

Abstract (English)

In this doctoral research, we explore several candidate genes involved in the behaviour of different insect models. The selected genes comprise the *foraging* gene, involved in food-related plasticity, the circadian clock genes regulating the daily behavioural pattern as well as playing a role in reproduction and the *fruitless* gene that regulates male courtship and copulation behaviour. The function of these genes was studied in three distinct insect models. The first insect model, the desert locust *Schistocerca gregaria*, is known for its ability to undergo a phase transition. Normally, they live as solitary animals but under certain environmental conditions, they become crowded and form enormous destructive swarms. The other models insects both are social insect species, *in casu* the common wasp *Vespula vulgaris* and the bumblebee *Bombus terrestris*. These have a remarkable altruistic division of labour where different workers of the colony display very different behaviours. In wasp colonies, workers will perform different tasks as they grow older and in bumblebee nests, this task allocation is dictated by the size of the workers as small workers are nurses and bigger workers are foragers.

As the function of the *foraging* gene in food-related behaviour is already established, it is a good candidate gene to study in the three insect species as they all display an interesting food-related plasticity. A *foraging* homologue was cloned in the three species and each sequence was used to study gene expression. We found a higher expression in *Vespula* nurses as compared to foragers and a higher expression in *Bombus* foragers as compared to same-aged nurses. This is concurrent with results in other social insects. More importantly, our results reveal an age-dependent expression in both foraging and nursing bumblebees which suggests that this gene is important in learning and memory processes leading to differences in behaviour.

The qPCR profiling studies in the desert locust clearly indicate that the *Sgfor* encoded cGMP protein kinase is important in food-related processes, development and phase polymorphism. The observation of decreasing *Sgfor* levels in subsequent larval stages suggests that the assumed role of PKG in the learning of the bumblebee can be extrapolated to the desert locust. We also observed higher *Sgfor* levels in the brains of gregarious larval locusts compared with adult locusts. Since

gregarisation of isolated locusts clearly affects the expression of *PKG* in the locust brain and thoracic ganglia, we suggest a role for PKG in the onset to gregarisation, probably through the downstream processing of external stimuli.

We provide evidence for the existence of a *Drosophila*-like circadian clock in the desert locust. Our results also indicate that there is no difference in the clock machinery between gregarious and solitary locusts. *Clock* displays a diurnal expression pattern in anti-phase of the pattern of *period* and *timeless* and the expression of both *per* and *tim* changes when one of the two genes is silenced using RNAi which indicates that they are involved in the same part of a regulatory feedback loop. As in *Drosophila*, *clk* expression is not influenced by *tim* and *per*. Importantly, we were able to reduce the female reproductive capacity by inducing a dsRNA mediated knockdown of *per* or *tim*. Remarkably, *clk* dsRNA treatment caused the death of all injected locusts. Further research should elucidate the exact role of the *clk* gene in *Schistocerca gregaria* and whether *per* and *tim* also can influence the male reproductive capacity.

The third gene under investigation in this thesis is the *fruitless* gene that is known to influence the normal courtship behaviour in male fruit flies. We found a partial *fru* sequence in an available locust EST-database and demonstrated its expression in the brain, testes and accessory glands. RNAi knockdown resulted in a hampered courtship behaviour and a decreased number of offspring from females that mated with RNAi-treated males. We suspect this could be due to changes in the seminal fluid content or a decreased number of spermatozoa.

Our results confirm very interesting functions for the selected candidate genes in different behavioural aspects in insects. It can form the foundation for further research to understand polyethism, phase transition and the food-related plasticity that is inherent to these two phenomena. It also gives rise to a new angle in locust pest control research as influencing their reproductive capacity is possibly an interesting way to prevent the formation of locust swarms.

Abstract (Nederlands)

In dit doctoraatsonderzoek werden verschillende kandidaatgenen onderzocht die een rol spelen in het gedrag van verscheidene insectmodellen. De geselecteerde genen omvatten het *foerageergen* dat betrokken is in voedselgerelateerde plasticiteit, de circadiane klokgenen die naast de regulatie van het dagelijkse gedragspatroon ook een rol vervullen in de voortplanting en het *fruitlessgen* dat de mannelijke hofmakerij en hun copulatiegedrag regelt. De functie van deze genen werd bestudeerd in drie verschillende insectmodellen. Het eerste insectmodel is de woestijnsprinkhaan *Schistocerca gregaria*, gekend vanwege zijn vermogen om een faseovergang te ondergaan. Normaal gezien leven deze sprinkhanen een solitair leven, maar onder bepaalde omstandigheden zullen ze aggregeren en grote zwermen vormen die uitgestrekte gebieden landbouwgewassen vernietigen. De gewone wesp *Vespula vulgaris* en de hommelmel *Bombus terrestris* zijn twee sociale insecten. Hun opmerkelijk altruïstische werkverdeling houdt in dat verschillende werkers binnen één kolonie heel verschillende gedragingen vertonen. In wespkolonies zullen werkers verschillende taken uitvoeren naarmate ze ouder worden. Op jonge leeftijd vervullen de werkers nestgerelateerde taken terwijl oudere werkers foerageren voor voedsel. In een hommelmel is de taakverdeling bepaald door de grootte van de werkers. Kleine werkers (*nurses*) zullen huishoudelijke taken op zich nemen in het nest en de grote werkers zullen foerageren.

De functie van het *foerageergen* in voedselgerelateerd gedrag werd al uitgebreid gedocumenteerd. Omdat de drie in deze thesis bestudeerde insecten een interessante voedselgerelateerde plasticiteit vertonen, is het *for* gen een goed kandidaat gen om te bestuderen in deze insecten. Voor elk van de drie insectensoorten werd een *foerageergen*homoloog gekloneerd dat dan gebruikt kon worden om de genexpressie te bestuderen. We vonden een hogere expressie in *Vespula nurses* vergeleken met de foerageersters en een hogere expressie in *Bombus* foerageersters vergeleken met even oude *nurses*. Onze resultaten bevestigen de resultaten in andere sociale insecten die al aantoonde dat de expressie van het *for* gen differentieel is tussen werkers van verschillende castes.

Innoverend zijn de resultaten die aantonen dat de expressie in zowel hommelmel *nurses* als foerageersters daalt met de leeftijd. Dit wijst op een rol voor het *foerageergeen* in leerprocessen die gerelateerd zijn aan verschillen in het werkstergedrag.

De qPCR experimenten in de woestijnsprinkhaan geven aan dat het cGMP afhankelijk proteïne kinase belangrijk is in voedselgerelateerde processen, ontwikkeling en het verschil tussen solitaire en gregaire dieren. De correlatie tussen de dalende *Sgfor* expressie en de opeenvolgende larvale stadia wijst erop dat de voorgestelde rol voor PKG in het leren bij de hommelmel ook valabel blijkt in de woestijnsprinkhaan. We vonden verhoogde *Sgfor* niveaus in de hersenen van gregaire larvale sprinkhanen en vermits de gregarisatie van solitaire sprinkhanen de expressie van *PKG* in de hersenen en thoracale ganglia beïnvloedt, suggereren wij een rol voor PKG in het vroege begin van de gregarisatie, waarschijnlijk door het vertalen van bepaalde externe stimuli.

Onze resultaten leveren bewijs voor het bestaan van een circadiane klok van het *Drosophila* type in de woestijnsprinkhaan. Wij vonden geen verschil in klokmechanisme tussen solitaire en gregaire sprinkhanen. *Clock* vertoonde een diurnaal expressiepatroon in anti-fase met het patroon van *period* en *timeless* en de expressie van zowel *per* en *tim* veranderde wanneer één van beiden werd uitgeschakeld met behulp van RNAi wat doet vermoeden dat ze deel uitmaken van hetzelfde deel van de regulatorische feedbacklus. Zoals in *Drosophila* werd de *clk* expressie niet beïnvloed door *per* en *tim*. Door een dsRNA gemedieerde daling van de *per* of *tim* expressie daalde de vrouwelijke reproductieve capaciteit. Opmerkelijk was dat dieren die geïnjecteerd werden met *clk* dsRNA allen voortijdig stierven. Verder onderzoek is nodig om de exacte rol van *clk* in *Schistocerca gregaria* te definiëren en om de eventuele invloed van *per* en *tim* op de mannelijke reproductieve capaciteit te ontdekken.

Het derde gen onderzocht in deze thesis is het *fruitless* gen dat in mannelijke fruitvliegen de normale hofmakerij beïnvloedt. In een beschikbare woestijnsprinkhaan EST databank was een gedeeltelijke *fru* sequentie aanwezig die expressie vertoont in de hersenen, testes en accessorische klieren. *Fru* RNAi veroorzaakte een verstoord copulatie gedrag in mannetjes en een verminderd aantal nakomelingen bij vrouwtjes die elk gepaard hebben met een RNAi-behandeld

mannetje. Wij vermoeden dat dit veroorzaakt wordt door een verandering in de samenstelling van de zaadvloeistof of een daling van het aantal spermatozoa.

De voorgestelde resultaten bevestigen de interessante functies van de geselecteerde kandidaatgenen in verschillende gedragsaspecten van insecten. Dit vormt de basis voor verder onderzoek naar polyethisme, faseovergang en de voedselgerelateerde plasticiteit die inherent is aan deze fenomenen. Het geeft ook een nieuwe invalshoek voor het onderzoek naar de voortplanting van de woestijnsprinkhaan en de beperking daarvan om alzo de vorming van sprinkhanenplagen te helpen voorkomen.