



Doctoral Thesis

Grundlagen zur Autoökologie und Artspezifität des Pilzes *Beauveria brongniartii* (SACC.) PETCH als Pathogen des Maikäfers (*Melolontha melolontha* L.)

Author(s):

Aregger-Zavadil, Eva

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000643444> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**GRUNDLAGEN ZUR AUTÖKOLOGIE UND
ARTSPEZIFITÄT DES PILZES
BEAUVERIA BRONGNIARTII (SACC.) PETCH
ALS PATHOGEN
DES MAIKÄFERS (*MELOLONTHA MELOLONTHA* L.)**

ABHANDLUNG
Zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
EVA AREGGER-ZAVADIL
dipl. Natw. ETH
geboren am 21. 1. 1960
von Domat/Ems (Kt. Graubünden), Oberkirch (Kt. Luzern)

Angenommen auf Antrag von :
Prof. Dr. V. Delucchi, Referent
Dr. W. Baltensweiler, Korreferent
Prof. Dr. T. Leisinger, Korreferent

Zürich 1992

SUMMARY

MASS PRODUCTION

Liquid cultures of *Beauveria brongniartii* (SACC.) PETCH yield a concentration of 10^8 to 10^9 blastospores / ml already within 2-3 days, whereas in surface-cultures sporulation of conidia starts after 7 days of incubation only. For the mass production of conidia a culture method on autoclaved grains of barley has been developed. The grains, water and oil were filled in polyamid bags, autoclaved, inoculated with blastospore suspension and incubated. To ensure a homogeneous development of the fungus the following conditions were essential : (a) a mixture of barley, water, oil and inoculum in optimal proportions, (b) sufficient air supply, (c) absolutely sterile medium, (d) temperature of 20°-23°C and (e) maintenance of the enormous surface of the medium. This formulation allowed to apply the fungus together with its medium so that the mycelium continued to sporulate in the soil until all nutrient reserves of the grains were utilized. Two attempts of mass production differing in the length of incubation and consequently in the conidia concentration and nutrient reserves of the barley at the time of application were carried out : Production A with 3×10^6 conidia / g barley after 14 days of incubation and Production B with 1×10^8 to 2×10^9 conidia / g after 24-42 days.

During storage at 2°C for 24 months the fungus, developing on the still humid samples of grains, continued to reduce the nutrient reserves. The number of viable conidia decreased due to germination and natural loss of viability. This led to a prolonged latent period and a considerably reduced efficacy of the formulation in bioassays against white grubs (*Melolontha melolontha* L.). Grains after a short incubation period and overgrown with sporulating mycelium (Production A) lost their quality more slowly than long incubated grains, covered with conidia (Production B). A parallel trial with 70% and 80% of initial water addition showed that the loss of quality during storage can significantly be diminished by lowering the water content of the medium.

AUTOECOLOGY

Development and the effect of temperature, humidity, UV(C)-radiation and soil on it were studied using five strains of *B. brongniartii* and one strain of *B. bassiana* (BALS.) VUILL.

Depending on the strain and age, conidia germinated within 24-48 h after a swelling period of ≥ 8 h whereas blastospores germinated without delay within 12 h. The first conidiophores appeared independently of the age and kind of the inoculum (blastospores or conidia) after 84-96 h. After 10-14 days the sporulation was terminated. Conidia

from 1-2 week old cultures germinated the fastest. However, 1 week old cultures of slowly developing strains contained often still unripe conidia. The concentration of viable conidia decreased within 16 weeks by as little as 3% or as much as 96% and after 24 weeks, 4 of the 6 strains contained no viable conidia anymore. *B. bassiana* differed in a faster conidia germination, but not in the loss of viability.

Development of *B. brongniartii* occurred at temperatures between 2°-33°C, with an optimum at 22°-25°C ; for *B. bassiana* the range was 3°-35°C with the optimum at 25°C. At optimal temperatures all spores germinated rather simultaneously, at lower and higher temperatures the spores differed in the speed of germination as well as in survival. Temperatures > 27°C became lethal for both kinds of spores of *B. brongniartii* ; for *B. bassiana* this threshold was at $\geq 33^\circ\text{C}$. At 35°C the LT_{50} for blastospores and conidia of both *Beauveria* species was 1-2 days only. As *B. brongniartii* germinated, grew and reappeared on the cadaver's surface even at 2°C, it may be assumed that in the field the mycosis develops also during the cold months of the year.

In agreement with several authors intermediate humidities rh around 75%, were the most lethal for both *Beauveria* species. The concentration of viable spores decreased after exposure for 21 days at 64% rh by a factor of 10^2 to 10^5 , but remained nearly constant at 90-100% rh. Blastospores responded more sensibly to the different humidities than conidia. Germination, growth and sporulation occurred only at 90-100% rh.

UV(C)-radiation caused a fast decrease of viability. The viability of blastospores decreased continuously, that of conidia after > 1 min of exposure. The surviving spores showed a reduced speed of germination. The viability of both kinds of *B. brongniartii* spores decreased after 5 min of irradiation below 10% and after 10 min to 0%. Spores of *B. bassiana* were by 10-20% more persistent. After 30 min of irradiation only a few spores germinated along the border of the petri dish, where they probably were protected from the UV(C)-radiation.

In the soil the development of *B. brongniartii* was influenced by the water content. The fungus is able to grow at a water content of 10% ; however, for sporulation at least 20% were necessary. Germination, saprophytic growth and sporulation occurred only on sterile soil samples. In unsterile conditions the fungus developed only on appropriate media such as infected white grubs or mycelium-overgrown grains. The quantity of spores produced depended on the larval instar and amounted to $(6.4 \pm 3.9) \times 10^9$ conidia / larva or 5×10^8 conidia per grain. In sterile-filtrated and native soil extracts no germination occurred. Anaerobic conditions seemed to have a conserving effect, because in unagitated extracts the viability of the sedimented conidia decreased more slowly than in samples continuously agitated and therefore homogeneously aerated.

ENVIRONMENTAL COMPATIBILITY

Among species of Scarabaeidae only white grubs of *Phyllopertha horticola* L. could be infected. With this exception the host specificity of *B. brongniartii* to *M. melolontha* was confirmed. Susceptibility varied between host populations and development stages. In conidia contaminated soil, in which all white grubs of *M. melolontha* were infected within 4 weeks, *Lumbricus terrestris* L. survived without any sign of disturbance. Contaminated food was as quickly and without any consequence consumed as the uncontaminated food. Because *B. brongniartii* conidia could be reisolated from soil contaminated with faeces, it is probable that earthworms operate as vectors of the spores in the soil.

The survival of the spores on the plant surface was studied, in connexion with the treatments of forest edges with *B. brongniartii* against cockchafers in 1988. The concentration of viable blastospores and conidia decreased from 10^8 to 10^2 / m² and 10^9 to 10^4 / m² respectively. Rain and sunshine caused a greater and faster loss of viability. Because of the high mortality due to mycosis in the control, the duration of the incubation period in cockchafers could not be determined. Considering the fast decrease of viable spores / m² in the field and the necessarily high concentration of spores for an efficient infection rate, the danger of secondary effects seems to be very low.

COMPARISON OF STRAINS AND ISOLATES

The main differences between the two *Beauveria* species consisted in the shape of conidia, the growth characteristics on artificial media, the pigment formation, the speed of germination, the rate of development at different temperatures, the susceptibility to UV(C)-radiation and host specificity. Strains and reisolates of *B. brongniartii* differed in the speed of germination, sporulation, persistence, development at < 10°C, susceptibility to temperatures > 27°C and UV(C)-irradiation as well as in pathogenicity. Blastospores were generally more susceptible to environmental conditions than conidia, but they were more persistent than expected. Within the same culture the spores differed in their persistence and, at low temperatures, in the speed of germination. Two reisolates of the same parental strain produced two different types of spores : (a) pathogenic, a red pigment secreting spores and (b) weakly pathogenic spores that did not change the colour of the medium.

ZUSAMMENFASSUNG

MASSENPRODUKTION

Für eine Massenproduktion von *Beauveria brongniartii* (SACC.) PETCH können in Flüssigkultur 10^8 bis 10^9 Blastosporen / ml innert 2 bis 3 Tage produziert werden. In Oberflächenkulturen dagegen setzt die Freisetzung von Konidien erst nach ca. 7 Tagen ein. Für die Massenproduktion von Konidien wurde eine Zuchtmethode auf autoklavierten Gerstenkörnern erarbeitet. Die Körner wurden zusammen mit Wasser und Öl in Polyamidsäcke abgefüllt, autoklaviert, mit Blastosporensuspension beimpft und inkubiert. Für eine gleichmässige Entwicklung waren folgende Bedingungen wesentlich : (a) optimale Mengenkombination von Gerste, Wasser, Öl und Inokulum, (b) ausreichender Gasaustausch durch Anbringen von luftdurchlässigen Sackverschlüssen, (c) absolut steriles Medium, (d) Temperatur von 20°-23°C und (e) Erhaltung der grossen Mediumoberfläche. Neu an diesem Verfahren ist, dass der Pilz zusammen mit dem Nährmedium appliziert wird und deshalb im Boden bis zum vollständigen Verbrauch der in den Gerstenkörnern vorhandenen Nährstoffe weitersporulieren kann. Insgesamt wurden 2 Massenproduktionen durchgeführt, die sich aufgrund verschiedener langer Inkubationsdauer in der Konidienkonzentration und folglich auch in den noch verfügbaren Nährstoffreserven der Gerste unterschieden : Produktion A enthielt nach 14 Tagen 3×10^6 Konidien / g eingewogener Gerste und Produktion B nach 24 bis 42 Tagen 1×10^8 bis 2×10^9 Konidien / g.

Während der 24-monatigen Lagerung bei 2°C setzte der Pilz seine Entwicklung auf den immer noch feuchten Körnerproben fort und reduzierte damit die Nährstoffreserven weiter. Gleichzeitig nahm die Konzentration von keimfähigen Konidien infolge von Keimung und natürlichem Verlust der Keimfähigkeit kontinuierlich ab. Dies hatte zur Folge, dass in Biotests mit Engerlingen von *Melolontha melolontha* L. die Latenzzeit mit der Lagerungsdauer immer länger und die pathogene Wirksamkeit der Formulierung immer schwächer wurde. Kurz inkubierte, mit sporulierendem Myzel bewachsene Körner (Produktion A) büssten jedoch ihre Qualität während der Lagerung langsamer ein als lang inkubierte, mit Konidien bedeckte Körner (Produktion B). Die Lagerfähigkeit kann aber verbessert werden, indem der Wassergehalt des Mediums gesenkt wird. Dies trat im Parallelversuch mit Körnerproben, die mit einer anfänglichen Wasserzugabe von 80% und 70% produziert wurden, deutlich zutage.

AUTÖKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Anhand von bis zu 5 *B. brongniartii*-Stämmen und einem Stamm von *B. bassiana* (BALS.) VUILL. wurden der Entwicklungsverlauf, sowie der Einfluss von Temperatur, Feuchtigkeit, UV(C)-Strahlen und des Bodens untersucht.

Konidien keimten je nach Stamm und Alter nach einer ≥ 8 -stündigen Quellungsphase innert 24-48 h aus, Blastosporen hingegen direkt und deshalb bereits innerhalb von 12 h. Nach 84-96 h erschienen im Luftmyzel die ersten Konidiophoren, unabhängig davon, ob das Inokulum aus Blastosporen oder Konidien unterschiedlichen Alters bestand. Am 6. Tag lösten sich die ersten reifen Konidien von den köpfchen- oder bäumchenförmigen Sporulationsherden ab. Nach 10-14 Tagen war die Sporulation beendet. Konidien aus 1-2 Wochen alten Kulturen keimten am raschesten aus, wobei die 1 Woche alten Kulturen bei langsamen Stämmen auch unreife, noch nicht keimfähige Sporen enthielten. Die Keimfähigkeit sank innert 16 Wochen um 3% bis 96% und nach 24 Wochen fiel sie bei 4 von 6 Stämmen auf 0% hinunter. *B. bassiana* zeichnete sich durch rascheste Konidienkeimung aus, unterschied sich jedoch nicht in der Abnahme der Keimfähigkeit.

Der Temperaturbereich für die Entwicklung von *B. brongniartii* lag bei 2°-33°C, mit einem Optimum bei 22°-25°C, für *B. bassiana* hingegen bei 3°-35°C und einem Optimum bei 25°C. Während im optimalen Temperaturbereich alle Sporen fast gleichzeitig auskeimten, zeigten sich unter- und oberhalb dieses Bereiches Unterschiede in der Keimungsgeschwindigkeit resp. Persistenz. Temperaturen $> 27^\circ\text{C}$ wirken auf beide Sporenformen von *B. brongniartii* letal, auf jene von *B. bassiana* erst solche $\geq 33^\circ\text{C}$. Bei 35°C betrug die LT_{50} für Blastosporen und Konidien bei beiden *Beauveria*-Arten nur 1-2 Tage. Da *B. brongniartii* noch bei 2°C keimen, wachsen und sogar an die Kadaveroberfläche dringen konnte, ist anzunehmen, dass im Feld die Krankheit auch während der kühlen Monate fortschreitet.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren wirkte auch in unseren Versuchen der mittlere Feuchtigkeitsbereich um 75% rLF auf beide *Beauveria*-Arten am letalsten. Nach 21 Tagen bei 64% rLF war die Konzentration von keimfähigen Sporen um das 10^2 - bis 10^5 -fache gesunken, bei 90-100% rLF hingegen fast unverändert geblieben. Blastosporen reagierten nur geringfügig empfindlicher auf die verschiedenen Feuchtigkeiten als Konidien. Keimung, Wachstum und Sporulation erfolgten nur bei 90-100% rLF.

Auf UV(C)-Exposition reagierten die Sporen mit einem raschen Verlust der Keimfähigkeit. Diese nahm bei Blastosporen mit der Bestrahlungsdauer kontinuierlich ab, hingegen bei Konidien erst nach einer Bestrahlung von > 1 min. Bei den noch keimfähigen Sporen war eine Verlangsamung der Keimungsgeschwindigkeit festzustellen. Die Keimfähigkeit sank bei beiden Sporenformen von *B. brongniartii* nach einer 5 minütigen Exposition unter 10% und nach 10 min auf 0%. Sporen von *B. bassiana* waren deutlich persistenter, nämlich um 10-20%. Nach 30 min Bestrahlung keimten bei beiden *Beauveria*-Arten vereinzelt Konidien nur noch entlang des Petrischalenrandes aus, weil die Sporen dort vor der Strahlung vermutlich geschützt waren.

In Bodenproben wurde die Entwicklung von *B. brongniartii* durch die Bodenfeuchtigkeit beeinflusst. So konnte der Pilz zwar bei einem Wassergehalt von 10% wachsen, aber erst bei einem Wassergehalt von 20% sporulieren. Keimung, saprophytisches Wachstum und Bildung von Sporulationsherden fanden jedoch nur auf sterilisierten Bodenproben statt. Unter nicht sterilen Bedingungen blieb die Entwicklung auf das Nährmedium (infizierte Engerlinge, myzelbewachsene Gerstenkörner) beschränkt. Die Konidienproduktion betrug je nach Larvenstadium $(6.4 \pm 3.9) \times 10^9$ Konidien pro Engerling resp. 5×10^8 Konidien / Korn. In sterilfiltrierten und nativen Bodenextrakten fand hingegen keine Konidienkeimung statt. Anaerobe Verhältnisse schienen zudem einen konservierenden Effekt zu haben, denn in ruhenden Proben verloren die sedimentierten Konidien ihre Keimfähigkeit langsamer als in gleichmässig belüfteten Extrakten.

UMWELTVERTRÄGLICHKEIT

Die Wirtsspezifität von *B. brongniartii* für *M. melonantha* konnte weitgehend bestätigt werden. Zwischen den Populationen und Entwicklungsstadien von *M. melonantha* waren aber Unterschiede in der Empfindlichkeit festzustellen. Unter den 5 getesteten verwandten Käferarten verpilzten nur Engerlinge von *Phyllopertha horticola* L., *Lumbricus terrestris* L. überlebte in mit Konidien infizierten Erdproben, in welchen alle Maikäferengerlinge innert 4 Wochen verpilzten, völlig unbehelligt. Infiziertes Futter wurde ebenso schnell und ohne jegliche Folgen konsumiert wie nicht infiziertes. Da diese mit der Fäces ausgeschiedenen Konidien anschliessend in den Erdproben nachgewiesen wurden, kann man annehmen, dass Regenwürmer bei ihrer Bodenaktivität für die Pilzsporen als Vektoren wirken.

Im Zusammenhang mit den Waldrandbehandlungen mit *B. brongniartii* gegen Maikäfer im 1988 wurde das Überleben der Sporen auf der Pflanzenoberfläche untersucht. Die Konzentration von keimfähigen Blastosporen sank innert 4 Wochen kontinuierlich von 10^8 auf 10^2 Sporen / m², jene der Konidien von 10^9 auf 10^4 / m², wobei starke Regenfälle und intensiver Sonnenschein jeweils eine stärkere Abnahme bewirkten. Leider konnte im Biotest die Zeitspanne, während der sich die Maikäfer an der kontaminierten Pflanzenoberfläche infizieren können, wegen der hohen Verpilzung in der Kontrolle nicht bestimmt werden. In Anbetracht der rasch sinkenden Dichte von keimfähigen Sporen / m² und der stark von der Dosis abhängigen Wirksamkeit der frischen Blastosporenbrühe im Biotest wird die Umweltgefährdung jedoch als gering eingestuft.

VERGLEICH DER STÄMME UND ISOLATE

Die Hauptunterschiede zwischen den beiden *Beauveria*-Arten bestanden in der Konidienform, Morphologie der Kulturen, Mediumverfärbung, Keimungsgeschwindigkeit, Temperaturverhalten, Empfindlichkeit auf UV(C)-Strahlen und Wirtsspezifität. Bei

B. brongniartii unterschieden sich die Stämme und Rückisolate in der Entwicklungsgeschwindigkeit vor allem bei Temperaturen $< 10^{\circ}\text{C}$, Sporulation, Empfindlichkeit auf Temperaturen $> 27^{\circ}\text{C}$ und UV(C)-Strahlen, sowie in der Pathogenität. Blastosporen reagierten im allgemeinen empfindlicher auf Umwelteinflüsse als Konidien, erwiesen sich jedoch um einiges persistenter als erwartet. Innerhalb derselben Kultur unterschieden sich die Sporen in der Persistenz und bei tiefen Temperaturen in der Keimungsgeschwindigkeit. Zwei Rückisolate vom gleichen Mutterstamm bildeten innerhalb derselben Kultur sowohl rotverfärbende, pathogene Sporen als auch nicht verfärbende, schwach pathogene Sporen.