

Een terugblik op Entomologische Berichten deel 1

Geslachtsbepaling bij de honingbij

Leo W. Beukeboom
Marinus J. Sommeijer
Jetske G. de Boer

TREFWOORDEN

Bevruchting, complementaire geslachtsbepaling, haploïd, Hymenoptera, parthenogenese

Entomologische Berichten 75 (6): 238-242

We kijken hier terug op een artikel van A.A. van Pelt Lechner waarin hij bevindingen samenvat van een eerder verschenen Duits artikel over geslachtsbepaling bij honingbijen. Wetenschappers zijn al heel lang geïnteresseerd in de vraag hoe de verschillende geslachten ontstaan en waarom er überhaupt verschillende geslachten zijn. In het artikel van Van Pelt Lechner wordt onder andere beweerd dat alle eieren die door de koningin gelegd worden, bevrucht zijn en dat een klierexcreet van de werksters en de omgeving in de broedcellen het geslacht van bijenlarven kunnen bepalen. Inmiddels weten we dat alle beweringen in het artikel onjuist zijn. Zelfs voordat het artikel van Van Pelt Lechner verscheen, werd door de Poolse priester Dzierzon al aangetoond dat honingbijdarren uit onbevruchte eitjes ontstaan, en werksters uit bevruchte eitjes. We bespreken ook de huidige kennis omtrent geslachtsbepaling bij honingbijen.

Inleiding

De meeste organismen hebben twee geslachten en bij insecten bestaan die als twee verschillende typen, vrouwtjes en mannetjes. In sommige organismen, zoals reptielen en vele evertelaten, wordt het geslacht bepaald door de omgeving. Bij reptielen bijvoorbeeld komen vrouwtjes uit eieren die bij hoge temperatuur ontwikkelen en ontstaan mannetjes bij lage temperatuur (Beukeboom & Perrin 2014). In andere organismen, zoals vrijwel alle insecten, wordt het geslacht genetisch bepaald. Er bestaan specifieke geslachtschromosomen die verschillen tussen vrouwtjes en mannetjes. In de meeste groepen hebben de mannetjes twee verschillende geslachtschromosomen, een X- en een Y- chromosoom, en vrouwtjes twee dezelfde geslachtschromosomen, twee X-chromosomen. Er zijn echter ook groepen, zoals de vlinders, waar de vrouwtjes twee verschillende geslachtschromosomen hebben en mannetjes twee dezelfde. De vliesvleugelige insecten hebben een heel apart systeem voor geslachtsbepaling: haplodiploidie. Mannetjes zijn haploïd, hebben van alle chromosomen één kopie, terwijl vrouwtjes diploïd zijn met van ieder chromosoom twee kopieën; er zijn dus geen aparte geslachtschromosomen.

Een artikel van A.A. van Pelt Lechner (1903, figuur 1) in deel 1 van Entomologische Berichten (EB) laat zien dat wetenschappers al heel lang hebben nagedacht over hoe geslachtsbepaling kan plaatsvinden in afwezigheid van specifieke geslachtschromosomen. In het artikel wordt een verhandeling van Ferdinand Dickel (1903) aangehaald waarin wordt beschreven hoe eitjes die de koningin van de honingbij, *Apis mellifera* Linnaeus, in werksterscellen legt en die normaliter opgroeien tot vrouwelijke werksters, zich tot mannetjes kunnen ontwikkelen als ze door de werksters worden overgebracht naar darrencellen (figuur 2). In het EB-artikel wordt verder commentaar vermeld dat Dickel vier zaken bewezen meent te hebben (vrijelijk aangepast door ons). (1) Als de koningin verloren gaat, kunnen werksters

uit larven en eieren waar zich normaliter werksters uit ontwikkelen, darren kweken door deze larven of eieren over te brengen naar darrencellen. (2) De eitjes gelegd door de koningin zijn tot een bepaald moment 'neutraal' en kunnen zich daarna ontwikkelen tot het ene of het andere geslacht. (3) Het kenmerk dat de omstandigheden in de broedcel functioneren als determinant voor het geslacht is een evolutionair verworven eigenschap van de honingbij. (4) Alle door de koningin gelegde eieren zijn bevrucht en alleen het kliersecret van de werksters bepaalt het geslacht.

Historische terugblik

Het is duidelijk dat communicatie over wetenschappelijke ontdekkingen in die tijd minder snel ging dan tegenwoordig. Immers Jan Dzierzon in Silesia (tegenwoordig een deel van Polen) had in 1845 in een Duits tijdschrift op basis van zijn uitgebreide observaties al gepubliceerd dat een koningin, nadat ze gepaard heeft met een dar, zowel bevruchte eieren kan leggen, die zich ontwikkelen tot vrouwtjes (koninginnen of werksters), als onbevruchte eitjes die zich door parthenogenese ontwikkelen tot mannetjes (deze 'darren' hebben dus wel een moeder maar geen vader). Dzierzon gebruikte voor zijn experimenten naast de donkere lokale honingbijen (*A. mellifera mellifera*, figuur 2) de opvallend geel gekleurde bijen van het Italiaanse ras *A. mellifera ligustica* als morfologische merker (figuur 3).

In Noord-Amerika was er meteen enthousiaste bijval voor de ontdekkingen van Dzierzon. Maar vooral in Europa was er kritiek. In 1861, in het allereerste nummer van het nog steeds bestaande American Bee Journal, publiceert Samuel Wagner, de oprichter van dit blad, door hem vertaalde brieven van August von Berlepsch die zijn bevriende collega Dzierzon verdedigt tegen verdachtmakingen en ridiculiserings (Wagner 1861). Wagner, die zelf ook een bezoek bracht aan Dzierzon,

Over de oorzaak van het sexueel verschil bij de Honigbij.

Pflüger's « Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere » Bnd. 95, Heft 1/2 (März 1903), pag. 66 v.v., bevat eene verhandeling van Ferd. Dickel, getiteld: « Die Ursachen der geschlechtlichen Differenzirung im Bienenstaat. (Ein Beitrag zur Vererbungsfrage.) »

Dickel meent daarin b e w e z e n te hebben, dat:

- 1^o. bij verlies der koningin, uit larven en eieren, waaruit zich anders arbeidsters ontwikkeld zouden hebben, darren opgekweekt worden, mits die larven en eieren gebracht worden in darrencellen;
- 2^o. de embryonen van arbeidsters tot op een zeker ontwikkelingsstadium sexueel in beide richtingen voor verdere ontwikkeling vatbaar, dus alsdan nog n e u t r a a l zijn;
- 3^o. de bijen-cel haar tegenwoordig karakter van reguleur der geslachts-ontwikkeling, niet oorspronkelijk kan bezeten hebben, doch dit beschouwd moet worden als eene verworven eigenschap,
- 4^o. a l l e door de koningin gelegde eieren b e v r u c h t zijn en alleen door het klier-secreet der werkbijen het geslacht bepaald wordt.

Wageningen, 18 Maart 1903.

A. A. VAN PELT LECHNER.

1. Het artikel 'Over de oorzaak van het sexueel verschil bij de honigbij' door A.A. Van Pelt Lechner uit 1903, zoals verschenen in het eerste deel van Entomologische Berichten (teksten van pagina's 70 en 71 zijn aan elkaar geplakt).

1. The article 'On the causes of sexual differentiation in honeybees' by A.A. Van Pelt Lechner (1903), as it appeared in the first volume of Entomologische Berichten (text of pages 71 and 72 is merged).

vertaalde eerder al het werk van Dzierzon uit 1848. De voor de ontwikkeling van de bijenteelt eveneens zeer belangrijke L.L. Langstroth (bijenkasten van het type Langstroth, gepatenteerd in 1852, zijn nog steeds de wereldstandaard) was zeer onder de indruk van het werk van Dzierzon. Hij schreef: 'No words can express the absorbing interest with which I devoured this work. I recognized at once its author as the Great Master of modern apiculture' (Langstroth 1853). En over Dzierzons ontdekking van de parthenogenetische geslachtsbepaling: 'his discovery must certainly be ranked among the most astonishing facts in all the range of animated nature' (Langstroth 1853).

Toch bleef de parthenogenetische geslachtsbepaling bij de honigbij nog jaren een punt van verhitte discussie, met name in Europa. In 1907 redigeerde de hierboven genoemde Dickel nog een artikel van Martin Kuckuck 'Es gibt keine parthenogenesis: Allgemeinverständliche wissenschaftliche Beweisführung' (Kuckuck 1907).

Pas in 1913 werd door H. Nachtsheim duidelijk gedemonstreerd dat de dar slechts 16 chromosomen heeft en de koningin of werkster 32 (16 van elke ouder). En 'Dzierzon's rule' werd algemeen aanvaard voor alle insecten van de orde van de Hymenoptera. Met het doel om meer bekendheid te geven aan de wetenschappelijke impact van het werk van Dzierzon, publiceerde Christopher Starr in 2008 een inleiding en zijn Engelse vertaling van het werk van Jan Dzierzon (www.ckstarr.net/cks/Dzierzon1845.pdf).

Biologische terugblik

Ruim een eeuw na de publicatie van Van Pelt Lechner kan geconcludeerd worden dat alle vier de conclusies overgenomen van Dickel over de geslachtsbepaling bij de honigbij foutief zijn.

De auteur denkt dat de geslachtsbepaling voornamelijk door de omgeving wordt bepaald in plaats van dat het een genetische basis heeft.

De eerste conclusie is dat bij verlies van de koningin werksters in darren kunnen veranderen mits de eieren en larven in darrencellen worden geplaatst. We weten nu echter dat darren uit onbevuchte eieren ontstaan en haploïd zijn (één set chromosomen), terwijl werksters uit bevruchte eieren ontstaan en diploïd zijn (twee sets chromosomen). Dit is een genetisch verschil. Hoe kan het dat een onbevuchte eitje met één set chromosomen tot een mannetje ontwikkelt, terwijl een bevrucht eitje met een dubbele set chromosomen een vrouwtje wordt? De geslachtsbepaling van de honigbij wordt bepaald door één gen, genaamd complementary sex determiner (csd, Beye et al. 2003). Heterozygotie (twee verschillende allelen) van dit gen resulteert in vrouwtjes en homozygotie (twee dezelfde allelen) in mannetjes. Omdat onbevuchte eitjes haploïd blijven (hemizygoot) dragen ze maar één allel en ontwikkelen ze zich tot mannetjes. Dit mechanisme van complementaire geslachtsbepaling komt in een aantal vliesvleugelige groepen voor, zoals de bijen en mieren, maar ook in bladwespen en sommige parasitaire wespen. Er zijn echter ook groepen waarin de geslachtsbepaling op een andere genetische manier plaatsvindt.

Het aantonen van complementaire geslachtsbepaling gebeurde oorspronkelijk met kruisingen en morfologische merkers (figuur 3 en 4). Whiting (1943) gebruikte de parasitaire wespen van het geslacht *Bracon* (Braconidae) om kruisingen tussen verwante individuen op te zetten zoals bijvoorbeeld tussen dochters en zonen van eenzelfde moeder. Bij dergelijke inteeltkruisingen is de kans dat de zus een identiek allel doorgeeft als de broer 50%. Wanneer een diploïd ei homozygoot is, ontwikkelt het zich tot een diploïd mannetje. In bijen gebeurt hetzelfde,



2. Een honingbijmannetje wordt gevoerd door een werkster. Mannetjes van de honingbij, darren, zijn groter dan werksters. Ze zijn in het volk ook te herkennen aan de grote ogen die boven op de kop bijna aan elkaar raken. Het doorgeven van vloeibaar voedsel van mond tot mond noemt men bij kolonievende insecten 'trophallaxis'. Foto: Rinus Sommeijer

2. A honeybee male is fed by a worker. Male honeybees, drones, are larger than females and can be identified by their large eyes that almost touch each other on top of the head. Passing liquid food from mouth to mouth is called 'trophallaxis' in social insects.

maar diploïde mannetjes zijn niet levensvatbaar in bijenkolonies door kannibalisme van de werksters in het vroege larvale stadium (Woyke 1963).

Er zijn ook vliesvleugelige groepen, zoals bepaalde parasitaire wespen, waarin de geslachtsbepaling niet volgens het complementaire systeem plaatsvindt. Hoe vrouwtjes en mannetjes in deze groepen ontstaan is nog slecht bekend. Ons eigen onderzoek aan de sluipwesp *Nasonia* (Chalcidoidea, figuur 4) heeft een geheel nieuw systeem aan het licht gebracht. Vrouwtjes schakelen een specifiek gen uit voor vrouwelijke ontwikkeling in hun eitjes waardoor onbevuchte eitjes tot mannetjes ontwikkelen. Alleen als een eitje wordt bevrucht met een chromosomenset van de vader, waarop dit gen niet is uitgeschakeld, kan er een vrouwtje ontstaan (Verhulst et al. 2010). Deze nieuwe vorm van geslachtsbepaling kon alleen worden ontdekt doordat we nu de beschikking hebben over allerlei genetische en genomische technieken die ten tijde van Dzierzon, Van Pelt Lechner en Whiting niet voorhanden waren. Zo kunnen we tegenwoordig specifieke genen uitschakelen en bepalen hoe dat de geslachtsbepaling beïnvloedt. In het artikel van Verhulst et al. wordt beschreven hoe door het uitschakelen van één bepaald gen in een bevrucht eitje, een vrouwtje in een mannetje kan veranderen. Dit gen lijkt op het *csd*-gen van de honingbij, maar is niet precies hetzelfde.

De tweede conclusie van het voorliggende artikel is dat het geslacht van de honingbij nog niet vastligt in het ei, maar embryo's nog tot beide geslachten kunnen ontwikkelen. Dit is onjuist gebaseerd op de bovenbeschreven genetische geslachtsbepaling. Op het moment dat een honingbij een eitje legt is het al bevrucht of niet. Zoals alle vliesvleugeligen heeft de moeder controle over dit proces, omdat een vrouwtje het sperma na de paring opslaat in een spermatheca dat zich bevindt aan de basis van haar legboor, en al dan niet een spermacel kan toelaten tot het eitje wanneer het gelegd gaat worden. Dit verklaart waarom in veel vliesvleugeligen het aantal mannetjes veel kleiner is dan het aantal vrouwtjes: moeders leggen meer bevruchte dan onbevuchte eitjes. Deze eigenschap heeft er waarschijnlijk toe bijgedragen dat er in sommige groepen sociale structuren zijn

geëvolueerd. In sociale insecten bestaan de volkeren voor een groot deel uit (steriele) vrouwelijke werksters. Er is bij de honingbijen van het geslacht *Apis* één uitzondering bekend, namelijk de 'Kaapse bij', *A. mellifera capensis*. Bij deze in Zuid-Afrika voorkomende ondersoort kunnen bepaalde werksters onbevuchte eieren leggen, die zich ontwikkelen tot koninginnen die tot paring in staat zijn en daarna bevruchte eieren kunnen leggen (Verma & Ruttner 1983).

De derde conclusie is dat de geslachtsbepalende functie van een bijencel een verworven eigenschap is. Dit is grotendeels onjuist; een onbevucht haploïd eitje wordt een mannetje (dar) en een bevrucht diploïd eitje wordt een vrouwtje (koningin of werkster). Wat nog niet vastligt, is of een diploïde ei zich zal ontwikkelen tot een koningin of een steriele werkster. Dit wordt wel bepaald door de omgeving, namelijk de hoeveelheid voedsel die de werksters aandragen voor de larven (Haydak 1943). Meestal groeien er maar enkele koninginnen op in een honingbijenkolonie en ontwikkelen alle andere bevruchte eitjes zich tot werksters. De differentiatie tussen werkster en koningin zou dus beschouwd kunnen worden als een eigenschap van de bijencel bepaald door de voedselvoorziening van de werkster. Het verschil tussen een dar en een werkster of koningin ligt echter al vast op het moment dat een eitje wordt gelegd en kan derhalve niet meer veranderen.

De vierde conclusie is dat de honingbijkoningin alleen bevruchte eitjes legt en de werksters via een klierafscheiding het geslacht van deze eitjes bepaalt. Dit is onjuist. De koningin legt zowel onbevuchte als bevruchte eitjes waaruit respectievelijk darren ofwel werksters of een koningin ontwikkelen. Meestal legt ze meer bevruchte dan onbevuchte eitjes wat verklaart waarom er meer werksters dan darren voorkomen in een kolonie. De werksters kunnen met hun voedselvoorziening wel bepalen of een diploïde eitje zich tot een eileggende koningin of steriele werkster ontwikkelt.

Meer kennis over geslachtsbepaling bij honingbijen en andere vliesvleugeligen heeft ook een economisch belang. Vaak zijn het alleen de vrouwtjes die nectar verzamelen en kan de honingproductie verhoogd worden door het aantal vrouwtjes



3. Bijen van het Zuid-Europese ras *Apis mellifera ligustica* hebben brede gele banden op het achterlijf. Deze 'Italiaanse' bijen zijn tegenwoordig vooral in Noord-Amerika sterk verbreid en de meeste commerciële bijenhouders werken daar met deze bijen die onder andere geselecteerd zijn voor resistentie tegen de varroamijt (*Varroa destructor* Anderson & Trueman). (a) Een 'hofstaat' van een koningin (met verfstip) en werksterbijen. De werksters worden aangetrokken door 'koninginnestof', en likken de koningin en bieden haar voedsel. Door dit contact brengt de koningin een beetje 'koninginnestof' over op de hofstaatwerksters. Dit chemisch signaal van de koningin geeft haar aanwezigheid in het volk aan en heeft invloed op de fysiologie van de werksters. De individuele werksters in de hofstaat wisselen zodra de koningin zich verplaatst. (b) Werkster verzamelt nectar van een lavendelbloem in Californië. Foto's: Gary Reuter (a) & Kathy Keatley Garvey (b)

3. Bees of the South-European subspecies *Apis mellifera ligustica* have wide yellow bands on their abdomen. Nowadays, these 'Italian' bees are particularly widespread in North-America where most commercial beekeepers keep this subspecies, which has been selected for resistance against varroa mites (*Varroa destructor* Anderson & Trueman). (a) A retinue of a queen (marked with paint) and workers. A group of workers is attracted by 'queen substance' and they lick and feed the queen. Through this contact some of this queen signal is passed to them. Since the workers in the retinue are replaced as soon as the queen is moving they inform other workers in the colony that the queen is present in the hive. In addition to a behavioural response of workers this chemical signal also results in physiological changes in workers. (b) Worker collecting nectar on a lavender flower in California.



4. De sluipwesp *Nasonia vitripennis* (Walker). (a) Wildtype-vrouwje met donkerpaarse ogen legt haar eitjes in een vliegenpop die dient als voedsel voor de larven, en (b) een oogkleurmutant met felrode ogen. Foto's: Peter Koomen

4. The parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Walker). (a) Wildtype female with dark purple eyes lays her eggs in a fly pupa, which served as food for the larvae, and (b) eye-colour mutant with bright red eyes.

te vergroten. Parasitaire wespen worden veel toegepast als biologische bestrijders. Omdat alleen de vrouwjes plaaginsecten parasiteren kan een verhoging van de productie van vrouwjes bijdragen aan een efficiëntere biologische controle.

Dankwoord

Met dank aan Christopher Starr voor informatie over het werk van Jan Dzierzon, en Marla Spivak en Jackie Park Burris voor het regelen van foto's van de Italiaanse honingbij.

Literatuur

- Beukeboom LW & Perrin N 2014. The evolution of sex determination. Oxford University Press.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE & Omholt SW 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419-429.
- Dickel F 1903. Die Ursachen der geschlechtlichen Differenzierung im Bienenstaat (Ein Beitrag zur Vererbungsfrage). Plügers 'Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Tiere' Bnd95: 66-106.
- Dzierzon J 1845. Ueber die Fortpflanzung der Bienen. In: Gutachten über die von Hrn. Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. *Bienen-Zeitung* 1: 109-13, 119-21.
- Haydak MH 1943. Larval food and development of castes in the honeybee. *Journal of Economic Entomology* 36: 778-792.
- Kuckuck M 1907. Es gibt keine parthenogenesis: Allgemeinverständliche wissenschaftliche Beweisführung. C.F.W. Fest.
- Langstroth LL 1853. On the hive and the honey-bee, a bee-keeper's manual. Hopkins.
- Nachtsheim H 1913. Cytologische Studien über die Geschlechtsbestimmung bei der Honigbienen (*A. mellifera* L.). *Archiv für Zellforschung* 11: 169-241.
- Van Pelt Lechner AA 1903. Over de oorzaak van het sexuele verschil bij de honingbij. *Entomologische Berichten* 1: 70-71.
- Verhulst EC, Beukeboom LW & Van de Zande L 2010. Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. *Science* 328: 620-623.
- Verma S & Ruttner F 1983. Cytological analysis of the thelytokous parthenogenesis in the Cape honeybee (*Apis mellifera capensis* Escholtz). *Apidologie* 14: 41-57.
- Wagner S 1861. The Dzierzon theory. *The American Bee Journal* 1: 5.
- Whiting PW 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* 28: 365-382.
- Woyke J 1963. What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony? *Journal of Apicultural Research* 2: 73-75.

Geaccepteerd: 26 augustus 2015

Summary

Sex determination in honeybees

In the first volume of *Entomologische Berichten* (1903), A.A. van Pelt Lechner contributed a translation of a German article on sex determination in honeybees (*Apis mellifera*). Scientists have been interested for a long time in the question of how the different sexes are determined and why there are different sexes in the first place. The historical article claims that all eggs laid by honeybee queens are fertilized and that a glandular secretion of the workers and the larval cell can influence the sex of honeybee larvae. We now know that all conclusions reported in the article are wrong. Interestingly, the Polish priest Dzierzon showed that honeybee males develop from unfertilized eggs and females from fertilized eggs, even before the article by van Pelt Lechner was published. We also reflect on the current state of knowledge on sex determination in honeybees.



Leo W. Beukeboom

Rijksuniversiteit Groningen
Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences (GELIFES)
Evolutionary Genetics
Postbus 11103
9700 CC Groningen
l.w.beukeboom@rug.nl

M.J. (Rinus) Sommeijer

Winklerlaan 76
3571 Kl Utrecht

Jetske G. de Boer

Wageningen Universiteit
Laboratorium voor Entomologie
Postbus 16
6700 AA Wageningen