



Doctoral Thesis

Photorhabdus luminescens als Symbiont insektenpathogener Nematoden

Author(s):

Grunder, Jürg M.

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001754150> →

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](#).

DISS. ETH Nr. 11952

PHOTORHABDUS LUMINESCENS
ALS SYMBIONT INSEKTENPATHOGENER
NEMATODEN

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

JÜRIG M.GRUNDER

Dipl. Ing. Agr. ETH

geboren am 5. Februar 1958,

von Rüti bei Lyssach, Bern

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Th. Leisinger, Referent

Prof. Dr. P. Lüthy, 1. Korreferent

Dr. R.-U. Ehlers, 2. Korreferent

Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland

1997

ZUSAMMENFASSUNG

Insektenpathogene Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* werden in der biologischen Bekämpfung von pflanzenschädlichen Insektenlarven eingesetzt. Das im Boden freilebende Stadium der Nematoden sucht mittels chemischer und physikalischer Gradienten die Insektenwirte auf, dringt bis in die Hämolymphe der Insekten ein und setzt Zellen der symbiotischen Bakterien *Photorhabdus luminescens* aus dem Intestinaltrakt des Nematoden frei. Die Vermehrung dieser Bakterien tötet das Wirtsinsekt und bietet den Nematoden die Voraussetzung für die Bildung einer neuen Generation von Nematodenlarven. Diese verlässt nach Abschluss des Vermehrungszyklus den Insektenkadaver, um im umliegenden Boden nach weiteren Wirtsinsekten zu suchen.

Bei Entwicklungsarbeiten zur Massenvermehrung von Nematoden (*Heterorhabditis* sp. CH-HW79) an der FA-Wädenswil zeigte sich die grosse Bedeutung des bakteriellen Mikrosymbionten, *Photorhabdus luminescens* (Stamm PW79). Unter *in vitro* Bedingungen trat sporadisch die Formvariante SW79 auf. Diese führte zur Störung der Symbiose und hatte eine negative Wirkung auf die Nematodenentwicklung und -vermehrung. Die Untersuchung der Funktionen des natürlichen Mikrosymbionten und seiner Formvariante und deren Einfluss auf die Symbiose mit den Nematoden war das zentrale Thema dieser Arbeit.

Die molekulargenetische Analyse einer spezifischen Domäne des 16S ribosomalen RNA-Genes stellt den Bakterienstamm CH-PW79 in die NW-europäische Gruppe der Art *Photorhabdus luminescens*. Der natürliche Mikrosymbiont *P. luminescens* PW79 und seine Formvariante SW79 wurden mit bakteriologischen und biochemischen Methoden charakterisiert. Zur Differenzierung der beiden Bakterienformen konnten die Pigmentierung, die antibiotische Wirkung gegenüber verschiedenen Indikatorbakterien, das Wachstumsverhalten bei 25°C, das Vorkommen von kristallinen Einschlüssen, die Biolumineszenz sowie Unterschiede in biochemischen Reaktionen herangezogen werden. Durch Längenmessungen konnten die Zellen von *P. luminescens* PW79 und seiner Formvariante SW79 als Population statistisch gesichert unterschieden werden, jedoch war es nicht möglich, individuelle Zellen mittels morphologischer Messungen einer der beiden Formen zuzuordnen. Bei intralymphaler Injektion von Bakterienzellen in Insektenlarven wurden keine Unterschiede in der pathogenen Wirkung zwischen *P. luminescens* PW79 und der Formvariante SW79 festgestellt. In allen getesteten Medien verursachten die Bakterienformen eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7.5 bis 8.5. Im Zusammenhang mit der Nematodenvermehrung konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss der Formvariante der pH-Wert stärker anstieg, was im Zuchtmedium eine massive Reduktion der Ausbeute und anschliessende Lagerfähigkeit der Nematoden zur Folge hatte.

Aus *in vitro* Kulturen von *P. luminescens* konnte die Formvariante selten isoliert werden. *In vivo* liess sich die Formvariante unter Laborbedingungen erst nach 40 - 50 Tagen in

Insektenlarven nachweisen, zu einem Zeitpunkt, zu dem die Nematoden den Insektenkadaver schon längst wieder verlassen hatten.

Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Längs- und Querschnitten durch den Intestinaltrakt des Nematoden konnten durchschnittlich 2700 Bakterienzellen pro Nematode gezählt werden. Eine Lagerdauer von 450 Tagen bei 5-6°C hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der Bakterien.

Nematoden, welche direkt nach der Vermehrung in Befallsversuchen eingesetzt wurden, erreichten eine 95 - 100%-ige Mortalität bei Insektenlarven. Die Überprüfung der Pathogenität ergab, dass Nematoden nach Lagerzeiten von 360 Tagen bei 5-6°C im Zuchtmedium respektive nach 140 Tagen bei 15°C in Erds substrat noch 7 bzw. 4 % der Insektenlarven töten können.

Versuche zur molekulargenetischen Unterscheidung des Genomes von *P. luminescens* PW79 und der Formvariante SW79 mit 207 verschiedenen Randomprimern zeigten keine Unterschiede. Die Verwendung von Antiseren gegen PW79 und gegen SW79 gestattete erstmals eine Identifizierung der Bakterien im Nematodenkörper. Die Isolation der Bakterien aus dem Intestinaltrakt der Nematoden über eine Periode von 140 Tagen führte ausschliesslich zu Kulturen von *P. luminescens* PW79.

Für die Ausbeute an Nematoden bei der Vermehrung auf festem Zuchtmedium war eine 5-tägige Vorinkubationsperiode mit *P. luminescens* PW79 optimal. Keimfreie Zuchtmedien wurden durch Bestrahlung erhalten. Damit konnte im axenischen Medium gezeigt werden, dass bakterienfreie, inokulierte Nematodeneier, weder in der Kombination mit toten Zellen von *P. luminescens* noch mit toten Zellen der Formvariante sich entwickeln konnten. In allen Versuchen mit Inkubation des Mediums durch Zellen der Formvariante SW79 wurde die Nematodenvermehrung blockiert. Die inokulierten Nematoden starben innert kurzer Zeit.

Die ursprüngliche Arbeitshypothese, welche die stabile Formvariante SW79 als Dauerform im Intestinaltrakt des Nematoden annahm, konnte widerlegt werden. Die Formvariante SW79 hat unter *in vivo* Bedingungen keinen direkten Einfluss auf den Lebenszyklus des Nematoden.

Die Gesamtheit der Resultate ermöglichte es, den Lebenszyklus von Nematoden und den symbiotischen Bakterien darzustellen. Eindeutig konnte gezeigt werden, dass die Formvariante in der Symbiose des natürlichen Zyklus von Bakterien und Nematoden keine direkte Bedeutung hat. Eine unerwünschte Rolle kann die Formvariante in der kommerziellen Massenvermehrung von Bakterien und Nematoden spielen. Die Formvariante kann die Symbiose mit den Nematoden nicht unterstützen. Eine neue Hypothese zur Rolle der Formvariante wurde diskutiert.

Aufgrund der erhaltenen Resultate wurden Massnahmen vorgeschlagen, wie der monoxenische Status von *P. luminescens* PW79 zu erhalten und optimale Verhältnisse für die Nematodenvermehrung zu schaffen sind. Damit können Produktionsverluste verhindert, und eine erfolgreiche kommerzielle Massenvermehrung von Nematoden auf festem Medium gewährleistet werden.

ABSTRACT

Investigation on the bacterium *Photorhabdus luminescens* as symbiont of insect pathogenic nematodes

Entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* are used for the biological control of pest insects in their larval stage. During their free-living period in soil, the nematode locates the hosts by physical and chemical means and enters the insect-hemolymph where it releases the symbiotic bacterium *Photorhabdus luminescens*. The multiplication of the bacteria within the insect forms the nutritional basis for the development of a new generation of nematodes, which subsequently leave the insect body to attack other hosts in the surrounding soil.

During the *in vitro* multiplication of *P. luminescens* PW79 a secondary form SW79 occurs spontaneously. It interferes with the symbiosis and inhibits the development and multiplication of the nematode. The investigation of the biology of both forms of bacteria and their symbiosis with nematodes was the main objective of this thesis.

P. luminescens PW79 has been proved to belong to the North-west European group of the species *Photorhabdus luminescens*. The natural symbiont *P. luminescens* PW79 and its secondary form SW79 were characterised using bacteriological methods. To distinguish the two forms of the bacteria, studies of pigmentation, antibiotic effect against different bacterial indicators, the growth rate at 25°C, the occurrence of inclusion bodies, bioluminescence as well as biochemical tests of enzymatic activities and the carbohydrate metabolism were made. The intralymphal injection of both forms of bacteria into insect larvae showed no difference in their pathogenic character. Both bacteria, *P. luminescens* PW79 and its secondary form SW79 caused an increase of the pH value in all culture media tested. The final pH value was even higher when nematodes and the secondary form SW79 were cultured together. This led to reduced reproduction levels and to a decrease in shelf life of the nematodes. Using *in vivo* methods, the secondary form SW79 could be isolated only under laboratory conditions after 40 - 50 days, at which time the nematodes had already left the insect cadaver.

Attempts to differentiate the genome of *P. luminescens* PW79 and its secondary form SW79 using PCR-methods, showed identical DNA-patterns for both forms of bacteria.

The use of antiserum against *P. luminescens* and its secondary form allowed for the first time to identify the bacteria within the nematode. The original hypothesis, that the secondary form is identically to the "dauerform" in the intestinal tract of the nematode, was refuted.

Using electron microscopy to analyse length and cross sections through the intestinal tract of the nematode, the number of bacteria per nematode was approximately 2700.

Testing the pathogenicity of nematodes freshly isolated, showed an infection rate of 95 to 100% among the insects. When the nematodes were kept for 140 days in soil at 15°C the mortality of the insect larvae decreased to 4 %. Nematodes held on culture media during 360 days at 5°C to

6°C were able to kill 7% of the insect larvae. The bacteria isolated from the intestinal tract of nematodes at regular intervals up to 360 days were identified as *P. luminescens* PW79.

To study the influence of bacteria isolates on the symbiosis and development of the nematodes, bacteria free eggs were cultured *in vitro*, either in the presence of *P. luminescens* PW79 or its secondary form SW79. Using gamma-irradiation, the effect of living or killed bacteria on the nematode development was studied. Egg development and nematode growth in artificial media on which bacteria were pre-cultured for five days was demonstrated to be optimal. It was demonstrated that nematode eggs developed only when living cells of *P. luminescens* PW79 were present in the culture media. The nematodes were not able to develop in presence of the secondary form SW79. This was also true, if killed bacteria of both forms were used.

The results of the studies allowed the demonstration of the life cycle of nematodes and their symbiotic bacteria. Under natural and laboratory conditions, the secondary form SW79 could not be found as symbiotic bacteria in the intestine of the nematode. Furthermore the secondary form SW79 proved to be lethal when used in *in vitro* cultures. It can be concluded that the secondary form SW79 is not symbiotic and plays no role in the nematode's life cycle.

Based on these results, recommendations were made how to maintain a pure culture of *P. luminescens* PW79 and to guarantee optimal conditions for the reproduction of the nematodes. By preventing losses of whole batches, the base of commercial mass production of nematodes on solid medium could be markedly improved.