

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Themenbereiche bearbeitet, die zur Charakterisierung der intrazellulären, bakteriellen Endosymbionten im Mitteldarm von Ameisen der Gattung *Camponotus* beitrugen.

Es wurden phylogenetische Untersuchungen mit Hilfe der 16S rDNA-Sequenzen der Symbionten und der Sequenzen der Cytochrom-Oxidase-Untereinheit I (COI-Sequenzen) ihrer Wirte durchgeführt, die zur näheren Klärung der Fragen zu Übertragungsweg und Stellung der *Camponotus*-Endosymbionten verhalfen. Untersuchungen an dreizehn verschiedenen *Camponotus*-Arten brachten folgende Ergebnisse. Die intrazellulären Bakterien der Ameisen gehören zur γ -Subklasse der Proteobakterien. Innerhalb des 16S-Stammbaumes der Symbionten kann man drei Untergruppen unterscheiden, in denen die einzelnen Arten enger miteinander verwandt sind. Bei den nächstverwandten Bakteriennachbarn der *Camponotus*-Endosymbionten handelt es sich um die ebenfalls symbiontisch lebenden Bakterien der Gattungen *Wigglesworthia* und *Buchnera*. Die Ameisen-Symbionten besitzen in ihren *rrs*-Genen intervenierende DNA-Sequenzen (IVS), die stabile Sekundärstrukturen ausbilden können. Ihre 16S-Gene sind nicht strangaufwärts von den 23S-Genen lokalisiert. Durch diese genetische Besonderheit ähneln die *Camponotus*-Symbionten den *Buchnera*-Symbionten, deren rRNA-Gene auf zwei Transkriptionseinheiten verteilt sind. Innerhalb des Stammbaumes der untersuchten Wirtsameisen existieren ebenfalls drei Untergruppen, deren einzelne Arten enger miteinander verwandt sind. Die direkte Gegenüberstellung des Symbionten-Stammbaumes mit dem der Ameisen zeigt ein weitgehend gleiches Verzweigungsmuster. Beide Dendrogramme zeigen signifikante Übereinstimmungen bezüglich ihrer taxonomischen Beziehungen und legen eine kongruente Entwicklung von Symbionten und Wirten, die nur durch einen vertikalen Übertragungsweg erzeugt werden kann, nahe. Einzige Ausnahme bildete hierbei der *C. castaneus*-Symbiont, bei dem ein horizontaler Transfer von Symbionten nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen ermöglichten die Benennung einer neuen Symbiontengattung innerhalb der γ -Subgruppe der Proteobakterien: „*Candidatus* Blochmannia spp.“

Histologische Studien der Endosymbiose mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Methoden sollten Fragen zur Symbiontenlokalisierung innerhalb adulter Individuen beantworten und die Ergebnisse zum Übertragungsweg der

intrazellulären Bakterien festigen. Die Endosymbionten sind in den Mitteldarmepithelien von Arbeiterinnen, Königinnen und Männchen in Myzetozytenzellen lokalisiert, die in das Mitteldarmepithel interkalieren. Diese spezialisierten Zellen besitzen kaum Vesikel und tragen keinen Mikrovillisaum. In den Oozyten der Ovarien von Königinnen und Arbeiterinnen wurden ebenfalls große Symbiontenmengen gefunden. Die Spermatheka der Königinnen und die Geschlechtsorgane der Männchen waren symbiontenfrei. Die Abwesenheit von Symbionten innerhalb dieser beiden Organe zeigt, dass eine Bakterieninfektion der weiblichen Tiere nicht durch die Männchen stattfindet, sondern wie schon in den phylogenetischen Untersuchungen postuliert, ein rein maternaler Übertragungsweg der Symbionten vorliegt.

Die Detektion der Bakterien in Eiern und Larven der Ameisen mittels *In situ*-Hybridisierungen trugen zur Aufklärung des Weges der Endosymbionten während der Embryogenese bei. Während sich im abgelegten Ei ein Ring aus Symbionten bildete, kam es in den Larvenstadien 1 bis 3 zur Auswanderung der Bakterien in Meso- bzw. Ektoderm. Im größten untersuchten Larvenstadium 4, das kurz vor der Verpuppung stand, konnten die Symbionten ausschließlich in den Myzetozyten des Mitteldarmes detektiert werden.

Die Behandlung der Ameisen mit Antibiotika ermöglichte es, symbiontenfreie Ameisen zu erzeugen, die über einen längeren Zeitraum weiterlebten, ohne ihre Symbionten zu regenerieren. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, die intrazellulären Bakterien intakt aus dem sie umgebenden Mitteldarmgewebe zu isolieren. Somit konnten gereinigte Symbionten für Kultivierungs- und Infektionsversuche verwendet werden. Diese Versuche die mit Hilfe von Bakteriennährmedien und Insektenzelllinien durchgeführt wurden, zeigten jedoch sehr deutlich, dass es nicht möglich ist, die *Camponotus*-Symbionten außerhalb ihrer Wirte zu kultivieren.

1 Summary

This thesis deals with the characterization of intracellular endosymbiotic bacteria in the midgut of carpenter ants (*Camponotus* spp.).

Sequences of the 16S rDNA of the symbionts and the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) were used for phylogenetic analyses, respectively. These investigations led to new insights concerning the transmission pathway and the phylogenetic classification of the *Camponotus* endosymbionts. The following results were obtained by extensive analysis of thirteen different *Camponotus* species. The intracellular bacteria of these species form a distinct lineage in the γ -subclass of the Proteobacteria. Within the *Camponotus* symbionts three subclusters are apparent, in which the strains are more related to each other than to the members of the other subclusters. The taxa closest related to the ant symbionts are the symbiotic bacteria of the genus *Wigglesworthia* and *Buchnera*. The *rrs* genes of the *Camponotus* endosymbionts contain putative intervening sequences (IVS). Their 16S rDNA apparently is not located upstream of the 23S rDNA, and the 16S and 23S genes seem to be organized in different transcription units. This genetic characteristic was already described for the symbionts of the genus *Buchnera*. Similar to the endosymbionts, the phylogenetic relationship of the host ants could be arranged into three clusters with increasingly closer relationship. The direct comparison of the phylogenetic trees of the endosymbiotic bacteria and the ants revealed a nearly similar branching pattern. The exception is *C. castaneus*, which can not be related to any other species on the basis of the COI analysis. Nevertheless, both trees showed very significant congruence suggesting parallel evolution of symbiotic bacteria and host ant species.

These phylogenetic investigations provided the justification for proposing a new taxon in the γ -subclass of the Proteobacteria: “*Candidatus* Blochmannia spp”.

By light- and electronmicroscopical studies I investigated the mode of transmission of the endosymbionts and their location in adult individuals. These studies showed that the bacteria are localized in specialized cells, so-called mycetocytes. These cells are intercalated between the epithelial cells of the midgut. The mycetocytes lack vesicles and microvilli. *Camponotus* endosymbionts have not been detected in spermathecae of queens or in the testes of males, but they were found intracellularly in oocytes of queens and workers. This strongly indicates a maternal transmission of the bacteria.

Using *in situ* hybridization with species specific probes, the endosymbiotic bacteria could be detected in eggs and larvae. With these experiments it was possible to study the

spatial arrangements of the symbionts during embryogenesis. In the egg-stage the symbionts form a ball. In larval stages 1-3 a migration of bacteria into the meso- and ectoderm was observed. In larval stage 4 the symbionts were accumulated in the midgut epithelium, like in adult individuals. Symbionts could only be detected in the mycetocytes of the gut.

Ants treated with antibiotics were free of symbionts, and could be maintained to a long time period (more than 12 weeks) without regenerating their bacteria. In these studies we were able to isolate the symbionts out of the midgut epithelial successfully. These isolated microorganisms were used for cultivation and infection experiments. Using different culture mediums and insect cells we showed, that it is impossible to cultivate the *Camponotus* symbionts outside their host organisms.