



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Of moths, mites and microbes - The role of bacteria in the life history of two arthropod herbivores

Staudacher, H.

Publication date

2016

Document Version

Final published version

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Staudacher, H. (2016). *Of moths, mites and microbes - The role of bacteria in the life history of two arthropod herbivores*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Summary

Bacteria are omnipresent in nature and a multitude of associations between bacteria and higher organisms (plants, animals and fungi) have been described. The effect of bacteria can vary from beneficial to neutral to detrimental as for the fitness of the organism with which the bacteria are associated. In this thesis, I investigated the bacterial communities as well as pathogenic and non-pathogenic effects of bacteria on life history traits of two generalist herbivorous arthropods. In the noctuid moth *Heliothis virescens*, I described the variability of bacterial communities that are associated with this moth in the laboratory and the field (CHAPTER 2). Furthermore, I determined the effect of immune challenge on mating success, female sex pheromone composition and oviposition strategy (CHAPTERS 3 & 4). In the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, I investigated the bacterial communities of two of its strains, as well as the effects of *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* on mite survival and oviposition, mite gene expression and the induction of tomato responses after mite feeding (CHAPTER 5).

In CHAPTER 2, I describe the variability of bacterial communities that are associated with the moth *H. virescens* that was determined by using bacterial tag-encoded FLX pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. Bacterial communities varied between *H. virescens* larvae that had fed on different host plants and between larvae originating from the field and those from laboratory rearing. Notably, while larvae from the laboratory contained an unidentified *Enterococcus* strain in high relative amounts, this bacterial strain was absent in field larvae. Moreover, field larvae contained a more diverse bacterial community than larvae from the laboratory. Bacterial communities also varied between biological replicates in larvae from the field and between moths of different developmental stages, i.e., eggs, larvae and female adults. Overall, the variability of bacterial communities in *H. virescens* suggests that this moth has not evolved a long-term, stable symbiosis with the detected bacteria. Whether bacteria that are transiently present in these moths have a beneficial effect on fitness and may for instance support host plant utilization remains to be investigated.

In CHAPTER 3, I show sexual dimorphism in immune system activation of the moth *H. virescens* in response to an immune challenge with dead cells of the bacterial entomopathogen *Serratia entomophila*. When measuring expression levels of immunity-related genes, females showed higher immune deployment, i.e., immune system activation in response to a pathogenic threat, whereas males had higher immune maintenance, i.e., their immune system was at a higher basic level of immune defence than females. Furthermore, the female immune response seemed to differentiate more between wounding and bacterial challenge, suggesting a more specific and possibly more cost-efficient immune response than the male immune system. Sexual dimorphism in immune response matched the results from mating experiments: bacteria-challenged females had lower mating success than non-

challenged females, while males showed no differences in mating success between bacteria-challenged, wounded or non-challenged males. This suggests that females trade off immunity for mating success, while males do not. Lastly, the sex pheromone composition of bacteria-challenged females differed from that of non-challenged and wounded females, suggesting that females may trade off immunity for sexual signalling, although the differences in female sex pheromone cannot explain the differences in mating success between females. Overall, the observed difference in the type of immunity between males and females adds a new dimension to the research of sexual dimorphism in immunity.

In CHAPTER 4, I demonstrate that immune challenge with dead cells of the bacterial entomopathogen *S. entomophila* affects the oviposition strategy of *H. virescens*. Females increased their oviposition rate in response to bacterial challenge. Notably, bacteria-challenged females had shorter life spans, but did not lay significantly fewer eggs than control females, indicating that bacteria-challenged females can compensate for a shorter life-span. However, bacteria-challenged females were less selective in terms of oviposition site than control females. Bacteria-challenged females laid equal numbers of eggs on plants that were infested with *H. virescens* larvae as on uninfested plants, whereas control females preferred uninfested plants. Since *H. virescens* larvae are cannibalistic and infested plants can be expected to have higher levels of secondary plant metabolites, non-preference of bacteria-challenged females likely has a negative effect on female fitness. The strategy of *H. virescens* females to increase their oviposition rate after an immune-challenge, which may compensate for a shortened life span, might thus come at the cost of reduced growth and survival of their offspring.

In CHAPTER 5 it is shown that various (endo)symbiotic bacteria of *T. urticae*, i.e., *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma*, affect mite survival and oviposition, and mite gene expression as well as induced responses of tomato, the mite's host plant, after mite feeding. These effects were investigated in two strains of *T. urticae*, one plant defence suppressor strain (DeLier-1) and one plant defence inducer strain (Santpoort-2) which contained different endosymbionts: while the suppressor strain harboured *Wolbachia* (W) and *Spiroplasma* (S), the inducer strain harboured *Cardinium* (C) and *Spiroplasma* (S). By means of antibiotic treatment, different mite groups were produced, containing or not containing W and S or C and S.

In the suppressor strain, the presence of *Wolbachia* was associated with higher survival of the mites, and higher expression of digestion- and detoxification-related genes, compared to mites that did not contain *Wolbachia*. Additionally, mites with *Wolbachia* reduced salicylic acid (SA) levels in tomato leaflets compared to leaflets that were infested with mites that contained only *Spiroplasma*. Further, *Spiroplasma* was associated with reduced JA-precursor [12-oxophytodienoic acid (OPDA)] levels in tomato leaflets, while *Wolbachia* had the opposite effect.

In the inducer strain, mites that contained *Cardinium* and *Spiroplasma* had lower survival, laid lower amounts of eggs and fed less than mites that did not

Summary

contain the two bacterial strains. Moreover, leaflets that were infested with C+S+ mites had higher expression of SA-marker genes, and leaflets accumulated lower amounts of abscisic acid (ABA), than leaflets infested with mites without these bacteria. Further, C+S+ mites caused rusty/red feeding scars, while C-S- mites caused white feeding scars. Overall, *Wolbachia* seems to be beneficial for the mites, while *Cardinium* is likely a parasite. Even though the role of *Spiroplasma* is less clear, the results suggest that *Spiroplasma* may interact with *Wolbachia* in the suppressor strain, as *Wolbachia* seems to counteract the effects of *Spiroplasma*.

Samenvatting

Bacteriën zijn alom aanwezig in de natuur en derhalve bestaat er een grote verscheidenheid aan associaties tussen bacteriën en hogere organismen (planten, dieren en schimmels). Effecten van bacteriën kunnen variëren van gunstig tot neutraal en schadelijk voor het organisme waarmee de bacteriën geassocieerd zijn. In dit proefschrift heb ik de samenstelling van de bacteriële gemeenschappen en de pathogene en niet-pathogene effecten van bacteriën op de levensgeschiedenissenmerken van twee generalistische geleedpotigen onderzocht. In de nachtvlinder *Heliothis virescens* heb ik de variabiliteit van de aanwezige bacteriële gemeenschappen in het veld en in het laboratorium in kaart gebracht (HOOFDSTUK 2). Ook heb ik het effect van een immuunuitdaging (d.w.z. een infectie) op het paringssucces en de samenstelling van het seksferomoon in vrouwtjes en hun ovipositie-strategie bepaald (HOOFDSTUKKEN 3 en 4). In twee lijnen van de spintmijt *Tetranychus urticae* heb ik de bacteriële gemeenschappen onderzocht en heb ik bepaald wat de effecten van *Wolbachia*, *Cardinium* en *Spiroplasma* bacteriën zijn op de overleving, ovipositie en gen-expressie van de gastheer en op de inductie van de reactie van tomatenplanten die door mijten zijn aangevreten (HOOFDSTUK 5).

In **HOOFDSTUK 2** beschrijf ik de variabiliteit van bacteriële gemeenschappen die geassocieerd zijn met *H. virescens*; de bacteriën werden moleculair-genetisch getypeerd met behulp van zogenoemde bacteriële tag-gecodeerde FLX pyrosequencing van 16S rRNA amplicons. De bacteriële gemeenschappen verschilden tussen *H. virescens* rupsen die gegeten hadden op verschillende planten en tussen rupsen uit het veld vergeleken met die uit het laboratorium. Verder bleek dat rupsen uit het laboratorium voornamelijk veel van een ongeïdentificeerde *Enterococcus*-soort bevatten, terwijl deze soort afwezig was in rupsen uit het veld. Rupsen uit het veld bevatten ook een meer diverse bacteriële gemeenschap dan rupsen uit het laboratorium. Aangezien de bacteriële gemeenschappen tussen biologische replicas van rupsen uit het veld en tussen verschillende ontwikkelingsstadia (eieren, rupsen en volwassen vrouwtjes) nogal varieerden, lijkt het erop dat in deze nachtvlinder geen stabiele, langdurige symbiose is ontwikkeld met de gevonden bacteria. Of de tijdelijk aanwezige bacteriën een gunstig effect hebben op de fitness van de nachtvlinders, doordat ze bijvoorbeeld betrokken zijn bij het verteren en ontgiften van voedsel zodat de rupsen op planten kunnen leven die in afwezigheid van de bacteriën niet geschikt zouden zijn, zal verder onderzocht moeten worden.

In **HOOFDSTUK 3** toon ik aan dat, wanneer volwassen *H. virescens* geïnjecteerd worden met dode cellen van de bacteriële entomopathogeen *Serratia entomophila*, de motten een sekse-specifieke activatie van het immuun-systeem laten zien. Bij het meten van de expressie-niveaus van immuun-gerelateerde genen vertoonden vrouwtjes een hogere activatie dan mannetjes, terwijl mannetjes een hogere handhaving van het immuunsysteem vertoonden, d.w.z. hun immuunsysteem had een hoger basis

expressie-niveau dan dat van vrouwtjes. Bovendien leek de immunrespons in vrouwtjes meer te differentiëren tussen verwonding op zich (injectie met controlestof) en een bacteriële injectie, hetgeen een specifiekere en mogelijk kosten-efficiëntere immunrespons in vrouwtjes dan in mannetjes suggereert. Dit sekse-specifieke onderscheid in immunrespons kwam overeen met de resultaten van de parings-experimenten: met bacterie geïnjecteerde vrouwtjes hadden een lager paringssucces dan niet-geïnjecteerde vrouwtjes, terwijl het paringssucces van mannetjes niet verschilde tussen bacterieel-geïnjecteerde, gewonde of niet-geïnjecteerde mannetjes. Dit suggereert dat vrouwtjes een balans vertonen tussen immuniteit en seksuele aantrekkingskracht, hoewel de verschillen in paringssucces niet verklaard kunnen worden door verschuivingen in het seksferomoon van het vrouwtje. De gevonden verschillen in immuniteit tussen vrouwtjes en mannetjes voegen een nieuwe dimensie toe aan het onderzoek naar sekse-specifieke immuniteit.

In **HOOFDSTUK 4** toon ik aan dat activatie van het immuunsysteem met dode cellen van de bacteriële entomopathogeen *S. entomophila* het ovipositie-gedrag van *H. virescens* beïnvloedt. Vrouwtjes verhoogden het aantal gelegde eieren na immun-activatie, maar leefden ook korter, zodat ze uiteindelijk dezelfde hoeveelheid eieren legden als niet-geactiveerde vrouwtjes. Dit suggereert dat bacterieel-geïnfecteerde vrouwtjes een kortere levensduur kunnen compenseren door sneller meer eieren te leggen. Dergelijke vrouwtjes waren echter tegelijkertijd minder selectief in hun ovipositiekeuze dan controle-vrouwtjes: de bacterieel-geactiveerde vrouwtjes legden dezelfde hoeveelheid eieren op planten met *H. virescens* rupsen als op planten zonder die rupsen, terwijl controle-vrouwtjes bij voorkeur hun eieren legden op de niet-aangevreten planten. Omdat *H. virescens*-rupsen kannibalistisch zijn, en met rupsen bezette planten waarschijnlijk meer secundaire plantenstoffen bevatten (als verdedigingsreactie van de plant op de insectenvraat), heeft het ontbreken van keuzegedrag van geïnfecteerde vrouwtjes hoogstwaarschijnlijk een negatief effect op de fitness van deze vrouwtjes. De strategie van *H. virescens* vrouwtjes om meer eieren te leggen na een immun-activatie, hetgeen kan compenseren voor een verkorte levensduur, gaat dus waarschijnlijk ten koste van een verminderde groei en overleving van hun nakomelingen.

In **HOOFDSTUK 5** beschrijf ik dat verschillende (endo)symbiotische bacteriën van de mijt *T. urticae*, in het bijzonder *Wolbachia*, *Cardinium* en *Spiroplasma*, de overleving en ovipositie van mijten beïnvloeden, evenals hun gen-expressie patronen en, na mijtenvraat, ook geïnduceerde responsen in tomaat, een waardplant van de mijt. Deze effecten zijn in twee mijten-lijnen onderzocht, een plantenafweer-onderdrukkende lijn (DeLier-1) en een plantenafweer-inducerende lijn (Santpoort-2), lijnen die verschillende endosymbionten bevatten: terwijl de onderdrukkende lijn *Wolbachia* (W) en *Spiroplasma* (S) bevat, herbergt de inducerende lijn *Cardinium* (C) en *Spiroplasma*. Door de mijten te behandelen met antibiotica konden verschillende groepen mijten geproduceerd worden, die wel of niet W en S of C bevatten.

In de onderdrukkende lijn was de aanwezigheid van *Wolbachia* (W+) geassocieerd met hogere overleving van de mijten en een hoger expressieniveau van verterings- en detoxificatie-gerelateerde genen, vergeleken met mijten zonder *Wolbachia* (W-). Ook verlaagden W+ mijten salicylzuur (SA)-niveaus in tomatenbladeren vergeleken met tomatenbladeren die met S+ mijten geïnfecteerd waren. De aanwezigheid van *Spiroplasma* was geassocieerd met gereduceerde niveaus van 12-oxofytodienoisch zuur, een voorloperstof van jasmonzuur, in tomatenbladeren, terwijl *Wolbachia* juist het tegenovergestelde effect hadden.

In de inducerende mijtenlijn hadden mijten met *Cardinium* en *Spiroplasma* (C+S+) een lagere overleving, legden ze minder eieren en vraten ze minder dan mijten die deze bacteriën niet bevatten. Bovendien vertoonden bladeren die geïnfecteerd waren met C+S+ mijten een hogere expressie van SA-merker genen en accumuleerden deze bladeren lagere hoeveelheden abscisinezuur dan bladeren met C-S- mijten. Ook veroorzaakten C+S+ mijten roestige, rode vraat-littekens, terwijl C-S- mijten juist witte vraat-littekens veroorzaakten. Kortom, de aanwezigheid van *Wolbachia* lijkt gunstig te zijn voor de mijten, terwijl *Cardinium* een parasiet lijkt te zijn. Hoewel de rol van *Spiroplasma* minder duidelijk is, suggereren de resultaten dat *Spiroplasma* en *Wolbachia* elkaar beïnvloeden in de onderdrukkende mijtenlijn, aangezien *Wolbachia* de effecten van *Spiroplasma* lijkt tegen te werken.