

6 Diskussion

6.1 Phylogenetische Charakterisierung der Endosymbionten

Für Myzetozyten-assoziierte Endosymbionten wird ein ausschließlich vertikaler Übertragungsweg angenommen (Buchner 1965), der eine hoch kongruente Entwicklung von Wirtstieren und Symbionten nach sich zieht. Tatsächlich wurde bei einigen bereits beschriebenen Bakterien-Insekten-Endosymbiosen eine Kospeziation der beiden Partner festgestellt. Bekannte Beispiele einer kongruenten Symbionten-Wirt-Entwicklung sind die Assoziationen zwischen Blattläusen mit ihren Symbionten der Gattung *Buchnera*, Tsetsefliegen mit ihren Symbionten der Gattung *Wigglesworthia* und Schaben mit ihren entsprechenden bakteriellen Partnern aus der Gruppe der Flavobakterien (Baumann et al. 1995; Aksoy 1995a; Bandi et al. 1995).

In der hier untersuchten Ameisen-Bakterien-Symbiose wurde ein Vergleich des phylogenetischen Stammbaumes der Bakterien mit dem ihrer Wirtsameisen durchgeführt, um so Aussagen über die evolutive Entwicklung der beiden Partner machen zu können. Die Stammbäume basieren auf Vergleichen der 16S rDNA-Sequenzen der Symbionten bzw. der COI-Sequenzen (Cytochrom Oxidase Untereinheit I-Sequenzen) der Ameisen. Innerhalb beider Stammbäume bilden die nord- und südamerikanischen Arten *C. floridanus*, *C. atriceps*, *C. rufipes* und *C. rufipes* B aus der Untergattung *Myrmothrix* die deutlichsten Untergruppen aus (Abb. 8; 2. UG). Die Symbionten der Arten *C. ligniperdus*, *C. herculeanus* (E), *C. herculeanus* (A) und *C. pennsylvanicus* zeigen ebenfalls eine signifikant kongruente Entwicklung mit ihren Ameisenwirten, die der *Camponotus*-Untergattung *Camponotus* (s.s) angehören (Abb. 8; 3. UG). Die Ameisenart *Camponotus sericeiventris*, die mit Hilfe der klassischen, auf morphologische Merkmale basierenden, Systematik in die Untergattung *Myrmepomis* eingeordnet wurde, nimmt einen isolierten Platz sowohl innerhalb des 16S-Symbionten-Stammbaumes als auch innerhalb des COI-Stammbaumes der Ameisen ein (Abb. 8). Die Symbionten von *C. sericeiventris* sind jedoch näher mit den Symbionten der beiden südamerikanischen Arten *C. silvicola* und *C. balzani* (Untergattung: *Tanaemyrmex*) verwandt, als dies bei ihren Wirtstieren der Fall ist. *Tanaemyrmex* ist eine Untergattung, welche eine große, sehr diverse Gruppe von *Camponotus*-Arten umfasst. Teilweise wurden in diese Untergattung Arten eingeordnet, die nicht eindeutig klassifiziert werden konnten. Auch bei den hier untersuchten Arten aus

der Untergattung *Tanaemyrmex*, bilden nur die Arten *C. silvicola* und *C. balzani* ein signifikantes Cluster, das im molekularen Symbionten- und Ameisen-Stammbaum Bestand hat. Die beiden anderen Arten *C. (Tanaemyrmex) socius* und *C. (Tanaemyrmex) castaneus* können beim Vergleich der beiden Stammbäume keiner gemeinsamen Gruppe zugeordnet werden. Im Falle von *C. socius* zeigte die 16S rDNA-Sequenz der Symbionten eine engere Verwandtschaft mit der *Camponotus* sensu stricto Untergattung (*C. ligniperdus*, *C. herculeanus*, *C. pennsylvanicus*) als mit den anderen untersuchten Symbiontenarten (Ähnlichkeitswerte: 97.0-97.2%). Dies war ebenfalls im Ameisen-Stammbaum der Fall (Ähnlichkeitswerte: 82.9-85.4%). Die Ausnahmestellung, die *C. castaneus* innerhalb der Stammbäume einnimmt, soll nachfolgend noch näher erläutert werden. Es ist zu erwarten, dass phylogenetische Analysen weiterer Mitglieder der Untergattung *Tanaemyrmex* eine komplette Umstrukturierung ihrer bisherigen, mit klassischen Mitteln erstellten Systematik mit sich bringen wird.

In den bisher diskutierten Ergebnissen zeigte der direkte Vergleich der Stammbäume, dass es in zwölf von den insgesamt dreizehn untersuchten *Camponotus*-Arten eine strenge Kospeziation von Endosymbionten und Ameisenwirten gibt. Einzige Ausnahme bildete die Art *Camponotus castaneus*. Bei dieser Art ließ sich keine parallele Entwicklung von Symbiont und Wirt feststellen. Die enge Verwandtschaft der *C. castaneus*-Symbionten mit den *C. pennsylvanicus*-Symbionten (Ähnlichkeitswert: 99.7%) deckt sich nicht mit den Ergebnissen, welche die Analyse der COI-Teilsequenzen (Ähnlichkeitswert: 86.4%) (Gadau et al. 1999) oder die klassische, mit Hilfe morphologischer Marker erstellte, Systematik (nach Creighton 1950) der Wirte erbrachte. Im Ameisen-Dendrogramm sind die Arten *C. herculeanus* und *C. ligniperdus* deutlich näher mit *C. pennsylvanicus* verwandt (Ähnlichkeitswerte: 87.6-88.2%) und bilden innerhalb dieses Stammbaumes ein eigenes Cluster (bootstrap-Wert der Verzweigung: 96%). Bisher gibt es noch keine ausreichende Erklärung für die nahe Verwandtschaft, die zwischen den *C. castaneus*- und den *C. pennsylvanicus*-Symbionten besteht. Interessanterweise leben ihre Wirtsameisen in geographisch stark überlappenden Gebieten, was auf einen horizontalen Transfer der Symbionten hindeuten könnte.

Im Gegensatz dazu scheint eine horizontale Übertragung von Symbionten bei anderen untersuchten *Camponotus*-Arten trotz geographischer Überlappung nicht stattgefunden zu haben. Die in Florida lebende Art *C. floridanus* ist z.B. näher mit der in Südamerika beheimateten Art *C. rufipes* verwandt, als mit den ebenfalls in Florida leben Arten *C. castaneus* oder *C. socius*. Es scheint, dass in der Vergangenheit eine Migration

der beiden Ameisenarten (*C. floridanus* und *C. rufipes*) über eine lange geographische Distanz erfolgte und es trotz der geographischen Nähe von *C. floridanus* mit den beiden Arten *C. castaneus* und *C. socius* niemals zu einer horizontalen Übertragung von Symbionten kam. Die geographische Ausbreitung von *C. herculeanus* ist besonders interessant. Diese *Camponotus*-Art ist in Europa, Asien und Nordamerika zu finden (Bolton 1995). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein europäisches und ein nordamerikanisches *C. herculeanus*-Isolat phylogenetisch eingeordnet. Die COI-Sequenzen der beiden Arten waren zu 100% identisch (Tab. 3) (Gadau et al. 1999), die 16S rDNA-Sequenzen ihrer Symbionten, besaßen ebenfalls eine sehr große Ähnlichkeit von 99.5% (Tab. 2) (Sauer et al. 2000). Die Trennung von Populationen der Art *C. herculeanus* scheint deswegen erst gegen Ende der letzten Eiszeit vor ca. 10 000 Jahren geschehen zu sein, als die Landbrücke zwischen Alaska und Asien getrennt wurde. Die beiden Isolate bilden zusammen mit der europäischen Art *C. ligniperdus* und der nordamerikanischen Art *C. pennsylvanicus* eine gemeinsame Gruppe, was durch beide Stammbäume unterstützt wird (Abb. 8). Alle vier Arten werden der *Camponotus* sensu stricto Untergattung zugeordnet. Diese Einordnung, die sich auf die genetischen Untersuchungen stützt, deckt sich ebenfalls mit der Einteilung, die mit Hilfe der klassischen Systematik vorgenommen wurde. Eine mögliche Erklärung für den geringeren Ähnlichkeitswert (99.5%), den die 16S rDNA-Sequenzen der Symbionten von *C. herculeanus* im Gegensatz zur 100%igen Übereinstimmung der COI-Sequenzen besitzen, könnte in einer höheren Mutationsrate ihrer 16S rDNA begründet sein. Tatsächlich belegen neuere Untersuchungen, dass in den 16S-Genen von rein maternal übertragenen Endosymbionten gehäuft Basensubstitutionen auftreten (Lambert und Moran 1998). Die codierenden Gene weisen eine Zunahme von Nukleotidsubstitutionen auf, die einen Aminosäure-Austausch bewirken können (Moran 1996). Die Verfügbarkeit von fossilen Funden unterschiedlicher Arthropodenarten erlaubte die Kalibrierung einer molekularen Uhr, die auf die Nukleotidsubstitutionsrate in der 16S rDNA der Symbionten rückschließen lässt. Die Substitutionsrate innerhalb der den *Camponotus*-Symbionten nah verwandten Bakteriengattung *Buchnera* (1-2% pro 50 Mio Jahre), ist etwa doppelt so hoch wie die Rate bei freilebenden Bakterien (1% pro 50 Mio. Jahre) und kann bis zu 36 mal höher liegen als die Substitutionsrate innerhalb der 18S rDNA der Blattlauswirte (Moran 1996; Moran et al. 1995). Mit Hilfe dieser errechneten Substitutionsraten kann man auf das Alter bestimmter Symbiosen rückschließen.

Vergleiche der phylogenetischen Stammbäume von Ameisen-, Tsetsefliegen- und Aphidensymbionten eröffnen neue Einblicke in mögliche evolutive Zusammenhänge dieser Symbiosen. Die Kospeziation der *Buchnera*-Symbionten mit ihren Wirten begann vor ca. 160-280 Mio. Jahren (Moran et al. 1993). Ebenso könnte auch die Ameisen-Bakterien-Symbiose vor mehr als 100 Mio. Jahren entstanden sein. Allerdings konnten in den ursprünglicheren Unterfamilien der *Formicidae* (*Nothomyrmecinae*, *Aneuretinae*, *Myrmeciinae*, *Ponerinae*) bisher noch keine Symbionten gefunden werden, wohingegen die höher entwickelte Unterfamilie der *Formicinae* Endosymbiosen mit Bakterien ausbildet. Interessanterweise zeigte sich beim Vergleich des Stammbaumes der Aphidensymbionten mit dem der Ameisen, dass beide von einem gemeinsamen Vorfahr abstammen könnten. Hierfür wäre eine mögliche Erklärung, dass in vielen Ökosystemen Ameisen und Blattläuse in einer engen Symbiose leben. Die Blattläuse sondern Honigtau ab, der vor allem von Ameisen der Unterfamilien *Dolichoderinae* und *Formicinae* als Nahrungsquelle genutzt wird (Houk und Griffiths 1980). Die Ameisen halten die Blattläuse als „Haustiere“ und beschützen sie vor Fressfeinden (Hölldobler und Wilson 1990). Es ist nicht bekannt, wie lange diese ektosymbiontische Partnerschaft schon existiert, jedoch ist es durchaus denkbar, dass es ursprünglich zu einer horizontalen Übertragung des gemeinsamen Bakterien-Vorfahrens von Blattlaus zu Ameise kam.

Eine genetische Besonderheit, welche die 16S-Gene aller untersuchten *Camponotus*-Endosymbionten besitzen, ist die Existenz von intervenierenden Sequenzen (IVS). Diese IVS repräsentieren kurze DNA-Sequenzen, die in der reifen rRNA nicht mehr zu finden sind und die eventuell als artspezifische Marker bei der phylogenetischen Klassifikation von Bakterien mithelfen könnten (Rainey et al. 1996). Alle 16S-Gene der Endosymbionten besaßen zwei intervenierende Sequenzen, die in ihrer Länge variabel und ungewöhnlich AT-reich waren. Die kürzesten Inserts besaßen die *C. socius*-Symbionten, deren GC-Gehalt interessanterweise mit 43 mol% deutlich höher lag als der Gehalt der anderen untersuchten Arten (5-33 mol%). Untersuchungen der IVS der 16S rDNA-Sequenzen einzelner Individuen der drei Symbionten-Untergruppen hinsichtlich Insertlänge und GC-Gehalt variierten so stark, dass hier keine Korrelation der Symbionten aufgrund der Eigenschaften ihrer intervenierenden Sequenzen möglich war, sodass die IVS hier als phylogenetischer Marker nicht geeignet sind.

Eine weitere genetische Besonderheit, die alle untersuchten *Camponotus*-Endosymbionten besaßen, war eine untypische Anordnung ihrer rRNA-Gene. PCR-Analysen zeigten, dass ihr rRNA-Operon nicht, wie bei den meisten Bakterien in der

Reihenfolge *rrs* – *rrl* – *rrf* (16S-, 23S-, 5S rDNA) angeordnet ist (Abb. 6), sondern wahrscheinlich aus zwei Transkriptionseinheiten besteht. Um die Anordnung des rRNA-Operons in den *Camponotus*-Symbionten genau zu klären, bedarf es diesbezüglich in der Zukunft noch genauerer Untersuchungen ihrer genomischen DNA. Bei der nah verwandten Gattung *Buchnera* konnte gezeigt werden, dass ihr rRNA-Operon auf die beiden Transkriptionseinheiten *rrs* und *tRNA^{Glu} – rrl – rrf* aufgeteilt ist (Munson et al. 1993; Rouhbakhsh und Baumann 1995). Die den *Camponotus*-Symbionten nächstverwandten Tsetsefliegensymbionten besitzen eine „normale“ Operon-Struktur (Aksoy 1995a; Aksoy et al. 1995). Ebenso verhält es sich bei den freilebenden Vertretern der *Enterobacteriaceae*.

6.2 Histologische Untersuchungen der Endosymbiose

In der Vergangenheit wurden schon viele histologische Untersuchungen, bezüglich Gestalt, Form, Lokalisation, Entwicklung und Übertragung an den *Camponotus*-Endosymbionten durchgeführt (Buchner 1918, 1921, 1965; Hecht 1924; Lilienstern 1932; Kolb 1959; Dasch 1975; Schröder 1996; Schroeder et al. 1996). Die in dieser Arbeit durchgeführten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die früheren Berichte nur zum Teil bestätigen.

Die ersten histologischen Arbeiten, die im Rahmen dieser Dissertation vorgenommen wurden, beschäftigten sich mit der Lokalisation der Symbionten innerhalb der Gewebe adulter Individuen aus den drei verschiedenen Ameisenkasten (Arbeiterinnen, Königinnen und Männchen). Die Endosymbionten wurden von Dasch (1975) bei *Camponotus* bisher ausschließlich in den Geweben des Mitteldarmes und in den Ovarien aller untersuchten weiblichen Individuen gefunden. Gehirn, Kopf, Thorax, Fettkörper, alle übrigen Teile des Verdauungstraktes und die Abdominalganglien waren endosymbiontenfrei. Ebenso fand er in den Geschlechtsorganen der Männchen keinerlei Symbionten. Mit den für diese Arbeiten untersuchten histologischen Präparaten lassen sich die Aussagen von Dasch (1975) zum größten Teil bestätigen. Die nachfolgend diskutierten Beobachtungen beziehen sich auf Untersuchungen an Mitteldarmepithelien von Arbeiterinnen, jungen bzw. älteren Königinnen und Männchen die sowohl von Königinnen, als auch von Arbeiterinnen produziert wurden. Die histologischen

Untersuchungen der Ovarien und Spermatheken von Königinnen, der Ovarien von Arbeiterinnen und der Hoden von Männchen, werden im Anschluss diskutiert.

Die Endosymbionten der Ameisengattung *Camponotus* befinden sich innerhalb des Mitteldarms in Myzetozytenzellen, die allerdings nicht, wie bei den beiden Symbiontengattungen *Buchnera* und *Wigglesworthia* beschrieben, ein eigenes Organ (Myzetom) bilden (Buchner 1965; Aksoy et al. 1995), sondern in das Mitteldarmepithel interkalieren (Schroeder et al. 1996). Myzetozytenzellen wurden in den Mitteldärmen aller untersuchten adulten Individuen gefunden. Bei den Ameisen-Symbionten handelt es sich um Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, die mit 10-30 μm ein Vielfaches der Größe der Aphiden- bzw. Tsetsefliegensymbionten besitzen. Sie sind auch nicht, wie z.B. *Buchnera*, von der Plasmamembran entstammenden Vesikelmembranen, sog. Symbiosomen, umgeben. Die *Camponotus*-Symbionten liegen, ebenso wie die Endosymbionten der Tsetsefliege *Glossina* (Reinhardt et al. 1972) und des Käfers *Sitophilus* (Nardon et al. 1988), frei im Zytoplasma der Myzetozytenzelle vor. Nach einer von Pearson (1963) aufgestellten und von Schwemmler (1989) unterstützten Hypothese, sind fakultative Parasiten üblicherweise von einer Membran umgeben, die sie vor einer Erkennung innerhalb der Wirtszelle schützt, während Symbionten frei im Zytoplasma vorkommen. Diese Hypothese wird durch die rein symbiontische Beziehung die zwischen den *Buchnera*-Symbionten und den Aphiden besteht, widerlegt.

In Querschnitten durch die Mitteldarmepithelien der *Camponotus*-Ameisen konnten bei Arbeiterinnen, Königinnen und Männchen Myzetozyten gefunden werden, die prall mit den stäbchenförmigen, gram-negativen Symbionten gefüllt waren (Abb. 9-13). Diese Myzetozytenzellen waren relativ groß und besaßen im Unterschied zu den Epithelzellen nie Lipidvesikel oder einen Mikrovillisaum. Das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Zelltypen innerhalb der Mitteldarmepithelien der Ameisen wurde bereits von einer Reihe Autoren (Hecht 1924; Lilienstern 1932; Kolb 1959; Buchner 1965; Schröder 1996) beschrieben. Dasch (1975) hingegen behauptete, nach Fixierung in S-Collidin-Puffer sei deutlich zu sehen, dass es sich um nur einen einzigen Zelltypus handle. Ein von anderen Autoren (Priester 1971; Schröder 1996) beschriebenes Aufplatzen des empfindlichen Gewebes der symbiontenträgenden Zellen sei nur auf die bei der Fixierung verwendeten Reagenzien Formaldehyd oder Glutaraldehyd zurückzuführen, die zum Anschwellen und Platzen dieses empfindlichen Gewebes führten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Fixiermethode nach Karnovsky angewendet, bei der keine der oben beschriebenen Artefakte beobachtet wurden. Auch das Aufplatzen ausschließlich symbionthaltiger

Myzetozyten, die ihren Inhalt ins Darmlumen abgeben (Schröder 1996), konnte nicht beobachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten histologischen Betrachtungen lassen den Schluss zu, dass im *Camponotus*-Mitteldarm tatsächlich zwei verschiedene Zelltypen existieren, nämlich die mit Bakterien gefüllten Myzetozyten und die vesikelreichen, Mikrovilli-tragenden Epithelzellen.

Auch alle in dieser Arbeit untersuchten Männchendärme besaßen myzetozytenähnliche Zellen, die prall mit Bakterien gefüllt waren (Abb. 12 und 13). Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Männchen von der Königin oder von Arbeiterinnen produziert waren. Interessanterweise findet man bei beiden Männchentypen jedoch auch innerhalb der Epithelzellen Bakterien (Abb. 12 und 13). Eventuell könnte mit dieser Beobachtung doch die Hypothese von Dasch (1975) unterstützt werden, die besagt, dass das Epithel aus nur einer Zellart besteht, welche durch ständige Erneuerung einer kontinuierlichen Gestaltänderung unterliegt. Da schon die äußere Morphologie der männlichen Ameisen stark von der weiblicher Individuen abweicht, unterscheiden sich möglicherweise auch die Strukturen ihrer inneren Organe, was das Vorhandensein zweier Zelltypen innerhalb der Därme weiblicher Individuen, als auch eventuell das nur eines Zelltyps innerhalb der Männchendärme erklären könnte.

Kolb (1959) und Dasch (1975) stellten fest, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme der Symbiontenzahl im Darm adulter Individuen kommt. Diese Beobachtungen konnte bei den untersuchten Arbeiterinnen und Männchen nicht bestätigt werden, denn innerhalb ihrer Darmgewebe fanden sich vergleichbar große Mengen an Symbionten. Die in dieser Arbeit innerhalb der *C. floridanus*-Arbeiterinnen gefundenen Symbiontenmengen unterschieden sich deutlich von denen Schröders (1996), die Arbeiterinnen mit einer großen Zahl Symbionten und solche, die fast gar nicht „infiziert“ waren fand. Alle hier untersuchten Arbeiterinnen besaßen gut gefüllte Myzetozyten (Abb. 9). In *C. floridanus*-Männchen, die aus Arbeiterinneneiern hervorgingen, fand Schröder (1996) nur wenige, oder gar keine Symbionten, in gefärbten Quetschpräparaten von Arbeiterinneneiern konnte sie jedoch die gleiche Menge Symbionten wie in den Eiern der Königinnen finden. Hölldobler (1965) fand ebenfalls große Symbiontenmengen in den Mitteldärmen von Männchen, die aus Eiern der Königin hervorgingen. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Männchen enthielten, gleichgültig ob von Königin oder Arbeiterinnen produziert, immer in etwa gleich viele Symbionten in ihren Darmepithelien. Eine Degeneration des Mitteldarmepithels bei älteren Männchen, wie es Hölldobler (1965) beschrieb, wurde bei den hier untersuchten Individuen nicht gefunden, da es sich

vermutlich um jüngere, wenige Tage bzw. Wochen alte Individuen handelte. Allerdings konnte das Alter der hier verwendeten Männchen nicht eindeutig bestimmt werden. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten nur in einem Fall eine altersbedingte Abnahme von Symbionten. Innerhalb des Darmepithels einer mehrere Jahre alten, begatteten Königin wurden ausschließlich leere Myzetozyten gefunden (Abb. 10). Im Mitteldarmepithel einer jungen, unbegatteten, erst einige Wochen alten Königin waren dagegen alle Myzetozyten noch prall mit Bakterien gefüllt (Abb. 11). Symbiontenfreie Myzetozyten konnten auch bei zwei weiteren älteren Königinnen gefunden werden, sodass anzunehmen ist, dass es bei Königinnen zu einer altersabhängigen Abnahme der Symbionten kommt. Eine naheliegende Erklärung für eine gleichbleibend hohe Symbiontenzahl innerhalb der Arbeiterinnen- bzw. Männchenkaste ist die relativ kurze Lebensdauer beider Kasten, die maximal mehrer Wochen bis Monate beträgt. Eine *Camponotus*-Königin kann dagegen bis zu zwanzig Jahre und älter werden (Hölldobler und Wilson 1990).

Schon die phylogenetischen Daten der *Camponotus*-Endosymbionten und ihrer Wirte lässt vermuten, dass es sich hier um einen vertikalen Übertragungsweg der Bakterien handelt. Der Nachweis von Bakterien in gefärbten Quetschpräparaten von Eiern der Königinnen und Arbeiterinnen wurde bereits von Schröder (1996) erbracht, sodass eine Infektion dieser Eier, wie schon von Lilienstern (1932) vermutet, auch tatsächlich stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden histologische Untersuchungen an den Geschlechtstieren der *Camponotus*-Ameisen durchgeführt, um die Hypothese eines maternalen Übertragungsweges genau zu betrachten. Früher durchgeführte lichtmikroskopische Untersuchungen an den Ovarien von *Camponotus*-Königinnen konnten folgendes zeigen: Jede Oozyte besitzt 15 Nährzellen und wird von einem Epithel aus Follikelzellen umgeben (Dasch 1975). Die Endosymbionten sind im jungen, sich entwickelnden Eileiter vorhanden und dringen in die entstehende Eizelle ein (Buchner 1918, 1921), die sie innerhalb kurzer Zeit, nach starker Vermehrung, vollständig ausfüllen (Buchner 1965). Im weiteren Verlauf verdrängt einströmende Dottermasse die Symbionten, bis diese schließlich nur noch am hinteren Pol der Eizelle zu finden sind (Hecht 1924). In den für diese Untersuchungen hergestellten lichtmikroskopischen Ovarienpräparaten von Königinnen und Arbeiterinnen waren die „reifen“ Eizellen fast vollständig mit Bakterien gefüllt (Abb. 14 und 15; links). Dieses Ergebnis kann mit parallel durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen gestützt werden (Abb. 14 und 15; rechts) und widerlegt die Ergebnisse von Hecht (1924).

Lilienstern (1932), Buchner (1965) und Dasch (1975) berichten, dass die Symbionten in sehr jungen Oozyten noch nicht vorkommen, dann aber, kurz bevor das Follikelepithel die Eizelle umgibt, aus dem Eileiter in die Follikelzellen eindringen und schließlich die Eizelle infizieren. Bei Untersuchungen des Endbereiches der Ovarien im Rahmen dieser Arbeit, wurden Oozyten gefunden, die noch sehr jung waren, jedoch schon Symbionten in sich trugen (Abb. 16) und von diesen ganz ausgefüllt waren. Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht mit elektronenmikroskopischen Bildern gestützt werden. Mit Hilfe der lichtmikroskopischen Präparate konnte nicht bestimmt werden, ob die jungen Oozyten schon vom Follikelepithel umgeben waren. Gegen die oben beschriebene Theorien von Lilienstern, Buchner und Dasch spricht jedoch die Beobachtung, dass bei Follikelzellen, welche die reife Eizelle umhüllen, zu keinem Zeitpunkt Symbionten gefunden werden konnten. Diese auch elektronenmikroskopisch untersuchten Follikelepithelien waren immer symbiontenfrei (Abb. 14 und 15; rechts). Im angrenzenden Ovargewebe konnten ebenfalls keine Bakterien gefunden werden. Um die Frage des Infektionsweges endgültig zu klären, müsste der Nachweis der Bakterien innerhalb der Ovarien mit Hilfe einer *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden vorgenommen werden.

Eine zweite Möglichkeit, wie Oozyten mit Symbionten infiziert werden könnten, stellt der Weg über die Männchen dar. Bisher gab es noch keine Hinweise auf eine mögliche Wirkung der *Camponotus*-Symbionten auf die Reproduktivität ihres Wirtes. Denkbar wäre jedoch, dass die Ameisen-Männchen, ähnlich wie bei beschriebenen, *Wolbachia*-infizierten Hymenopterenarten (Stouthamer 1999), einen Einfluß auf ihre eigene Fitness nehmen könnten, indem sie die Königinnen durch ihr Sperma mit Symbionten infizieren. Dieser Hypothese widersprechen zwar die oben beschriebenen Untersuchungen an Königinnen- und Arbeiterinnenovarien, welche deutlich zeigen, dass auch in jungen Oozyten schon große Symbiontenmengen vorhanden sind. Dennoch wurden entsprechende Untersuchungen an den Geschlechtsorganen von *C. floridanus*-Männchen gemacht, um diese Möglichkeit auszuschließen. Bei den untersuchten Männchen gibt es keine Hinweise auf Bakterien innerhalb ihrer Geschlechtsorgane. Allerdings war es sehr schwierig Aussagen darüber zu machen, da die Entwicklung der Geschlechtsorgane bei den Männchen stark altersabhängig ist und das Alter der verwendeten Individuen nicht eindeutig zu klären war. Die Samenblasen und die Anhangsdrüsen waren in allen Fällen schon gut entwickelt, was darauf hindeutet, dass es sich um ca. 14-25 Tage alte Männchen (Hölldobler 1965) handelte. Die Untersuchung

männlicher Geschlechtsorgane mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gestaltete sich sehr schwierig, da nach Fixierung und Einbettung der Präparate nicht mehr bestimmt werden konnte, um welchen Teil der Geschlechtsorgane es sich genau handelte. Dennoch wurde in keinem der elektronenmikroskopischen Präparate Bakterien gefunden (ohne Abbildung im Ergebnisteil), was die Beobachtungen von Dasch (1975) bestätigt. Versuche, die einzelnen Komponenten getrennt zu fixieren, wurden abgebrochen, da es stets zum Auslaufen der im Lumen befindlichen Sekrete kam und somit Aussagen über den Inhalt von Samenblase bzw. Anhangsdrüse nicht mehr möglich waren. Eine andere, einfachere Möglichkeit zu untersuchen, ob die Königin von den Männchen mit Symbionten infiziert wird, stellte die Untersuchung ihrer Spermatheka dar.

Eine *Camponotus*-Königin paart sich nur einmal in ihrem Leben (Seifert 1996). Die Spermien, die sie dabei aufnimmt und in ihrer Spermatheka aufbewahrt, bleiben bis ans Lebensende der Königin befruchtungsfähig. Da die Spermatheka das einzige Organ ist, mit dem der männliche Samen in Kontakt kommt, sollten dort, im Falle einer Infektion durch das männliche Sperma, Bakterien zu finden sein. In allen diesbezüglich untersuchten Organen konnte außer Spermien nichts gefunden werden (Abb. 17). Dieses Ergebnis überrascht nicht, bedenkt man, dass auch Arbeiterinnen, die keine Spermatheka besitzen und sich niemals mit Männchen paaren, Symbionten innerhalb ihrer Ovarien besitzen. Die Untersuchungen an den Spermatheken der Königinnen liefern einen zusätzlichen Hinweis auf einen rein maternalen Übertragungsweg.

Tatsächlich gibt es zunehmende Beweise, dass das Eindringen der Bakterien in die Oozyten der Ameisen die Basis für deren maternalen Übertragungsweg bildet. Über den Weg, den die Bakterien während der Eireifung, nach der Eiablage und während der Embryogenese der Ameisen wählen, gibt es bisher nur wenig befriedigende Ergebnisse, weswegen diese Frage im Rahmen dieser Arbeit ausführlich behandelt wurde. Das Vorhandensein stäbchenförmiger Strukturen im Ovar von *C. ligniperdus*-Königinnen wurde erstmals von Blochmann (1882) beschrieben, der bereits einen maternalen, zytoplasmatischen Weg der Symbionten-Vererbung postulierte. Buchner (1918, 1921) gab eine genaue Beschreibung des Eindringens der Bakterien durch die Follikelzellen in die wachsenden Oozyten.

Otto Hecht (1924) fand, dass die Endosymbionten im abgelegten Ei dichtgedrängt als wirre Bündel an dessen Hinterpol lokalisiert sind. Mit fortschreitender Eireifung kommt es zu einer Umlagerung der Bakterien. Zwischen primäre Bakteriozyten (Myzetozyten) werden „Zwischenzellen“ eingelagert, die später zu endgültigen

Bakteriozyten (Myzetozyten) werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen an Gefrierschnitten von Eiern zeigen im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hecht (1924), dass die Symbionten innerhalb des abgelegten Eies ringförmig angeordnet sind (Abb. 19; A), d.h. sie formen räumlich gesehen einen Ball oder eine Kugel. Eine Polarisierung der Symbionten konnte innerhalb aller untersuchten Eistadien nie beobachtet werden. Dies wird durch neuere entwicklungsbiologische Untersuchungen an Insekteneiern bestätigt (Borror et al. 1992), deren Aufbau wie nachfolgend beschrieben aussieht. Während der Oogenese der Eier produzieren die Follikelzellen die Eischalen. Zuerst wird die innere Eischale, die sogenannte Vittelinmembran, produziert, danach die äußere, stabile Schale, das sogenannte Chorion aufgelagert. An einem Pol der Oozyte bildet eine spezielle Gruppe von Follikelzellen die Mikropyle aus, ein kleines Röhrchen, durch die das Spermium eindringen kann. Die Follikelzellen sterben nach Abschluss der Bildung des Chorions ab. Nach der Befruchtung kommt es zu einer synchronen Kernteilung ohne Zytokinese, sodass ein Syncytium von zahlreichen Kernen entsteht. Diese Kerne wandern an die Peripherie der Eizelle und das periphere Zytoplasma wird in Zellen unterteilt, die jede einen Nukleus besitzen. Dieser periphere Zellgürtel bildet das Blastoderm aus. Die Blastodermzellen auf der ventralen Seite des Eies wachsen, verdicken sich und bilden die Ventralplatte. Aus dieser entwickeln sich die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) (Borror et al. 1992; Wehner und Gehring 1990). Aus dem Ektoderm entstehen während der Embryogenese Körperhülle, Tracheensystem, Nervensystem, Malpighigefäße und vorderes bzw. hinteres Ende des Verdauungstraktes. Das Mesoderm bildet Muskel, Herz und Gonaden aus und aus dem Endoderm entwickelt sich der Mitteldarm. Betrachtet man die Entstehung des Verdauungskanals im Insektenei nochmals genauer, bildet sich zuerst ein Ring aus endodermalem Rudiment, aus dem der spätere Mitteldarm entsteht. Nach Betrachtung dieser entwicklungsbiologischen Vorgänge während Oogenese und früher Embryogenese sind die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen an den Symbionten in frisch gelegten Eiern gut zu erklären. Da der hauptsächliche Aufenthaltsort der Symbionten der Mitteldarm der Ameisen ist, könnte es schon in diesem frühen Entwicklungsstadium zu einer ringförmigen Polarisierung der Symbionten kommen. In den Larvalstadien 1-3 (Abb. 19; B, C, D) wurde eine Auswanderung der Bakterien in mesodermales bzw. ektodermales Gewebe beobachtet, was aus entwicklungsbiologischer Sicht zu diesem Zeitpunkt noch problemlos möglich ist (Dr. P. Wolbert, pers. Mitteilung). Der schon im Ei beobachtete Bakterienring wurde bei der Auswanderung nicht aufgelöst

(Abb. 19; B, C, D). Die Umlagerung der Bakterien während der Ameiseneentwicklung erscheint wichtig, bedenkt man, dass in anbetracht des rein maternalen Übertragungsweges der Symbionten diese zu irgendeinem Zeitpunkt in die Gonaden der weiblichen Tiere gelangen müssen. Da sich die Gonaden aus dem Mesoderm entwickeln, ist eine Wanderung der Bakterien unumgänglich. Leider gelang es mit den hier verwendeten Techniken nicht, die Gonaden innerhalb der Larven klar zu lokalisieren, was Aussagen über einen Verbleib von Symbionten darin nicht möglich macht. Im letzten untersuchten Larvenstadium 4 (Abb. 19; E) konnten, außer im Larvendarm, keinerlei Bakterien im umgebenden Gewebe gefunden werden. Hier scheinen schon die gleichen Verhältnisse wie innerhalb der Mitteldärme adulter Individuen (Abb. 9-13) vorzuherrschen, d.h. die bakteriengefüllten Myzetozytenzellen interkalieren zwischen die Darmepithelzellen. Wie diese Beobachtungen an späten Larvenstadien zeigen, scheint es im Verlauf der Larvalentwicklung der *Camponotus*-Ameisen zu einem Absterben, oder zur Umlagerung der im Meso- und Ektoderm befindlichen Symbionten zu kommen. Für die Art und Weise wie dies geschieht, sind weitere entwicklungsbiologische Untersuchungen notwendig. Neuere Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie speziell bei Ameisen gibt es leider noch nicht. Wir können daher nur auf Ergebnisse zurückgreifen, die fünfzig Jahre und länger zurückliegen (Blochmann 1882; Buchner 1918, 1921; Hecht 1924; Lilienstern 1932) und sich auch nicht mit der Larvalentwicklung der Ameisen beschäftigen, sondern entwicklungsbiologische Betrachtungen des *Camponotus*-Eies beschreiben. Umfassende entwicklungsbiologische Untersuchungen des Ameisenwirtes wären daher, im Rahmen weiterer Forschungen an dieser Ameisen-Bakterien-Symbiose, von höchstem Interesse. Interessanterweise konnten in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien Symbionten innerhalb des Darmlumens gefunden werden, was eine Aufnahme dieser durch die Nahrung ausschließt und wiederum für den rein maternalen Übertragungsweg spricht.

6.3 Rolle der Endosymbionten

Um die Funktion der *Camponotus*-Endosymbionten für ihren Wirtes genauer untersuchen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit symbiontenfreie Ameisen erzeugt werden. Dadurch könnten Effekte, welche die fehlenden Mikroorganismen bewirken, studiert werden.

Es ist bereits gelungen, durch Antibiotika- oder Wärmebehandlung aposymbiotische Aphiden aufzuziehen (Wilkinson 1998; Campbell 1990; Douglas 1992; Ohtaka und Ishikawa 1991). Die Blattläuse reagierten auf die Behandlung mit vermindertem Wachstum und stark zurückgehender Reproduktivität. Es scheint also in diesem Fall eine Abhängigkeit dieser Insekten von ihren Mikroorganismen zu existieren. Bei früher durchgeführten Eliminierungsversuchen an intrazellulären Insektensymbionten, war es oft schwierig, Nebeneffekte, welche durch die Antibiotika- oder Wärmebehandlung hervorgerufen wurden, von Effekten, die fehlende Symbionten erzeugen, zu unterscheiden. Die am häufigsten benutzten Antibiotika Tetrazyklin und Rifampicin können sich in höheren Konzentrationen schädlich auf die Tiere auswirken (Campbell 1990; Griffiths und Beck 1974). Dennoch konnte durch eine Reihe von Versuchen für *Buchnera* gezeigt werden, das die beobachteten negativen Effekte hauptsächlich auf das Fehlen der Symbionten zurückzuführen sind (Baumann et al. 1995).

An Hymenopteren wurden Antibiotikabehandlungen schon bei den Wespenarten *Nasonia* und *Trichogramma* (Wilkinson 1998), sowie bei *Encarsia*, einem Endoparasiten der Schnabelkerfen durchgeführt (Zchori-Fein et al. 1992). Bei den sich rein thelytok fortpflanzenden *Trichogramma*-Wespen bewirkte die Behandlung mit Antibiotika eine Umkehr von Thelytokie zur Arrhenotokie (Stouthamer 1990). Die Wespen begannen mit der Männchenproduktion, jedoch nur dann, wenn sie mit den Antibiotika Rifampicin, Sulfamethoxazol, oder Tetrazyklin behandelt wurden. Die Antibiotika Chloramphenicol und Streptomycin zeigten geringe Wirkung, bei Ampicillin, Erythromycin, Gentamycin, Nitrofurantoin und Penicillin gab es überhaupt keine Effekte (Stouthamer 1990). Bei den Symbionten des Endoparasiten *Encarsia formosa* wurde durch Tetrazyklin-Fütterung ebenfalls die Männchenproduktion induziert (Zchori-Fein et al. 1992). Die in dieser Arbeit durchgeführten Fütterexperimente orientierten sich an den von Stouthamer (1990) beschriebenen Untersuchungen. Dass die Behandlungen die Stouthamer (1990) und Zchori-Fein mit Kollegen (1992) an *Trichogramma* bzw. *Encarsia* durchgeführt haben nicht problemlos auf *Camponotus*-Ameisen übertragbar sind, zeigte sich schon in der Vergangenheit. Dasch (1975) versuchte bereits durch Tetrazyklin-Fütterungen und Injektion von Lysozym aposymbiotische *C. pennsylvanicus*-Ameisen herzustellen. Jedoch gelang ihm nur eine Reduktion der Symbiontenzahl um ca. 90%, die mit der Bildung sphäroblastenartiger Strukturen einherging. Die Effekte welche die unternommenen Behandlungen auf den Ameisenorganismus hatten, gehen aus seiner Arbeit nicht hervor. Der Versuch, durch Wärme die intrazellulären Bakterien der Ameisen zu eliminieren

scheiterte ebenfalls (Dasch 1975). Die Ameisen schienen nach der Wärmebehandlung sogar weit mehr Symbionten zu besitzen als vorher. Schröder (1996) gelang die Eliminierung der Symbionten durch einmalige Fütterung mit 6% Tetrazyklin ebenfalls nicht vollständig. In dieser Arbeit wurden daher zuerst Kontrollversuche an *C. floridanus*-Arbeiterinnen durchgeführt, um über einen längeren Zeitraum (5 Wochen), die Wirkung verschiedener Antibiotika, bei unterschiedlichen Konzentrationen zu testen. Es wurden die Antibiotika Rifampicin, Chloramphenicol, Tetrazyklin und Ciprobay 200® verwendet. Bei den behandelten Ameisen zeigte sich, dass die Antibiotika Chloramphenicol und Ciprobay 200® keinerlei Wirkung zeigten (Abb. 22), wohingegen bei Rifampicin- bzw. Tetrazyklin gute Ergebnisse erzielt wurden. Die mit diesen beiden Antibiotika behandelten Tiere waren nach fünf Wochen Behandlung mit jeweils einprozentigen Lösungen praktisch symbiontenfrei (Abb. 23). Es wurden, wie auch schon von Dasch (1975) beschrieben, noch vereinzelte Symbionten in den Darmepithelien gefunden, jedoch waren diese meist stark deformiert. Sphäroblastenartige Strukturen wurden, ebenso wie schon von Schröder (1996) beschrieben, in dieser Untersuchung nicht gefunden. Die Nebenwirkungen, die eine Antibiotikabehandlung hervorruft sind bei den *Camponotus*-Ameisen jedoch enorm. Die Tiere reagierten besonders stark auf die Fütterungen mit Tetrazyklin. Neben starken Durchfällen (Abb. 25) kam es zu einer Aktivitätsabnahme der behandelten Individuen im Gegensatz zu der mit Honig behandelten Kontrollgruppe. Außerdem griffen die verabreichten Antibiotika das Mitteldarmgewebe der Ameisen stark an (Abb. 24). Besonders große Gewebeschäden entstanden hierbei durch Tetrazyklin (Abb. 24; rechts). Diese Schäden konnten bei mit Rifampicin behandelten Tieren nicht gefunden werden. Daher wurden alle weiteren Versuche mit Rifampicin gemacht. Auswirkungen auf das Wachstum der aposymbiontischen Ameisen, ähnlich wie bei *Buchnera* (Wilkinson 1998; Campbell 1990; Douglas 1992; Ohtaka und Ishikawa 1991), konnten nicht beobachtet werden, da es sich bei den untersuchten Tieren schon um ausgewachsene Arbeiterinnen handelte. Auch Aussagen über die reproduktive Aktivität der Arbeiterinnen sind nur schwer möglich. Normalerweise beginnen isolierte *Camponotus*-Arbeiterinnen nach einigen Wochen mit der Produktion von Eiern, aus denen sich dann Männchen entwickeln. Die Reproduktivität von Arbeiterinnen kann durch viele äußere Einflüsse beeinträchtigt werden. Außerdem entwickeln meist nur junge Individuen ihre Ovarien. Alle für diese Experimente verwendeten Arbeiterinnen waren jedoch Außendiensttiere, bei denen man davon ausgehen kann, dass sie schon älter waren. Bei den hier durchgeführten Experimenten, die über einen

Zeitraum von 20 Wochen liefen, produzierten weder die Antibiotika-Testgruppen, noch die Kontrollgruppen Eier. Man kann hier also keine Aussagen über mögliche Effekte der *Camponotus*-Symbionten auf die Reproduktivität ihrer Wirte machen. Bei den hier durchgeführten Langzeitversuchen wurde gezeigt, dass sich die Symbionten innerhalb der Mitteldärme nicht mehr regenerieren können. Aposymbiontische *C. floridanus*-Arbeiterinnen, die über einen längeren Zeitraum „normal“ (mit sterilisiertem Honig und Heimchen) weitergefüttert wurden, lebten über Wochen und Monate weiter, ohne in irgendeiner Art und Weise verhaltensauffällig zu werden (Abb. 24).

Nach der ersten durchgeführten Kontrolluntersuchung an *C. floridanus* wurde versucht, das für diese Art erhaltene Fütterprotokoll auf andere Arten der Gattung *Camponotus* zu übertragen. Die beiden zusätzlich getesteten Arten *C. rufipes* und *C. balzani* reagierten jedoch auf die Antibiotikabehandlung vollkommen unterschiedlich. Während *C. rufipes* das Antibiotika-Honig-Gemisch kaum anrührte und mit durchschnittlich gefressenen 0,08 g signifikant weniger fraß ($t = 2,42$; $p < 0,05$), als *C. floridanus* (0,4-0,5 g) und *C. balzani* (0,1-0,2 g) (Abb. 26), konnten bei dieser Art auch keine symbiontenfreien Tiere erzeugt werden. Es scheint, dass die Arbeiterinnen der Ameisenart *Camponotus rufipes* fremdartige Stoffe am Geruch erkennen können und diese meiden, gleichgültig wie hungrig sie sind. Die für dieses Experiment verwendeten *C. balzani*-Arbeiterinnen reagierten sehr empfindlich auf Isolation und einseitige Ernährung. Sowohl Test- als auch Kontrollgruppe reagierten auf die Behandlungen mit einer deutlich erhöhten Sterberate, im Gegensatz zu den *C. floridanus*-Gruppen. In der Vergangenheit wurde beobachtet, dass auch die beiden europäischen *Camponotus*-Vertreter *C. ligniperdus* und *C. herculeanus* sehr empfindlich auf die Behandlung mit Antibiotika reagieren (M. Obermayer, pers. Mitteilung). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, wie schwierig es ist in den Ameisenorganismus einzugreifen und Aussagen über mögliche Effekte zu machen. Dennoch soll nachfolgend versucht werden die Aufgaben, welche die Symbionten innerhalb der anderen untersuchten Insekten besitzen, mit den Möglichkeiten die den *Camponotus*-Endosymbionten zur Verfügung stehen, zu vergleichen und zu diskutieren.

Betrachten wir zunächst die im phylogenetischen Stammbaum (Abb. 4) den *Camponotus*-Endosymbionten nächstverwandten Gattungen *Wigglesworthia* und *Buchnera*. Die Wirte dieser beiden Gattungen besitzen eine sehr einseitige Ernährung. Tsetsefliegen saugen Blut, Blattläuse ernähren sich von Phloemsaft, der reich an Kohlenhydraten, aber äußerst stickstoffarm ist (Dixon 1973; Minks 1987). Während es bei

Wigglesworthia nur Hinweise auf eine mögliche Funktion bei der Nahrungsergänzung gibt (Nogge 1981; Dasch et al. 1984), wurde diese Funktion der *Buchnera*-Symbionten bereits zweifelsfrei geklärt. Sie liefern den Blattläusen essentielle, stickstoff- und schwefelhaltige Aminosäuren (Douglas und Prosser 1992; Douglas 1988) und möglicherweise Vitamine (Baumann 1995a). Für die ein breites Nahrungsspektrum nutzenden Ameisen der Gattung *Camponotus* scheint eine derartige Symbiontenfunktion unnötig. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Fütterversuche wurde über einen längeren Zeitraum eine *C. floridanus*-Arbeiterinnengruppe mit und eine ohne Symbionten nur mit Honig gefüttert. Die Ergebnisse dieser Fütterungen sind nicht im Ergebnisteil dargestellt, da die Stichprobengröße zu klein war und diese Fütterung auch bisher noch nicht reproduziert wurde. Es zeigte sich jedoch, dass die Ameisen auf diese stickstoffarme Diät ihr Verhalten dahingehend ändern, dass sie damit beginnen ihre Artgenossinnen zu fressen. Dieses kannibalistische Verhalten wurde sowohl bei den aposymbiontischen, als auch bei den symbionten-tragenden Ameisen beobachtet. Auch unterschieden sich die Sterberaten innerhalb der unterschiedlichen Gruppen nicht, sodass ein Einfluß der Symbionten auf die Ernährung nicht offensichtlich ist. Dieses Ergebnis bedarf jedoch noch einiger weiterer Untersuchungen. Wichtig wäre in jedem Fall der Versuch, über mehrere Generationen hinweg symbiontenfreie Tiere zu erhalten, indem Königinnen mit Antibiotika behandelt werden. Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigen jedoch deutlich, dass es wahrscheinlich großer Mengen an Königinnen bedarf, um langfristig Individuen zu erhalten, die sowohl im Mitteldarm, als auch in ihren Gonaden symbiontenfrei sind. Die hier durchgeführten histologischen Untersuchungen zeigten bereits, dass Königinnen ohne Symbionten im Mitteldarm dennoch große Bakterienmengen in ihren Ovarien besitzen können (Abb. 10 und 14). Ein Vergleich der *Camponotus*-Endosymbionten mit den nächstverwandten Gattungen *Wigglesworthia* und *Buchnera* erbringt keinen Hinweis auf die mögliche Funktion der Symbionten. Daher sollen weitere Funktionen von Bakterien-Insekten-Symbiosen genauer betrachtet werden.

Untersuchungen an den Symbionten von Käfern erbrachten weitere denkbare Aufgaben für die *Camponotus*-Endosymbionten. Die symbiontischen Bakterien der Rüsselkäfer sind z.B. in der Lage die enzymatische Aktivität innerhalb der Mitochondrien ihrer Wirte zu steigern (Heddi et al. 1993). Beim Blatthornkäfer *Costelytra zealandica* produzieren symbiontische Bakterien einen Sexuallockstoff (Hoyt et al. 1971). Die Bakterien der Art *Bacillus* spp. produzieren für Borkenkäfer ebenfalls Pheromone (Brand et al. 1975). Auch bei den *Camponotus*-Ameisen bestünde die Möglichkeit, dass

deren Endosymbionten im Mitteldarm Pheromonvorstufen produzieren. Aus diesen könnten im Enddarm Spurpheromone produziert werden, die bei der Futterrekrutierung der Ameisen eine wichtige Rolle spielen. Somit könnten die Symbionten der Ameisen indirekt doch an deren Ernährung beteiligt sein. Die wichtigsten Komponenten der *Camponotus*-Spurpheromone stellen die 3,4-Dihydroisocumarine und die δ -Laktone dar (Bestmann et al. 1997; Bestmann et al. 1995; Haak et al. 1996; Übler et al. 1995). Die in dieser Arbeit verwendeten *Camponotus*-Arten besitzen in ihrem Rectum entweder die eine, oder die andere Verbindung als Hauptbestandteil des Spurpheromons. Bringt man nun den phylogenetischen Stammbaum der Symbionten in Zusammenhang mit ihren Haupt-Pheromonkomponenten (Abb. 30), findet man eine eindeutige Korrelation zwischen Pheromon-Struktur und Ameisensymbionten.

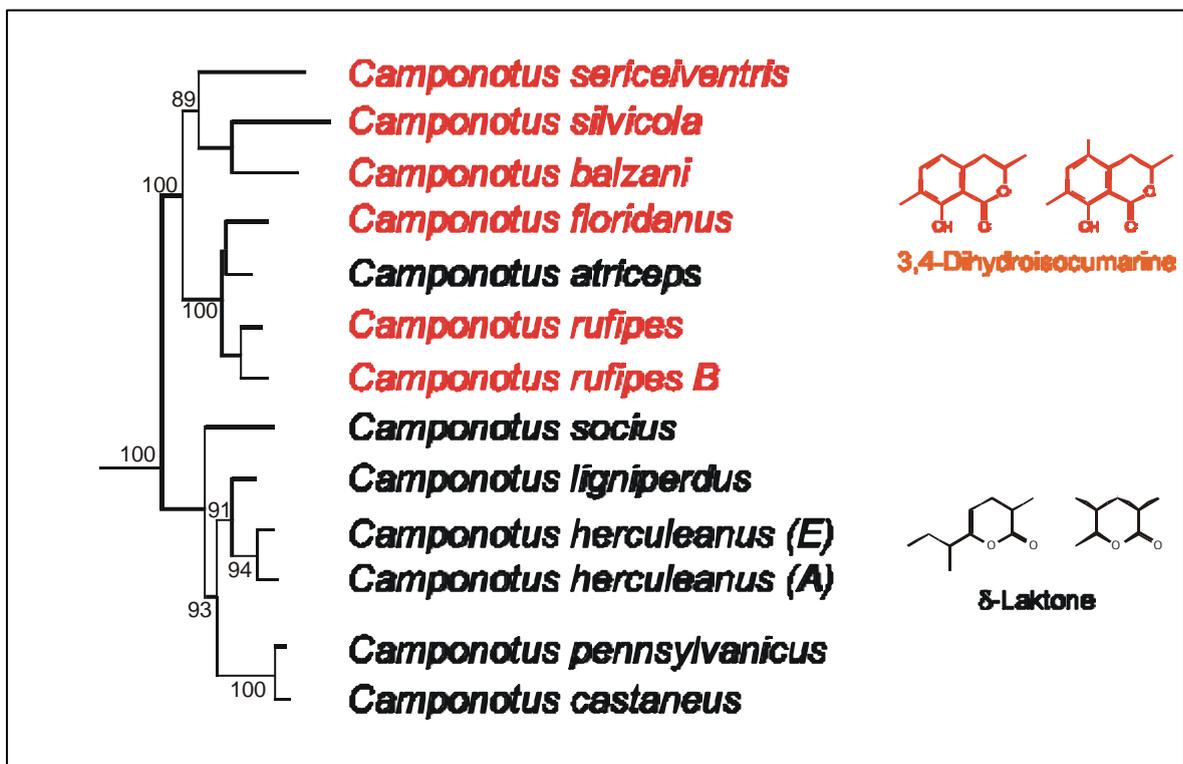


Abb. 30: Korrelation des Symbionten-Stammbaumes mit den in den Rectalblasen der jeweiligen Wirte gefundenen Pheromonkomponenten.

Die Arten *C. sericeiventris*, *C. silvicola*, *C. balzani*, *C. floridanus* und *C. rufipes* besitzen in ihren Rectalblasen als Hauptkomponenten 3,4-Dihydroisocumarine, wohingegen die Arten *C. socius*, *C. ligniperdus*, *C. herculeanus*, *C. pennsylvanicus* und *C. castaneus* δ -Laktone besitzen. Betrachtet man den Symbionten-Stammbaum (Abb. 30) fällt auf, dass die Arten, welche 3,4-Dihydroisocumarin in ihrem Rectum besitzen

(*C. sericeiventris*, *C. silvicola*, *C. balzani*, *C. floridanus* und *C. rufipes*), eine eng verwandte Gruppe innerhalb des Dendrogrammes bilden. Ebenso die Arten, welche δ -Laktone produzieren (*C. socius*, *C. ligniperdus*, *C. herculeanus*, *C. pennsylvanicus* und *C. castaneus*). Einzige Ausnahme bildet hierbei der *Camponotus atriceps*-Symbiont. Durch Antibiotikabehandlung sollten symbiontenfreie *C. rufipes* bzw. *C. balzani* Ameisen generiert werden. Da diese beiden Arten große Mengen 3,4-Dihydroisocumarin in ihren Rectalblasen besitzen, wäre der quantitative Nachweis von Pheromon mit Hilfe der Gaschromatographie leicht möglich. Bei *C. rufipes* bzw. *C. balzani* Ameisen wären deshalb signifikante Aussagen über Pheromonmengen mit bzw. ohne Symbionten möglich gewesen. Leider scheiterten diese Versuche, wie oben beschrieben, bereits im Vorfeld, da diese beiden Ameisenarten extrem sensibel auf die Antibiotikabehandlungen reagierten. Bei *C. rufipes* konnten keine symbiontenfreien Tiere erzeugt werden und durch die enormen Sterberate von *C. balzani* standen von dieser Art nicht mehr genügend Tiere zur Verfügung. Da *C. floridanus* zu wenig Spurpheromon im Rectum besitzt, ist es nicht möglich, diese quantitativ gaschromatographisch zu untersuchen. Eventuell besteht aber die Möglichkeit, bei dieser Art aposymbiotische bzw. symbionten-tragende Tiere, mit Hilfe von Futter-Rekrutierungsversuchen zu testen. Da diese Versuche jedoch sehr aufwendig sind, wären große Tiermengen nötig. Eine Übertragung der Antibiotikabehandlung von den in dieser Arbeit verwendeten „Kleingruppen“ auf ganze *C. floridanus* Kolonien (die mehrere tausend Individuen umfassen) erscheint schwierig.

6.4 Isolierung und Kultivierung der Endosymbionten

Für die meisten Endosymbionten gibt es keine geeignete in vitro Kultivierungsmethode. Ausnahmen bilden die Symbionten von Schaben und der Tsetsefliege, die in Primärzellkulturen über längere Zeit kultiviert werden konnten (Welburn et al. 1987; Landureau 1966). Bei den kultivierten Tsetsefliegensymbionten handelte es sich allerdings nicht um die Myzetozyten-assoziierten P-Symbionten, sondern um die in den Epithelhüllzellen des Mitteldarmes befindlichen S-Symbionten (Aksoy et al. 1995; Aksoy 1995). Schwemmler (1973) berichtete von der erfolgreichen Kultivierung intrazellulärer Zikaden-Symbionten mittels Gewebekultur. Schröder (1996) versuchte erfolglos die Symbionten in verschiedenen Bakteriennährmedien zu kultivieren. Sie benutzte zum Animpfen der Medien Zellsuspensionen von Mitteldarmgewebe, was zu

Kontaminationen der Medien mit Hefen führte. In Anlehnung an ihre Versuche wurden in dieser Arbeit die gleichen Medien nochmals für Kultivierungsversuche verwendet. Diese Medien wurden jedoch mit zuvor frisch aus dem Mitteldarmgewebe isolierten Symbionten angeimpft. Zur Isolierung der Symbionten aus dem sie umgebenden Gewebe wurden zuerst verschiedene Methoden getestet, die bei der Isolierung von Aphidensymbionten bereits erfolgreich eingesetzt wurden (Harrison 1989; Houk und McLean 1974; Ishikawa 1982). Allerdings waren diese Methoden, die auf der Dichtegradienten-Zentrifugation von Homogenisaten ganzer Tiere beruhen, bei Ameisen nicht erfolgreich. Die Ameisen besitzen eine wesentliche robustere Kutikula als die Blattläuse, außerdem sind sie viel größer. Um die *Camponotus*-Symbionten zu isolieren, mussten zuerst die Mitteldärme aus den Ameisen herauspräpariert werden. Diese konnten dann homogenisiert werden und durch Zentrifugation bei bestimmten Geschwindigkeiten ließen sich die Symbionten dann sauber und nach lichtmikroskopischer Kontrolle äußerlich intakt, vom Darmgewebe abtrennen. Mit auf diese Art isolierten Symbionten, wurden die hier benutzten Nährmedien angeimpft, die sowohl aerob, als auch mikroaerophil bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Dasch (1975) charakterisierte die Symbionten als aerob oder fakultativ aerob, ohne weitere Angaben darüber zu machen, woher er diese Information bezog. Die Kontamination nur einer Flüssigkultur mit fremden Mikroorganismen zeigt, wie „rein“ die *Camponotus*-Symbionten mit der oben erwähnten Methode isoliert werden konnten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigten die von Schröder (1996) durchgeführten Kultivierungsversuche und zeigten eindeutig, dass es mit den hier eingesetzten mikrobiologischen Medien und Wachstumsbedingungen nicht möglich ist, die *Camponotus*-Endosymbionten zu kultivieren. Eine Reduktion der Genomgröße ist für Endosymbionten ein mehrfach belegtes Phänomen (Andersson und Kurland 1998). Es muss erwartet werden, dass diese Reduktion langfristig zu einem Verlust von nicht mehr benötigten metabolen Eigenschaften führt, welche der Symbiosepartner übernimmt. Die Genomgröße der *Camponotus*-Endosymbionten wurde bisher noch nicht ermittelt, die nah verwandten *Buchnera*-Symbionten besitzen jedoch nur eine Genomgröße von 675 kb, was nur einem Siebtel der Größe der freilebenden *E. coli* entspricht (Charles und Ishikawa 1999). Es wäre durchaus denkbar, dass die Ameisen-Symbionten ein ähnlich kleines Genom besitzen, was eine mögliche Erklärung für deren fehlgeschlagene in vitro Kultivierung sein könnte. Die Analyse der genomischen DNA der *Camponotus*-Endosymbionten ist für zukünftige Untersuchungen an der

Ameisen-Bakterien-Symbiose daher unumgänglich. Durch die in dieser Arbeit entwickelte Isolierungsmethode der Symbionten wird dies problemlos möglich sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Infektion von Schneider's *Drosophila*- und SF9 (*Spodoptera frugiperda*)-Zellen mit isolierten Ameisensymbionten erbrachten ebenfalls kein verwertbares Ergebnis. Offensichtlich sind die Symbionten stark an ihre intrazelluläre Umgebung angepasst, was auf eine sehr lange und enge Assoziation schließen lässt. Dies konnte mit den phylogenetischen Untersuchungen auch gezeigt werden. Da die *Camponotus*-Endosymbionten ohne ihren Wirtsorganismus scheinbar nicht überlebensfähig sind, folgt daraus auch, dass sie in der Umwelt nicht existieren können und eine Übertragung auf die Nachkommen stattfinden muss, bei der die Bakterien ihren Wirtsorganismus nicht verlassen. Dies ist wiederum ein Hinweis auf einen rein zytoplasmatischen Übertragungsweg. Bisher stehen noch keine Zelllinien von Ameisen zu Verfügung, sodass für weitere Versuche die Etablierung einer Ameisenzelllinie von außerordentlichem Nutzen wäre. In der Literatur gibt es schon einige Beispiele für die Etablierung von Insektenzelllinien aus den Geweben verschiedener Entwicklungsstufen. Bei Lepidopteren wurden kontinuierliche Zelllinien aus den Ovarien von Puppen (Mitsubishi 1995), dem Fettkörper von Larven (Mitsubishi und Inoue 1988) hergestellt. In einem Fall gelang es sogar aus larvalen Mitteldärmen Epithelzelllinien zu etablieren (Baines et al. 1994). Letztere Möglichkeit sollte vielleicht für weitere Versuche der Insektenzellkultur mit Ameisenzellen in Betracht gezogen werden.

6.5 Benennung einer neuen Symbiontengattung

Die genauen phylogenetischen und histologischen Untersuchungen der *Camponotus*-Endosymbionten, die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurden, machten es möglich die nicht kultivierbaren Bakterien als Kandidaten für eine neue Gattung vorzuschlagen (Sauer et al. 2000). In Anlehnung an Murray und Schleifer (1994) wurde ein sogenannter „*Candidatus*“-Status gewählt. Für die Endosymbionten von Ameisen der Gattung *Camponotus* wurde die neue Bezeichnung „*Candidatus* Blochmannia“ gewählt. Der Name Blochmannia ist auf den deutschen Zoologen Friedrich Johann Wilhelm Blochmann (* 21.1.1858 Karlsruhe, † 22.9.1931) zurückzuführen, der die *Camponotus*-Endosymbionten im Jahre 1882 als erster beschrieb.

„*Candidatus* Blochmannia“ umfasst stäbchenförmige, Gram-negative Bakterien, die im Zytoplasma spezialisierter Zellen, den sogenannten Myzetozyten, lokalisiert sind. Die Myzetozyten interkalieren zwischen die Epithelzellen des Mitteldarms von Ameisen aus der Unterfamilie der *Formicinae*. Sie sind auch in den Oozyten von Arbeiterinnen und Königinnen zu finden. Die Bakterienzellen sporulieren nicht, sondern vermehren sich durch Zellteilung. Die stäbchenförmigen Symbionten haben einen Durchmesser von 0,5 bis 1,5 μm und können zwischen 10 und 30 μm lang werden. Nach phylogenetischer Untersuchung ihrer 16S rDNA-Sequenzen wurden diese Mikroorganismen in die γ -Subklasse der Proteobakterien eingeordnet. Besondere genetische Eigenschaften, welche die Symbionten besitzen sind erstens, das Vorhandensein von intervenierenden Sequenzen innerhalb der 16S rDNA und zweitens liegen ihre für die 16S RNA codierenden *rrs*-Gene nicht stromaufwärts von den 23S RNA-Genen. Die in dieser Arbeit bewiesene streng kongruente Entwicklung der Symbionten mit ihren Wirten (Abb. 8) und die vorgenommenen histologischen Untersuchungen sprechen für ihren ausschließlich vertikalen Übertragungsweg. Bei den Symbionten der Ameisenarten *C. floridanus*, *C. rufipes* und *C. herculeanus* war es möglich innerhalb ihrer 16S rDNA für sie spezifische, kurze Sequenzen zu finden. Somit konnten mit Hilfe artspezifischer Oligonukleotidsonden *In situ*-Hybridisierungen an diesen drei Arten durchgeführt werden (Schroeder et al. 1996). Hierdurch konnten die Symbionten gezielt im Wirtsgewebe detektiert werden. Durch diesen artspezifischen Nachweis war somit es möglich, die Symbionten der drei Arten wie folgt zu benennen:

„*Candidatus* Blochmannia floridanus“ [(*Proteobacteria*) NC; NAS (GenBank-Nummer X92549), Oligonukleotidsequenz ist komplementär zu einer einzigen Region innerhalb des 16S rRNA-Gens 5'-CTCTACTCAGTTCTTTGGG-3'; S (*Camponotus floridanus*, Myzetozyten)]; Schroeder et al. 1996.

„*Candidatus* Blochmannia rufipes“ [(*Proteobacteria*) NC; NAS (GenBank-Nummer X92552), Oligonukleotidsequenz ist komplementär zu einer einzigen Region innerhalb des 16S rRNA-Gens 5'-GTCTATGTAGTTCTTTGG-3'; S (*Camponotus rufipes*, Myzetozyten)]; Schroeder et al. 1996.

„*Candidatus* Blochmannia herculeanus“ [(*Proteobacteria*) NC; NAS (GenBank-Nummer X92550), Oligonukleotidsequenz ist komplementär zu einer einzigen Region innerhalb des 16S rRNA-Gens 5'-GTGGGCTATTACCCCG-3'; S (*Camponotus herculeanus*, Myzetozyten)]; Schroeder et al. 1996.