

Schuivende hybridezones in kamsalamanders

Hybridezones blijken beweeglijker dan gedacht

Ben Wielstra & Pim Arntzen

Wanneer nauw verwante soorten elkaar tegen komen, vormen ze regelmatig zones waar ze hybridiseren en genetisch materiaal uitwisselen. Als de ene soort zich uitbreidt ten koste van de andere, dan verschuift hun hybridezone. Er is onenigheid over hoe ver zo'n hybridezone zich kan verplaatsen. De klassieke literatuur suggereert dat een schuivende hybridezone zich snel zou moeten stabiliseren. Recente studies aan kamsalamanders schetsen echter een ander beeld.

Inleiding

Soortvorming omvat een stadium waarin divergerende soorten nog steeds genetisch materiaal met elkaar uit kunnen wisselen (Wu & Ting, 2004). Zulke *gene flow* tussen soorten vindt plaats in de hybridezones die zulke soorten vormen waar en wanneer ze elkaar tegenkomen in de vrije natuur (Barton & Hewitt, 1985). Het proces waarin allelen (genvarianten) van de ene soort opgenomen worden in het genoom van de andere, wordt *introgressie* genoemd (Mallet, 2005).

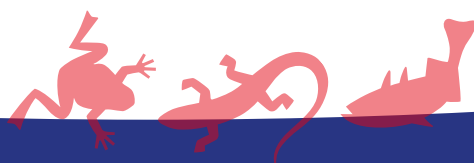
Als het ene lid van een paar van hybridiserende soorten de ander verdringt, dan beweegt hun hybridezone over het landschap. Zulke beweging is geregeld 'live' waargenomen over een periode van enkele tot tientallen jaren (Buggs, 2007). Dit suggereert dat hybridezones mogelijk grote afstanden af kunnen leggen op een 'evolutionaire' tijdschaal. Echter, theoretische studies opperen dat verschuivende hybridezones zich snel zullen stabiliseren in 'troggen' van lage populatiedichtheid, zoals regio's met ongeschikt habitat (Buggs, 2007). Er is dan ook praktisch geen bewijs voor bewegende hybridezones over langere tijd en afstand.

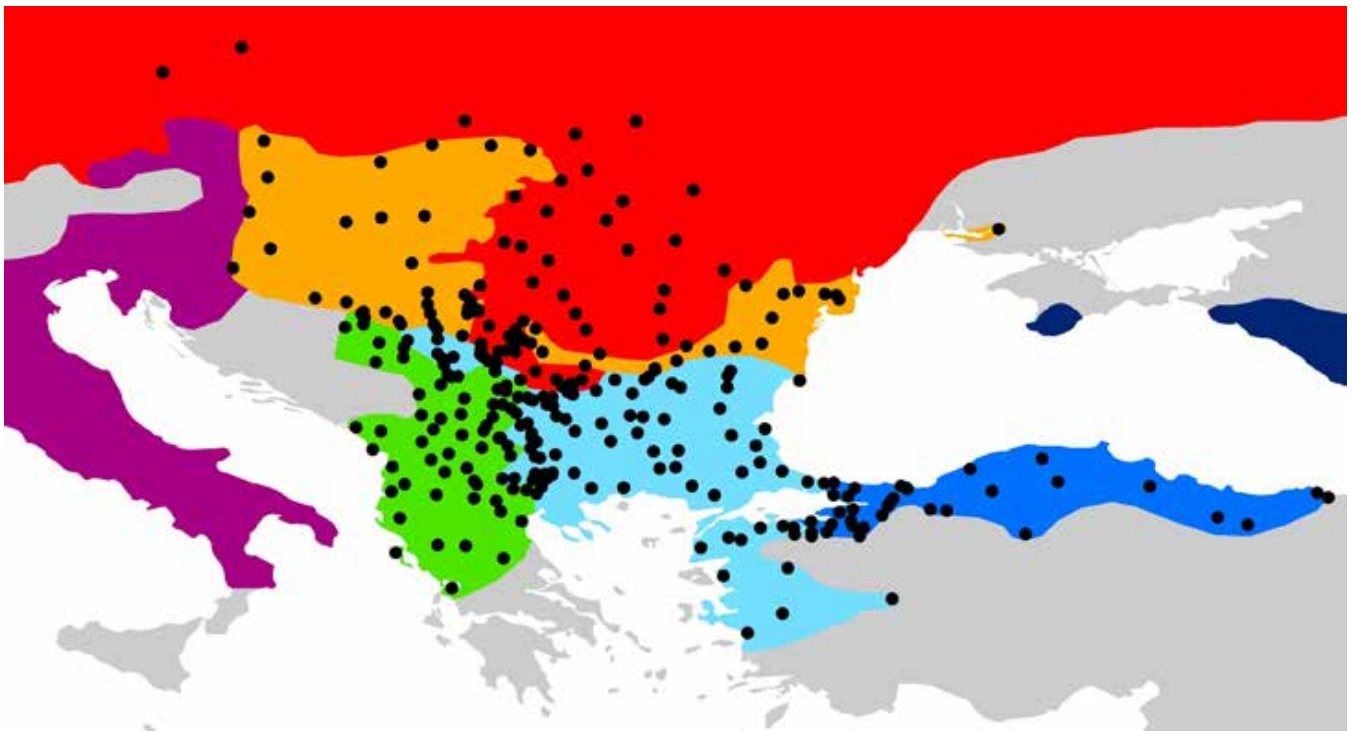
Een cruciale voorspelling met betrekking tot verschuivende hybridezones, is dat de teruggedrongen soort *selectief neutrale allelen* (dus varianten van een gen zonder bijzondere voor- of nadelen) achter laat in de zich uitbreidende soort (Barton & Hewitt, 1985; Currat *et al.*, 2008). Het blootleggen van zo'n *genetische voetafdruk* zou de dynamische geschiedenis van de hybridezone kunnen aantonen. Met deze insteek testen wij de beweeglijkheid van hybridezones in een systeem waarvan we reeds vermoeden dat de hybridezones mobiel zijn: de kamsalamanders (genus *Triturus*).

De kamsalamanders vormen een groep van zeven nauw verwante soorten (sommige recent beschreven, sommige voorheen als ondersoort beschouwd) die hybridezones vormen daar waar ze elkaar ontmoeten (Arntzen *et al.*, 2014). Wij kijken hier specifiek naar twee regio's met hybridezones van kamsalamanders, te weten Turkije en de Balkan. In Turkije ontmoet de Bulgaarse kamsalamander (*Triturus ivanbureschi*) de Anatolische kamsalamander (*T. anatolicus*) en op de Balkan ontmoet ze de kamsalamander (*T. cristatus*), de Donaukamsalamander (*T. dobrogicus*) en de Macedonische kamsalamander (*T. macedonicus*). We onderzoeken een groot aantal genen, op zoek naar de *genetische voetafdruk* die een bewegende hybridezone achter zou moeten laten.



Macedonische kamsalamander (*Triturus macedonicus*; boven), Bulgaarse kamsalamander (*T. ivanbureschi*; midden) en Anatolische kamsalamander (*T. anatolicus*; onder). (Foto's: Michael Fahrbach)



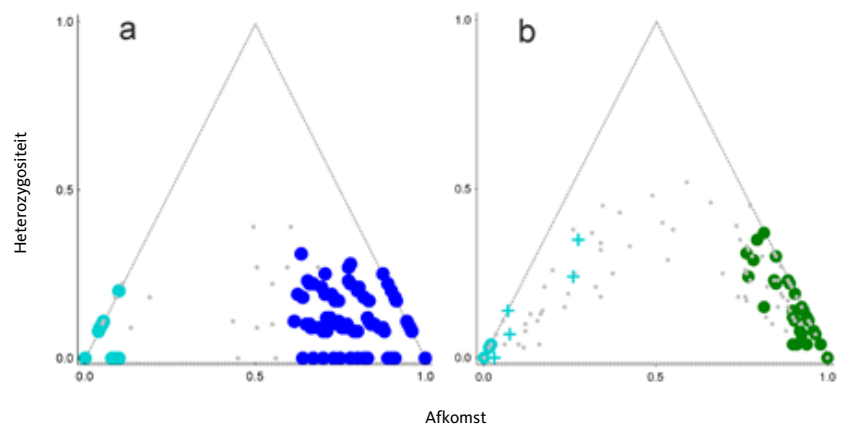


Figuur 1. Verspreiding en monsternamen van vijf kamsalamandersoorten met hybridezones.

Kleuren vertegenwoordigen de vijf hier onderzochte soorten, kamsalamander *T. cristatus* (rood), Donaukamsalamander *T. dobrogicus* (oranje), Macedonische kamsalamander *T. macedonicus* (groen), Bulgaarse kamsalamander *T. ivanbureschi* (lichtblauw), en Anatolische kamsalamander *T. anaticus* (donkerblauw), en de twee overige kamsalamandersoorten, Italiaanse kamsalamander *T. carnifex* (paars) en Oostelijke kamsalamander *T. karelinii* (zwartblauw). Let op de enclave van de Bulgaarse kamsalamander in Servië, geïsoleerd van de rest van haar verspreidingsgebied en volledig omgeven door andere kamsalamandersoorten.

Methode

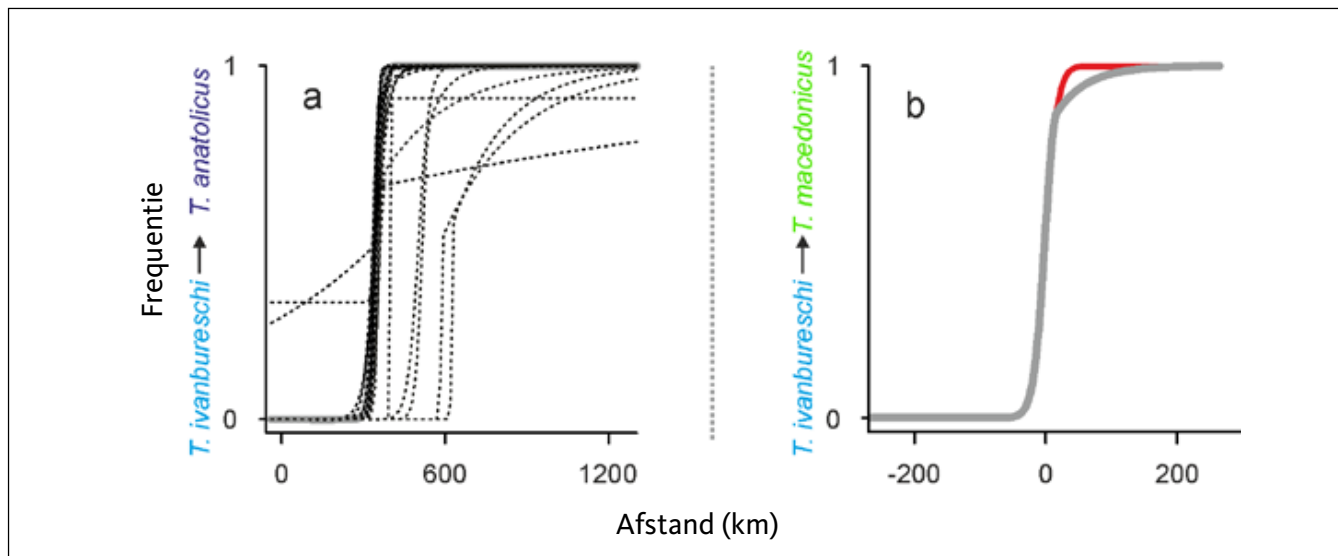
Voor vijf soorten kamsalamanders op de Balkan en in Turkije verzamelden we geografisch zeer fijnmazig weefselmonsters (zie figuur 1). Vervolgens stelden we de DNA-code vast van een stukje mitochondriaal DNA en van ongeveer vijftig nucleaire genen. Op basis van deze genetische data konden we bevestigen tot welke soort elk individu behoort en bepalen of er aanwijzingen zijn voor genetische vermenging met andere soorten. Aan de hand van 'referentiepopulaties', populaties die ver weg van hybridezones liggen en waarvoor aangenomen wordt dat ze niet aangetast zijn door *gene flow*, bepaalden we welke allelen diagnostisch zijn voor elke soort. Op basis van deze gegevens documenteerden we hoe soortspecifieke allelen opgenomen zijn in een andere soort. Als laatste keken we naar de ruimtelijke overgang per gen (de *geografische cline*) van de ene naar de andere soort, ten opzichte van de soortgrens. Voor verdere details, zie de originele studies (Wielstra *et al.*, 2017a; Wielstra *et al.*, 2017b).



Figuur 2. Heterozygiteit uitgezet tegen afkomst voor twee bewegende hybridezones.

Heterozygiteit staat voor de fractie van genen vertegenwoordigd door allelen van beide soorten (0 als geen enkele marker heterozygoot is en 1 als ze dat allemaal zijn) en afkomst voor de fractie van allelen afkomstig van elke soort (0 als een individu puur de ene soort is en 1 als ze puur de andere soort is). Genetisch pure individuen verwacht je dus in één van de onderhoeken. De hybridezones tussen de Bulgaarse kamsalamander *T. ivanbureschi* (lichtblauw) en a) de Anatolische kamsalamander *T. anaticus* (donkerblauw) en b) de Macedonische kamsalamander *T. macedonicus* (groen) tonen een *genetische voetafdruk*: er is namelijk een asymmetrie van introgressie van *T. ivanbureschi* naar de andere soorten toe. Grijs punten vertegenwoordigen individuen uit de regio waar de verspreidingsgebieden van de verschillende soorten elkaar raken. Blauwe kruisjes (in b) vertegenwoordigen Bulgaarse kamsalamanders uit de *enclave* (zie Discussie en figuur 1).





Figuur 3. Geografische clines voor twee bewegende hybridezones.

Frequentie loopt van genetisch puur de ene soort (o) tot genetisch puur de andere soort (1). De hybridezones tussen de Bulgaarse kamsalamander *T. ivanbureschi* en a) de Anatolische kamsalamander *T. anatolicus* en b) de Macedonische kamsalamander *T. macedonicus* tonen een *genetische voetafdruk*: in a) zijn geografische clines voor meerdere individuele genen (gestippelde clines) ten opzichte van een cline voor het overall genotype (dikke grijze cline) verschoven richting de Anatolische kamsalamander en in b) toont een *geografische cline* op basis van het algemene genotype (dikke grijze cline) een minder scherpe overgang (een 'staart') richting de Macedonische kamsalamander (de rode lijn toont aan hoe de cline zou lopen als ze symmetrisch was). Gezien de gecompliceerde geografische setting van de hybridezone tussen de Bulgaarse en Macedonische kamsalamanders (zie figuur 1) was een analyse langs een 1-dimensionaal transect (zoals gedaan is voor de Anatolische kamsalamander) niet mogelijk. De x-as geeft daarom de kortste afstand weer tot de 2-dimensionale hybridezone.

Resultaten

We bevestigen dat de vijf onderzochte kamsalamanders hybridiseren, daar waar hun verspreidingsgebieden elkaar raken. Op basis van asymmetrische *gene flow* vinden we duidelijke aanwijzingen dat één van de vijf soorten, de Bulgaarse kamsalamander, lokaal verdrongen is door andere kamsalamandersoorten. We zien namelijk beduidend minder Bulgaarse kamsalamanders met genetische sporen van de Anatolische of Macedonische kamsalamander dan het omgekeerde, en al zeker niet op grotere afstand van de hybridezones (figuren 2 en 3). Dit is conform een scenario waarbij in Turkije de Anatolische kamsalamander en op de Balkan de Macedonische kamsalamander zich hebben uitgebreid, ten koste van de Bulgaarse kamsalamander.

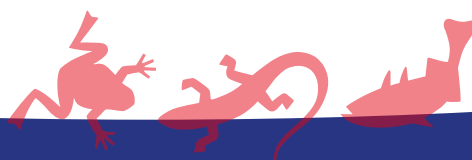
Discussie

In twee kamsalamanderstudies vinden we een *genetische voetafdruk* van een schuivende hybridezone, afkomstig van een voorheen verdrongen

soort – in beide gevallen de Bulgaarse kamsalamander – met allelen nu opgenomen in het genoom van de soort die zich heeft uitgebreid – de Anatolische kamsalamander in Turkije en de Macedonische kamsalamander op de Balkan (Wielstra *et al.*, 2017a; Wielstra *et al.*, 2017b). De sterk asymmetrische en geografisch verreikende *introgressie* die we vinden, dus de aanwezigheid van typische Bulgaarse kamsalamander-allelen diep in het verspreidingsgebied van twee andere kamsalamandersoorten waarmee de Bulgaarse kamsalamander hybridiseert, toont aan dat hybridezones zich wel degelijk over een aanzienlijke tijd en ruimte kunnen verplaatsen.

De kamsalamanders op de Balkan vertonen bovendien een intrigerend verspreidingspatroon, waarbij een stukje van het verspreidingsgebied van de ene soort (in dit geval de Bulgaarse kamsalamander) omhult is door dat van andere soorten (figuur 1). Omdat kamsalamanders niet in staat zijn grote afstanden in één keer te overbruggen, kan zo'n *enclave* eigenlijk alleen maar uitgelegd worden door een scenario waarin de ene soort verdrongen wordt door de andere (zoals geldt voor de Bulgaarse kamsalamander), maar het lokaal nog even uithoudt, terwijl de binnendringer er omheen en voorbij beweegt. Daarmee levert een enclave dus onafhankelijk bewijs voor een schuivende hybridezone (Arntzen, 1978; Wielstra *et al.*, 2017a).

Het erkennen van de dynamiek van hybridezones is een belangrijke toevoeging binnen de biogeografie (Hewitt, 2011). Wij verwachten dat het verschuiven van hybridezones onder natuurlijke condities veel meer voorkomt dan momenteel wordt aangenomen. Tevens is het verdringen van hybridiserende soorten interessant vanuit het oogpunt van natuurbescherming, daar waar exoten zijn geïntroduceerd binnen het verspreidingsgebied van een nauw verwante, bedreigde, inheemse soort. Kamsalamanders leveren ook hier een goed voorbeeld van. Zo breidt op de Veluwe de exotische Italiaanse kamsalamander zich uit ten koste van de inheemse kamsalamander, en dit proces was te achterhalen omdat genetische sporen van de kamsalamander zijn achtergebleven in het genoom van de Italiaanse kamsalamander (Meilink *et al.*, 2015).





Poelen in de hybridezone van de Bulgaarse kamsalamander (*Triturus ivanbureschi*) met de Macedonische kamsalamander (*T. macedonicus*) op de Balkan (links) en de Anatolische kamsalamander (*T. anaticus*) in Turkije (rechts). (Foto's: Ben Wielstra)

Dankwoord

Het hier gepresenteerde onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met T. Burke en R.K. Butlin aan de University of Sheffield, Verenigd Koninkrijk en A. Avcı, N. Üzüm, E. Bozkurt en K. Olgun aan de Adnan Menderes University in Aydın, Turkije. B. Wielstra heeft financiële steun ontvangen voor dit onderzoek via een *Newton International Fellowship* en via de Europese Unie's *Horizon 2020 research and innovation programme* in het kader van *Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 655487*.

Summary

Hybrid zone movement in crested newts

Speciation typically involves a stage in which species can still exchange genetic material. Interspecific gene flow is facilitated by the hybrid zones that such species establish upon secondary contact. If one member of a hybridizing species pair displaces the other, their hybrid zone would move across the landscape. Such movement has occasionally been observed over years or even decades. This suggests that hybrid zones have the potential to traverse considerable distances over evolutionary time. Yet, the prevalence of such long-term hybrid zone movement is poorly understood. A key prediction of hybrid zone movement is that the receding species leaves behind a trail of introgressed selectively neutral alleles within the expanding one. We test for such a genomic footprint of hybrid zone movement in two hybrid zones between crested newt species (genus *Triturus*) that are thought to have shifted position. The strongly asymmetrical and geographically extensive introgression we uncover in the two crested newt cases provide firm support for hybrid zone movement proceeding over considerable time and space.

Literatuur

- Arntzen, J.W., 1978. Some hypotheses on postglacial migrations of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Linnaeus) and the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus). *J. Biogeogr.* 5: 339-345.
- Arntzen, J.W., B. Wielstra & G.P. Wallis, 2014. The modality of nine *Triturus* newt hybrid zones, assessed with nuclear, mitochondrial and morphological data. *Biol. J. Linn. Soc.* 113: 604-622.
- Barton, N.H. & G.M. Hewitt, 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113-148.
- Buggs, R.J.A., 2007. Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* 99: 301-312.
- Currat, M., M. Ruedi, R.J. Petit & L. Excoffier, 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* 62: 1908-1920.
- Hewitt, G., 2011. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* 139: 617-638.
- Mallet, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20: 229-237.
- Meilink, W.R.M., J.W. Arntzen, J.J.C.W. van Delft & B. Wielstra, 2015. Genetic pollution of a threatened native crested newt species through hybridization with an invasive congener in the Netherlands. *Biol. Conserv.* 184: 145-153.
- Wielstra, B., T. Burke, R.K. Butlin & J.W. Arntzen, 2017a. A signature of dynamic biogeography: enclaves indicate past species replacement. *Proc. Royal Soc. B* 284: 20172014.
- Wielstra, B., T. Burke, R.K. Butlin, A. Avcı, N. Üzüm, E. Bozkurt, K. Olgun & J.W. Arntzen, 2017b. A genomic footprint of hybrid zone movement in crested newts. *Evolution Letters* 1: 93-101.
- Wu, C.-I. & C.-T. Ting, 2004. Genes and speciation. *Nat. Rev. Genet.* 5: 114-122.

Ben Wielstra

University of California, Los Angeles
University of Sheffield
Naturalis Biodiversity Center
Ben.Wielstra@naturalis.nl

Pim Arntzen

Naturalis Biodiversity Center
Pim.Arntzen@naturalis.nl

