory learning is a so called ventral unpaired median (VUM) neuron and is octopaminergic. Therefore the octopaminergic cells in *Cotesia* have been made visible by use of an anti-octopamine antibody and subsequent CLSM analysis. Three different octopaminergic cell groups were identified that are similar in other insects, including the VUM neurons. It is likely that in *Cotesia* one of these cells is the reward-mediating neuron. In conclusion: the morphology of the neural pathways that underlie a difference in learning is mapped and provides a solid base for further studies. In my thesis I also studied behavioural differences and evolutionary factors which might have shaped the difference in learning.

