

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Nagyfejű csajkók (*Lethrus apterus*) génexpressziójának vizsgálata az utódgondozó viselkedés szempontjából**

Nagy Nikoletta Andrea

Témavezetők:  
Prof. Barta Zoltán  
Dr. Németh Zoltán



DEBRECENI EGYETEM  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2021



## I. Bevezetés és célkitűzések

Az utódgondozás a szociális viselkedés egyik legösszetettebb formája. Definíció szerint ide tartozik minden olyan szülői jelleg, amely növeli az utód rátermettségét, és feltételezhetően ezen funkció ellátására alakult ki, illetve ez tartja fenn (Smiseth et al. 2012). Az aktuális utódba történő befektetés azonban csökkenti az esélyét, hogy a szülők további utódokba is tudjanak investálni (Trivers 1972). Ennek következtében többféle evolúciós stratégia alakult ki, melyek alapján az élőlényeket négy fő csoportba oszthatjuk: utódgondozás nélküli, csak anyai utódgondozással rendelkező, csak apai utódgondozással rendelkező, valamint kétszülős utódgondozással rendelkező élőlények. A csoportokon belüli diverzitás az utódgondozás szintjében és időtartamában nyilvánul meg. Az evolúcióbiológia egyik kiemelt célja feltárni az utódgondozás eredetét, valamint megérteni ezen viselkedés változatosságának hátterét (Clutton-Brock 1991). Az erre irányuló vizsgálatok egyik fontos eleme a proximális mechanizmusok, köztük a genetikai és fiziológiai folyamatok vizsgálata (Hofmann et al. 2014).

A rovarok között rendkívül változatos formákban jelenik meg az utódgondozó viselkedés, a tojások, illetve a fészek őrzésétől a kikelő utódok aktív ellátásáig. Ennek következtében kiváló modellszervezetekként szolgálhatnak az utódgondozás evolúciójának és genetikai hátterének vizsgálata során (Trumbo 2012). A rovarok osztályán belül, ugyanúgy, ahogy az emlősök és a hüllők esetében, az anyai utódgondozás a legelterjedtebb, azonban találkozhatunk csak apai utódgondozással is az átváltozással (hemimetabolia) fejlődő fajok között, valamint kétszülős utódgondozással, amely a teljes átalakulással (holometabolia) fejlődő rovarok esetében gyakoribb (Gilbert & Manica 2015).

A rovarok utódgondozásának genetikai és hormonális háttere egyelőre alul-kutatott tudományterület. Az eddig megjelent tanulmányok alapján a juvenilis hormon központi szerepet játszik ezen viselkedés szabályozásában, így a vizsgálatok fókuszában a juvenilis hormon, valamint az azzal összefüggésben álló molekulák voltak, például ekdiszteroidok, allatosztatinok, biogén aminok és a neuropeptidek (Trumbo 2002; Panaitof et al. 2016; Cunningham et

al. 2016). A tanulmányok jelentős részében a vizsgált modellszervezet a feketecsápú dögbogár (*Nicrophorus vespilloides*) volt, melynél csak anyai, csak apai és kétszülős utódgondozást is megfigyelhetünk, így ideális alany az utódgondozás változatosságának megértéséhez. Az evolúciobiológiában a komparatív vizsgálatokhoz azonban nélkülözhetetlen, hogy minél több fajról álljon rendelkezésünkre információ. Ezért doktori képzésem során egy új, kétszülős utódgondozással rendelkező modellfaj vizsgálatával igyekeztem bővíteni e viselkedéssel és a genetikai hátterével kapcsolatos információinkat.

A nagyfejű csajkó (*Lethrus apterus* Laxmann, 1770) az alganéjtűró-félék (Geotrupidae) családjába tartozik. Elterjedési területe Magyarországtól a Don-kanyarig húzódik, preferált élőhelyei a sztyeppék (Král et al. 2013). A nagyfejű csajkó kizárólag szaporodási időszakában aktív, amely időjárástól függően március elejétől június elejéig tarthat. Ezen időszak során az egyedek ébredést követően párba állnak, majd a párok közösen kialakítják föld alatti fészküket. A fészkek egy központi járatból és az abból elágazó költőjáratokból áll, melyek egy-egy bölcsőkamrában végződnek (Schreiner 1906). Ezt követően megindul az utódgondozó időszak, mely során a szülők között jól meghatározott munkamegosztás figyelhető meg: a hímek fiatal növényi hajtásokat hordanak a fészkekhez, melyeket a nőstények a bölcsőkamrákban az utódok számára egyesével felhalmoznak. A hímek emellett védik a fészket a betolakodóktól, legyen az kompetitor hím vagy ragadozó (Emich 1884; Schreiner 1906).

Megfigyeléseken alapuló információink a nagyfejű csajkó életmenetéről és szaporodással kapcsolatos viselkedésének változásáról a XIX. század végéről, illetve a XX. század elejéről származnak. Mivel a viselkedésgenetikai vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen, hogy naprakész információ álljon rendelkezésre a tanulmányozott modellszervezetről, első számú tanulmányunkban **(1. tanulmány) egy természetes populáció szaporodási időszaka során terepi megfigyeléseket végeztünk a szülők munkamegosztására vonatkozóan, majd a szaporodási siker becsléséhez a megfigyelt egyedek fészkeiben meghatároztuk az egészséges, kifejlett és az elpusztult utódok arányát.**

Terepi megfigyelésinket követően megkezdtuk a nagyfejű csajkó utódgondozó viselkedésének genetikai vizsgálatait. A modern eszközökkel történő viselkedésgenetikai vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen, hogy a modellfaj genom szekvenciája rendelkezésre álljon. Annak ellenére, hogy a bogarak rendkívül változatos szociális és szaporodási viselkedésüknek köszönhetően kiváló alanyai lehetnének a szociogenetikai tanulmányoknak, eddig összesen alig több, mint egy tucat bogár genomot publikáltak (Cunningham 2020). Ezek között olyan kiemelkedő fontosságú – javarészt kártevő – fajok találhatóak, mint a kukorica-kislisztbogár (*Tribolium castaneum*), és a burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*). A megjelent szekvenciák közül azonban eddig csak kettő utódgondozással, azon belül is kétszülős utódgondozással rendelkező faj, a feketecsápú dögbogár és a szarvas trágyatúró (*Onthophagus taurus*) genomja elérhető. Kettes számú tanulmányunk (**2. tanulmány**) célja a nagyfejű csajkó genom szekvenciájának meghatározása és funkcionális annotációja volt. Ennek során kiemelt figyelmet fordítottunk a szaporodási viselkedéssel kapcsolatos gének azonosítására, melyek kiváló kiindulási pontjai lehetnek az utódgondozás genetikai hátterének vizsgálatában.

A különböző viselkedésformák genetikai, illetve hormonális hátterének vizsgálata gyakran csak néhány génnel kezdődik. A valós idejű kvantitatív PCR az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás, mely hatékonyan képes megmérni alacsony számú célgén expressziós szintjét (Radonić et al. 2004). A módszer egyik kritikus lépése az adatok referencia génekkel történő normalizálása, mellyel a folyamat során felmerülő technikai hibákat lehet kiküszöbölni (Kozera & Rapacz 2013). A referencia gének általában háztartási gének közül kerülnek ki, melyek az alapvető sejtfenntartó funkciókat hivatottak ellátni, így expressziójuk viszonylag állandó. Hármasszámú tanulmányunkban (**3. tanulmány**) a nagyfejű csajkó genom szekvenciáját felhasználva olyan referencia géneket kerestünk, melyeknek kifejeződésére sem a szexon, sem az ivar nincs hatással, mely géneket az utódgondozás és a szülők közötti munkamegosztás genetikai hátterének vizsgálata során tudunk alkalmazni.

A genom szekvencia és a validált referencia gének birtokában az utódgondozó viselkedés genetikai hátterének vizsgálatát egy neuropeptid, az inotocin génexpressziós analízisével kezdtünk meg, amely a rovarokban megtalálható oxitocin/vazopresszin ortológ. E neuropeptidcsalád tagjai számos állatcsoportban megtalálhatóak, köztük a fonálférgekben, a rovarokban, valamint a gerincesekben (Beets et al. 2013). Az ide sorolható peptidek több funkciója konzervált az állatvilágban, melyek közül a legtöbbet vizsgált a vízháztartásban (Hanoune 2010) és az utódgondozás, valamint a szociális kapcsolatok szabályozásában betöltött szerepük (Donaldson & Young 2008). Az inotocin vízháztartásban betöltött funkcióját eddig számos fajban vizsgálták (Muratspahić et al. 2020). Emellett azonban érdekes kérdés lehet, hogy az inotocin vajon részt vesz-e a rovarok szociális, azon belül is utódgondozó viselkedésének szabályozásában. Az állatvilágban megfigyelhető konzervált funkciók alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a nagyfejű csajkóban az inotocin szerepet játszhat a vízháztartásban, illetve az utódgondozó viselkedés, és a szülők közötti munkamegosztás szabályozásában. Ezért négyes számú tanulmányunkban **(4. tanulmány) az inotocin és az inotocin receptor génexpressziójának változását vizsgáltuk alacsony páratartalom mellett, valamint a szaporodási időszak során és az ivarok között.** Azt vártuk, hogy ha az inotocin részt vesz a vízháztartás szabályozásában, a száraz környezetnek kitett és a kontroll egyedek génexpressziója között különbséget fogunk találni. Ezen felül, amennyiben ez a peptid közrejátszik az utódgondozás szabályozásában, a gének expressziója szezonális változást, valamint az ivarok között eltérést fog mutatni a munkamegosztásnak megfelelően.

## II. Anyagok és módszerek

**1. tanulmány** A nagyfejű csajkó szaporodási időszakában egyedi jelöléssel láttunk el hímeket és nőstényeket. Ezt követően rögzítettük a szezon során, ha egy jelölt egyedet levélgyűjtés közben láttunk. A szezon után, amikor az utódok

már teljesen kifejlődtek, kiástuk a levélhordás közben feljegyzett egyedek fészkeit, és megszámláltuk az utódokat.

**2. tanulmány** A genom szekvenciájának meghatározása érdekében hat hím és hat nőtény egyedből torizom mintát vettünk. DNS kivonást követően új-generációs szekvenálás segítségével határoztuk meg a nagyfejű csajkó genomját. Az összeszerelt genomban strukturális annotáció során azonosítottuk a gének szerkezetét, majd más fajok génjeivel mutatott homológia alapján funkciójukat is. A funkcionális annotáció során kiemelt figyelmet fordítottunk azokra a génekre és géncsaládokra, amelyek más rovarokban szerepet játszanak a szaporodási viselkedés szabályozásában. Végül filogenetikai analízist végeztünk olyan fehérje kódoló ortológ gének segítségével, melyek az eddig publikált minden bogár genomban megtalálhatóak.

**3. tanulmány** A nagyfejű csajkó szaporodási időszaka során több alkalommal fej és tor mintát vettünk egyenlő számú hím és nőtény egyedből. RNS izolálást követően reverz transzkripció során cDNS-re fordítottuk az mRNS molekulákat. A genom szekvenciában azonosított 11 háztartási gén expressziójának stabilitását valós-idejű kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk. A megfelelő referencia géneket öt, különböző algoritmust használó szoftver konszenzus eredményei alapján választottuk ki.

**4. tanulmány** Az utódgondozó periódusban egy alkalommal kísérletet végeztünk, mely során egyenlő számú hímet és nőtényt alacsony páratartalomnak tettünk ki négy órán át, majd fejmintát vettünk ezekből és nem kezelt (kontroll) egyedekből is. A szaporodási időszak alatt terepi megfigyeléseket végeztünk, melyek során vonal transzekt mentén feljegyeztünk minden észlelt egyedeket és az aktuális tevékenységét. Ezzel párhuzamosan a szezonban egyenletesen elosztott alkalmakkor fejmintát vettünk egyenlő számú hímből és nőtényből. A gyűjtött fejmintákban az inotocin, az inotocin receptor, és az előzőleg kiválasztott két referencia gén expresszióját a 3. tanulmányban leírt módon mértük meg. A

kísérlet, a szezon és az ivar génexpresszióra gyakorolt hatását kevert modellek segítségével vizsgáltuk.

### III. Eredmények

**1. tanulmány** Megfigyeléseink alapján a levélhordó jelölt egyedek többsége nőtény volt, és csak nagyon kis arányban hím. A kiásott fészkek közül, a nőtényekében egy elpusztult utódtól eltekintve csak egészséges, kifejlett utódokat találtunk, míg a hímek fészkei csak halott lárvákat tartalmaztak.

**2. tanulmány** Az összeszerelt genom fragmentált, számos kontigból épül fel, azonban a fejlett szárnyas rovarokra (Endopterygota) jellemző „core” ortológ gének jelentős részét teljes hosszukban tartalmazza. A nagyfejű csajkó genom statisztikai paraméterei alapján a jó minőségű nyers genomok közé sorolható. A kontigok egy csoportjának lefedettsége elmaradt a genom többi részétől. A hím és nőtény mintákat külön megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy ez a lefedettségbeli különbség csak a hím mintákban található meg, 1:2 arányban, amely alapján feltételezhetjük, hogy ezen szekvenciák ivari kromoszómán helyezkednek el. A nagyfejű csajkó tehát valószínűleg XY vagy X0 ivarmeghatározási rendszerrel rendelkezik. Funkcionális annotációnk során több, mint 20.000 fehérje kódoló gént azonosítottunk, melyek között a szaporodási viselkedéssel kapcsolatos gének és géncsaládok is szerepeltek. E géncsaládok közül az illatanyag- és a feromon-megkötő fehérjék száma jóval alacsonyabb volt, mint az összehasonlítás alapjául szolgáló többi bogárfaj genomjában. A filogenetikai analízis alapján a nagyfejű csajkó és a szarvas trágyatúró monofiletikus egységet alkotnak a feketecsápú dögbogárral, mely három faj kétszülős utódgondozással rendelkezik.

**3. tanulmány** A nagyfejű csajkó utódgondozásának genetikai vizsgálatához két referencia gén alkalmazása optimális. Ezen két gén a fej minták esetében a riboszomális fehérje L7A és RP18, míg a tor mintákban a riboszomális

protein L7A és RP4. Csak a nőstény mintákat vizsgálva a fejben és a torban is az RP18 és az L7A alkalmazása javasolt. Hím egyedek esetében a fej mintákban a riboszomális fehérje S8 és L7A, míg a tor mintákban az L7A és az elongációs faktor 2 (EF2) az ideális génpár.

**4. tanulmány** Eredményeink alapján az alacsony páratartalomnak nem volt hatása sem az inotocin, sem receptorának génexpressziójára a négy órás kezelési idő alatt. A kísérlet során az inotocin expressziója a nőstényekben, míg az inotocin receptoré a hímekben volt magasabb, azonban mindkét esetben csak marginális összefüggést tapasztaltunk. A terepi megfigyeléseink során a szaporodási időszak első felében inkább hímeket, a második felében inkább nőstényeket figyeltünk meg. A levélhordás a szezon elején nagyjából kiegyensúlyozott volt a hímek és a nőstények között, a szezon második felében azonban a nőstények esetében jelentősen megnőtt a gyakorisága, különösen a pillangós virágúak gyűjtése, mely az utódgondozó időszak kezdetére utal. Sem az inotocin, sem receptorának expressziójában nem találtunk különbséget az ivarok között, azonban mindkét gén kifejeződésében hasonló növekedést tapasztaltunk a szezon során, mint a levélhordásban: az utódgondozó időszakban magasabban expresszáldtak, mint a szaporodási időszak elején.

#### **IV. Következtetések**

Megfigyeléseink alapján a nagyfejű csajkó szülők közötti munkamegosztása a korábban megfigyeltekhez képest megváltozott: a hímek helyett a nőstények gyűjtik a leveleket az utódok számára (**1. tanulmány**). Ez a viselkedési mintázat más populációkban, illetve más években is következetes volt, így feltételezhetjük, hogy állandó rendszerként van jelen. A nagyfejű csajkó 100-150 évvel ezelőtt kártevőnek számított, különösen a szőlősökben (Emich 1884). Mára azonban a nagyüzemi gazdálkodás következtében jelentősen lecsökkent, fragmentálttá vált az elterjedési területe. Egy 2017-es tanulmányban pozitív korrelációt találtak a csajkó fészekőrző

viselkedése és a populáció sűrűségének vagy hím ivararányának növekedése között (Rosa et al. 2017). Ez az őrző viselkedés mind Emich (1884), mind Schreiner (1906) leírásában megjelenik, azzal a megfigyeléssel együtt, hogy a nőstények átvehetik a hím levélhordó szerepét, ha az valamilyen módon eltűnik. Ezen információk alapján nem kizárt, hogy az elterjedési területek szűkülésével a populációk valamilyen strukturális változáson mentek keresztül, amelynek következtében a hímek több energiát fektetnek a fészkek védelmébe, így a szaporodási siker biztosításába, míg a nőstények átvették a levélgyűjtő feladatot.

A nagyfejű csajkó utódgondozásának genetikai vizsgálatához első lépéseként meghatároztuk a genom szekvenciáját, és a benne kódolt géneket (**2. tanulmány**). Ezen információk kulcsfontosságúak a génexpressziós vizsgálatokhoz, például a transzkriptom analízishez, melynek során a hasonló expressziós mintázatot mutató gének azonosításával meghatározhatjuk az utódgondozásban szerepet játszó molekulákat és jelátviteli útvonalakat. A genom funkcionális annotációja során génredukciót találtunk az illatanyag- és a feromon-megkötő fehérjéket kódoló géncsaládokban, melyek a környezeti szignálok feldolgozásában játszanak szerepet. Figyelembe véve a nagyfejű csajkó szülők fejlett munkamegosztását, mely során nélkülözhetetlen, hogy a párok tagjai felismerjék egymást, illetve az utódgondozó időszakban a pillangós virágú hajtások irányában mutatott preferenciát, ez egy rendkívül érdekes eredmény. Ez a génredukció a későbbiekben a szociális kapcsolatok fenntartásának vizsgálatában fontos kiindulási alapként szolgálhat.

A génexpressziós vizsgálatok egyik gyakran alkalmazott módszere a valós-idejű kvantitatív PCR, melynek fontos lépése a referencia génekkel történő normalizálás. A nagyfejű csajkó genom szekvenciájában azonosítottunk 11 háztartási gént, melyek közül két riboszomális fehérje fejeződött ki az általunk vizsgált körülmények között (a szezon során és az ivarok között) a legstabilabban (**3. tanulmány**). A riboszomális proteinek a translációban játszanak esszenciális szerepet, így termelődésükre folyamatosan szükség van. Ennek következtében ezek a leggyakrabban használt referencia gének közé tartoznak. Az általunk azonosított referencia gének a

nagyfejű csajkó utódgondozó viselkedését szabályozó gének vizsgálatának alapvető elemei.

A genom szekvencia és a validált referencia gének segítségével megvizsgáltuk a rovar oxitocin/vazopresszin ortológ, az inotocin, valamint receptorának génexpresszióját (**4. tanulmány**). Egyik gén kifejeződése sem mutatott összefüggést a páratartalom manipulálásával, mely arra utal, hogy az inotocin nem játszik szerepet a nagyfejű csajkó felnőtt egyedének vízháztartásában. Mind az inotocin, mind receptorának génexpressziója növekedett a szezon előrehaladtával, azonban egyik gén sem mutatott ivarok között eltérést. Ezen eredmények alapján az inotocin feltehetően hasonló funkciót tölt be a hímekben és a nőstényekben. Megfigyeléseink alapján a szezon második felében a nőstények által gyűjtött levelek nagy hányada pillangós virágú hajtás volt, amely valószínűleg az utódok számára a megfelelő nitrogénforrás biztosításához szükséges, így a levél-, azon belül is a pillangós virágú gyűjtés gyakoriságának növekedése kitűnő indikátora az utódgondozó időszak kezdetének. Figyelembe véve az expressziós mintázatok viselkedésbeli változásokkal mutatott hasonlóságát, az eredmények arra engednek következtetni, hogy az inotocin szerepet játszhat az utódgondozás, vagy valamely azzal kapcsolatos viselkedésforma szabályozásában, például a szülők közötti kapcsolat fenntartásában. Mivel a vizsgálataink természetes populációban történtek, így azonban az sem kizárt, hogy eredményeinkre hatással voltak az egyedeket érő abiotikus tényezők, mint a tavasz során egyre emelkedő átlaghőmérséklet.

Összefoglalásként elmondható, hogy disszertációmban négy olyan esettanulmányt mutatok be, melyek a nagyfejű csajkót modellszervezetként használva segíthetnek megérteni az utódgondozás evolúciós hátterét. A leírt eredmények kiváló kiindulási alapot jelentenek nem csupán az utódgondozást szabályozó gének és hormonok azonosításához, de a szülők közötti munkamegosztást befolyásoló környezeti tényezők feltárásához is.

## V. A disszertációhoz felhasznált publikációk listája

**1. tanulmány** – Kosztolányi, A., **Nagy, N.**, Kovács, T., & Barta, Z. (2015). Predominant female care in the beetle *Lethrus apterus* with supposedly biparental care. *Entomological Science*, 18(2), 292-294.

**2. tanulmány** - **Nagy, N. A.**, Rácz, R., Rimington, O., Póliska, S., Orozco-terWengel, P., Bruford, M. W., & Barta, Z. (2021). Draft genome of a biparental beetle species, *Lethrus apterus*. *BMC genomics*. *Elfogadott kézirat*.

**3. tanulmány** – **Nagy, N. A.**, Németh, Z., Juhász, E., Póliska, S., Rácz, R., Kosztolányi, A., & Barta, Z. (2017). Evaluation of potential reference genes for real-time qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae). *PeerJ*, 5, e4047.

**4. tanulmány** - **Nagy, N. A.**, Németh, Z., Juhász, E., Póliska, Sz., Rácz, R., Kiss, J., Kosztolányi, A. & Barta, Z. Inotocin, a potential modulator of reproductive behaviours in a biparental beetle, *Lethrus apterus*. *Journal of Insect Physiology*. *Elfogadott kézirat*.



Nyilvántartási szám: DEENK/204/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Nikoletta Andrea  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10056729

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Nagy, N. A.**, Németh, Z., Juhász, E., Pólliska, S., Rácz, R., Kosztolányi, A., Barta, Z.: Evaluation of potential reference genes for real-time qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae).  
*PeerJ.* 5, 1-16, 2017. EISSN: 2167-8359.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4047>  
IF: 2.118
2. Kosztolányi, A., **Nagy, N. A.**, Kovács, T., Barta, Z.: Predominant female care in the beetle *Lethrus apterus* with supposedly biparental care.  
*Entomol. Sci.* 18 (2), 292-294, 2015. ISSN: 1343-8786.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ens.12123>  
IF: 1.144

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,262**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,262**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.04.19.





**Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)**

**Investigation of the gene expression of *Lethrus apterus*  
in the perspective of parental behaviour**

by Nikoletta Andrea Nagy

Supervisors:  
Prof. Zoltán Barta  
Dr. Zoltán Németh



UNIVERSITY OF DEBRECEN  
Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2021



## I. Introduction and objectives

Parental care is one of the most complex forms of social behaviour. By definition, it includes ‘any parental trait that enhances the fitness of a parent’s offspring, and that is likely to have originated and/or to be currently maintained for this function’ (Smiseth et al. 2012). Investment in the current offspring, however, reduces the chances to invest in further offspring (Trivers 1972). As a consequence, several evolutionary strategies have emerged, based on which organisms can be categorised into four main groups: organisms with no care, female only care, male only care and biparental care. Diversity within groups occurs in the level and duration of parental care. One of the major goals of evolutionary biology is to uncover the origins of parental care, besides, to understand the background of the diversity observed within this behaviour (Clutton-Brock 1991). An important aspect of this endeavour is the study of proximal mechanisms, including genetic and physiological processes (Hofmann et al. 2014).

There is a wide variety of reproductive behaviour among insects, from egg and nest attendance to well-coordinated system for active offspring provision. Therefore, insect species can serve as outstanding model organisms for investigating the evolution and genetic background of parental care (Trumbo 2012). As in mammals and reptiles, female only care is the most common type of parental care among insects, however, male only care can also be found in species that evolve through hemimetabolism, additionally, biparental care occurs as well, mainly in holometabolan species (Gilbert & Manica 2015).

Genetic and hormonal background of insect reproduction is still an under-studied research area. Studies published to date suggest that juvenile hormone plays a central role in regulation of this behaviour, therefore, researchers have focused on the investigation of juvenile hormone and related molecules such as ecdysteroids, allatostatin, biogenic amines and neuropeptides (Trumbo 2002; Panaitof et al. 2016; Cunningham et al. 2016). In the majority of studies, the model organism was the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* which has female only, male only and biparental care, making it an ideal subject for understanding variation in parental care. However, in

evolutionary biology, it is essential to have information about as many species as possible for comparative studies. For this purpose, during my PhD, I was studying a new model species which has biparental care to expand our knowledge of this behaviour and its genetic background.

*Lethrus apterus* (Laxmann, 1770) belongs to the family Geotrupidae. Its distribution ranges from Hungary to the river Don where it prefers grassland habitats (Král et al. 2013). This species is active only during its breeding season, which lasts from early March to early June, depending on the weather. During this period, individuals first search for mates, which is followed by building their underground nests together. The nest consists of a main channel with chambers branching from it each of them ending in one brood cell (Schreiner 1906). After this, parental care period begins during which a well-defined division of labour between the parents can be observed: males carry fresh plant leaves to the nest then females form a ball from these leaves into each brood cell. The males also protect the nest from intruders, being it a competitive male or predator (Emich 1884; Schreiner 1906).

The observational information on the life history and changes in reproductive behaviour of *L. apterus* dates from the late 19th and early 20th centuries. Since up-to-date information on the model organisms studied is essential for behaviour genetic studies, in our first study (**Study 1**) **we made field observations on the division of labour between parents during the breeding season of a natural population**, in addition, we determined the proportion of healthy adult and dead offspring in the nests of the observed individuals to **estimate reproductive success**.

Following our field observations, we began investigating the genetic background of the parental care of *L. apterus*. For behaviour genetic studies using modern tools, it is essential that the genome sequence of the model species is available. Despite the fact that beetles can be excellent subjects for sociogenetic studies due to their highly diverse social and reproductive behaviour, only a little more than a dozen beetle genomes have been published so far (Cunningham 2020). These include – primarily pest – species of

outstanding importance such as the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). However, of the published sequences, the genomes of only two parental, specifically, biparental species, the burying beetle *N. vespilloides* and the taurus scarab beetle (*Onthophagus taurus*), are available. Therefore, **the aim of our second study (Study 2) was to sequence and functionally annotate the genome of *L. apterus*.** During the latter process, we paid particular attention to genes related to reproductive behaviour which can serve as excellent starting point for examining the genetic background of parental care.

Investigating the genetic or hormonal background of different behaviours often starts with only a few genes. Real-time quantitative PCR is one of the most commonly used techniques that can efficiently measure the expression levels of a small number of target genes (Radonić et al. 2004). A critical step in the method is the normalisation of the data with reference genes to eliminate technical errors occurring during the process (Kozera & Rapacz 2013). Reference genes are usually selected from housekeeping genes which are responsible for basic cell maintenance functions thus their expression is relatively constant. In our third study (**Study 3**), we used the genome sequence of *L. apterus* to **search for reference genes whose expression is not influenced by the season or sex**, therefore can be used to investigate the genetic background of parental care and the division of labour between parents.

With the genome sequence and the validated reference genes, we began our investigation on the genetic background of parental care by analysing the gene expression of the insect oxytocin/vasopressin ortholog, inotocin. Members of this neuropeptide family are found in many animal taxa, including nematodes, insects and vertebrates (Beets et al. 2013). Several functions of these peptides are conserved in the animal kingdom, the most studied of which are their roles in water maintenance (Hanoune 2010) and in the regulation of parental care and social relationships (Donaldson & Young 2008). The role of inotocin in water balance has been investigated in several species (Muratspahić et al. 2020). In addition, however, it may be an intriguing question whether inotocin is involved in the regulation of insect social behaviour, including parental care. Based on the

conserved functions in the animal kingdom, we hypothesized that inotocin may play a role in water maintenance in *L. apterus* and in the regulation of parental care behaviour and division of labour between parents. Therefore, in our fourth study (**Study 4**), **we investigated the changes in gene expression of inotocin and inotocin receptor under low humidity, during the breeding season and between sexes**. We expected that if inotocin is involved in the regulation of water maintenance, we would find a difference in gene expression between individuals exposed to desiccation and control individuals. Furthermore, if this peptide is involved in the regulation of parental care, gene expression would show seasonal variation and difference between sexes according to the division of labour.

## **II. Materials and methods**

**Study 1** In the active season of *L. apterus*, males and females were individually marked. Leaf collection events performed by the marked individuals were recorded during the breeding period. After the season, when the offspring were fully developed, we excavated the nests of individuals observed during leaf collection and counted the offspring.

**Study 2** In order to determine the genome sequence, thorax muscle samples from six males and six females were collected. After DNA extraction, the genome of *L. apterus* was determined using next-generation sequencing. Structural annotation of the assembled genome was used to identify the structure of genes which was followed by determination of their function based on homology with genes from other species. During functional annotation, special attention was paid on genes and gene families which are involved in the regulation of reproductive behaviour in other insects. Finally, we performed phylogenetic analysis using orthologous protein-coding genes those are present in all beetle genomes published to date.

**Study 3** During the breeding season of *L. apterus*, head and thorax samples were taken several times from equal numbers of male and female individuals. After RNA isolation, mRNA molecules were reverse transcribed to cDNA. Expression levels of 11 housekeeping genes identified in the genome sequence were measured by real-time quantitative PCR. Suitable reference genes were selected based on consensus results from five methods using different algorithms.

**Study 4** During the parental care period, an experiment was conducted in which equal numbers of males and females were exposed to low humidity for four hours, after which head samples were taken from both the treated and untreated (control) individuals. During the breeding period, we performed field observations, recording all individuals observed and their current activity along a line transect. In parallel, head samples were taken from equal numbers of males and females at evenly distributed times throughout the season. In the collected head samples, the expression of inotocin, inotocin receptor, and the two previously selected reference genes were measured with the same method as described in Study 3. The effects of treatment, season and sex on gene expression levels were investigated using mixed models.

### **III. Results**

**Study 1** Based on our observations, the majority of the leaf collecting marked individuals were females, and only a very small proportion were males. Of the nests excavated, females' contained only healthy adult offspring, except for one dead larva, while male nests contained only dead larvae.

**Study 2** Albeit the assembled genome is fragmented, consisting of many contigs, it contains in full length a significant proportion of the core orthologous genes typical for species in the group Endopterygota. Considering the statistical parameters of the genome of *L. apterus*, it can be classified as

a high quality draft genome. We found a group of contigs which had lower coverage than the rest of the genome. Examining male and female samples separately revealed that this difference in coverage was only found in male samples, with a 1:2 ratio, suggesting that these sequences are located on a sex chromosome. Thus, *L. apterus* is likely to have XY or XO sex determination system. Our functional annotation identified more than 20,000 protein-coding genes, including genes and gene families related to reproductive behaviour. Among these gene families, the number of odorant- and pheromone-binding proteins found was much lower than in the genomes of other beetle species used for comparison. Based on the phylogenetic analysis, *L. apterus* and the taurus scarab beetle form a monophyletic unit with the burying beetle *N. vespilloides* which three species have biparental care.

**Study 3** For genetic investigation of parental care in *L. apterus*, the use of two reference genes is optimal. These two genes are the ribosomal proteins L7A and RP18 for head samples and the ribosomal proteins L7A and RP4 for thorax samples regardless of the sex. Considering only females, the use of ribosomal proteins RP18 and L7A is recommended both for head and thorax samples. For males, ribosomal proteins S8 and L7A in head samples and L7A and elongation factor 2 (EF2) in thorax samples are the ideal gene pairs.

**Study 4** Our results showed that low humidity had no effect on the gene expression of either inotocin or its receptor during the four-hour treatment period. After the experiment, inotocin expression was higher in females, and inotocin receptor expression was higher in males, however, only marginal correlations were observed in both cases. During our field observations, more males were recorded in the first half of the breeding period, whereas in the second half of it, females tended to be more active. Leaf collection was roughly balanced between males and females at the beginning of the season, however, in the second half of the season the frequency of leaf collection increased significantly for

females, especially the collection of legume species, indicating the beginning of the parental care period. No difference was found in the expression of either inotocin or its receptor between sexes, nonetheless, similar increase in the expression of both genes were observed during the season as in leaf collection: expression levels were higher in the parental care period than at the beginning of the reproductive season.

#### **IV. Conclusions**

Our observations suggest that the division of labour between the parents of *L. apterus* has changed from what was previously observed: females replaced males in the collection of leaves for offspring (**Study 1**). This behavioural pattern was consistent in other populations and in other years, hence we can assume that it is a stable system. *L. apterus* was considered as a pest 100-150 years ago, especially in vineyards (Emich 1884). Since then, however, its distribution has been significantly reduced and became fragmented due to the intense agriculture. In a study from 2017, positive correlation was found between the nesting guarding behaviour of *L. apterus* and the increase of population density or male sex ratio (Rosa et al. 2017). This guarding behaviour appears in both Emich's (1884) and Schreiner's (1906) descriptions, along with the observation that females can also accomplish leaf collection if the male is somehow lost. On the basis of these information, a possible explanation can be that with the narrowing habitats, populations have undergone some structural change which resulted in males investing more energy in nest attendance to ensure reproductive success, while females have taken over the leaf collecting role.

As a first step for investigation the genetic background of parental care in *L. apterus*, we determined the sequence of the genome and the genes encoded in it (**Study 2**). This information is crucial for gene expression studies, such as transcriptome analysis, which can identify molecules and signalling pathways involved in offspring care by identifying genes with similar expression patterns. Functional annotation of the genome has revealed gene reductions in gene families encoding odorant- and pheromone-binding proteins

which are involved in processing of environmental signals. Considering the well-developed division of labour between *L. apterus* parents, where it is essential for mates to recognize each other, together with the preference for legume leaves during the parental care period, this is an intriguing result. This gene reduction may serve as an important baseline for future studies on the maintenance of social relationships in this species.

A commonly used method for gene expression analysis is real-time quantitative PCR, with an important step being normalisation with reference genes. We identified 11 housekeeping genes in the genome sequence of *L. apterus*, from which two ribosomal proteins were the most stably expressed under the conditions studied, i.e., during the season and between sexes (**Study 3**). Ribosomal proteins play an essential role in translation, therefore, their production is constantly required. As a consequence, they are among the most commonly used reference genes. The reference genes that we have identified are essential components of investigation of genes regulating parental care behaviour in *L. apterus*.

Based on the genome sequence and the validated reference genes, we were able to investigate the gene expression of the insect oxytocin/vasopressin ortholog, inotocin, and its receptor (**Study 4**). The expression of neither gene showed correlation with humidity manipulation, suggesting that inotocin may not play a role in water maintenance in adult *L. apterus*. Nevertheless, gene expression of both inotocin and its receptor increased with the season, however, neither gene showed any difference between sexes. These results suggest that inotocin may have similar functions in males and females. Based on our observations, a large proportion of the leaves collected by females in the second half of the season belonged to legume species, which are probably necessary to provide an adequate nitrogen source for the offspring. Consequently, an increase in the frequency of leaf collection, especially legume leaves, is an excellent indicator of the beginning of the parental care period. Considering the similarity found between the gene expression patterns and the behavioural changes, results suggest that inotocin may play a role in the regulation of parental care or a related behaviour, such as maintaining the relationship between parents. However, as our

studies were carried out in a natural population, it is also possible that our results were influenced by abiotic factors affecting the individuals, such as the increasing average temperature during spring.

In conclusion, I present four case studies in my thesis using *L. apterus* as a model organism to contribute to understanding the evolutionary background of parental care. The presented results provide an excellent starting point not only for identifying the genes and hormones that regulate parental care, but also for exploring the environmental factors that influence the division of labour between parents.

## V. List of publications used in the dissertation

**Study 1** – Kosztolányi, A., **Nagy, N.**, Kovács, T., & Barta, Z. (2015). Predominant female care in the beetle *Lethrus apterus* with supposedly biparental care. *Entomological Science*, 18(2), 292-294.

**Study 2** - **Nagy, N. A.**, Rácz, R., Rimington, O., Póliska, S., Orozco-Wengel, P., Bruford, M. W., & Barta, Z. (2021). Draft genome of a biparental beetle species, *Lethrus apterus*. *BMC genomics*. **Accepted manuscript.**

**Study 3** – **Nagy, N. A.**, Németh, Z., Juhász, E., Póliska, S., Rácz, R., Kosztolányi, A., & Barta, Z. (2017). Evaluation of potential reference genes for real-time qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae). *PeerJ*, 5, e4047.

**Study 4** - **Nagy, N. A.**, Németh, Z., Juhász, E., Póliska, Sz., Rácz, R., Kiss, J., Kosztolányi, A. & Barta, Z. Inotocin, a potential modulator of reproductive behaviours in a biparental beetle, *Lethrus apterus*. *Journal of Insect Physiology*. **Accepted manuscript.**

## Irodalomjegyzék / References

- Beets, I., Temmerman, L., Janssen, T., & Schoofs, L. (2013). Ancient neuromodulation by vasopressin/oxytocin-related peptides. *Worm*, 2(2), e24246.
- Clutton-Brock, T. H. (1991). *The evolution of parental care*. Princeton University Press, Princeton.
- Cunningham, C. B. (2020). Functional genomics of parental care of insects. *Hormones and Behavior*, 122, 104756.
- Cunningham, C. B., VanDenHeuvel, K., Khana, D. B., McKinney, E. C., & Moore, A. J. (2016). The role of neuropeptide F in a transition to parental care. *Biology Letters*, 12(4), 20160158.
- Donaldson, Z. R., & Young, L. J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*, 322(5903), 900-904.
- Emich, G. (1884). A csajkó fejlődése és átalakulása. *Rovartani Lapok*, 1, 30-33.
- Gilbert, J. D., & Manica, A. (2015). The evolution of parental care in insects: a test of current hypotheses. *Evolution*, 69(5), 1255-1270.
- Hanoune, J. (2010). Comparative and evolutionary aspects of vasopressin. *Perspectives On Vasopressin*, Imperial College Press, London, pp. 21-38.
- Hofmann, H. A., Beery, A. K., Blumstein, D. T., Couzin, I. D., Earley, R. L., Hayes, L. D., et al. (2014). An evolutionary framework for studying mechanisms of social behavior. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(10), 581-589.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406.
- Král, D., Hillert, O., Drožová, D., & Šípek, P. (2013). *Lethrus (Lethrus) schneideri* sp. n. (Coleoptera, Geotrupidae) from Greece. *ZooKeys*, 339, 93-106.
- Muratspahić, E., Monjon, E., Duerrauer, L., Rogers, S. M., Cullen, D. A., Broeck, J. V., & Gruber, C. W. (2020). Oxytocin/vasopressin-like neuropeptide signaling in insects. *Vitamins and Hormones*, 113, 29-53.
- Panaitof, S. C., Yaeger, J. D., Speer, J. P., & Renner, K. J. (2016). Biparental behavior in the burying beetle *Nicrophorus orbicollis*: a role for dopamine?. *Current Zoology*, 62(3), 285-291.

- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856-862.
- Rosa, M. E., Barta, Z., Fülöp, A., Székely, T., & Kosztolányi, A. (2017). The effects of adult sex ratio and density on parental care in *Lethrus apterus* (Coleoptera, Geotrupidae). *Animal Behaviour*, 132, 181-188.
- Schreiner, J. (1906). Die Lebensweise und Metamorphose des Rebenschneiders oder grossköpfigen Zwiebelhornkäfers (*Lethrus apterus* Laxm.). *Horae Societatis Entomologicae Rossicae*, 37, 197-208.
- Smiseth, P. T., Kölliker, M., & Royle, N. J. (2012). What is parental care?. *The Evolution of Parental Care*. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-17.
- Trivers, R. (1972). Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection & the Descent of Man*. Aldine Publishing Company, Chicago, pp. 136-179.
- Trumbo, S. T. (2002). Hormonal regulation of parental care in insects. *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, Cambridge, pp. 115-139.
- Trumbo, S. T. (2012). Patterns of parental care in invertebrates. *The Evolution of Parental Care*. Oxford University Press, Oxford, pp. 81-100.



Registry number: DEENK/204/2021.PL  
Subject: PhD Publication List

Candidate: Nikoletta Andrea Nagy

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10056729

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Nagy, N. A.**, Németh, Z., Juhász, E., Pólska, S., Rácz, R., Kosztlányi, A., Barta, Z.: Evaluation of potential reference genes for real-time qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae).  
*PeerJ.* 5, 1-16, 2017. EISSN: 2167-8359.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4047>  
IF: 2.118

2. Kosztlányi, A., **Nagy, N. A.**, Kovács, T., Barta, Z.: Predominant female care in the beetle *Lethrus apterus* with supposedly biparental care.  
*Entomol. Sci.* 18 (2), 292-294, 2015. ISSN: 1343-8786.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ens.12123>  
IF: 1.144

**Total IF of journals (all publications): 3,262**

**Total IF of journals (publications related to the dissertation): 3,262**

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

19 April, 2021

