

# **Stabilisation of desiccation and heat tolerance through selective breeding and creation of inbred lines and attempts to design bioassays for genetic improvement of the chemotactic response of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora***

Samuel Ashebir Anbesse, MSc  
Ehlers

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R.-U.

Entomopathogene Nematoden (EPN) der Gattung *Heterorhabditis* werden als effektives biologisches Pflanzenschutzmittel gegen zahlreiche Schadinsekten eingesetzt. Wiederholtes Vermehren dieser Nematoden für experimentelle Zwecke im Labor oder für kommerzielle Zwecke in industriellen Anlagen können allerdings zum Verlust von nützlichen Eigenschaften führen. Austrocknungs- und Hitzetoleranz sind wichtige Eigenschaften von EPN. Die Haltbarkeit von Nematoden basierten Produkten ist limitiert auf wenige Wochen wenn sie bei niedrigen Temperaturen gelagert werden. Eine andere Möglichkeit den Metabolismus der Nematoden zu reduzieren besteht in einer moderaten Austrocknung. Eine erhöhte Austrocknungstoleranz würde eine Lagerung bei geringem Wassergehalt ermöglichen und so die Haltbarkeit verlängern. Kurzeitige Erwärmung (>35°C) der Nematoden, zum Beispiel beim Transport, kann die Qualität der Nematoden reduzieren. Deshalb wurde die Austrocknungs- und Hitzetoleranz von *H. bacteriophora* durch genetische Selektion und Kreuzung verbessert. Allerdings ging der Züchtungserfolg schnell verloren wenn die Nematoden in Insekten subkultiviert wurden. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt die Austrocknungs- und Hitzetoleranz in *H. bacteriophora* zu stabilisieren und überprüft inwieweit so der erreichte Züchtungserfolg erhalten werden kann. Die Nematoden wurden in *in vitro* Flüssigkulturen vermehrt und dabei gleichzeitig bei Austrocknung und Hitze selektiert. Die Entwicklung der Toleranz wurde verglichen mit Nematodenchargen, die *in vitro* und *in vivo* ohne Selektionsdruck vermehrt wurden. Die Flüssigkultur resultiert in der Entwicklung von weitestgehend homozygoten Inzuchtlinien. Ob diese Linien von Inzuchtdepressionen betroffen waren wurde ebenso untersucht wie der Effekt der anschließenden Kreuzung der Inzuchtlinien während der Vermehrung in Insekten. Um zu überprüfen ob die Selektion auf Austrocknungs- und Hitzetoleranz zu ‚trade-off‘ Effekten in anderen nützlichen Eigenschaften führt, wurde die Virulenz der verschiedenen Hybrid- und Inzuchtlinien kontrolliert. Um die Chemotaxis auf flüchtige Substanzen zu verbessern, die mit der Wirtsfindung im Zusammenhang stehen wurden verschiedene Methoden getestet.

Selektion bei Austrocknungs- oder Hitzestress vor der Vermehrung *in vivo* und *in vitro* führte in beiden Fällen zu einer erhöhten Toleranz. Wurde der Selektionsdruck aufgehoben, dann ging die erzielte Toleranz während der *in vivo* Vermehrung wieder verloren, während die Toleranz auf hohem Level erhalten blieb wenn die Nematoden in Flüssigkultur vermehrt wurden. Der Transfer von homozygoten Inzuchtlinien von *H. bacteriophora* aus der Flüssigkultur in die *in vivo* Bedingungen im Insekt ermöglichen die getrenntgeschlechtliche Vermehrung, was zu einer erhöhten Austrocknungstoleranz der heterozygoten Nachkommen im Vergleich zu den homozygoten Inzuchtlinien führt. Dies deutet darauf hin, dass Heterosis eine weitere Möglichkeit darstellt diese Eigenschaft weiter zu verbessern. Im Gegensatz dazu war die Hitzetoleranz des heterozygoten Nachwuchses geringer als die der homozygoten Population, was auf einen negativen Heterosiseffekt deuten könnte oder aber einen erneuten Verlust der Toleranz bei *in vivo* Vermehrung ohne Selektionsdruck.

Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Virulenz konnten für kontinuierlich *in vitro* vermehrte Nematoden im Vergleich zum kommerziellen Stamm gefunden werden, während die *in vivo* vermehrten Nematoden weniger virulent waren. Berichte, dass (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen, eine flüchtige Substanz, die von Maispflanzen abgegeben wird, wenn diese von den Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers *Diabrotica virgifera virgifera* attackiert

werden, *H. bacteriophora* zu den Pflanzenwurzeln und so zu dem Schädling lockt, konnte nicht bestätigt werden. Die Versuche hatten zum Ziel die Substanz in geeigneten Testverfahren für die genetische Selektion auf verbesserte Wirtsfindung des Nematoden zu nutzen. Weder *H. bacteriophora* noch *H. megidis* wurden jedoch durch synthetisches Caryophyllen in vier verschiedenen Testverfahren mit Sand oder Agar angelockt.