

Synergistische Wirkung von Rickettsien und entomopathogenen Nematoden bei Larven des Waldmaikäfers (*Melolontha hippocastani*)

Martin Berner & Wolfgang Schnetter

Scheffold-Gymnasium Schwäbisch Gmünd

Abstract: Synergistic interaction of rickettsia and entomopathogenic nematodes in larvae of the cockchafer (*Melolontha hippocastani*)

The work presented here investigates the efficiency of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* against larvae of the cockchafer (*Melolontha hippocastani*) which were infected with rickettsia. This rickettsia causes the so called "Lorscher illness" of the white grubs.

The results show that a pre-infection of the white grubs with rickettsia increases the efficiency of the nematodes about a factor of 3-6. The reproduction-rate of the nematodes in these white grubs was decreased about 50%. Nematodes which have reproduced in rickettsia-infected white grubs were less effective suggesting a decreased fitness and quality of them. We suppose a strong competition about the fat body of the white grub and a disturbed interaction of the nematodes and its symbiotic bacteria as the reason for this result. Those nematode dauerlarvae which were released from rickettsia-infected grubs were able to transport the rickettsia into the body of a health white grub but not to cause a real rickettsia infection of the grub because the efficiency and the development of the symbiotic bacteria of the nematodes are much faster.

In summary we found a synergistic effect of both pathogens with regard to the efficiency and an antagonistic effect with regard to the reproduction and development of them.

Key words: entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Melolontha*, biological control, rickettsia

Martin Berner, Wolfgang Schnetter, Scheffold-Gymnasium, Scheffoldstr. 102, D-73529 Schwäbisch Gmünd, E-mail: MartinBerner@web.de (vormals Zoologisches Institut der Uni Heidelberg)

Am Zoologischen Institut der Uni Heidelberg wurde bereits seit einigen Jahren an der Entwicklung einer biologischen Bekämpfungsstrategie gegen Maikäfer gearbeitet. Neben einem *Bacillus thuringiensis*-Stamm, der bei einigen Maikäfer-Verwandten wirksam ist (WAGNER & SCHNETTER 2001), wurde vor allem mit entomopathogenen Nematoden der Gattungen *Steinernema* und *Heterorhabditis* geforscht (BERNER & SCHNETTER 2001). Die Anfälligkeit der Larven sowohl des Feld- als auch des Waldmaikäfers gegenüber diesen Nematoden ist jedoch im Vergleich zu anderen Scarabaeiden, wie dem Gartenlaubkäfer (*Phyllopertha horticola*), relativ gering (SULISTYANTO & EHLERS 1996), so dass auch die bisher durchgeführten Freilandversuche wenig Erfolg brachten (BERNER & SCHNETTER 2002). Neben der Suche nach möglichst infektiösen Nematodenarten und -stämmen ist für den Erfolg einer Nematodenapplikation im Freiland eine vorausgehende Systemanalyse des Standortes von entscheidender Bedeutung. Hierbei sind neben abiotischen Faktoren wie der Witterung und den Bodenverhältnissen auch biotische Faktoren wie dem Vorkommen von Pathogenen in der Engerling-Population zu erfassen. Insbesondere eine Vorinfektion der Engerling-Population kann einen falschen Wirkungsgrad der Nematoden vortäuschen, da unter diesen Bedingungen antagonistische oder synergistische Wechselwirkungen zwischen den latenten Pathogenen und den applizierten Nematoden zu erwarten sind.

Ausgangspunkt der hier vorgestellten Arbeit war eine Engerling-Population des Waldmaikäfers (*Melolontha hippocastani*), die 1999 in der Nähe von Lorsch gefunden wurde und einen hohen Prozentsatz an Engerlingen aufwies, der mit Rickettsien (*Rickettsiella popilliae*) infiziert war. Aufgrund der hohen Dichte und der ausgeprägten Symptome der als „Lorscher Seuche“ bei Engerlingen bekannten Rickettsien-Infektion konnte die Krankheit bereits im Feld diagnostiziert werden (vgl. NIKLAS 1960).

Mit den Untersuchungen sollte folgenden Fragen nachgegangen werden: (1) Sind die mit Rickettsien infizierten Engerlinge anfälliger gegenüber dem entomopathogenen Nematoden *Heterorhabditis bacteriophora*? (2) Ist die Vermehrung der Nematoden in den kranken Engerlingen beeinträchtigt? (3) Ist die Infektivität der Nematoden, die sich in den kranken Engerlingen vermehrt hatten, beeinträchtigt? (4) Lassen sich Rickettsien durch die Nematoden übertragen/verbreiten?

Material und Methoden

Die mit Rickettsien befallene Engerling-Population des Waldmaikäfers (*Melolontha hippocastani*) wurde 1999 in einem Wald in der Nähe von Lorsch gefunden. Der Anteil Engerlinge mit deutlich erkennbaren Symptomen der Lorsch Krankheit lag beim L2-Larvenstadium bei etwa 38% und beim L3-Larvenstadium bei etwa 33%. Für Vergleichsuntersuchungen wurden L3-Larven des Feldmaikäfers (*M. melolontha*) aus einer gesunden Population in der Nähe von Bruchsal verwendet.

Bei den Nematoden handelte es sich um einen kommerziell in Flüssigkultur produzierten Hybridstamm (HYB) der Art *Heterorhabditis bacteriophora*. Die Nematoden wurden von e-nema (Raisdorf) bezogen.

Um zu prüfen, ob die im fortgeschritteneren Stadium erkrankten Larven anfälliger gegenüber Nematoden sind und ob sich die Nematoden in diesen Tieren vermehren können, wurden die Larven sorgfältig in „gesunde“ (= ohne sichtbare Symptome der Lorsch Krankheit) und „kranke“ (= deutlich sichtbare Symptome) getrennt. Die Wirksamkeit des Nematoden *H. bacteriophora* bei externer Applikation wurde in standardisierten Biotests geprüft. Hierbei wurden die Engerlinge einzeln in Zuchtgefäßen mit 25 ml schluffigem Sand (sterilisierte Walderde, 10% Feuchtigkeit) gehalten.

Das Vermehrungspotential der Nematoden in gesunden und kranken Engerlingen wurde ermittelt, in dem die mit Nematoden infizierten Engerlinge in eine White-Falle gelegt wurden (vgl. WOODRING & KAYA 1988). Die aus dem Kadaver auswandernden Nematoden-Dauerlarven wurden acht Tage nach Beginn des Auswanderns ausgezählt und auf das durchschnittliche Lebendgewicht der Engerlinge bezogen.

Um zu prüfen, ob die Nematoden, die sich in kranken Engerlingen (= mit Rickettsien infiziert) vermehrt hatten, beim Befall eines neuen Engerlings Rickettsien übertragen und eine Rickettsien-Infektion auslösen können, wurden diese Nematoden-Dauerlarven in einem neuen Biotest mit gesunden Engerlingen des Feldmaikäfers eingesetzt. Zur Kontrolle wurde einem Teil der gesunden Engerlinge ein Homogenat dieser Nematoden-Dauerlarven (Dauerlarven wurden zuvor oberflächensterilisiert) oder ein Homogenat eines kranken Engerlings verfüttert. Der Befall mit Rickettsien wurde anhand von Krankheitssymptomen der Engerlinge und durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Hämolymphe überprüft.

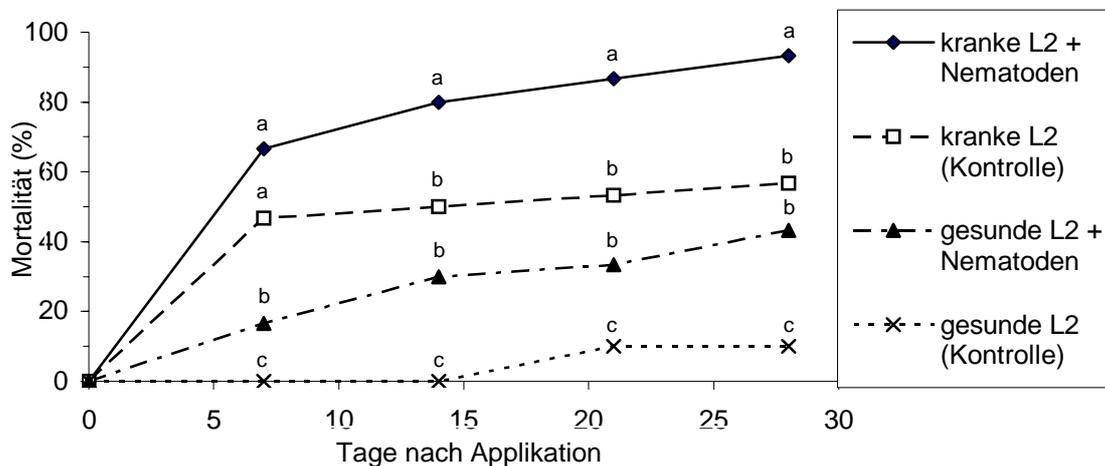


Abb. 1: Einfluss einer Vorinfektion durch Rickettsien auf die Mortalität von *M. hippocastani*-Larven (L2) nach externer Applikation von 1000 Nematoden von *H. bacteriophora* (HYB). Gewicht der *M. hippocastani*-Larven (L2): $0,412 \pm 0,021$ g. Die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichneten Werte innerhalb eines Zeitpunkts unterscheiden sich signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse konnten belegen, dass die Rickettsien-Infektion von *M. hippocastani*-Larven (L2 und L3) deren Anfälligkeit für eine Infektion durch *H. bacteriophora* im Vergleich zu gesunden Larven um den Faktor 3-6 erhöht (Abb. 1 und 2. A). KOPPENHÖFER & KAYA (1997) berichten von synergistischen Wirkungen bei gleichzeitiger oder zeitlich aufeinander folgender Applikation von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui und den Nematoden *H. bacteriophora* oder *S. glaseri* bei Larven von *Cyclocephala hirta* und *C. pasadenae* (Scarabaeidae). Die höchste Anfälligkeit der Larven gegenüber diesen Nematoden wurde erreicht, wenn die Bakterien mindestens sieben Tage vor den Nematoden appliziert wurden. Eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen durch den Pilz *Beauveria brongniartii* konnten FERRON et al. (1969) bei *M. melolontha*-Larven, die mit *Paenibacillus popilliae* (alter Name: *Bacillus popilliae*) infiziert waren, feststellen. THURSTON et al. (1993) stellten eine 5-10fach erhöhte Anfälligkeit gegenüber *H. bacteriophora* bei Larven von *Cyclocephala hirta* (Scarabaeidae) fest, die mit *P. popilliae* infiziert waren. Diese Beispiele und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen damit die Hypothese von STEINHAUS (1958), nach der gestresste (kranke) Insekten anfälliger für (weitere) Infektionen sind.

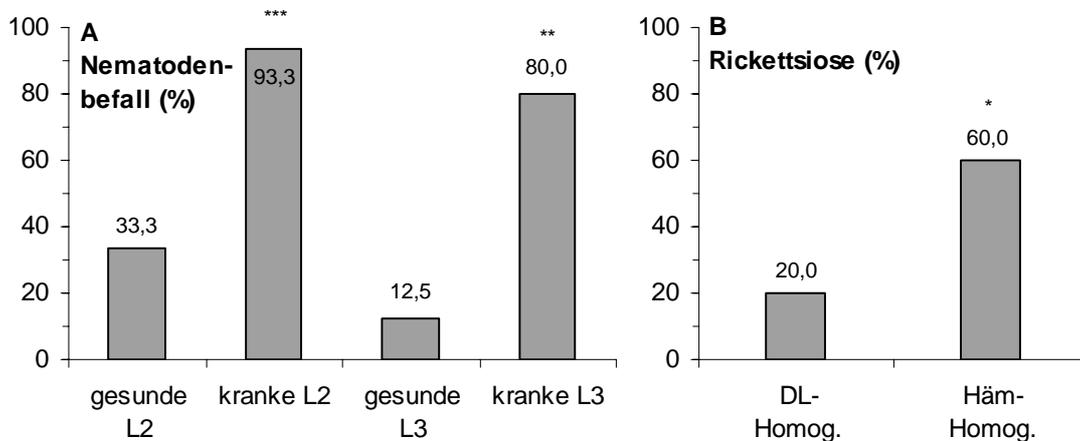


Abb. 2: **A.** Vergleich der Mortalität von mit Rickettsien befallenen (= „kranke L2/L3“) und gesunden *M. hippocastani*-Larven (L2 und L3) bei externer Applikation von 1000 Nematoden von *H. bacteriophora* (HYB) nach 35 Tagen (Vergleich der Mortalitäten bei den L2 mit dem Chi-Quadrat-Test und bei den L3 mit dem Exakten Test nach Fisher).

B. Prozentsatz von *M. melolontha*-Larven (L3) mit Symptomen der Lorscher Krankheit 70 Tage nach Verfütterung eines Homogenats von Dauerlarven (DL-Homog.), die aus kranken Larven (*M.h.*-L2) gewonnen wurden, oder nach Verfütterung eines Homogenats einer kranken *M.h.*-L2-Larve (Häm-Homog.; Exakter Test nach Fisher). Nach externer Applikation von Nematoden aus kranken Engerlingen konnten in keinem Fall Symptome der Lorscher Krankheit festgestellt werden. Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,954 \pm 0,067$ g. Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant voneinander (* = $\alpha < 0,1$; ** = $\alpha < 0,05$; *** = $\alpha < 0,01$). DL = Nematoden-Dauerlarven.

In den mit Rickettsien infizierten Larven konnte eine deutliche Reduzierung der Reproduktionsrate von *H. bacteriophora* nachgewiesen werden (Abb. 3. B). Im Gegensatz zu diesem Befund konnten THURSTON et al. (1993) zeigen, dass zwischen der Reproduktionsrate der Nematoden in mit dem Bakterium *P. popilliae* infizierten und gesunden Larven kein Unterschied bestand. Diese Unterschiede lassen daher auf eine stärker ausgeprägte Konkurrenz, z.B. bei der Ressourcen-Nutzung innerhalb der Larve, zwischen dem *H. bacteriophora* Nematoden-Bakterien-Komplex und den Rickettsien als zwischen dem Nematoden-Bakterien-Komplex und *P. popilliae* schließen. Bei Engerlingen die während der zahlreichen Biotests durch den Pilz *Beauveria brongniartii* infiziert wurden, konnte niemals eine Vermehrung von Nematoden beobachtet werden. BARBERCHECK & KAYA (1990) berichten ähnliches bei Co-Infektionen mit dem Pilz *Beauveria bassiana* und dem Nematoden *S. feltiae*.

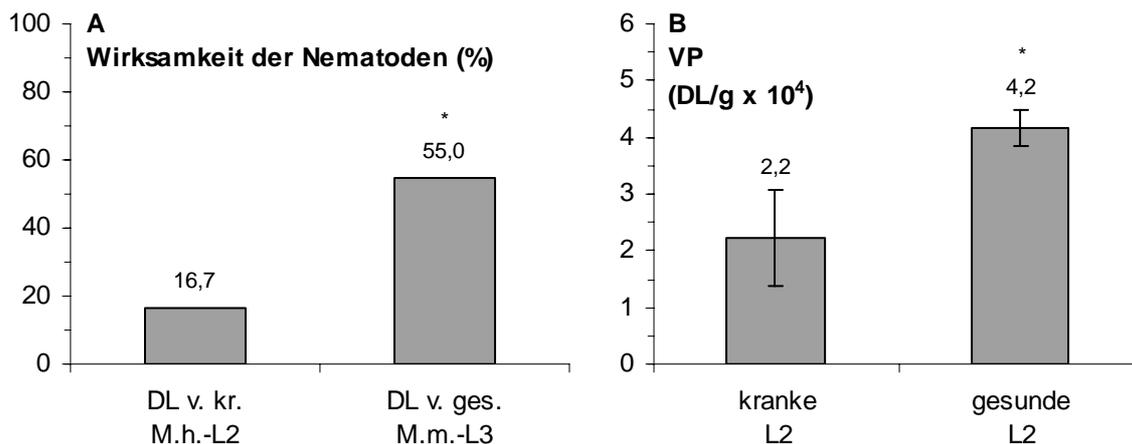


Abb. 3: **A.** Vergleich der Wirksamkeit gegen gesunde *M. melolontha*-L3-Larven nach externer Applikation von 1000 Nematoden, die aus kranken *M.h.*-L2-Larven (= DL v. kr. M.h.-L2) oder aus gesunden *M.m.*-L3-Larven (DL v. ges. M.m.-L3) gewonnen wurden (Chi-Quadrat-Test). Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,953 \pm 0,117$ g.
B. Mittleres Vermehrungspotential (VP) von *H. bacteriophora* in kranken und gesunden *M. hippocastani*-Larven (L2) (*t*-Test). Gewicht der *M.h.*-Larven (L2): $0,412 \pm 0,021$ g. Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant voneinander ($\alpha < 0,05$). DL = Nematoden-Dauerlarven.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Nematoden, die sich in mit Rickettsien befallenen *Melolontha*-Larven vermehrt hatten, eine deutlich verminderte Wirksamkeit im Biotest hatten als Nematoden aus gesunden Larven (Abb. 3. A). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Rickettsien die symbiotischen Interaktionen zwischen Nematode und Bakterium beeinträchtigt sind, z.B. resultierend in weniger eingelagerten symbiotischen Bakterien pro Dauerlarve. Die intensive Nutzung des Fett-Eiweiß-Körpers der Insektenlarve durch die Rickettsien (KRIEG, 1971) könnte ein Grund für die verminderte Vermehrung von *H. bacteriophora* in kranken Larven sein. Für ihre Entwicklung benötigen die Nematoden bestimmte Fettsäuren in ausreichender Menge; die Menge an eingelagerten Fetten ist daher ein wichtiges und relativ einfach (z.B. visuell) zu bestimmendes Kriterium für die Fitness und damit für die Qualität einer Dauerlarve PATEL et al. (1997) schlagen die visuelle Ermittlung des Lipidgehalts der Dauerlarven nach einer Anfärbung mit „Oil Red O“ als Kriterium für deren Infektivität vor. Die verminderte Wirksamkeit der Nematoden, die sich in kranken Larven vermehrt hatten, könnte daher auf einem verminderten Fettdepot der Dauerlarven beruhen. Denkbar sind neben den quantitativen auch qualitative Veränderungen der zur Verfügung stehenden Fettsäuren in den von Rickettsien befallenen Larven (vgl. HATAB et al. 1998).

Nach Verfütterung homogenisierter Dauerlarven, die aus einem kranken Engerling stammten und nach Verfütterung eines homogenisierten kranken Engerlings an gesunde Engerlinge konnten nach 70 Tagen in 20 bzw. 60% der Fälle typische Symptome der Lorsch Krankheit festgestellt werden (Abb. 2. B). Im Gegensatz hierzu konnte bei externer Applikation der Nematoden aus kranken Larven keine Rickettsien-Infektion ausgelöst werden. Die Rickettsien waren nur in geringer Konzentration in der Hämolymphe der durch die Nematoden befallenen Larven nachzuweisen. Dieses Ergebnis lässt sich durch die extrem langsame Pathogenese der Rickettsien erklären. Die „mitgeschleppten“ Rickettsien werden in den Nematoden-befallenen Larven wahrscheinlich durch die sich schnell vermehrenden symbiotischen Bakterien des Nematoden überwachsen und in ihrer eigenen Vermehrung unterdrückt, da der Nematoden-Bakterien-Komplex eine vergleichsweise schnelle Pathogenese hat.

Über den Aufenthaltsort der Rickettsien innerhalb einer Dauerlarve (in welchen Geweben sind sie angesiedelt?) und die direkten Auswirkungen der Rickettsien auf die Nematoden (findet eine Vermehrung der Rickettsien im Nematoden statt?) können keine Aussagen gemacht werden. Da ein Zusammentreffen von Rickettsien und entomopathogenen Nematoden unter natürlichen Bedingungen durchaus möglich ist, wäre

die weitere Untersuchung dieser Aspekte interessant und könnte insbesondere Fragen im Zusammenhang mit der Ausbreitungsbiologie der Rickettsien klären.

Literatur

- BARBERCHECK, M.E. & KAYA, H.K. (1990): Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. – J. Invertebr. Pathol. 55: 225-234.
- BERNER, M. & SCHNETTER, W. (2001): Wirksamkeit entomopathogener Nematoden gegen Engerlinge der Maikäfer (*Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*). – Mitt. Dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 13: 165-167.
- BERNER, M. & SCHNETTER, W. (2002): Field trials with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* against white grubs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the southern part of Germany. – IOBC wprs Bulletin 25 (7): 29-34.
- FERRON, P., HURPIN, B. & ROBERT, P.H. (1969): Sensibilisation des larves de *Melolontha melolontha* L. a la mycose a *Beauveria tenella* par une infection prealable. – Entomophaga 14 (4): 429-437.
- HATAB, M.A., GAUGLER, R. & EHLERS, R.-U. (1998): Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. – J. Parasitol. 84 (2): 215-221.
- KOPPENHÖFER, A.M. & KAYA, H.K. (1997): Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. – Biological Control 8: 131-137.
- KRIEG, A. (1971): Possible use of rickettsia for microbial control of insects. – In: Microbial Control of Insects and Mites (Burgess, H.D., Hussey, N.W., eds.). Academic Press, London: 173-179.
- NIKLAS, O.F. (1960): Standorteinflüsse und natürliche Feinde als Begrenzungsfaktoren von *Melolontha*-Larvenpopulationen eines Waldgebietes (Forstamt Lorsch, Hessen) (Coleoptera: Scarabaeidae). – Mitt. Biolog. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 101: 1-60.
- PATEL, M.N., STOLINSKI, M. & WRIGHT, D.J. (1997): Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. – Parasitology 114: 489-496.
- STEINHAUS, E.A. (1958): Stress as a factor in insect disease. – Proc. XIInt. Congr. Entomol. 4: 725-730.
- SULISTYANTO, D. & EHLERS, R.-U. (1996): Efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the control of grubs (*Phyllopertha horticola* and *Aphodius contaminatus*) in golf course turf. – Biocontrol and Science 6: 247-250.
- THURSTON, G.S., KAYA, H.K., BURLANDO, T.M. & HARRISON, R.E. (1993): Milky disease bacterium as a stressor to increase susceptibility of scarabaeid larvae to an entomopathogenic nematode. – J. Invertebr. Pathol. 61: 167-172.
- WAGNER, W. & SCHNETTER, W. (2001): Proteasen im Darmsaft des Feldmaikäfers (*Melolontha melolontha*) und Abbau des Cry8C-Toxins von *Bacillus thuringiensis* Stamm Buibui. – Mitt. Dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 13: 169-172.
- WOODRING, J.L. & KAYA, H.K. (1988): Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Techniques. – Arkansas Agric. Exp. Stn. South. Coop. Bull. 331.

