

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66825> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Wang, Y.

**Title:** The effects of burying beetle social behaviours on interspecific interactions

**Issue Date:** 2018-11-20

# Chapter 7

## Nederlandse Samenvatting – Summary in Dutch

Darmmicroben in insecten beïnvloeden de gezondheid en ontwikkeling van de gastheer, de effecten van de darmmicroben kunnen zowel positief als negatief zijn in verschillende systemen (1,2). Om mutualistische darmmicroben aan te trekken hebben insecten diverse methodes geëvolueerd. De methodes om de darmmicroben aan te trekken verschillen per insect, sommige zijn sterk afhankelijk van verticale transmissie of van horizontale transmissie (3, 4). Naast mutualistische microben zijn er ook invasieve soorten bekend die het darmsysteem van een insect aanvallen door middel van giftige stoffen en uiteindelijk kunnen leiden tot het overlijden van de gastheer (5–7). Om zich tegen deze pathogenen te verweren hebben insecten verschillende strategieën ontwikkeld in bijvoorbeeld gedrag of expressie van antimicrobiële peptiden (AMPs) (8–10). De insect symbionten kunnen ook de gastheer helpen door andere microben buiten te houden, bijvoorbeeld door het verhinderen van kolonisatie van pathogenen genaamd kolonisatieresistentie (11–13). Deze manier van afweer is positief voor zowel de gastheer als de microbe. (12, 14). Echter is het nog steeds onbekend hoe insecten de kolonisatieresistentie beïnvloeden en of de kolonisatieresistentie voortkomt uit een specifieke samenstelling van microben. Tijdens deze thesis heb ik in de doodgraver *Nicrophorus vespilloides* de associaties tussen insect ecology en zijn microben onderzocht, samen met de effecten van de competitieve interacties in de darmflora en de gevolgen op de gastheer. Mijn studie zal ons de complexe interactie tussen de gastheer en zijn microbiom beter helpen begrijpen.

De doodgraver *N. vespilloides* (Coleoptera, Silphidae) is een holometabool insect welke een volledige metamorfose ondergaat. Deze kever broedt op ontbindende kadavers waar ze in aanraking komen met een groot, divers scala bacteriële populaties (15). De microben van de kadavers kunnen de darmen van de keverlarve infecteren met als gevolg een achtergestelde ontwikkeling (16). Opmerkelijk is de ouderlijke zorg die de kevers geven, zowel voor als na het uitbroeden, welke resulteert in een lagere kans op besmetting met microben. Voorbeelden van deze zorg zijn het uitscheiden van antimicrobiële stoffen die het kadaver modificeren en het veranderen van het voedsel voor de

larven door middel van regurgiteren (15, 17). In deze thesis heb ik onderzocht of de microbiële interacties in de darmen van *N. vespilloides* ook bijdragen aan de antimicrobiële strategieën. Zo heb ik kunnen verduidelijken hoe de ouderlijke zorg het overdragen van de darmmicroben faciliteert op een ontwikkelende keverlarve in bijzijn van een karkas met hoge bacterie dichtheid. Buiten de microbiële interacties wordt *N. vespilloides* ook geassocieerd met mijten en nematoden. Door de interacties met nematoden, te onderzoeken heb ik in deze thesis veel interspecifieke interacties tijdens de ontwikkeling van insecten kunnen bestuderen en zo de effecten op de *Nicrophorus* ecologie kunnen vaststellen.

Risico van omgevings microben op de fitness van *N.vespilloides* tijdens het eier stadium.

In **hoofdstuk 2** heb ik beschreven hoe microben de levensvatbaarheid van *N.vespilloides* eieren beïnvloeden door de milieublootstelling aan bacteriën te variëren. Een langere blootstelling aan aas resulteerde in een gereduceerde levensvatbaarheid. Door de eieren nablootstelling te steriliseren kan het negatieve effect op levensvatbaarheid ongedaan worden gemaakt, wederom blootstellen aan aas resulteerde opnieuw in verlaagde levensvatbaarheid. Vervolgens heb ik onderzocht of de *Nicrophorus* eieren het aangeboren immuunsysteem uiten. Eerst heb ik vastgesteld dat *Nicrophorus* eieren een immunologische actief serosa bevatten. Vervolgens is de gemedieerde immuunrespons van de serosa gekwantificeerd door het toedienen van bacteriële infecties. Verrassend en in tegenstelling tot andere insecten (18), vond ik dat de serosa de productie van AMP niet lijkt te reguleren. Deze bevinding wijst erop dat een immuunrespons afwezig is in de eieren. Bovendien vertonen *Nicrophorus* eieren een beperkte afweer tegen uitdroging, uitdroging wordt ook gereguleerd door de serosa. In een evolutionaire context lijkt de ontwikkeling van *N.vespilloides* veel op die van *Drosophila melanogaster* (19), een snelle ontwikkeling staat centraal en dit gaat ten koste van de aangeboren immuunrespons.

Ouderlijke zorg faciliteert de overdracht van darm microben in *N.vespilloides*

In **hoofdstuk 3** heb ik de ouderlijke zorg voor nakomelingen van *N.vespilloides* gemanipuleerd. Hierbij volgde ik de dynamiek van de darmmicrobioom kolonisatie kijkend naar bacteriële dichtheid en compositie

gedurende de ontwikkeling. Door MALDI-TOF Biotyping en 16s rDNA-sequencing te combineren heb ik aangetoond dat het microbiom van de larvale darm een vergelijkbare dynamiek ondergaat in termen van dichtheid, ongeacht de duur van de ouderlijke zorg. De samenstelling van bacteriën wordt echter wel sterk bepaald door ouderlijke zorg. Ook ontdekte ik een stadium tijdens de verpopping waarin de larve volledig steriel worden. Na dit stadium en tijdens het ontpoppen worden de kevers gekoloniseerd door de bacteriën die aanwezig zijn op de muur van de poppenkamer. Hierdoor heb ik kunnen vaststellen dat de ouderlijke zorg voor het uitkomen van de eieren de kolonisatie en overdracht van de darm microben niet alleen faciliteren maar ook verzekerd. Bij volledige afwezigheid van ouderlijke zorg koloniseren grotendeels bacteriën uit het nabije milieu de darm van *N.vespilloides*. Deze resultaten samen suggereren een competitieve interacties binnen de *N.vespilloides* darmflora een rol kunnen spelen bij de kolonisatie en bestendigheid van de darm microben.

Kolonisatieresistentie functioneert in de bestendigheid van darmbacteriën en verstrekt resistentie tegen pathogenen.

In **hoofdstuk 3** hebben we geconcludeerd dat in de larvale darm van *N.vespilloides* het endogene microbiom het microbiom van het degraderende karkas weg concurreert. In **hoofdstuk 4** was ik in staat deze hypothese te testen door gebruik te maken van in vivo competitie analyses. Het experiment is uitgevoerd met vier bacteriesoorten. *Providencia rettgeri* en *Morganella morganii* zijn bacteriesoorten die een veel voorkomen in de darm van *Nicrophorus*. De bacteriesoorten *E.coli* en de pathogeen *Serratia marcescens* (20) komen veel voor in de leefomgeving van *Nicrophorus*. Eerst heb ik alle vier de bacteriestammen gescheiden geïnoculeerd in *N.vespilloides* larve, hierdoor kon ik aantonen dat de bacteriesoorten variëren in hun kolonisatie vermogen binnen de darm. Vervolgens heb ik, gelijktijdig aan dit experiment, larven geïnoculeerd met een combinatie of serie van verschillende bacterie. Met dit experiment heb ik aangetoond dat endogene soorten in de *Nicrophorus* darm significant beter overleven dan uitheemse soorten, ongeacht de volgorde van enten. Zo kon ik bevestigen dat de *N.vespilloides* darmbacterien resistentie bieden tegen kolonisatie van de pathogeen *S. marcescens*. Om de potentiële voordelen van deze kolonisatieresistentie verder te verhelderen en te bepalen heb ik de fitness effecten van de inheemse darmflora bij het ontwikkelen van de larven gekwantificeerd. De resultaten

tonen aan dat *N.vespilloides* profiteert van de darm microbiom door de fitness van zowel de larve als de ouder te vergroten. Deze resultaten bespreek ik in zowel een ecologische als een evolutionaire context. Hierbij suggereer ik dat ouderlijk gedrag, microbiële competitie en de interactie daartussen een invloed hebben op de transmissie en kolonisatie van de *Nicrophorus* darm microbiom.

### Involed van phoretic nematoden op *N.vespilloides* fitness

In het laatste experimentele deel van mijn thesis, **hoofdstuk 5**, leg ik de focus op de interspecifieke interacties tussen *N.vespilloides* en nematoden. Door gebruik te maken van een microscopische telling heb ik het aantal nematoden in zowel wilde als lab kever monsters kunnen kwantificeren. In deze telling heb ik geen significant verschil kunnen aantonen tussen de nematoden dichtheid tussen mannen en vrouwen kevers. Vervolgens heb ik vastgesteld dat de phoretic nematoden in *N.vespilloides* van het soort *Rhabditoides regina* zijn. Ook karakteriseerde ik de effectiviteit van de overdracht van nematoden over verschillende partners en generaties. Mijn resultaten tonen aan dat de overdracht van nematoden op *N.vespilloides* plaatsvindt tijdens het broeden, dit kan tijdens het paren zijn of van ouder op nakomeling. Het is noemenswaardig dat de overdracht van nematoden van ouder naar nakomeling kan plaatsvinden onder een extreem lage waarde van ~ 10 wormen. De overdracht van wormen van parende volwassenen heeft een drempel van ~ 100 wormen. Ten slotte schatte ik het effect van verschillende beginnende nematoden dichtheid op de larvale fitness en toonde ik aan dat de negatieve effecten van nematoden op *N.vespilloides* larve zelfs al bij een zeer lage inoculatie grootte worden waargenomen.

### Conclusie

In deze thesis toon ik aan dat er verticale transmissie van de darmmicrobiota, van ouders naar nakomeling, plaatsvindt en aanhoudt tijdens de ontwikkeling in de soort *N.vespilloides*. Vervolgens demonstreer ik het klaarblijkelijk mutualisme tussen *N.vespilloides* en hun darm-symbionts. Een merkwaardige bevinding is dat kolonisatieresistentie een belangrijke rol speelt in de transmissie en kolonisatie van *N.vespilloides* darmmicrobiota. Ten slotte beschrijf ik een nieuwe phoretic nematode soort, *R. regina*, welke ik in verband breng met *N.vespilloides* en de fitness van deze kever significant verlaagt. Mijn gegevens

dragen bij aan een beter begrip van de relatie tussen de ouderlijke zorg door insecten en de sociale overdracht van nuttige darmbacteriën. Toekomstige studies zullen licht werpen op de mechanismen die het gastheer-symbiont mutualisme in dit modelsysteem reguleren.

## References

1. Macke E, Tasiemski A, Massol F, Callens M, Decaestecker E. 2017. Life history and eco-evolutionary dynamics in light of the gut microbiota. *Oikos* 126:508–531.
2. Engel P, Moran NA. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37:699–735.
3. Drown DM, Zee PC, Brandvain Y, Wade MJ. 2013. Evolution of transmission mode in obligate symbionts. *Evol Ecol Res* 15:43–59.
4. Russell J a, Moran N a. 2005. Horizontal Transfer of Bacterial Symbionts : Heritability and Fitness Effects in a Novel Aphid Host Horizontal Transfer of Bacterial Symbionts : Heritability and Fitness Effects in a Novel Aphid Host. *Appl Environ Microbiol* 71:7987–7994.
5. Ruiu L. 2015. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects* 6:352–367.
6. Miyoshi S, Shinoda S. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2:91–98.
7. Wong ACN, Luo Y, Jing X, Franzenburg S, Bost A, Douglas AE. 2015. The host as the driver of the microbiota in the gut and external environment of *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol* 81:6232–6240.
8. Zhukovskaya M, Yanagawa A, Forschler B. 2013. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. *Insects* 4:609–630.
9. Dimarcq JL, Zachary D, Hoffmann J a, Hoffmann D, Reichhart JM. 1990. Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipteracin, in *Phormia terranova*. *EMBO J* 9:2507–2515.
10. Hui-Yu Yi, Munmun Chowdhury, Ya-Dong Huang and X-QY. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5807–5822.
11. Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Aguiar-Martins K, Al Salem WS, Cavalcante RR, Dillon VM, Bates PA, Genta FA, Dillon RJ. 2014. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from

bacterial infection. *Parasit Vectors* 7:329.

12. Mohanraj P, Subramanian S, Muthuswamy M. 2009. Assessment of colonization resistance in silkworm, *Bombyx mori* L. using molecular marker tagged *Escherichia coli*. *Karnataka J Agric Sci* 22:519–520.

13. Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK. 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol Lett* 8:1291–1298.

14. Charlie G. Buffie, Pamer EG. 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 13:790–801.

15. Eggert A-K, Reinking M, Mu JK, Ller. 1998. Parental care improves offspring survival and growth in burying beetles. *Anim Behav* 55:97–107.

16. Rozen DE, Engelmoer DJP, Smiseth PT. 2008. Antimicrobial strategies in burying beetles breeding on carrion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17890–17895.

17. Scott MP. 1998. The ecology and behaviour of burying beetles. *Annu Rev Entomol* 43:595–618.

18. Jacobs CGC, Spaink HP, van der Zee M. 2014. The extraembryonic serosa is a frontier epithelium providing the insect egg with a full-range innate immune response. *Elife* 3:1–21.

19. Jacobs CGC, Van Der Zee M. 2013. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Dev Comp Immunol* 41:263–269.

20. Flyg C, Kenne K, Boman HG. 1980. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* 120:173–181.