

## Samenvatting

### Context

Sinds Darwins' "The Origin of Species" bestaat er een voortdurende belangstelling voor het soortvormingsproces. Adaptieve radiaties, zoals die van cichliden, wordt sinds decennia als een ideaal modelsysteem gebruikt om het soortvormingsproces te bestuderen. Eerdere studies op deze groep leverden trouwens waardevolle inzichten op in de geografische, ecologische en gedragsmatige mechanismen die aan de basis liggen van de soortvorming. De ontwikkeling van nieuwe sequentietechnieken heeft een nieuwe impuls gegeven aan dit onderzoeksgebied, vooral sinds geannoteerde cichliden genomen beschikbaar zijn. De beschikbare technieken maken het mogelijk om de genomische evolutie bij cichliden te onderzoeken, waarbij ze tot vandaag grotendeels gebruikt worden om genen te koppelen aan waargenomen fenotypische veranderingen die zo kenmerkend zijn voor de Afrikaanse cichliden. Er zijn vrijwel geen studies die hebben geprobeerd om de meest geavanceerde genomische methoden toe te passen bij de studie van het gedrag van deze vissen. Vermits verschillende cichlidensoorten in de Oost-Afrikaanse Grote Meren naast elkaar bestaan én gemakkelijk kunnen hybridiseren, wordt aangenomen dat het gedragsmechanisme een van de belangrijkste drijfveren is voor het speciatieproces.

### Doelstellingen

We hebben getracht de grenzen van soorten te bestuderen aan de hand van *Ophthalmotilapia* een klein cichliden genus van het Tanganyika-meer. De verschillende soorten van dit geslacht: *O. nasuta*, *O. boops*, *O. ventralis* en *O. heterodonta*, staan bekend om hun co-existentie en hybridisatie in het wild. Deze soorten hebben allemaal een uitgesproken seksueel dimorfisme. Ze zijn maternale muilbroeders en vertonen een complex en uitgebreid paringsritueel. Om deze drie redenen verwachten we dat de keuze van de vrouwelijke partner verantwoordelijk is voor het handhaven van de soortgrenzen. Interessant is dat de hybridisatie onder *Ophthalmotilapia*-soorten assymetrisch is gebleken. Dit betekent dat vrouwtjes van de ene soort minder geneigd zijn om heterospecifieke paringen te accepteren dan de vrouwtjes van de andere soort. Dit stelt ons in staat om niet alleen de soortgrenzen te onderzoeken, maar ook om soortengrenzen te vergelijken die verschillen in sterkte. We zullen een genomische, transcriptomische en gedragsmatige gereedschapskist combineren om te onderzoeken hoe de soortgrenzen in dit geslacht in stand worden gehouden. Daarnaast zullen we streven naar het identificeren van zogenaamde 'speciatiegenen', genen die verantwoordelijk zijn voor het aansturen van het speciatieproces. Door het screenen van de genomen van soorten in het genus over het gehele verspreidingsgebied zullen we onderzoeken of deze potentiële speciatiegenen ook hebben bijgedragen aan de diversificatie van het genus, en aan het in stand houden van de soortgrenzen in de natuur.

### Methodologie

We hebben een 'klassieke' gedragsstudie gecombineerd met een gedetailleerde vergelijking van het genexpressie in het cichlidenbrein tijdens en voor de paring. Hiervoor hebben we twee sets van gedragsexperimenten uitgevoerd die de begin- en eindfase van het paringsproces karakteriseren: een korte eerste ontmoeting met een potentiële partner, en een volledige paring die eindigde met een succesvolle voortplanting (de bevruchting). De experimenten werden uitgevoerd met in het wild gevangen *O. nasuta* en *O. ventralis* exemplaren, afkomstig uit een plaats in het Tanganyikameer waar ze samen voorkomen.

Beide experimenten werden uitgevoerd in een con- en een heterospecifieke setting, d.w.z. vrouwelijke exemplaren van *Ophthalmotilapia* werden gepresenteerd met con- of een heterospecifiek mannetje. Het gedrag van de vrouwtjes werd op een onbevooroordeelde manier vergeleken. Na de experimenten werden de verschillende hersendelen gebruikt voor RNA-sequencing. Transcriptomen van de verschillende hersendelen werden vergeleken voor exemplaren die aan een andere behandeling werden onderworpen en er werden op- en neergereguleerde genen geïdentificeerd met behulp van het geannoteerde genoom van de Nijl tilapia.

Daarnaast werd een genotypering door middel van sequencing gevolgd om SNP-data te verkrijgen voor 500 monsters van *Ophthalmotilapia* en verwante soorten, wat ons in staat stelde om patronen van hybridisatie te onderzoeken.

### **Resultaten**

Gezien de patronen van asymmetrische hybridisatie die in de natuurlijke populaties werden waargenomen, voorspelden we dat *O. ventralis* wijfjes minder discriminerend zouden zijn ten opzichte van heterospecifieke mannetjes dan *O. nasuta* wijfjes. Dit werd bevestigd in de presentatie-experimenten waar we soortherkenning observeerden voor vrouwtjes van *O. nasuta* maar niet voor die van *O. ventralis*. De gevormde gedroegen zich anders bij het observeren van een con- of een heterospecifiek mannetje, terwijl voor de laatste geen significant verschil in gedrag werd waargenomen. Bij het kijken naar neurale genexpressie kwamen veertien genen differentieel tot expressie in minstens één van de hersendelen van *O. nasuta* wijfjes na het zien van een *O. nasuta* of een *O. ventralis* mannetje. Het gebrek aan discriminerend gedrag bij vrouwelijke *O. ventralis* werd ook waargenomen in de paringsexperimenten. Hier werden drie succesvolle paringen tussen een *O. ventralis* vrouwtje en een *O. nasuta* mannetje waargenomen. Bij het vergelijken van de transcriptomen van *O. ventralis* vrouwtjes na con- en heterospecifieke paringen, werden 106 genen differentieel uitgedrukt. Fylogenetische en fylogenomische analyses toonden een vergelijkbare geografische structuur in *Ophthalmotilapia*. Genetische structurende analyses toonden aan dat soorten werden ondersteund, maar gevallen van hybridisatie, voorheen alleen gevonden met mitochondriale markers werden ook gedetecteerd met behulp van een GBS-aanpak.

### **Conclusies**

De hybridisatie die in een eerdere studie op enkele genetische merkers werd waargenomen, kon met behulp van genomische instrumenten worden bevestigd. Uit experimenten bleek dat de patronen van asymmetrische hybridisatie in de natuur te wijten waren aan verschillen in soortherkenning en partnerkeuze bij de vrouwtjes en niet aan verschillen in paringsgedrag van de mannetjes. Differentiële genexpressiepatronen toonden ook aan dat de vrouwtjes onderscheid maken tussen con- en heterospecifieke mannetjes. Bovendien kwam differentiële genexpressie voor in dezelfde hersendelen en omdat bij beide experimenten vergelijkbare biologische processen betrokken waren bij de soortherkenning. We voorspellen dat deze genen, die als kandidaat-speciatiegenen kunnen worden beschouwd, processen moduleren die hybridisatie onder natuurlijke omstandigheden zouden kunnen remmen.

**Trefwoorden:** Soortvorming, gedrag, partnerkeuze, transcriptoom, hersenen