

Mikroorganismen-gesteuerte Parthenogenese bei Thysanopteren

Sandra Kumm, Renate Kranz & Gerald Moritz

Institut für Zoologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abstract: Parthenogenesis under influence of microbes in Thysanoptera.

Several thrips species were tested for the presence of parthenogenesis-inducing bacteria of the genus *Wolbachia* using primers amplifying either the 16S rDNA gene or the *ftsZ* gene. Tested species show either arrhenotoky (*Frankliniella occidentalis*, *Echinothrips americanus*, *Gynaikothrips ficorum*, *Suocerathrips linguis*) or thelytoky (*Hercinothrips femoralis*, *Parthenothrips dracaenae*). In contrast, *Thrips tabaci* reproduces by arrhenotoky in some areas and by thelytoky in others. The thelytokous thrips species *H. femoralis* and *P. dracaenae* possess *Wolbachia*, and the presence of the bacterium in *H. femoralis* was shown to cause thelytokous reproduction since male offspring could be generated by treating females with antibiotics. Males copulated with females and sperm was found in the spermathecae of females. The arrhenotokous species *E. americanus*, *G. ficorum*, and *S. linguis* also have *Wolbachia*, but the bacterium was not detected in *F. occidentalis* and *T. tabaci*.

Key words: *Wolbachia*, Thysanoptera, thrips, thelytoky, arrhenotoky, haplodiploidy

Sandra Kumm, Renate Kranz, Gerald Moritz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Lehr- und Forschungsbereich Entwicklungsbiologie, Institut für Zoologie, Domplatz 4, D-06108 Halle, E-mail: kumm@zoologie.uni-halle.de

Der Reproduktionsmechanismus der meisten Thysanopteren beruht auf Haplodiploidie (EVANS et al. 2004). Die Mehrzahl der Arten vermehrt sich durch Arrhenotokie. Bei einigen Arten sind Männchen jedoch sehr selten, sie vermehren sich durch Thelytokie. Von *Thrips tabaci*, *Taeniothrips inconsequens* und *Haplothrips tritici* sind sowohl thelytoke als auch arrhenotoke Populationen bekannt (LEWIS 1973).

Thelytoke Vermehrung kann von Bakterien wie *Wolbachia* beeinflusst werden (STOUTHAMER et al. 1990, WERREN 1997, GOTTLIEB et al. 2002, CHARLAT et al. 2003). *Wolbachia* wurde bisher in drei thelytoken Thripsarten gefunden und zwar in *Heliothrips haemorrhoidalis*, *Hercinothrips femoralis* (PINTUREAU et al. 1999a) und *Franklinothrips vespiformis* (ARAKAKI et al. 2001), wobei nur bei *F. vespiformis* *Wolbachia* als Ursache der Thelytokie nachgewiesen wurde, da hier Männchen durch Antibiotika-Behandlung entstanden.

Um mehr über die geschlechtsbestimmenden Mechanismen bei Thysanopteren herauszufinden, wurden in der vorliegenden Studie Thrips-Arten, die entweder Arrhenotokie oder Thelytokie bzw. beide Formen zeigen, auf das Vorhandensein von *Wolbachia* getestet.

Material und Methoden

Thripszucht

Von folgenden Thripsarten wurden im Labor Stammzuchten etabliert: *F. occidentalis*, *T. tabaci* (thelytoke Population), *E. americanus*, *H. femoralis*, *P. dracaenae* und *S. linguis*. Ein Teil des Untersuchungsmaterials (*T. tabaci*-Männchen, *G. ficorum*) stammte jedoch aus Freilandfängen und wurde in 100% Ethanol fixiert.

Wolbachia-Nachweis

Für die DNA-Extraktion wurde die 100-Fliegen-Methode von ROBERTS (1998) modifiziert. Ein einzelner Thrips wurde in 100 µl Extraktionspuffer (Zusammensetzung: 0,2 M Sucrose, 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05

M EDTA, 0,5% SDS, pH 9,2) homogenisiert und anschließend für 15 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 15 µl eiskaltem 8 M Kaliumacetat wurde die Probe für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen neuen Eppendorf-Tube überführt, die 2,5fache Menge 100%iger Ethanol mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben und für 1 h bei -80°C aufbewahrt. Die Probe wurde für 15 min zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 16 µl ddH₂O resuspendiert.

Es wurden *Wolbachia*-spezifische Primer gewählt, die die 16S rDNA (99F/994R, O'NEILL et al. 1992) bzw. das *ftsZ* Gen (494F/1262R, HOLDEN et al. 1993) amplifizieren. Der PCR-Ansatz bestand aus 2 µl Template-DNA, 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,4 µl dTNPs (25 mM), 1,5 µl von jedem Primer (20 pmol/µl) sowie 0,2 µl Taq Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Auswertung erfolgte an einem Image Master VDS (Pharmacia Biotech) mittels der Software Image Master 1D Elite v.3.01.

Behandlung *Wolbachia*-infizierter *H. femoralis*-Weibchen mit Antibiotika und Hitze:

Es wurden jeweils die Nachkommen von einzeln gehaltenen Weibchen behandelt. Puppenstadien wurden 24h oder 48h 35°C ausgesetzt und das Geschlecht der Nachkommen bestimmt. Sowohl Zweitlarven als auch adulte Tiere wurden mit Tetracyclin (50 mg/ml) behandelt. Einige Tiere wurden nach der Behandlung für eine spätere Analyse in 100% Ethanol überführt.

Ergebnisse und Diskussion

Wolbachia wurde in folgenden Thripsarten nachgewiesen: *E. americanus*, *P. dracaenae*, *G. ficorum*, *S. linguis* (Gele hier nicht abgebildet) und *H. femoralis* (Abb. 1). Das Bakterium war jedoch weder in *F. occidentalis* (Abb. 1) noch in *T. tabaci* (Abb. 1) nachweisbar. Dabei lieferten beide Primerpaare jeweils das gleiche Ergebnis.

Antibiotika-Behandlung führte bei *H. femoralis* zur Entstehung von Männchen. Keinen Einfluss auf das Geschlecht der Nachkommen hatte die Behandlung mit Hitze, alle Individuen entwickelten sich zu Weibchen. Die durch Antibiotika entstandenen Männchen kopulierten mit den Weibchen, und es wurden Spermien in der Spermatheka gefunden. Allerdings war es bisher nicht möglich, die thelytoke Vermehrungsweise von *H. femoralis* wieder in eine arrhenotoke umzukehren. PCR-Tests der Nachkommen der mit Antibiotika behandelten Weibchen zeigten bei einigen Individuen ein positives, bei anderen ein negatives Resultat (Abb. 2). Eine stabile Anzahl von Männchen in der Nachkommenschaft wurde nur erzielt, wenn die Antibiotika-Gabe kontinuierlich in jeder Generation erfolgte. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, dass jeweils ein Teil der Bakterien überlebt, sich vermehrt und so eine männliche Entwicklung gestoppt wird, wie in *Trichogramma cordubensis* (Hymenoptera) (PINTUREAU et al. 1999b). Andererseits vermuten ZCHORI-FEIN et al. (1992) und WERREN (1997), dass nach einer ausreichend langen Zeit der *Wolbachia*-Infektion die Ansammlung von Mutationen in Genen, die die Geschlechtsdetermination betreffen, ausreicht, um Thelytokie irreversibel zu machen.

Thelytokie in *H. femoralis* wird also durch *Wolbachia* induziert, und dies ist auch für *P. dracaenae* anzunehmen. Im Gegensatz dazu wird die thelytoke Vermehrung der untersuchten *T. tabaci* Population nicht durch *Wolbachia* beeinflusst. Außer *Wolbachia* sind allerdings noch andere intrazellulär lebende Bakterien bekannt, die Thelytokie induzieren können (ZCHORI-FEIN et al. 2001, 2004). Da jedoch eine Antibiotika-Behandlung von thelytoken *T. tabaci* Weibchen nicht zu einer Änderung des Geschlechterverhältnisses führte, kann ein bakterieller Einfluss weitgehend ausgeschlossen werden. Wie bei Hymenopteren (STOUTHAMER & KAZMER 1994) existieren demzufolge auch bei Thysanopteren zwei verschiedene Formen von Thelytokie, eine umkehrbare wie bei *H. femoralis* und eine nicht-reversible wie bei *T. tabaci*.

Erstaunlich ist die Anwesenheit von *Wolbachia* in *E. americanus*. Die Population zeigte ein stark Weibchen dominierendes Geschlechterverhältnis (Weibchen : Männchen = 1:0,3, n=123). Antibiotika-Tests würden zeigen, ob *Wolbachia* einen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis hat und somit die Reproduktion dieser Art manipuliert.

G. ficorum und *S. linguis* gehören beide zur Unterordnung der Tubulifera. Nicht alle getesteten Tiere zeigten eine Infektion mit *Wolbachia*. *S. linguis* lebt subsozial auf *Sanseveria spec.* und ernährt sich von Pilzen. Auf Abstrichen der Pflanzenoberfläche wurden interessanterweise zwei Vertreter der Gattung

Penicillium nachgewiesen. Denkbar wäre ein Schutz vor Bakterieninfektionen, so dass ein Einfluss von *Wolbachia* auf die Reproduktion dieser Art fraglich ist (MORITZ et al. 2004).

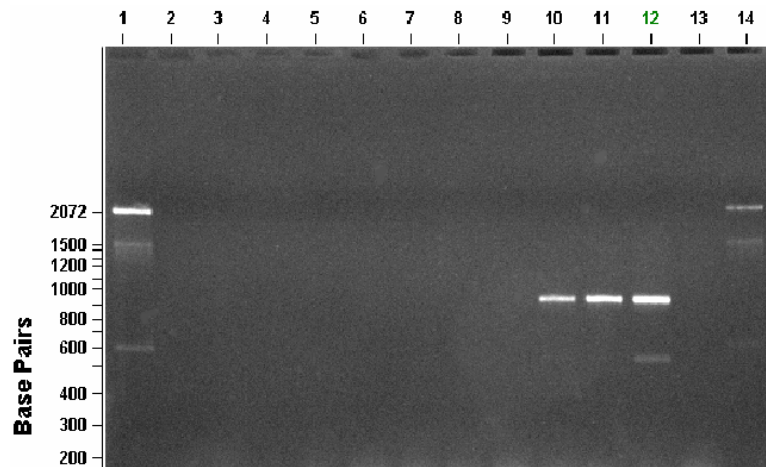


Abb. 1: Nachweis von *Wolbachia* mittels 16S rDNA-spezifischer Primer, Lane 1 – DNA-Leiter; Lane 2 – *T. tabaci*, Weibchen; Lane 3 – *F. occidentalis*, Weibchen; Lane 4 – *F. occidentalis*, Weibchen; Lane 5 – *F. occidentalis*, Männchen; Lane 6 – *F. occidentalis*, Männchen; Lane 7 – *F. occidentalis*, Weibchen; Lane 8 – *F. occidentalis*, Männchen; Lane 9 – *F. occidentalis*, Männchen; Lane 10 – *H. femoralis*, Weibchen; Lane 11 – *H. femoralis*, Weibchen; Lane 12 – *H. femoralis*, Weibchen; Lane 13 – Negativkontrolle; Lane 14 – DNA-Leiter.

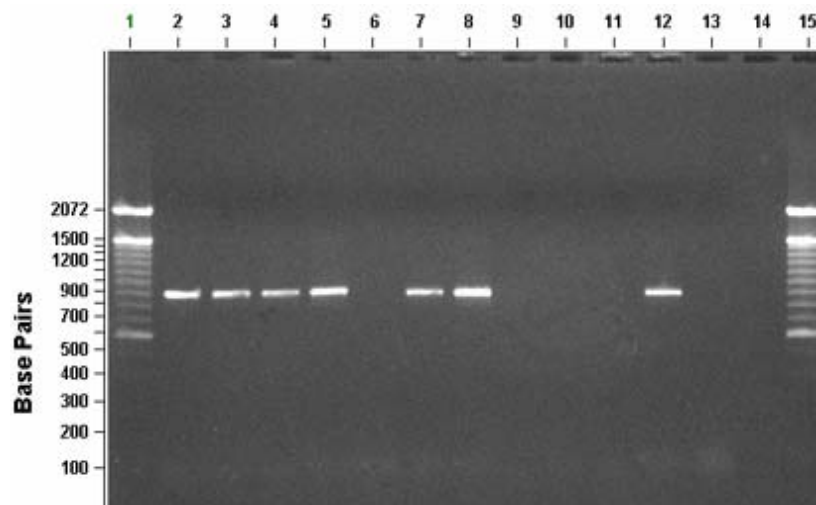


Abb. 2: *Wolbachia*-Test nach zweimaliger (Zweitlarve und Imago) Antibiotika-Behandlung der Weibchen von *H. femoralis*: Lane 1 – DNA-Leiter, Lane 2-4 Weibchen, Lane 5 – Männchen, Lane 6-8 Weibchen, Lane 9 – Männchen, Lane 10 – Weibchen, Lane 11 – Männchen, Lane 12 – Weibchen, Lane 13-14 Negativkontrolle, Lane 15 – DNA-Leiter.

Dank

Für die Zusendung von Tiermaterial danken wir LAURENCE MOUND (Canberra), ANTON LOOMANS (Wageningen), PHILL GRIFFITHS und ALISON SCOTT-BROWN (London) sowie OPHIR TAL (Israel).

Literatur

- ARAKAKI, N., MIYOSHI, T. & NODA, H. (2001): *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). – Proc. R. Soc. Lond. B 268: 1011-1016.
- CHARLAT, S., HURST, G.D.D. & MERCOT, H. (2003): Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. – Trends Genet. 19: 217-223.
- EVANS, J.D., SHEARMAN, D.C.A. & OLDROYD, B.P. (2004): Molecular basis of sex determination in haplodiploids. – Trends Ecol. Evol. 19: 1-3.
- GOTTLIEB, Y., ZCHORI-FEIN, E., WERREN, J.H. & KARR, T.L. (2002): Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). – J. Invertebr. Pathol. 81: 166-174.
- HOLDEN, P.R., BROOKFIELD, J.F.Y. & JONES, P. (1993): Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. – Mol. Gen. Genet. 240: 213-220.
- LEUTERITZ, S. (1969): Verbesserte Azan-novum Färbung für histologische Präparate. – Wiss. H. Päd. Inst. Köthen 2: 55.
- LEWIS, T. (1973): Thrips. Their biology, ecology, and economic importance. – Academic Press, London and New York, 740 pp.
- MORITZ, G., SCHÄFER, E., KUMM, S., STELLER, A. & TSCHUCH, G. (2004): Der Alien-Thrips: *Suocerathrips linguis* – Biologie und Verhalten. – Mitt. Dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 14: 177-181.
- O'NEILL, S.L., GIORDANO, R., COLBERT, A.M.E., KARR, T.L. & ROBERTSON, H.M. (1992): 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. – PNAS 89: 2699-2702.
- PINTUREAU, B., LASSABLIÈRE, F., KHATCHADOURIAN, C. & DAUMAL, J. (1999a): Parasitoïdes oophages et symbiotes de deux thrips européens. – Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.) 35 (suppl.): 416-420.
- PINTUREAU, B., CHAPELLE, L. & DELOBEL, B. (1999b): Effects of repeated thermic and antibiotic treatments on a *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) symbiont. – J. Appl. Ent. 123: 473-483.
- ROBERTS, D.B. (1998): *Drosophila*, a practical approach. – Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press: 399 pp.
- SMITH, A. & BRUTON, J. (1979): Farbatlas histologischer Färbemethoden. – Schattauer-Verlag Stuttgart und New York.
- STOUTHAMER, R. & KAZMER, D.J. (1994): Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. – Heredity 73: 317-327.
- STOUTHAMER, R., LUCK, R. & HAMILTON, W.D. (1990): Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert sex. – PNAS 87: 2424-2427.
- WERREN, J.H. (1997): Biology of *Wolbachia*. – Annu. Rev. Entomol. 42: 587-609.
- ZCHORI-FEIN, E., ROUSCH, R.T. & HUNTER, M.S. (1992): Male production induced by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). – Insect Mol. Biol. 4: 173-178.
- ZCHORI-FEIN, E., GOTTLIEB, Y., KELLY, S.E., BROWN, J.K., WILSON, J.M., KARR, T.L. & HUNTER, M.S. (2001): A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. – PNAS 98: 12555-12560.
- ZCHORI-FEIN, E., PERLMAN, S.J., KELLY, S.E., KATZIR, N., HUNTER, M.S. (2004): Characterization of 'Bacteroidetes' symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of 'Candidatus Cardinium hertigii'. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 961-968.