

# Insecten als wijnmakers

Joanna Sundstrom, Jennie Gardner  
Matthew Whiteside, Ken Kraaijeveld  
Toby Kiers, Jacintha Eilers, Vladimir Jiranek

## TREFWOORDEN

*Drosophila*, gist, sluipwespen, symbiose

Entomologische Berichten 76 (4): 122-125

Insecten hebben een slechte naam in de landbouw. In de fruitteelt, bijvoorbeeld, kunnen insecten grote economische schade veroorzaken door onrijp fruit aan te vreten of er eieren in te leggen. In de wijnbouw begint men echter in te zien dat insectenvraat ook positieve effecten kan hebben. Insecten die op rijpe druiven af komen, zoals *Drosophila*-fruitvliegen, spelen waarschijnlijk een cruciale rol in het verspreiden van gisten. Er zijn veel verschillende soorten gist en die hebben sterke invloed op het aroma en de smaak van de wijn. In de meeste wijnmakerijen wordt het fermentatieproces in gang gezet door te inoculeren met de 'standaard-gist' *Saccharomyces cerevisiae*. Om bijzondere wijnen te maken, stappen wijnboeren steeds vaker over naar zogenaamde spontane fermentatie, oftewel fermentatie door gisten die al op de druiven aanwezig waren. Er is weinig bekend over waar deze 'wilde' gisten vandaan komen, hoe ze op tijdelijke voedselbronnen – zoals een rijpe druif – terecht komen en waar ze overleven in tijden dat er geen fruit beschikbaar is. In het hier beschreven werk zetten we de eerste stappen om meer duidelijkheid te krijgen in de verbanden tussen gist, fruitvliegen en hun parasitaire wespen in de wijnbouw.

## Gist maakt de wijn

Het type gist dat wordt gebruikt voor fermentatie van druiven heeft een grote invloed op de snelheid van de fermentatie en het smaakprofiel van de uiteindelijke wijn. Om efficiënte fermentatie en 'schone', voorspelbare smaken en aroma's te garanderen, maken wijnmakers meestal gebruik van pure gist-starter. Meestal is dat *Saccharomyces cerevisiae*. Echter, volgens de echte connaisseurs gaat daarmee het 'terroir' van de wijn verloren. Voor een echt kenmerkende regionale wijn zijn dus niet alleen de lokale druiven, grondsoort, klimaat en wijnmaak-gewoontes van belang, maar ook lokale gisten. Recent onderzoek heeft aangetoond dat wijngaarden een breed scala aan gisten herbergen en dat er inderdaad verschillen zijn tussen wijnregio's (zie bijvoorbeeld Bokulich et al. 2014, Knight et al. 2015).

Vroeger hadden wijnboeren geen giststarters en werden de druiven gefermenteerd door de aanwezige gisten. De gisting was dan misschien niet zo snel als zou kunnen en de wijn liep grotere kans om te bederven, maar het leverde wel complexere wijn op (Egli et al. 1998, Ciani & Comitini 2015). Het is dan ook niet verwonderlijk dat dit soort spontane fermentatie de laatste tijd aan populariteit wint. Kennis over de dynamica van spontane fermentatie, zoals de levenscyclus van de lokale gisten en hoe ze op de druiven terecht komen, kan de wijnboeren helpen de beste resultaten uit spontane fermentatie te krijgen.

## Dilemma's van een gistcel

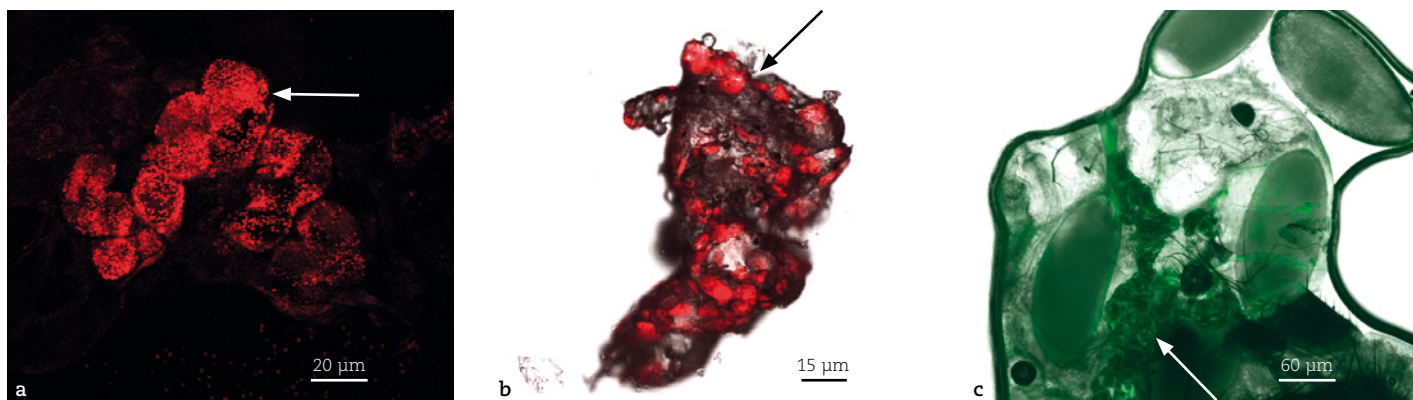
Wijndruiven en ander fruit zijn rijk aan suikers en een ideale voedselbron voor gist, met name als het fruit beschadigd is. Het is echter wel een tijdelijke voedselbron. Aangezien gist niet kan vliegen, is het koloniseren van een nieuwe druif een uitdaging. Een voor de hand liggende oplossing is om insecten te hulp

te roepen. Gist dat bezig is suikers uit druiven te fermenteren, produceert vluchtige aroma's die aantrekkelijk zijn voor fruitvliegen en wijnliefhebbers (Becher et al. 2012, Palanca et al. 2013, Schiabor et al. 2014).

Als fruitvliegen over een fermenterende druif lopen, blijven er onherroepelijk gistcellen aan hun poten kleven. Die cellen kunnen dan waarschijnlijk gemakkelijk de volgende druif die door de fruitvlieg wordt bezocht infecteren. Mannelijke fruitvliegen slaan ook in hun krop gist op, die ze vervolgens aan vrouwelijke fruitvliegen aanbieden als een liefdesgeschenk (Steele 1986). Ook hierbij lijkt het aannemelijk dat de overleving van vegetatieve gistcellen hoog is, al is dat niet aangetoond. Of vegetatieve gistcellen zich inderdaad verspreiden via de poten en krop van fruitvliegen is nooit onderzocht.

Gist is een belangrijke voedselbron voor zowel volwassen fruitvliegen als hun larven (Simmons & Bradley 1997, Anagnostou et al. 2010a). In ons onderzoek markeren we gistcellen met 'quantum dots'. Dit zijn kleine deeltjes met een fluorescente metalen kern waar we glutathion aan gekoppeld hebben en die vervolgens aan gist zijn gevoerd (Gustafsson et al. 2014). Gistcellen die de deeltjes hebben opgenomen zijn daarna gemakkelijk te traceren door er licht met een specifieke golflengte op te schijnen. Het blijkt dat de spijsverteringsstelsels van doorvoede fruitvliegen (figuur 1a) en larven (figuur 1c) inderdaad vol zitten met vegetatieve gistcellen. De overleving daarvan in het spijsverteringsstelsel van de vlieg is waarschijnlijk laag. Vegetatieve gistcellen overleven beter in de darmen van fruitvlieg-larven (Stamps et al. 2012), maar de waarde daarvan voor de verspreiding naar andere druiven lijkt gering.

Gistsporen overleven de reis door de vlieg wel goed. Dat bleek in ons quantum-dot-experiment, waar we ruime hoeveelheden fluorescentie detecteerden in fruitvliegpoep (figuur 1b).



1. Gistcellen met fluorescente quantum dots (pijlen) in (a) het spijsverteringsstelsel van een adulte *Drosophila*-fruitvlieg, (b) uitwerpselen van de fruitvlieg en (c) het spijsverteringsstelsel van vliegen die als larven gelabelde gist hadden gegeten. Foto's: Matthew Whiteside

1. Quantum dot-labelled yeast (arrows) in (a) *Drosophila* intestine, (b) frass, and (c) the gut of flies emerged from larvae fed quantum dot-labelled yeast.

Sterker nog, in de vlieg komen de sporen vrij uit de sporenzakjes, de zogenaamde asci, en mixen met die van andere asci, zodat ze elkaar kunnen bevruchten (Reuter et al. 2007, Coluccio et al. 2008). Voor gist is een vliegendarm dus een seksuele ontmoetingsplek: een analoge gist-tinder, zeg maar.

De interactie tussen fruitvlieg en gist lijkt beide partijen voordeel op te leveren en is dus te kwalificeren als een mutualisme. Fruitvliegen eten gist, gist verspreidt zich via fruitvliegen, die daar zelf later weer van profiteren als de nieuwe generatie fruitvliegen opnieuw wat te eten heeft. Er is echter nog veel onduidelijk. Welke andere vectoren heeft gist tot zijn beschikking? Mogelijkheden zijn mensen, bijen en vogels (Goddard et al. 2010, Francesca et al. 2012).

Het is met name onbekend wat er gebeurt als de druiven aan het einde van het seizoen op zijn. Hoe overleeft het hele systeem de winter? Gisten zijn gevonden in wondvocht van bomen, boomchors en in de grond (Phaff & Knapp 1956, Knight & Goddard 2016), maar het belang hiervan is onbekend. Bovendien is het niet duidelijk hoe de gist vanuit daar weer op fruit terecht komt. Een overwinteringsplek met meer potentie voor gist wordt gevormd door insecten. Een recente studie laat zien dat sociale wespen (*Vespa crabro* Linnaeus en *Polistes*) gistcellen opnamen als ze druiven bezochten (Stefanini et al. 2012). Het bleek dat kleine aantallen vegetatieve gistcellen in de wespen zelf overleefden als deze overwinterden in hun nesten. In het voorjaar werden deze gistcellen doorgegeven aan de larven via opgebraakt voedsel. Op deze manier zouden de jonge wespen weer nieuwe

druiven kunnen infecteren. Echter, de aantallen gistcellen die in deze studie werden gevonden waren laag. Het belang van sociale wespen voor de verspreiding van gist is nog niet duidelijk.

### Gist, fruitvliegen en sluipwespen

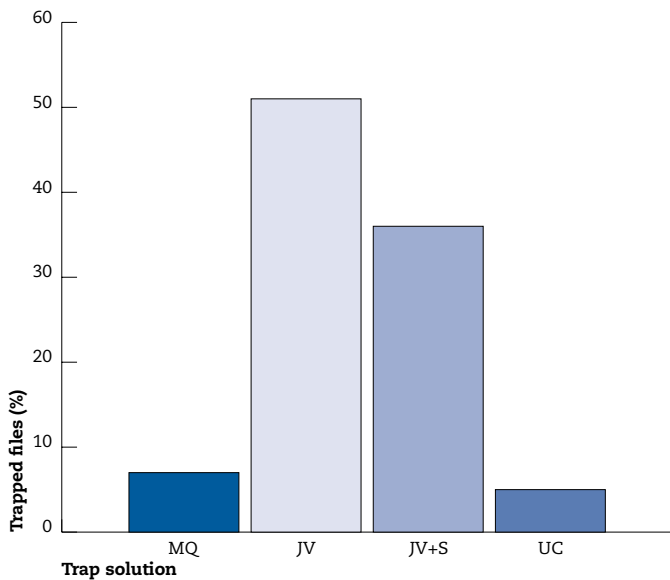
Fruitvliegen worden aangevallen door een scala aan sluipwespen. Sommige, zoals *Trichopria drosophilae* Perkins infecteren vliegpoppen, terwijl soorten uit genera als *Leptopilina*, *Asobara* en *Gnaspis* larven parasiteren (Small et al. 2012). Deze sluipwespen komen op hun zoektochten naar slachtoffers in fermenterend fruit ongetwijfeld in contact met gist. Daarmee vormen ze een andere mogelijke vector voor de verspreiding van gist. Of de gistcellen die door de *Drosophila*-gastheer zijn opgegeten ook kunnen worden overgedragen aan sluipwespen, is niet bekend. Bezoek van sluipwespen aan fermenterend fruit is niet waar fruitvliegen op zitten te wachten, maar biedt duidelijke kansen voor gist. Zou er een drieweginteractie tussen deze organismen zijn (figuur 2)?

Er zijn aanwijzingen dat de interactie tussen fruitvlieg en wesp beïnvloed wordt door gist. Zo waren fruitvliegen beter in staat een ei van een sluipwesp in te kapselen als ze de gist *Metschnikowia* gegeten hebben dan wanneer ze andere soorten gist hebben geconsumeerd (Anagnostou et al. 2010b). De wespen zouden zich kunnen aanpassen door zich te concentreren op fruitvliegen die eten van gisten die het immuunsysteem minder stimuleren. Fruitvliegen lijken ook plekken met hoge ethanol-



2. De spelers in de drieweg interactie tussen (a) gist *Saccharomyces cerevisiae*, (b) fruitvlieg *Drosophila melanogaster* Meigen en (c) sluipwesp *Leptopilina heterotoma* Thomson. Foto's: Joanna Sundstrom (a), Peter Koomen (b-c)

2. The participants in the potential 3-way relationship between (a) *Saccharomyces* wine yeast, (b) *Drosophila melanogaster* Meigen fruit flies and (c) their parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* Thomson.



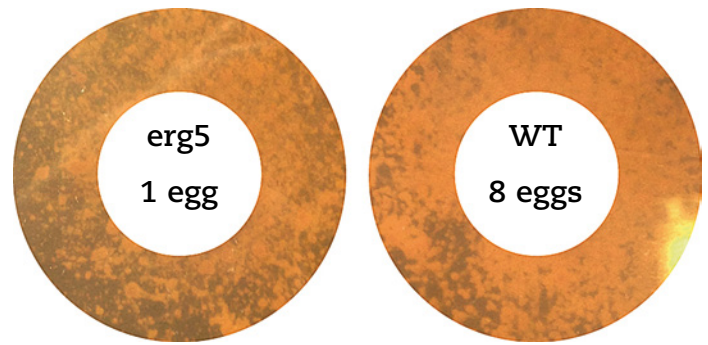
3. Relatieve aantrekkelijkheid van verschillende substraten voor adulte *Drosophila melanogaster* Meigen. MQ = water, JV = fruitsap en azijn (50:50), JV+S = fruitsap en azijn met 12,5  $\mu\text{M}$  natriumsulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ). Fruitvliegen werden in een 2 liter kamer geplaatst waarin vallen geplaatst werden met MQ, JV of JV+S. Na 16 uur werd het aantal vliegen in elke val geteld. Sommige vliegen gingen geen enkele val in (UC). Fruitsap met azijn heeft duidelijk de grootste aantrekkingskracht. Toevoeging van sulfide lijkt dit effect te verzwakken.

3. Relative attractiveness to *Drosophila melanogaster* Meigen adults of either water (MQ), fruit juice and vinegar (50:50; JV) or juice and vinegar plus 12.5  $\mu\text{M}$  sodium sulfide (JV+S). Flies were placed into a chamber (approximately 2 litres) that in turn contained one-way traps (each constructed from a 50 ml tube) spiked with either MQ, JV, or JV+S. After being left for 16 hours in the dark, the distribution of the flies was determined (expressed as a percentage of the total). Some flies remained uncommitted (UC) having failed to enter any trap under the conditions. The potent attractiveness of juice/vinegar is clear, as is the modest dampening of this effect by sulfide.

gehalten uit te zoeken om zichzelf te beschermen tegen sluipwesp (Kacsoh et al. 2013). Zulke plekken zijn waarschijnlijk rijk aan *Saccharomyces*-gist, dat een hogere alcoholtolerantie heeft dan andere gistsoorten. Zouden sluipwespen op hun buurt een voorkeur hebben voor minder ethanolrijke plaatsen en gisten?

Gegeven dat gist *Drosophila* kan aantrekken om zijn eigen verspreiding te bevorderen, kunnen we speculeren dat gistaroma's ook het gedrag van sluipwespen kunnen beïnvloeden. In ons onderzoek hebben we een begin gemaakt om deze interactie te bestuderen. Aan het eind van de wijnfermentatie, als voedsel voor gist schaars begint te worden, produceren gisten vaak waterstofsulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ , Jiranek et al. 1995). Dit is precies het moment waarop gist onder natuurlijke omstandigheden graag naar een nieuwe voedselbron getransporteerd zou willen worden. Helaas blijken fruitvliegen eerder afgeschrikt dan aange trokken te worden door sulfide (figuur 3). Opvallend was echter dat fruitvliegen wel een grotere voorkeur (ongeveer 9x) hadden om hun eieren te leggen op gist waaraan sulfide toegevoegd was. Zou sulfide ook sluipwespen afschrikken en dus bescherming bieden aan fruitvliegervelen?

Een derde mogelijke factor in de gist-fruitvlieg-sluipwespinteractie is vet. Parasitoïde insecten hebben in de loop van de evolutie herhaaldelijk het vermogen verloren om zelf vet aan te maken (Visser et al. 2010). Waarschijnlijk halen ze al hun



4. Relatieve aantrekkelijkheid van verschillende typen gist voor bezoek en eileg door *Drosophila*. Kolonies van wild-type (WT) *Saccharomyces cerevisiae*-gist en een gist met een mutatie in vetmetabolisme (*erg5*) werden gekweekt op verschillende agarplaten. Deze werden 16 uur lang in kamers van 2 liter geplaatst met adulte vrouwen *Drosophila*. Daarna werden de platen nog een dag geïncubeerd. Waar de vliegende gistcellen uitgelopen hadden over de rest van de plaat, zijn nieuwe gistkolonies zichtbaar als oranje vlekken op de grijsgroene agar. Het wildtype gist is door de vliegen duidelijk meer bezocht en verspreid dan de mutant (met minder oranje gebieden). Het wildtype gist werd ook geprefereerd voor eileg, aangezien er gemiddeld 8x meer eieren op werden gelegd dan op de mutant (data niet getoond).

4. Relative attractiveness of yeast biomass to *Drosophila* for visitation and oviposition. A colony of either a wild-type (WT) *Saccharomyces cerevisiae* strain or a mutant in lipid metabolism (*erg5*) was pre-grown on a separate agar plate. The plates were then uncovered and placed into a chamber with pregnant female flies (2 l chamber, 16 hours, dark) before the flies were removed and the plates incubated for another day. Flies attracted to the biomass walked through it tracking yeast cells across other parts of the agar plate. After incubation, this 'foot traffic' developed into additional yeast colonies of various sizes (appearing as beige/orange speckling on the green/grey agar). Greater foot traffic around the wild-type colonies is evidenced by the fact that the plate with the wild-type colony is almost entirely covered with secondary yeast growth (i.e., only little green/grey areas). The wild-type colonies were also on average 8x more preferred for oviposition based on the number of eggs found on the primary colony itself (not shown).

benodigde vet uit hun slachtoffer. Het vetgehalte van de fruitvliegen zou op hun beurt weer beïnvloed kunnen worden door de gist die ze eten. Als we fruitvliegen lieten kiezen tussen kolonies van normale gist of gist waarvan het vetmetabolisme verstoord was door een mutatie, zagen we geen verschil in het aantal bezoeken (figuur 4). Echter, er werden acht keer zoveel eieren gelegd op de normale gist dan op de mutant. Het zal interessant zijn om te zien of sluipwespen dit onderscheid ook maken.

## Conclusie

In ons onderzoek zetten we momenteel de eerste stappen om meer inzicht te krijgen in de levenscyclus van gisten in wijngaarden en de rol van insecten daarin. Het gebruik van nieuwe quantum-dot-technologie is hierin van grote waarde. Hiermee kan gist gemerkt worden zonder genetische manipulatie of toevoeging van kleurstoffen. Onze eerste experimenten hiermee zijn zeer hoopgevend (figuur 1).

De interacties tussen gist, fruitvliegen en sluipwespen hebben onze speciale aandacht. Sluipwespen zouden een directe vector voor gist kunnen zijn. Daarbij zouden ze voorkeuren voor bepaalde typen gist kunnen hebben. Alles bij elkaar zouden de evolutionaire interacties tussen deze drie spelers het terroir van de uiteindelijke wijn kunnen beïnvloeden.

## Literatuur

Anagnostou C, Dorsch M & Rohlf M 2010a. Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits. *Entomologia*

*Experimentalis et Applicata* 136: 1-11.  
Anagnostou C, LeGrand EA & Rohlf M 2010b. Friendly food for fitter flies? - Influence of dietary microbial species on food choice

and parasitoid resistance in *Drosophila*. *Oikos* 119: 533-541.  
Becher PG, Flick G, Rozpedowska E, Schmidt A, Hagman A, Lebreton S, Larsson M, Hans-

- son BS, Piskur J, Witzgall P & Bengtsson M 2012. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology* 26: 822-828.
- Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM & Mills DA 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: E139-E148.
- Ciani M & Comitini F 2015. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science* 1: 1-6.
- Coluccio AE, Rodriguez RK, Kernan MJ & Neiman AM 2008. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. *PLoS One* 3: e2873.
- Egli CM, Edinger WD, Mittrakul CM & Henick-Kling T 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology* 85: 779-789.
- Francesca N, Canale DE, Settanni L & Moschetti G 2012. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environmental Microbiology Reports* 4: 105-112.
- Goddard MR, Anfang N, Tang R, Gardner RC & Jun C 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology* 12: 63-73.
- Gustafsson F, Whiteside M & Jiraneck V 2014. Development and use of a quantum dot probe to track multiple yeast strains in mixed culture. *Scientific Reports* 4: 6971.
- Jiraneck V, Langridge P & Henschke PA 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 461-467.
- Kacsoh BZ, Lynch ZR, Mortimer NT & Schlenke TA 2013. Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science* 339: 947-950.
- Knight SJ & Goddard MR 2016. Sporulation in soil as an over-winter survival strategy in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 16: doi 10.1093/femsyr/fov102.
- Knight S, Klaere S, Fedrizzi B & Goddard MR 2015. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to *terroir*. *Scientific Reports* 5: 14233.
- Palanca L, Gaskett AC, Günther CS, Newcomb RD & Goddard MR 2013. Quantifying variation in the ability of yeasts to attract *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 8: e75332.
- Phaff HJ & Knapp EP 1956. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. *Antonie van Leeuwenhoek* 11: 117-130.
- Reuter M, Bell G & Greig D 2007. Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Current Biology* 17: R81-83.
- Schiabor KM, Quan AS & Eisen MB 2014. *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria are required for optimal attractiveness to *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 9: e113899.
- Simmons FH & Bradley TJ 1997. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 43: 779-788.
- Small C, Paddibhatla I, Rajwani R & Govind S 2012. An introduction to parasitic wasps of *Drosophila* and the antiparasite immune response. *Journal of Visualized Experiments* 63: 3347.
- Stamps JA, Yang LH, Morales VM & Boundy-Mills KL 2012. *Drosophila* regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate. *PLoS One* 7: e42238.
- Steele 1986. Courtship feeding in *Drosophila subobscura*. 1. The nutritional significance of courtship feeding. *Animal Behaviour* 34: 1087-1098.
- Stefanini I, Dapporto L, Legras J-L, Calabretta A, Di Paola M, De Filippo C, Viola R, Capretti P, Polsinelli M, Turillazzi S & Cavalieri D 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 13398-13403.
- Visser B, Le Lann C, Den Blanken FJ, Harvey JA, Van Alphen JJM & Ellers J 2010. Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8677-8682.

Geaccepteerd: 30 maart 2016

## Summary

### Insects as winemakers

Uninoculated or spontaneous fermentations in winemaking are increasingly finding favour for their 'naturalness' and the sensory properties of the wine. In such cases, no pure culture starters of selected *Saccharomyces cerevisiae* yeasts are added, thus leaving the many yeast genera occurring on the grapes and in the winery to conduct fermentation. But even in these fermentations one or more strains of indigenous *S. cerevisiae* are likely to dominate, due to the inherently superior growth and ethanol tolerance of this species. Despite their importance, surprisingly little is known about where such indigenous *S. cerevisiae* yeasts come from, how these non-motile organisms move between the ephemeral sources of sugars they seem ideally suited to, and where they overwinter when fruit is absent. Attractiveness of yeast derived aromas to fruit flies has previously been shown and flies act as a yeast vector. In this article we report on the mild repulsive effect of another yeast derived volatile, hydrogen sulfide. In contrast we also observed that flies preferred to oviposit on colonies of yeast that were spiked with sulfide. Interestingly flies also avoided laying eggs on lipid deficient yeast colonies. We discuss how these results may have further implications in the natural context, not only in interactions between yeast-grape-fly, but also between yeast-grape-fly-parasitic wasp, resulting in vectoring of yeast and potential sources of yeast harbouring. Other presented work, using quantum dot labelled yeast, has allowed us to visualise yeast as it passes through the digestive system of *Drosophila*. This will be a useful tool in future studies investigating the interactions between the afore-mentioned organisms.



Joanna Sundstrom, Jennie Gardner & Vladimir Jiraneck  
The University of Adelaide  
School of Agriculture, Food and Wine  
PMB1, Glen Osmond, SA 5064  
Australia  
vladimir.jiraneck@adelaide.edu.au

Matthew Whiteside, Ken Kraaijeveld, Toby Kiers & Jacintha Ellers  
Vrije Universiteit  
Faculty of Earth and Life Sciences  
Department of Ecological Science  
De Boelelaan 1085  
1081 HV Amsterdam