

Diss. ETH No. 13869

**Cultivation, sporulation and phylogenetic analysis of
Neozygites parvispora and *Entomophthora thripidum*,
two fungal pathogens of thrips**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Florian Matthias FREIMOSER
Dipl. Natw. ETH Zurich
Born March 10th, 1973
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Aebi, examiner
Prof. Dr. Jørgen Eilenberg, coexaminer
Dr. Urs Tuor, coexaminer

2000

Summary

This thesis describes studies with the two fungi *Neozygites parvispora* and *Entomophthora thripidum* that are both pathogenic to *Thrips tabaci* (onion or potato thrips; Thysanoptera). *N. parvispora* has been isolated previously for the first time in this laboratory and the accomplishment of the *in vitro* cultivation of *E. thripidum* is one of the results of this work.

To investigate the evolutionary relationship of Neozygitaceae within the Entomophthorales the small subunit ribosomal DNA (ssu rDNA) sequences of several species were determined and analyzed phylogenetically. For this analysis the sequences of microsporidia were included because these important intracellular parasites of insects and other animals have been related to Entomophthorales recently. This study confirmed at the molecular level the monophyletic origin of Neozygitaceae and their belonging to the Entomophthorales as well as the fungal origin of microsporidia. Most interestingly it was revealed that microsporidia originated from within the Entomophthorales and formed a sister group to Neozygitaceae. It was therefore concluded that microsporidia have their origin within the phylum of the Zygomycota, belong to the Entomophthorales and are most closely related to Neozygitaceae. This represented the first localization of the origin of microsporidia within the fungal kingdom.

The main body of this PhD thesis consisted of the isolation of a growth factor from hemolymph that is essential for growth of *N. parvispora* under laboratory conditions. For this reason the MTT assay was first developed for the rapid colorimetric determination of fungal cell densities in small culture volumes. Fractionation of hemolymph revealed the presence of a HMW (high molecular weight) and a LMW (low molecular weight) fraction that both had growth promoting activity. Since the HMW activity could be replaced by adding FBS (fetal bovine serum) we focused on the purification of the LMW activity, which was specific for hemolymph and could not be replaced. The LMW growth promoting activity resisted heating to 100°C and digestion with peptidases, had a molecular weight between 100 and 500 Da and was inactivated by acid treatment. Further purification was performed on Sephadex and Dowex resins, but did not result in sufficient material for the structural identification of possible growth factors. This study was concluded with the assertion that much more hemolymph would be required for the successful purification of growth promoting substances.

The second fungal species studied during this PhD was *E. thripidum*. We isolated this fungus for the first time from infected but still living thrips in a

complex liquid medium. *E. thripidum* is noteworthy for its vegetative growth in the form of protoplasts that could be continuously cultured in Grace's insect cell culture medium or in GLEN medium that were both supplemented with FBS. The protoplasts aggregated *in vitro* thus forming dense pellets. If these protoplast pellets were kept in the same culture medium for 10 to 20 days they underwent a differentiation process that led to cell wall formation, hyphal growth and mycelium. This switch from protoplasts to mycelium was a prerequisite for the production of infectious spores, which took place after the transfer onto water agar. These spores were infectious to the original host and the fungus could be reisolated from such infected thrips. A more detailed investigation of the differentiation process revealed that *E. thripidum* produced and secreted a factor that autoinduced the formation of mycelium. The differentiation to mycelium was inhibited by nitrogen. Furthermore it was found that instead of mycelium some isolates formed huge spherical cells that led to structures similar to resting spores. In analogy to the induction of mycelium resting spores were autoinduced.

Zusammenfassung

Während dieser Doktorarbeit habe ich die zwei Pilze *Neozygites parvispora* und *Entomophthora thripidum* studiert, welche beide natürliche Pathogene von *Thrips tabaci* (Kartoffel- oder Zwiebelthrips; Fransenflügler; Thysanoptera) sind. Beide Pilze wurden in unserem Labor zum ersten Mal isoliert und kultiviert. Das Erreichen der *in vitro* Kultivierung von *E. thripidum* ist eines der Resultate dieser Arbeit.

Um die phylogenetische Beziehung von *Neozygites* zu den übrigen Entomophthorales zu untersuchen wurden SSU rDNA (DNS der kleinen Ribosomen-Untereinheit) Sequenzen von mehreren Arten bestimmt und phylogenetisch analysiert. In diese Analyse wurden auch Sequenzen von Mikrosporidien eingeschlossen, da diese bedeutenden intrazellulär lebenden Parasiten von Insekten und anderen Tieren vor kurzem mit Entomophthorales in Verbindung gebracht wurden. Dabei wurden der monophyletische Ursprung der Neozygitaceae und deren Zugehörigkeit zu den Entomophthorales wie auch die Zugehörigkeit der Mikrosporidien zum Reich der Pilze auf molekularer Ebene bestätigt. Interessanterweise hatten die Mikrosporidien ihren Ursprung innerhalb der Entomophthorales und bildeten eine Tochtergruppe zu den Neozygitaceae. Daraus wurde geschlossen, dass der Ursprung der Mikrosporidien innerhalb des Phylums Zygomycota liegt, dass Mikrosporidien zu den Entomophthorales gehören und innerhalb dieser am nächsten verwandt zu den Neozygitaceae sind. Dies stellte die erste Lokalisierung des Ursprungs von Mikrosporidien innerhalb des Reiches der Pilze dar.

Die Hauptarbeit dieser Doktorarbeit bestand in der Isolation von Wachstumsfaktoren aus Hämolymphe, welche für die Kultivierung von *N. parvispora* unerlässlich ist. Hierfür wurde zuerst der MTT-Test entwickelt, der die schnelle kolorimetrische Bestimmung der Zelldichte in kleinen Kulturvolumina ermöglicht. Die Insektenhämolymphe wurde in eine hochmolekulare und eine niedermolekulare wachstumsfördernde Fraktion aufgetrennt. Da die hochmolekulare Aktivität mit FBS (fötales Rinderserum) ersetzt werden konnte, haben wir uns auf die Reinigung der niedermolekularen Wachstumsaktivität konzentriert. Diese Fraktion war spezifisch für Insektenhämolymphe und konnte nicht ersetzt werden. Es wurde gefunden, dass die niedermolekulare Aktivität resistent gegenüber Erhitzen auf 100°C und Abbau durch Peptidasen war, dass das Molekulargewicht zwischen 100 und 500 Da lag, und dass diese Aktivität nach Säurebehandlung nicht mehr vorhanden war. Bei der weiteren Auftrennung auf Sephadex und Dowex Säulenmaterialien konnte nicht genügend Material zurückgewonnen werden,

um mögliche Wachstumsfaktoren strukturell zu identifizieren. Diese Studie schliesst mit der Aussage, dass wesentlich grössere Mengen Insektenhämolymph nötig sind, um die wachstumsfördernden Substanzen erfolgreich isolieren zu können.

Der zweite Pilz, welcher während diesem Doktorat studiert wurde, ist *E. thripidum*. Wir haben diesen Pilz von infizierten, aber noch lebenden Thripsen in einem komplexen Flüssigmedium isoliert. *E. thripidum* ist wegen des vegetativen Wachstums in der Form von langgestreckten Protoplasten bemerkenswert. Diese Protoplasten konnten in Grace's Insektenzellkulturmedium oder in GLEN Medium nach der Zugabe von FBS kontinuierlich gezüchtet werden. *In vitro* aggregierten die einzelnen Protoplastenzellen und bildeten dichte Zellhaufen. Wenn diese Protoplastenhaufen während 10 bis 20 Tagen im selben Medium belassen wurden durchlief der Pilz einen Differentiationsprozess, der zu Zellwandbildung, Hyphenwachstum und Myzelbildung führte. Dieser Wechsel vom Protoplasten- in das Myzel-Stadium war Voraussetzung für die Ausbildung von infektiösen Sporen, welche nach dem Transfer des Myzels auf Wasseragar gebildet wurden. Die *in vitro* produzierten Sporen konnten benutzt werden, um das ursprüngliche Wirtsinsekt zu infizieren. Daraufhin konnte der Pilz wieder aus diesen künstlich infizierten Thripsen isoliert werden. Detaillierte Studien zum Differenzierungsprozess zeigten, dass *E. thripidum* einen Faktor produzierte und sekretierte, der die Myzelbildung induzierte. Diese Differenzierung wurde durch die Anwesenheit von Stickstoffquellen verhindert. Es wurde des weiteren gefunden, dass manche Isolate von *E. thripidum* anstelle von Myzel grosse runde Zellen bildeten. Diese Kugeln entwickelten sich schliesslich zu Strukturen, die den Dauersporen der Entomophthorales sehr ähnlich sahen. Analog zur Myzelbildung war auch diese Dauersporenbildung selbstinduziert.