

**Ecology and evolution of host plant use and larval secretions  
in the leaf beetle genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae)**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
for the degree of  
Doctor of natural sciences

presented by  
**Alfred Köpf**  
Dipl. Biol. Univ.  
Universität Bayreuth  
(Bayreuth, Germany)  
born March 16th, 1965  
Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. P. Schmid-Hempel, examiner  
Prof. Dr. P. Edwards, co-examiner  
Prof. Dr. N. E. Rank, co-examiner  
Prof. Dr. J. Tahvanainen, co-examiner

## 1. Summary

The recent development of molecular techniques and their use in phylogeny reconstruction led to a renaissance of the Ehrlich and Raven escape and radiation model of coevolution. Besides butterflies, various groups of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) have been the prime system for research in the field of plant herbivore interactions. The leaf beetle genus *Phratora* is a clade of specialized leaf feeders. All species are either specialized on willows and/or poplars (family: Salicaceae) or they feed on birch (family: Betulaceae). Phenolic glucosides are the characteristically secondary plant chemicals for willows and poplars. Those compounds play a key role for host selection in adult beetles in the genus *Phratora*.

The larvae of all species possess highly volatile and noxious secretions, stored in nine pairs of gland reservoirs and discharged upon disturbance. Two types of secretion production are present in the genus *Phratora*. All but one species produce cyclopentanoid monoterpenes autogenously (*de novo* production). Only *P. vitellinae* utilizes the plant derived phenolic glucosides salicin and salicortin (and related compounds) as precursors for its larval secretion (sequestration).

To put the host plant associations and the secretion chemistry of the genus *Phratora* in a phylogenetic context, a phylogeny based on the nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (COI) was reconstructed (Chapter 4). The host plant preferences of the species within the genus *Phratora* are strongly influenced by their evolutionary history. Closely related species of beetles feed on related species of plants. The ancestral state in the genus appears to have been a generalist feeding on both willows and poplars. Specialization occurred subsequently onto poplars and certain willow groups. A radical host shift onto birch took place only recently in the most oligophagous group of willow feeders (*P. tibialis/polaris* clade). DNA sequence information as well as behavioral evidence suggest, that the taxonomic status of *P. tibialis* and *P. polaris* has to be reconsidered. The willow feeding populations of both species seem to form one species, whereas the birch feeding *P. polaris* are clearly separated (Chapter 4, 5). The phylogeny also shows that sequestration as mode of secretion production evolved independently in the genus *Phratora* and the closely related genus *Chrysomela*.

The processes and ecological factors that might have shaped the above described evolutionary patterns are the main focus of the second part of this thesis. Information on the natural enemies and host plant associations for chrysomeline leaf beetles feeding on Salicaceae are summarized and reviewed in Chapter 6. We tested the influence of host plant chemicals on the larval survival of *Phratora vitellinae* in a large scale field experiment. Laboratory experiments suggested, that the larval performance should be closely related to the phenolic glucoside content in the host plants. The plants providing

the highest amounts of precursors enable the larvae to produce the most secretion, which should give the maximal protection against natural enemies. However in the field experiment the larval survival was similar on a high and a low phenolic glucoside host. Feeding experiments with the most common predators showed, that the defensive action of the larval secretions was rather limited (Chapter 7). More detailed behavioral studies revealed that specialized predators like the syrphid fly larvae *Parasyrphus nigriventris* are not repelled by the noxious chemicals. On the contrary, they are attracted to and use the volatiles to locate their beetle prey (Chapter 8). An additional function of the larval secretions present in the genus *Phratora* and related chrysomelids is oviposition regulation (Chapter 9).

These ecological functions of the secretions suggest that their adaptive significance may be quite different than has been previously supposed. The evidence that has been accumulated in this thesis suggests that new evolutionary scenarios must be developed to understand the relationship between host plant use and the larval secretions of these leaf beetles. Additionally, the interactions between the predators and the herbivores can be just as specialized as those between the herbivores and their host plants. This provides new insights into the ecological role of phenolic glucosides in natural systems.

## 2. Zusammenfassung

Die rasche Entwicklung molekularbiologischer Techniken und ihr zunehmender Einsatz bei der Rekonstruktion von Phylogenien, führte zu einem erneuten Interesse an Ehrlich und Ravens "escape and radiation" Modell der Koevolution. Neben Schmetterlingen etablierten sich verschiedene Blattkäfergruppen (Coleoptera: Chrysomelidae) als bevorzugte Systeme für das Studium von Pflanzen-Herbivoren-Interaktionen. Die Blattkäfergattung *Phratora* ist eine Klade spezialisierter Blattfresser. Alle Arten sind entweder auf Weiden und/oder Pappeln (Familie: Salicaceae) oder auf Birken (Familie: Betulaceae) spezialisiert. Phenolglykoside stellen die charakteristischen sekundären Pflanzeninhaltsstoffe der Weiden und Pappeln dar. Diese Sekundärstoffe spielen eine Schlüsselrolle bei der Wirtswahl der adulten Käfer in der Gattung *Phratora*.

Die Larven aller Arten besitzen hochflüchtige und aggressive Sekrete, die in neun paarigen Drüsenreservoirien gespeichert und bei Reizung der Larven abgegeben werden. Innerhalb der Gattung *Phratora* gibt es zwei Arten der Sekretproduktion. Alle Arten, ausser einer, synthetisieren ihr Sekret *de novo*. Nur *P. vitellinae* nutzt von der Pflanze stammende Phenolglykoside (Salizin, Salicortin und verwandte Verbindungen) als Ausgangsstoffe für die Sekretproduktion (Sequestrieren).

Um die Wirtspflanzen-Assoziationen und die larvale Sekretchemie in einem phylogenetischen Kontext betrachten zu können, wurde ein Stammbaum, basierend auf der Nukleotidsequenz des mitochondrialen Cytochrom Oxidase (Untereinheit I) Gens, erstellt. Die Wirtspflanzen-Präferenzen der Arten innerhalb der Gattung *Phratora* sind stark beeinflusst von ihrer evolutionären Geschichte. Nahe verwandte Arten fressen auf verwandten Pflanzenarten. Den ursprünglichen Zustand in der Gattung stellten Generalisten dar, die auf Weiden und Pappeln fressen. Eine Spezialisierung auf Pappeln und bestimmte Weidengruppen erfolgte nachträglich. Einen radikalen Wirtswechsel von Weiden auf Birken gab es in der Gruppe mit dem breitesten Wirtsspektrum innerhalb der Weidenfresser (*P. tibialis/polaris* Klade). Sowohl die DNA-Sequenzinformation wie auch die Ergebnisse aus Verhaltenstests legen eine taxonomische Neugruppierung der Arten *Phratora tibialis* und *P. polaris* nahe. Anscheinend formen die weidenfressenden Populationen beider Arten eine Art, von der die birkenfressenden *P. polaris* Populationen klar getrennt sind. Die Phylogenie zeigt auch, daß sich das Sequestrieren als Methode der Sekretherstellung in der Gattung *Phratora* und in der nahe verwandten Gattung *Chrysomela* unabhängig voneinander entwickelt hat.

Die Prozesse und die ökologischen Faktoren, die die oben beschriebenen evolutionären Muster formten, werden im zweiten Teil der Dissertation genauer betrachtet. Informationen über die natürlichen Feinde und die Wirtspflanzen-

Assoziationen der salicaceenfressenden Chrysomeliden sind in Kapitel 6 zusammengefasst und besprochen. Der Einfluß der Wirtspflanzenchemie auf das Überleben von *Phratora vitellinae* Larven wurde in einem großangelegten Feldversuch getestet. Laborexperimente implizierten einen engen Zusammenhang zwischen dem Überlebenserfolg der Larven und dem Phenolglykosidgehalt der Wirtspflanzen. Die Pflanzen, die am meisten Sekretvorstufen bereitstellten, ermöglichten es den Larven, die größten Volumina an Sekret herzustellen, was wiederum grösstmöglichen Schutz gegen Frassfeinde darstellen sollte. Allerdings unterschied sich das Überleben der Larven auf Pflanzen mit hohen und solchen mit niedrigen Phenolglucosidgehalten wider Erwarten nicht. Frassversuche mit den häufigsten Räufern der Käferlarven zeigten eine eher eingeschränkte Verteidigungswirkung der larvalen Sekrete (Kapitel 7). Eingehendere Verhaltenstests ergaben am Beispiel von Syrphidenlarven der Art *Parasyrphus nigrirarsis*, dass spezialisierte Räuber nicht von den Larvalen Sekreten abgeschreckt werden, sondern im Gegenteil davon angezogen werden und die flüchtigen Sekrete zum Lokalisieren ihrer Beute nutzen können (Kapitel 8). Eine weitere Funktion der Larvenssekrete der Gattung *Phratora* und verwandter Chrysomelidengruppen besteht in der Regulation der Eiablage (Kapitel 9).

Die ökologischen Funktionen, die die larvalen Sekrete auf intra- und interspezifischer Ebene erfüllen, deuten darauf hin, dass ihre adaptive Signifikanz nicht in erster Linie auf der Verteidigung gegen Frassfeinde beruht. Die vorliegenden ökologischen und phylogenetischen Ergebnisse erfordern eine Neubeurteilung der bestehenden Evolutionsszenarien, um die Beziehungen zwischen Wirtspflanzen-nutzung und larvalen Sekreten der Blattkäfer verstehen zu können. Es hat sich ausserdem gezeigt, dass die Interaktionen zwischen Prädatoren und Herbivoren ähnlich hoch spezialisiert sein können, wie die Interaktionen zwischen Herbivoren und ihren Frasspflanzen. Dies vermittelt neue Einblicke in die ökologische Funktion von Phenolglykosiden in natürlichen Systemen.