

University of Groningen

## Genetics of arrhenotokous and thelytokous reproduction in *Venturia canescens* (Hymenoptera)

Mateo Leach, Irene Victoria

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Mateo Leach, I. V. (2009). *Genetics of arrhenotokous and thelytokous reproduction in Venturia canescens (Hymenoptera)*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## **Samenvatting en conclusies**

In alle Hymenoptera vindt ontwikkeling van het ei plaats, zonder dat daar bevruchting aan voorafgaat. De meeste Hymenoptera soorten (wespen, bijen en mieren) reproduceren door arrhenotokie of asexuele voorplanting (haploïde mannetjes, diploïde vrouwtjes), waarbij mannetjes parthenogenetisch ontstaan uit onbevruchte haploïde eieren. Maar bij thelytoke ontwikkeling (asexuele voorplanting) ontstaan er vrouwtjes uit onbevruchte eieren; een proces waarbij cytologische mechanismen nodig zijn om diploidie te handhaven of te herstellen. De meeste asexuele Hymenoptera hebben een vorm van parthenogenese, wat inhoudt dat fusie van meiose producten (automixis) het diploïd aantal chromosomen in het ei herstelt. Dit proces kan op drie verschillende manieren plaatsvinden (*terminal fusion*, *central fusion* en *gamete duplication*) welke grote gevolgen hebben met betrekking tot de heterozygotie in de volgende generatie (Suomalainen *et al.*, 1987; Beukeboom & Zwaan 2005). Apomixis is minder algemeen voorkomend in Hymenoptera: asexuele nakomelingen worden mitotisch geproduceerd en zijn genetisch identiek aan de moeder.

Asexuele voorplanting kan onderverdeeld worden in twee categorieën, al na gelang het oorzakelijk mechanisme: microbe-geïnduceerd en genetisch bepaald. Van verscheidene bacteria is bekend dat ze reproductieve veranderingen in Hymenoptera kunnen veroorzaken zoals: asexuele voorplanting, *cytoplasmic incompatibility*, *male killing* en *feminization*. Van deze micro-organismen is *Wolbachia* het meest bestudeerd (e.g. O'Neill *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999) maar een steeds groter wordend aantal studies laat zien dat *Cardinium* en bacteriën van de orde *Rickettsia* dezelfde reproductieve veranderingen kunnen induceren (e.g. Hagimori *et al.*, 2006; Perlman *et al.*, 2006). Het cytologische mechanisme waardoor *Wolbachia* diploidie herstelt is gameet duplicatie (e.g. Stouthamer & Kazmer, 1994; Pannebakker *et al.*, 2004), maar er zijn ook uitzonderingen vermeld (Weeks & Breeuwer, 2001). Hoewel *Cardinium* en *Rickettsia* dezelfde fenotypen induceren als *Wolbachia*, blijkt het cytologische mechanisme van diploidie herstel verschillend te zijn (Adachi-Hagimori *et al.*, 2008).

Genetisch bepaalde asexuele voorplanting komt voor in enkele Hymenoptera soorten, maar er is erg weinig bekend van de genetische regulatie. De Kaapse honingbij is hierop een uitzondering omdat hierbij de mogelijke betrokkenheid van het thelytokie gen (*th*) als transcriptiefactor onlangs is gerapporteerd (Lattorff *et al.*, 2007). Er is meer informatie nodig over de genetische basis van asexuele voorplanting om de evolutionaire dynamiek van parthenogenese en de paradox van de "twofold cost of sex" te kunnen verklaren en begrijpen.

Asexuele voorplanting in Hymenoptera kan aan aantal belangrijke gevolgen hebben voor de genetische make-up van individuen en de hoeveelheid en structuur van genetische variatie in populaties. Hoewel er verschillende cytologische mechanismen bij betrokken zijn gelooft men toch dat alle vormen van automixis de homozygotie van individuen en van populaties doet toenemen. Toch staan we slechts aan het begin van het begrip van de interactie tussen de genetische

gevolgen van het cytologische mechanisme van asexuele voortplanting en de processen op populatie niveau welke de genetische variatie van asexuele populaties bepalen. Hiervoor zijn meer gedetailleerde populatiegenetische studies vereist met een breder scala aan asexuele soorten.

De parasitaire (sluip) wesp *Venturia canescens* is een voorbeeld van een soort waarbij asexuele voortplanting genetisch is bepaald, hoewel er ook seksuele individuen voorkomen. Eerdere studies aan *V. canescens* hebben een aantal basale verschillen in life-history traits tussen seksuele en asexuele individuen aan het licht gebracht, die het naast elkaar voorkomen van deze voortplantingsvormen vergemakkelijken (Schneider *et al.*, 2002). Toch hebben de genetische aspecten van asexuele voortplanting nauwelijks aandacht gekregen, terwijl die toch cruciaal zijn om de evolutie en het voortbestaan ervan te begrijpen.

Beukeboom & Pijnacker (2000) lieten al zien dat asexuele voortplanting in *V. canescens* niet door *Wolbachia* wordt veroorzaakt. In **Hoofdstuk II** bevestig ik deze resultaten en laat zien dat er ook geen andere microben bij betrokken zijn. Behandeling van asexuele wespen met antibiotica en hoge temperatuur gecombineerd met DNA amplificatie met specifieke *Wolbachia* en universele prokaryotische primers geeft een duidelijk bewijs dat er geen prokaryote microben aanwezig zijn in de eitjes van *V. canescens*. Ik onderzocht de mogelijke aanwezigheid van het "small RNA containing virus" (VcSRV), zoals beschreven door Reineke & Asgari (2005) in seksuele en asexuele wespen en vond de aanwezigheid ervan in beide voortplanting systemen. Dit duidt erop dat het VcSRV virus niet betrokken is bij asexuele voortplanting in *V. canescens*. Verder bediscussieer ik de mogelijke valkuilen bij experimenten die er op gericht zijn de afwezigheid van microben aan te tonen. Ik concludeer dat (hoogstwaarschijnlijk) asexuele voortplanting in *V. canescens* niet door microben wordt veroorzaakt, maar een genetische basis heeft. Deze resultaten vormden de basis voor de studie beschreven in **Hoofdstuk VI** (zie onder).

In **Hoofdstuk III** beschrijf ik het ontwerpen van 56 microsatelliet merkers voor beide voortplanting systemen. Deze merkers werden getest in seksuele en asexuele vrouwtjes, wat een eerste voorlopige beschrijving van de genetische make-up opleverde van individuen van beide voortplantings systemen. Asexuele vrouwtjes bleken meer homozygoot te zijn dan seksuele, in overeenstemming met het mechanisme van diploidie herstel zoals dat voorkomt in de asexuele stammen van *V. canescens* (central fusion automictic parthenogenesis, Beukeboom & Pijnacker, 2000).

Deze merker set maakte ook de constructie van de eerste koppelingskaart voor *V. canescens* mogelijk, bestaande uit 29 microsatelliten en 19 AFLP merkers (Hoofdstuk IV). De koppelingskaart heeft een resolutie van 11 koppelingsgroepen, het haploïde chromosome aantal van *V. canescens* ( $N = 11$ ), maar de kaart is onvolledig en er zijn meer merkers nodig om de resolutie te verbeteren. Ik heb twee belangrijke genen van *V. canescens* kunnen lokaliseren: het Virus Like Particle (*vlp*) gen aan het uiteinde van koppelingsgroep II en het complementary sex determi-

ning locus (*csd*) op koppelingsgroep IV. *Virus Like Particles* zijn goed beschreven in *V. canescens* en de polymorfie in een van de genen is gebruikt als moleculaire merker in verscheidene studies. Ik heb de voorspelling van Malmberg *et al.* (2000) over de kaart-positie van *vlp* kunnen bevestigen: *vlp* is meer homozygoot in asexuele populaties dan in seksuele omdat te verwachten is dat distale loci op een koppelingsgroep gaandeweg meer homozygoot worden door het cytologische mechanisme dat *V. canescens* bestaat. Het *csd* locus vertoont koppeling met de microsatelliet *Vcan071*, maar er is een meer fijnschalige kartering nodig om dit gen verder te lokaliseren en te isoleren. De voorliggende kaart biedt een begin voor meer gedetailleerde genetische studies in *V. canescens*, zoals toekomstige QTL mapping van gedrags- en life history traits, gebruikmakend van divergente seksuele populaties of selectie lijnen.

De negatieve uitkomst van de kruisingen tussen seksuele mannetjes en asexuele vrouwtjes geen hybride nakomelingen opleverde, noopten mij tot een heroverweging van de resultaten van Schneider *et al.* (2002; 2003). Is de "occasional sex" welke zij beschrijven algemeen? Hoe verwant zijn seksuele en asexuele populaties? Ontstaat asexuele voorplanting vaak uit seksuele voorplanting? Gelukkig kon ik gebruik maken van individuele monsters uit dezelfde populaties als gebruikt door Schneider *et al.* (2002) en ik breidde deze studie uit met enkele nieuw verzamelde monsters. Ik voerde eenzelfde genetische diversiteit studie uit, maar nu gebruikte ik microsatellieten en COI mitochondriale sequenties. In **Hoofdstuk V**, laat ik zien dat de genetische variatie van asexuele individuen lager is dan die van seksuele. Zoals eerder gezegd is dit het gevolg van het "genome homozygosity process". Ik vond een scherpe scheiding tussen de twee voorplanting systemen zowel voor de nucleaire (microsatellieten) als de mitochondriale (COI) merkers, wat aangeeft dat de gene flow zoals gesuggereerd door Schneider *et al.* (2002) in het veld niet vaak voorkomt. Dit is consistent met mijn resultaat dat kruisingen tussen seksuele mannetjes en asexuele vrouwtjes niet gemakkelijk leiden tot hybride nakomelingen onder laboratorium condities. De tegenstrijdigheid van de twee studies zou te wijten kunnen zijn aan de merkers die gebruikt zijn: de AFLPs gebruikt door Schneider *et al.* (2002; 2003) zijn codominante merkers die een overschatting kunnen geven van de overeenkomsten tussen beide reproductive systemen vergeleken met de microsatellieten gebruikt in mijn studie, als gevolg van het niet homo-log zijn van AFLP fragmenten van gelijke grootte. Bovendien, het is bekend dat AFLP genotypering reproduceerbare artefacten oplevert, die abusievelijk kunnen worden aangezien voor echte banden. Mitochondriale sequenties geven preciezere informatie over haplotypen dan de RFLPs welke werden gebruikt door Schneider *et al.* Mijn resultaten suggereren dat men voorzichtig moet zijn met het gebruiken van AFLP merkers voor populatiegenetische studies. De resultaten van **Hoofdstuk V** laten zien dat er één wijdverspreide asexuele clone is met weinig genetische overeenkomsten met seksuele wespen. Het is nu duidelijk dat genetische uitwisseling tussen individuen van de verschillende voorplanting systemen erg zeldzaam is.

In **Hoofdstuk VII** presenteer ik een studie die de fitness vergelijkt tussen vrouwtjes van de twee voorplanting systemen. Ik vond dat asexuele wespen meer investeren in ei-productie en superparasitisme terwijl sexuele wespen hun ei-productie uitsmeren over een langere tijdspanne (en langer leven). Deze resultaten zijn consistent met de beschikbare informatie over de verschillen in life history tussen de beide voorplanting systemen (Hoofdstuk VI in Schneider, 2003). Asexuele vrouwtjes worden over het algemeen gevonden in rijke omgevingen (bv. bakkerijen) met een hoge dichtheid aan gastheren (referenties in Schneider *et al.*, 2002), terwijl sexuele wespen meer aangepast lijken aan veld situaties met minder gastheren en grotere afstanden (Driessen *et al.*, 1995).

Samengevat en beschouwd in de context van evolutie van sextheorieën (**Hoofdstuk I**), geven alle resultaten aan dat sexuele and asexuele populaties genetisch gedifferentieerd zijn. Asexuele voorplanting ontstaat waarschijnlijk uit sexuele voorplanting als een zeldzame gebeurtenis en genetische uitwisseling tussen de twee systemen is uiterst zeldzaam. Sexuele en asexuele individuen bezetten verschillende habitats en maken gebruik van verschillende voedselbronnen en zijn daarom geen directe concurrenten in een veldsituatie. Dit verklaart de ogenschijnlijke coëxistentie van beide voorplanting systemen in de natuur. Zijn deze twee voorplanting systemen zo verschillend dat we ze als twee verschillende soorten moeten beschouwen? Ik denk van niet. Als sexuele en asexuele individuen tot verschillende soorten zouden behoren, zou het moeilijk te verklaren zijn dat sexuele individuen dezelfde mitochondriale haplotypen hebben als asexuele (**Hoofdstuk V**) alsmede het mogelijk zeldzame voorkomen van gene flow.

Door Beukeboom & Pijnacker (2000) werd een verschil in de cytologische mechanisme tussen onbevuchte sexuele en asexuele eieren geobserveerd. Een vergelijking van het RNA- en eiwit repertoire van onbevuchte sexuele en asexuele eieren werd gebruikt om inzicht te verkrijgen in de genetische controle van diploidie herstel in asexuele eieren. In **Hoofdstuk VI** presenteer ik een beschrijving van mogelijke RNAs en eiwitten, betrokken bij sexuele en asexuele ei ontwikkeling. In sexuele eitjes zijn meer expressieproducten aanwezig dan in asexuele, wat een aanwijzing is voor het feit dat deze voortplantingswijze meer complexe processen en genproducten vereist, zoals het verder verwerken van de spermakern na bevruchting. Asexuele vrouwtjes bevruchten hun eieren niet of slechts uiterst sporadisch, na paring met een sexuele mannetje. Klaarblijkelijk hebben zij deze functie verloren als gevolg van mutatie accumulatie (e.g. Carson *et al.*, 1982; Pannebakker *et al.*, 2005). Ik vond verscheidene genen en eiwitten welke een differentieel verschil in aanwezigheid-afwezigheid lieten zien tussen de twee voorplanting systemen. De explicite rol van deze kandidaat genen en eiwitten is moeilijk vast te stellen in de context van diploidie herstel, bevruchting of een ander proces dat verschillend is tussen de voorplanting systemen. VLP2, tubuline en actine zijn de meest waarschijnlijke kandidaten. Deze drie eiwitten zijn geassocieerd met de microtubulus structuur of met door microtubuli gereguleerde

processen, alsmede kernspoelvorming en orientatie, in overeenstemming met de observaties van Beukeboom en Pijnacker (2000). We staan nog slechts aan het begin van het ophelderen van de genetische regulatie van parthenogenetische voorplanting en er zijn meer gedetailleerde studies nodig om de rol van mogelijke genen en eiwitten in de context van diploidie herstel en (afwezigheid van) bevruchting te karakteriseren. De volgende generatie van genomische technieken, met inbegrip van de beschikbaarheid van de volledige genomsequentie van een toenemend aantal organismen, zal er toe bijdragen dat dit doel ooit bereikt wordt.

