

Entomologica Austriaca	13	57-62	Linz, 17.3.2006
------------------------	----	-------	-----------------

## Wie lange ist das Bakterium *Wolbachia* im Verdauungstrakt der Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* nachweisbar?

M. ENIGL & P. SCHAUSBERGER

**Abstract:** How long is the bacterium *Wolbachia* detectable in the digestive tract of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*? *Wolbachia* is an intracellular bacterium that potentially influences the reproduction of its host. It has been found in the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* and its prey the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. In order to avoid false positive results when screening for *Wolbachia* we investigated the persistence of the bacterium in the guts of *P. persimilis*. We tested DNA samples of 6 strains by PCR after starving the predators or feeding them *Wolbachia*-free *T. urticae* for various time periods. Those experiments showed that *Wolbachia* could not be detected after 16 h at 25 °C and 48 h at 20 °C. In light of this experiment and further evidence from a survey, cloning and sequencing, and crossing experiments we conclude that *P. persimilis* is either extremely rarely infected with *Wolbachia* or not a host of *Wolbachia* at all. Deprivation of infected prey seems a crucial procedure before screening predatory mites and insects for *Wolbachia* or other bacteria that also occur in their prey.

**Key words:** Phytoseiidae, *Wolbachia*, biological control, endosymbionts.

### Einleitung

*Wolbachia* ist ein intrazelluläres endosymbiontisches Bakterium, welches in Arthropoden weit verbreitet ist. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich vertikal, d.h. vom Muttertier auf die Nachkommen. Die Besonderheit des Bakteriums *Wolbachia* liegt darin, dass es die Reproduktion seines Wirtstieres mit Hilfe folgender Mechanismen beeinflussen kann: Cytoplasmatische Inkompatibilität (CI), Induktion von Parthenogenese (PI), Male Killing und Feminisierung (z. B. STOUTHAMER et al. 1999). Daraus ergeben sich gravierende Konsequenzen für die Fitness des Wirtstieres. *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) ist eine räuberische Milbe, die in der biologischen Schädlingskontrolle hauptsächlich gegen die Gemeine Spinnmilbe *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) eingesetzt wird (MCMURTRY & SCRIVEN 1997). *Wolbachia* wurde bereits in beiden Arten, also Räuber (BREEUWER & JACOBS 1996; JOHANOWICZ & HOY 1996; WEEKS et al., 2003; ZCHORI-FEIN & PERLMAN 2004) und Beute (e.g.: TSAGKARAKOU et al. 1996; BREEUWER & JACOBS 1996; GOTOH et al. 2003), gefunden. In ersten Versuchen fanden wir beinahe identische Sequenzen von *Wolbachia* in Räuber und Beute. Dies deutete darauf hin, dass der positive Nachweis im Räuber aus unverdauter Beute im Verdauungstrakt resultiert (ENIGL et al. 2005). Das Ziel der vorliegenden Studie war

herauszufinden, wie lange man *Wolbachia* aus dem Darminhalt des Räubers, also vom Beutetier stammend, nachweisen kann. Solche Untersuchungen sind unerlässlich, um falsche Positivnachweise und Schlussfolgerungen zu vermeiden.

## Material und Methode

### Herkunft und Zucht der Milben

Es wurden 6 *P. persimilis* Stämme (ER, K, KO, OR, PANF und BIO) von 5 verschiedenen Herkünften in unserem Labor auf Bohnenblättern mit *T. urticae* gezüchtet und für die Experimente verwendet. BIO und ER wurden mit Individuen aus einer Massenzucht etabliert, die wir von einer Nützlingszuchtfirma in Wien zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhielten. BIO befand sich 3 Monate, ER 24 Monate in unserem Labor. KO stammt von einem Massenzüchter in den Niederlanden (3 Monate im Labor), K von einem Massenzüchter in Nairobi/Kenia (7 Monate im Labor). OR und PANF wurden im Freiland gesammelt, wobei OR aus Oregon/USA (12 Monate im Labor) und PANF aus Sizilien/Italien (15 Monate im Labor) stammt. Jeder Stamm wurde auf einer eigenen Zuchtarena gehalten. Diese bestand aus Bohnenblättern auf einem wassergesättigten Schwamm mit einer Plastikplatte in einem Plastikgefäß – als Abgrenzung und Fluchtbarriere dienten Kosmetiktuchstreifen rund um die Platte. Die Milben wurden alle 2-3 Tage mit Spinnmilben gefüttert, indem befallene Bohnenblätter auf die Arena platziert wurden (MCMURTRY & SCRIVEN 1965). *Tetranychus urticae* stammt ursprünglich von der Nützlingszuchtfirma in Wien und wurde auf *Phaseolus vulgaris* (Buschbohnen) im Labor gezüchtet.

### Persistenz Experiment

Nachdem die Spinnmilben mit *Wolbachia* infiziert waren, mussten wir zunächst eine *Wolbachia*-freie Linie schaffen: 4 erwachsene Weibchen wurden in Acryl-Glas-Käfige mit 15 mm Durchmesser und 3 mm Höhe gesperrt, wobei der Boden aus einem feinmaschigen Netz bestand und ein Objektträger als Deckel diente (SCHAUSBERGER 1997). Die Käfige waren durch einen Filterpapierstreifen mit einer Lösung aus Glucose und einem Antibiotikum verbunden. Beim Aufsaugen der Flüssigkeit wurden die Spinnmilben durch das Antibiotikum von dem Bakterium kuriert. Nach 48 h wurden die Weibchen auf Blattarenen transferiert, wo sie für 3-5 Tage Eier ablegten. Danach wurden die Spinnmilben auf Bohnenpflanzen gebracht, worauf die *Wolbachia*-freie Linie in einem separaten Raum weitergezüchtet wurde. Die Abwesenheit von *Wolbachia* wurde immer wieder durch PCR (Polymerase Chain Reaction) bestätigt.

Die oben genannten *P. persimilis* Stämme wurden verwendet, um die Persistenz von *Wolbachia* im Darminhalt der Raubmilben zu untersuchen. Für die Experimente wurden 2-5 erwachsene Weibchen aus den Zuchtarenen der 6 Stämme genommen und bei 2 verschiedenen Temperaturen für unterschiedliche Perioden entweder gehungert oder mit kurierten Spinnmilben gefüttert. Die Temperaturen betragen 20 und 25 °C und die Zeitspannen 0, 16, 24, 32, 48 und 56 Stunden. Zum Hungern wurden die Weibchen in Käfige, wie oben beschrieben, gesetzt. Das Füttern mit kurierten Spinnmilben fand auf Blattarenen statt. Der Nachweis von *Wolbachia* erfolgte durch DNA-Extraktion und

anschließende PCR. Vor der Extraktion wurden die Individuen mit 70 %igem Alkohol gereinigt und 15 min luftgetrocknet, um externe Kontamination zu vermeiden. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits nach den Anweisungen des Handbuchs des Herstellers. Die PCR wurde mit den *Wolbachia*-spezifischen Primern *wsp-F* und *wsp-R* (JEYAPRAKASH & HOY 2000), welche ein etwa 600 bp Fragment amplifizieren, durchgeführt.

### Ergebnisse

Zeit (Logistische Regression;  $B = 0.930$ ;  $P < 0.0001$ ) und Temperatur ( $B = 0.115$ ;  $P < 0.0001$ ) hatten einen signifikanten Einfluss auf die Persistenz von *Wolbachia* im Darminhalt von *P. persimilis*; Herkunft ( $B = 1.068$ ;  $P = 0.600$ ) und Art der Behandlung (Hungern oder Füttern mit kurierten Spinnmilben;  $B = 0.814$ ;  $P = 0.651$ ) hatte keinen Effekt (Abb. 1). Nachdem die Raubmilben für eine ausreichende Zeit gehungert hatten oder mit kurierten Spinnmilben gefüttert worden waren, konnte in keiner Probe mehr *Wolbachia* nachgewiesen werden (Abb. 1).

### Diskussion

Spinnmilben sind häufig mit *Wolbachia* infiziert (z.B. BREEUWER & JACOBS 1996; siehe auch Einleitung) und unverdaute Beute im Darminhalt von *P. persimilis* kann zu Amplifizierung von *Wolbachia* durch PCR führen (JOHANOWICZ & HOY 1996). Aufgrund der Möglichkeit des Nachweises aus dem Darminhalt können falsche Schlüsse bezüglich der Infektion mit *Wolbachia* in der Raubmilbe gezogen werden. Die Umgebungstemperatur spielt offensichtlich eine wesentliche Rolle in Bezug auf den Infektionsstatus mit *Wolbachia* einzelner Individuen und für die Verbreitung innerhalb einer Population. *Galendromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) (JOHANOWICZ & HOY 1998) und *T. urticae* (VAN OPIJNEN & BREEUWER 1999) konnten durch Wärmebehandlung von *Wolbachia* kuriert werden. Wir konnten *Wolbachia* bei 25 °C nur für 16 h, jedoch bei 20 °C für 48 h nachweisen. Dies ist wahrscheinlich auf einen beschleunigten Metabolismus bei höherer Temperatur zurückzuführen. Das Hungern ist also eine essentielle Voraussetzung um Räuber auf eine Infektion mit *Wolbachia* zu untersuchen. In der fakultativ räuberischen Milbe *Amblyseius reductus* (Acari: Phytoseiidae), welche sich hauptsächlich von Pollen ernährt, konnte *Wolbachia* nur unmittelbar nach dem Füttern von infizierten Spinnmilben nachgewiesen werden, aber nicht mehr 4 h später (JOHANOWICZ & HOY 1996) – die Umgebungstemperatur während des Hungerns ist in diesem Fall unbekannt. Unsere Studie und jene von JOHANOWICZ & HOY (1996) sind die einzigen, die untersuchten, wie lange *Wolbachia* aus unverdaulichem Darminhalt nachweisbar ist. Weiters zeigt unsere Studie das erste Mal die Persistenz von *Wolbachia* im Darm, wenn die Nahrung des Räubers von infiziert auf nicht infiziert umgestellt wurde. Unsere Studie zeigt, dass *Wolbachia* unerwartet persistent im Darminhalt der räuberischen Milbe *P. persimilis* ist. Zusammen mit den Ergebnissen eines Screenings von 17 Herkünften, dem Klonieren und Sequenzieren von *Wolbachia* aus Räuber und Beute und Kreuzungsexperimenten (ENIGL et al. 2005) schließen wir, dass *P. persimilis* entweder sehr selten mit *Wolbachia* infiziert ist oder gar kein Wirtstier von *Wolbachia* ist. Die Ergebnisse dieser und damit zusammenhängender Studien (ENIGL

et al. 2005) sind von großer Bedeutung für die Ausführung zukünftiger und die Interpretation bereits durchgeführter Studien zur Infektion von Räubern/Parasitoiden mit *Wolbachia* und deren Beute/Wirtstieren.

### Danksagung

Wir danken S. Blackwood, C. Jung, C. Kazak, M. Gross, M. Knapp, S. Kreiter, S. Ragusa und G. Waite für die Bereitstellung von Milben. M. Enigl wurde vom FWF (Projekt P 15498) und P. Schausberger von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (APART Stipendium) finanziert.

### Zusammenfassung

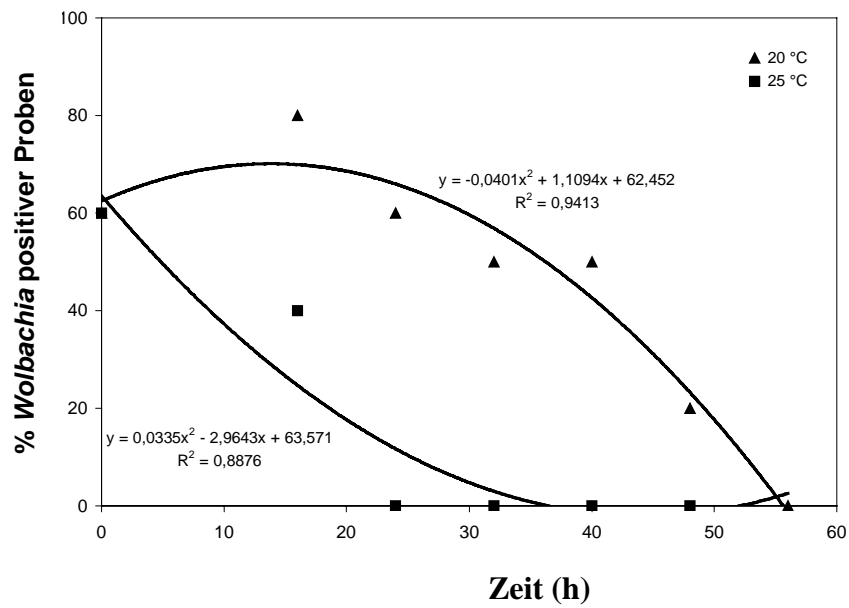
*Wolbachia* ist ein intrazelluläres Bakterium, welches potenziell die Reproduktion seines Wirtstieres beeinflussen kann. Es wurde bereits in der Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* und seinem Beutetier *Tetranychus urticae* gefunden. Um falsche positive Ergebnisse bei *Wolbachia*-Screenings zu vermeiden, untersuchten wir die Persistenz des Bakteriums im Darm des Räubers. Es wurden DNA Proben von 6 Stämmen mit Hilfe der PCR auf ihre Infektion mit *Wolbachia* getestet, nachdem die Räuber für unterschiedliche Zeitspannen hungern mussten oder mit durch Antibiotika kurierten Spinnmilben gefüttert wurden. In diesen Versuchen konnte *Wolbachia* in der Raubmilbe nicht länger als 16 h bei 25 °C und 48 h bei 20 °C nachgewiesen werden. Zusammen mit Ergebnissen aus Klonieren, Sequenzieren und Kreuzungsexperimenten schließen wir, dass *P. persimilis* entweder äußerst selten mit *Wolbachia* infiziert ist oder überhaupt kein Wirt des Bakteriums. Das Ausschließen von infizierter Beute aus räuberischen Milben und Insekten bei Untersuchungen zum Infektionsstatus mit *Wolbachia* erscheint uns deshalb als unerlässliche Vorbereitung.

### Referenzen

- BREEUWER J.A.J. & G. JACOBS (1996): *Wolbachia*: Intracellular manipulators of mite reproduction. — Exp. Appl. Acarol. **20**: 421-434.
- ENIGL M., ZCHORI-FEIN E. & P. SCHAUSBERGER (2005): *Wolbachia* in the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*: negative evidence. — Exp. Appl. Acarol. **36**: 249-262.
- GOTOH T., NODA H. & X.Y. HONG (2003): *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari : Tetranychidae) in Japan. — Heredity **91**: 208-216.
- JEYAPRAKASH A. & M.A. HOY (2000): Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76 % of sixty-three arthropod species. — Insect Mol. Biol. **9**: 393-405.
- JOHANOWICZ D.L. & M.A. HOY (1996): *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). — Annals of the Entomological Society of America. **89**: 435-441.
- JOHANOWICZ D.L. & M.A. HOY (1998): The manipulation of arthropod reproduction by *Wolbachia* endosymbionts. — Fla. Entomol. **81**: 310-317.
- MCMURTRY J.A. & B. CROFT (1997): Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. — Annu. Rev. Entomol. **42**: 291-321.
- MCMURTRY J.A. & G.T. SCRIVEN (1965): Life-History Studies of *Amblyseius limonicus*, with Comparative Observations on *Amblyseius hibisci* (Acarina: Phytoseiidae). — Annals of the Entomological Society of America **58**: 106-111.

- SCHAUSBERGER P. (1997): Inter- and intraspecific predation on immatures by adult females in *Euseius finlandicus*, *Typhlodromus pyri* and *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae). — Exp. Appl. Acarol. **21**: 131-150.
- STOUTHAMER R., BREEUWER J.A. & G.D. HURST (1999): *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. — Annu. Rev. Microbiol. **53**: 71-102.
- TSAGKARAKOU A., GUILLEMAUD T., ROUSSET F. & M. NAVAJAS (1996): Molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a *Tetranychus urticae* strain (Acari: Tetranychidae). — Insect Mol. Biol. **5**: 217-221.
- VAN OPIJNEN T. & J.A. BREEUWER (1999): High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. — Exp. Appl. Acarol. **23**: 871-881.
- WEEKS A., VELTEN R. & R. STOUTHAMER (2003): Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. — Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **270**: 1857-1865.
- WERREN J.H. (1997). Biology of *Wolbachia*. — Annu. Rev. Entomol. **42**: 587-609.
- ZCHORI-FEIN E. & S.J. PERLMAN (2004): Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. — Mol. Ecol. **13**: 2009-2016.

Anschrift der Verfasser:     Monika ENIGL  
                                   Peter SCHAUSBERGER  
                                   Institut für Pflanzenschutz,  
                                   Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und  
                                   Pflanzenbiotechnologie,  
                                   Universität für Bodenkultur  
                                   Peter Jordanstrasse 82, A-1190 Wien, Austria  
                                   E-Mail: [monika.enigl@boku.ac.at](mailto:monika.enigl@boku.ac.at)  
  [peter.schausberger@boku.ac.at](mailto:peter.schausberger@boku.ac.at)



**Abb. 1:** Prozent *Wolbachia*-positiver Proben, nachdem die Raubmilben eine gewisse Zeit gehungert hatten oder mit *Wolbachia*-freien Spinnmilben gefüttert worden waren (Daten für beide Arten der Behandlung zusammengefasst).