

**Disseminationsstrategien des entomopathogenen Pilzes
Lecanicillium muscarium (PETCH.) ZARE, GAMS syn. *Verticillium lecanii* in Populationen
des Kalifornischen Blüenthrips *Frankliniella occidentalis* (PERGANDE 1895)**

Sandra Lerche, Ulrike Meyer, Helga Sermann, Carmen Büttner

**Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät,
Institut f. Gartenbauwissenschaften, FG Phytomedizin**

Abstract: Dissemination strategies of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* (PETCH.) ZARE, GAMS syn. *Verticillium lecanii* in populations of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (PERGANDE 1895)

The entomopathogenic fungus *L. muscarium* can be used to control populations of the western flower thrips *F. occidentalis*. In laboratory, semi-field and greenhouse trials the infection and mortality of the host population were recorded. Secondly the fungus grew and sporulated on the cadavers of *F. occidentalis*.

Now trials were conducted to describe the dissemination strategies of *L. muscarium* in this host-pathogen-relationship.

The results show different possibilities of pathogen dispersal.

One of the most important ways of dissemination is by the behaviour and movement of the hosts. The dispersal was horizontally within the population, in and between the generations.

The second way of pathogen dispersal by the host was the contamination of the insect's habitat. This included the growth of the fungus after death of the host, the sporulation of infectious stages in cast exuviae after moulting and by the loss of spores during the movement of the host.

The physical agent running water also dispersed the pathogen efficient within the host habitat.

The results were discussed.

Keywords: Entomopathogener Pilz, *Lecanicillium muscarium*, Dissemination, Thysanoptera, *Frankliniella occidentalis*

S. Lerche, Dr. H. Sermann, Humboldt-Universität zu Berlin, FG Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin

Einleitung:

Die Wirksamkeit des entomopathogenen Pilzes (EPP) *L. muscarium* im Einsatz gegen *F. occidentalis* ist in unseren Versuchen mehrfach belegt worden. In verschiedenen Schalen-, Käfig- und Gewächshausuntersuchungen wurde festgestellt, dass die Applikation der Sporensuspension in das Wirtshabitat zur Infektion und zum Absterben der Wirte führt. Dabei konnte auch die saprophytische Entwicklung des Pilzes als Mycel mit Sporulation auf den Kadavern beobachtet werden (HETSCH 2004, LERCHE et al. 2004, 2005). Ausgehend von den sporulierenden Kadavern sind die Disseminationsstrategien in der Wirt-Parasit-Beziehung *F. occidentalis* und *L. muscarium*, in Relation zum Verhalten des Wirtes sowie der physikalischen Faktoren Wasser und Luftbewegung, untersucht worden. Die Aufklärung dieser Zusammenhänge ist entscheidend für eine höhere Effizienz und Nachhaltigkeit des Pilzes im Praxiseinsatz.

Material und Methode:

Die Versuche fanden als standardisierte Biotests im Labor und als Pflanzenversuche an der Buschbohne *Phaseolus vulgaris* in Kleinkäfigen unter Standardbedingungen (20°C, LD 14:8) statt. Die rel. Luftfeuchtigkeit (LF) lag im Biotest bei 98% und in den Käfigversuchen bei 65 bzw. 95%. Fünf Tage vor Versuchsansatz wurden die Inokulate des Wirtes erstellt. Dazu sind Bohnenblätter mit L2-Larven des Wirtes besiedelt und mit einer Konidiensuspension (10⁸ Sp./ml) appliziert worden. Die Inkubation erfolgte in der feuchten

Kammer bei 20°C und 98% rel. LF. Der anschließende Biotest wurde ebenfalls in Petrischalen mit je einem Bohnenblatt auf feuchtem Filterpapier in 10facher Wiederholung durchgeführt. Je Bohnenblatt befand sich ein Inokulat ohne sichtbare Verpilzung und 10 L1-Larven. Die Schalen sind unter den o. g. Standardbedingungen inkubiert worden.

Die Käfigversuche fanden mit einzeln getopften Bohnenpflanzen im 2-Blatt-Stadium in 12facher Wiederholung, statt. Auf einem der beiden Primärblätter befanden sich je ein Inokulat und 10 Wirtstiere (L1). Die Bonitur beider Versuchsansätze erfolgte 2, 4, 7, 9 und 14 Tage nach Auflegen der Inokulate (T.n.A.I.) mittels Auflichtmikroskopie. Bonitiert wurden am Wirt die Anzahl lebender, toter und verpilzter Individuen sowie am Mycel des Inokulates die Größe der Ausdehnung und der Zeitpunkt der Sporulation. Die nach 14 Tagen noch lebenden Imagines wurden in eine feuchte Kammer gelegt, bei 20°C inkubiert und nach weiteren 7 Tagen erneut bonitiert.

Zum Abschluss der Versuche ist von je 5 Blättern aller Varianten der beiden Versuche ein Blattabklatsch auf Selektiv-Agar durchgeführt worden. Fünf Tage nach Inkubation bei 20°C erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten.

Die Versuche zur Dissemination des EPP durch Wasser bzw. Luftströmung erfolgten in Käfigversuchen in 4facher Wiederholung. Auf ein Primärblatt der Versuchspflanzen wurden je 3 Inokulate aufgelegt und 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde auf die Blätter mit den Inokulaten je 1ml Wasser aufgesprüht und das abtropfende Wasser auf Selektiv-Agar ausplattiert. Zusätzlich fand nach Entfernung der Inokulate ein Blattabklatsch statt. In einem weiteren Versuch wurde über die Inokulate für je 1 min ein gerichteter Kaltluftstrom auf Agarplatten aufgeleitet. Die Agarplatten beider Varianten sind bei 20°C inkubiert und anschließend die Anzahl koloniebildender Einheiten erfasst worden.

Die Sporenadhäsion am Insektenintegument ist in Schalenversuchen und Käfigversuchen mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt worden. Die Markierung der Sporen fand mittels der Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescent Brightener 28 bzw. Fluochrom statt. Nach der Applikation der Suspension (je 5,5ml, 10⁷ Sp/ml) wurden je Blatt 10 L2-Larven von *F. occidentalis* aufgesetzt. Die Bonituren fanden nach 3, 6 und 24 Stunden zur der Anzahl anhaftender Sporen pro Tier unter dem Fluoreszenzmikroskop statt. In den Käfigversuchen wurden zehn einzeln getopfte Pflanzen in den Käfigen auf Erds substrat gestellt, das zuvor mit 50ml Sporensuspension (10⁸ Sp./ml) besprüht worden war. Auf den sauberen Blättern der Versuchspflanzen befanden sich je 10 unbehandelte Altlarven des Wirtes. Zu jedem Boniturtermin nach 7, 10, 18 und 22 Tagen nach Applikation (dpi) wurde von je 4 Blättern die Anzahl lebender, toter und verpilzter Individuen ausgezählt. Alle aufgefundenen Tiere wurden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Sporenhaftung und -keimung untersucht.

Ergebnisse:

Das Auswachsen des Mycels auf den Inokulaten konnte graduell in allen Versuchsvarianten festgestellt werden. Die durchschnittliche Ausdehnung des Pilzmycels lag im Schalenversuch (98% rel. LF) bei 3,10 mm² und im Käfigversuch (95% bzw. rel. LF) regelmäßig noch bei 0,75mm². Bei 65% rel. LF konnte noch eine Ausdehnung von 0,15mm² ermittelt werden.

Im weiteren Verlauf wurden an den zugeführten Wirtstieren in großer Zahl am Integument haftende Sporen gefunden.

In allen Versuchsvarianten starben Versuchstiere ab, auf deren Kadavern der Pilz wiederum sporulierte. Somit waren die aufgelegten Inokulate Ausgangspunkt für weitergehende Infektionen in der Population. Die Anzahl der Kadaver korrelierte stark mit der rel. LF. Im Schalenversuch konnte das Mycelwachstum bereits bei einzelnen abgestorbenen Larven schon 7 T.n.A.I. ermittelt werden (Abb. 1). Weiterhin wurde auch an Pronymphen und Nymphen und sogar an einzelnen Larven der F1-Generation das Auswachsen des EPP festgestellt.

Im Gegensatz dazu war in den Käfigversuchen ein Absterben der Larven nicht feststellbar. Die Mortalität bzw. Verpilzung der Pronymphen und Nymphen war in diesen Varianten nicht möglich, da sich die Ontogenese dieser Stadien im Boden vollzieht. Somit konnte die Verpilzung der Wirtstiere erst wieder an den Adulten zur Bonitur 21 T.n.A.I. festgestellt werden (Abb. 2).

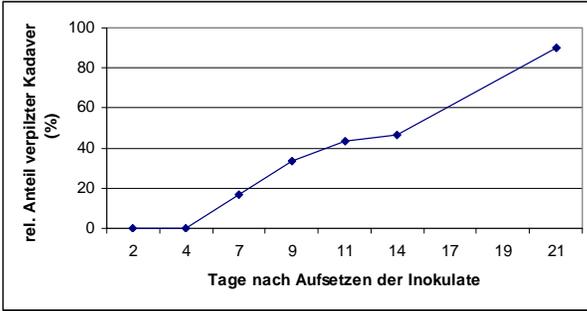


Abb. 1: rel. Anteil sporulierender Kadaver von der Ausgangspopulation des Wirtes 21 T.n.A.I. im Schalentest

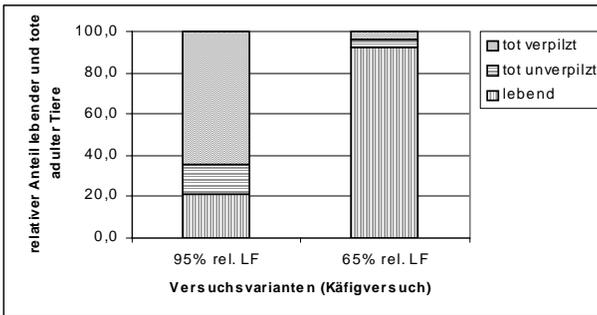


Abb. 2: rel. Anteil sporulierender Kadaver an der Gesamtheit aufgeflogener Adulte 21. T.n.A.I. im Käfigversuch

Der EPP konnte sich jedoch nicht nur auf den infizierten Versuchstieren erfolgreich entwickeln und sporulieren, sondern auch auf abgestreiften Exuvien. Zur Bonitur 7 T.n.A.I. wurden im Schalenversuch Häutungreste mit Mycelwachstum festgestellt. Die Wirtstiere starben zu einem späteren Zeitpunkt ab und verpilzten ebenfalls.

Die großflächige Verteilung des Pilzmaterials im Pflanzenbestand wurde sowohl in den Schalen- als auch den Käfigversuchen nachgewiesen. Auf den Versuchsblättern war der EPP ober- und auch unterseits über die koloniebildenden Einheiten nachzuweisen. Im Käfigversuch trat der EPP sogar auf dem Blatt ohne Inokulatauflage auf.

In den Versuchen zur Verbreitung mittels Wasser und Luft war die Dissemination des EPP nur durch Wasser zu erreichen. Koloniebildende Einheiten des Pilzes fanden sich in großer Zahl sowohl auf dem Pflanzenblatt (Mittelwert = 307 Sp./Blatt) als auch in dem abtropfenden Wasser (Mittelwert = 3389 Sp./ml). Durch Luftbewegung ließen sich keine Sporen des Pilzes verbreiten.

Schlussfolgerungen:

Anlehnend an die Arbeiten von TANADA (1964) und ANDREADIS (1987) zu den allgemeinen Verbreitungswegen entomopathogener Pilze wurden für die untersuchte Wirt-Parsit-Beziehung folgende Disseminationsstrategien ermittelt:

1. Dissemination des EPP durch das Verhalten und die Bewegung der Hauptwirte:
 - a) innerhalb der Population:

Die Verbreitung innerhalb der Population erfolgte über die Bewegung der Wirte, wobei die hohe Mobilität der Wirtstiere die Verteilung des EPP begünstigt (GARDNER et al. 1984; KAAKEH 1996). Die horizontale Verbreitung konnte innerhalb und – unter optimalen Umweltbedingungen – auch zwischen den Generationen ermittelt werden, wobei das Pathogen auch transstadial über mehrere Entwicklungsstadien der Ontogenese im Wirt verblieb und erst im Nymphen- bzw. Adultenstadium zum Tod führte.

b) Kontamination des Lebensraumes

Die Verbreitung des infektiösen Materials erfolgte differenziert:

- über die Sporulation des Pilzes auf den Wirtskadavern,
- über die Sporulation des Pilzes auf abgestreiften, kontaminierten Exuvien,
- Verlust dem Integument anhaftender Sporen bei der Bewegung der Wirte

2. Dissemination durch physikalische Mittel:

Die positiven Ergebnisse zur Verteilung des EPP mittels Wasser bestätigen diesen Verbreitungsweg, der bereits von HALL (1976) beschrieben wurde. Die Verbreitung durch Luftbewegung wird möglicherweise durch die schleimige Hülle um die Sporenköpfchen (extrazelluläre Matrix) inhibiert (HALL, ATKEY 1982).

Literatur:

- ANDREADIS, T. G. (1987): Transmission. Pp. 159 - 176. In J. R. FUXA and Y. TANADA. Epizootiology of Insect Diseases. Wiley, New York
- GARDNER, W. A.; OETTING, R. D.; STOREY, G. K. (1984): Scheduling of *Verticillium lecanii* and benomyl applications to maintain aphid (Homoptera: Aphidae) control in chrysanthemums in greenhouses. *Journal of Economic Entomology* **77** (2), S. 514 – 518
- HALL, R. A.; ATKEY, P. T. (1982): Infection of aphids by *Verticillium lecanii*. Annual Report 1980, Glasshouse Crops Research Institute, S. 119
- HALL, R. A. (1976): *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology* **28** (3), S. 389 – 391
- HETSCH, N. (2004): Untersuchungen zur Virulenzstabilität von *Verticillium lecanii* (ZIMM.) Viégas (Hyphomycetales, Moniliaceae) unter verschiedenen Umweltbedingungen am Beispiel von *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera, Thripidae). Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, FG Phytomedizin
- KAAKEH, W.; REID, B. L.; BENNETT, G. W. (1996): Horizontal Transmission of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and HYDRAMETHYLNON AMONG German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Entomological Science* **31** (4), S. 378 – 390
- LERCHE, S.; MEYER, U.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. (2004): Dissemination of the Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii* (ZIMM.) VIÉGAS (Hyphomycetales: Moniliaceae) in Populations of *Frankliniella occidentalis* (PERGANDE 1895) (Thysanoptera: Thripidae). *Comm. Appl. Sci. Ghent University* **69** (3), S. 195 – 200
- LERCHE, S.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. (2005): Evaluations of the dissemination of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (ZIMMERMANN) Viegas in populations of *Frankliniella occidentalis* (PERGANDE, 1895). *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* **35** (1), S. 22 – 23
- TANADA, Y. (1964) Epizootiology of Insect Diseases. In: DEBACH, P. *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. Reinhold, New York, S. 548 – 567